



**HAL**  
open science

# ROLE D'ENDOCAN DANS LA CROISSANCE TUMORALE ET EFFETS DES ANTICORPS ANTI-ENDOCAN SUR LE DEVELOPPEMENT TUMORAL

Bogdan Dragos Grigoriu

► **To cite this version:**

Bogdan Dragos Grigoriu. ROLE D'ENDOCAN DANS LA CROISSANCE TUMORALE ET EFFETS DES ANTICORPS ANTI-ENDOCAN SUR LE DEVELOPPEMENT TUMORAL. Biologie cellulaire. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2006. Français. NNT: . tel-00407521

**HAL Id: tel-00407521**

**<https://theses.hal.science/tel-00407521>**

Submitted on 25 Jul 2009

**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**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**

**Discipline : PNEUMOLOGIE**

Présentée et soutenue publiquement par

**Bogdan-Dragos GRIGORIU**

Le 10 Novembre 2006

Titre :

# **ROLE D'ENDOCAN DANS LA CROISSANCE TUMORALE ET EFFETS DES ANTICORPS ANTI-ENDOCAN SUR LE DEVELOPPEMENT TUMORAL**

Devant le Jury composé de :

**Professeur Etienne LEMARIE**

INSERM U618 – IFR 135  
Service de Pneumologie,  
CHU Bretonneau, TOURS

**Rapporteur**

**Professeur Jean-Paul SCULIER**

Service d'Oncologie Thoracique et Soins Intensifs  
Institut Jules Bordet, BRUXELLES

**Rapporteur**

**Professeur Anne JANIN**

INSERM U728, IUH-IFR105,  
Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques,  
Hôpital St. Louis, PARIS

**Professeur Eugen CARASIEVICI**

Service d'Immunologie  
Universitatea de Medicină și Farmacie « Gr. T. Popa », IAȘI

**Professeur Jean-Jacques LAFFITE**

Service de Pneumologie et Oncologie Thoracique  
CHRU Lille, LILLE

**Professeur Traian MIHAESCU**

Service de Pneumologie  
Universitatea de Medicină și Farmacie « Gr. T. Popa », IAȘI

**Co-directeur de Thèse**

**Docteur Philippe LASSALLE**

INSERM U774, Institut Pasteur de Lille, LILLE

**Co-directeur de Thèse**

Je remercie vivement les membres de ce jury :

- Monsieur le Professeur Etienne Lemarié
- Monsieur le Professeur Jean Paul Sculier
- Madame le Professeur Anne Janin
- Monsieur le Professeur Eugen Carasievici
- Monsieur le Professeur Jean Jacques Lafitte

qui ont accepté la tâche d'évaluer ce travail. Soyez assurés de mes sincères remerciements et de ma plus profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur André Bernard TONNEL, depuis mon arrivée dans votre laboratoire vous avez suivi avec beaucoup d'intérêt mes travaux. Votre énergie et vos encouragements m'ont transmis votre passion et votre dévotion à la médecine et la recherche. Je vous en serai toujours reconnaissant.

A Monsieur le Docteur Lassalle, je vous remercie de m'avoir accepté dans votre équipe de recherche et de m'avoir encadré pendant ces quatre (courtes) années. Vous m'avez confié ce travail et vous avez su m'encourager pour le mener à bien. Vous avez dirigé mes efforts avec rigueur et patience.

A Monsieur le Professeur Charles Hugo Marquette, vous m'avez accueilli pour la première fois à Lille, vous m'avez transmis votre enthousiasme pour la médecine expérimentale. Vos idées et votre énergie débordante m'ont toujours encouragé à trouver une solution à tout écueil.

A Monsieur le Professeur Traian Mihaescu, vous avez su m'encourager pour continuer ma formation médicale et scientifique et m'avez appris le travail et la patience.

A Monsieur le Professeur Vasile Astarastoe, vous m'avez encouragé à continuer sur le chemin long et épineux de la formation scientifique. Vous m'avez transmis vos valeurs morales et éthiques et m'avez constamment aidé à dépasser les obstacles administratifs qui ont parsemé mon parcours.

A Madame le Professeur Anne Janin, je vous remercie de m'avoir permis de bénéficier de vos compétences, de m'avoir soutenu et stimulé à toujours évoluer.

A Monsieur le Docteur François Brivet, vous m'avez accueilli dans votre service, vous m'avez enseigné l'amour et la dévotion pour la médecine et vous m'avez encouragé à continuer sur la voie rude de la recherche médicale. Je vous remercie pour votre confiance, vos critiques et l'excellente formation reçue à votre contact.

A Monsieur le Professeur Jean Jacques Lafitte, sans votre dynamisme et votre aide, une grande partie de ce travail n'aurait surement pas vu le jour.

Au Docteur Arnaud Scherpereel, sans ta confiance et ton aide une partie importante de ce travail n'aurait pas abouti. J'ai apprécié ta disponibilité, ta gentillesse et tes conseils pertinents. J'espère que notre amitié et notre travail commun ne s'arrêtera pas après cette thèse.

Au Docteur Thibaud Gentina qui a commencé ce travail, je te remercie pour ta disponibilité et ton aide pour les expériences animales.

A Florence Depontieu, notre collaboration a contribué à une partie de ces résultats. Je tiens à te remercier pour ton aide et ta disponibilité.

A mes collègues du groupe « endocan », Nathalie de Freitas Caires et Benjamin Legendre et à Marise Delehede je vous remercie pour tous les moments passés à défaire le nœud gordien de la recherche.

A Philippe Gosset, Anne Tsicopoulos, Catherine Duez, vous m'avez aidé à me former à et par la recherche. Je vous remercie pour vos conseils et le regard critique mais constructif porté sur mon travail.

A Christophe Leboeuf, je te remercie d'avoir tant investi dans nos projets communs. Ton travail acharné, ton humour, ta bonne humeur permanente et ton optimisme ont permis de faire aboutir ce travail

Au Docteur Frederic Jacobs, je te remercie pour tout ce que j'ai appris à ton contact. Ta dévotion pour la médecine et ton esprit critique ont été pour moi des repères solides.

A Philippe Marquillies, Gwenola Kerwoaze, Geneviève Marchandise, Han Vorng et Philippe Hauw, je vous remercie pour votre aide et je n'oublie pas que c'est vous qui m'avez formé au travail de laboratoire.

A Joël Pestel, Catherine Fourneau, Eva Vilain, Michèle Masurelle, Emilie Lefèvre, Edith Evrard, Patricia de Nadaï, Muriel Pichavant, Pierre Pochard, Céline Ratajczak, Laëtitia Breuilh, Solenne Taront, Latiffa Amniai, Coliné Plé, Cécile Chenivresse, Cecilia Estrella, Jules Gilet, Juliette Chabrol, Julie Giordano, Audrey Dieudonné, je vous remercie pour votre amitié et votre soutien.

A mon épouse et mes enfants qui m'ont aidé sans relâche pendant toutes ces années, avec tout mon amour.

# SOMMAIRE

<b>Résumé .....</b>	<b>3</b>
<b><u>PREMIERE PARTIE: REVUE DE LA LITERATURE</u></b>	
<b>I. Introduction .....</b>	<b>4</b>
<b>II. Biologie de la cellule tumorale.....</b>	<b>7</b>
II.1 Caractéristiques communes des cellules tumorales .....	8
II.2 Le microenvironnement tumoral.....	9
II.2.1 Composition de l'environnement tumoral.....	14
II.2.1.1 Les fibroblastes tumoraux .....	14
II.2.1.2 La matrice extracellulaire.....	15
II.2.1.2.1 Les protéoglycanes.....	17
II.2.1.3 Interaction de la matrice avec les cellules tumorales .....	24
II.2.1.4 Composante inflammatoire de l'environnement tumoral.....	25
II.2.1.4.1 Les macrophages associés aux tumeurs .....	26
II.2.1.4.2 Rôle des neutrophiles infiltrant la tumeur .....	28
II.2.1.4.3 Les lymphocytes intra-tumoraux.....	29
<b>III. Angiogénèse tumorale .....</b>	<b>32</b>
III.1 Les FGF.....	34
III.2 Le VEGF .....	34
III.3 Les récepteurs du VEGF .....	35
III.4 Les angiopoïétines.....	36
III.5 Autres facteurs angiogéniques .....	36
III.6 Le mimétisme vasculaire.....	37
<b>IV. Marqueurs endotheliaux tumoraux.....</b>	<b>39</b>

IV.1 Stratégies thérapeutiques ciblant la cellule endothéliale.....	40
IV.2 Identité de l'endothélium tumoral .....	40
<b>V. Endocan molécule endothéliale .....</b>	<b>43</b>
V.1 Structure .....	43
V.1.1 Le gène et l'ADNc .....	43
V.1.2 Structure protéique .....	45
V.2 Expression de l'ARNm et régulation de l'expression .....	46
V.3 Expression protéique .....	49
V.4 Fonctions d'endocan .....	49
<b>VI. Le mésothéliome pleural.....</b>	<b>51</b>
VI.1 Introduction .....	51
VI.2 Diagnostic du mésothéliome pleural malin .....	52
VI.2.1 Marqueurs diagnostiques du MPM .....	53
VI.2.1.1 L'ACE .....	53
VI.2.1.2 Le Cyfra 21-1 .....	53
VI.2.1.3 Le TPA .....	53
VI.2.1.4 L'acide hyaluronique.....	54
VI.2.1.5 La mésothéline .....	54
VI.2.1.5.1 Le megakaryocyte potentiation factor.....	56
VI.2.1.5.2 Les peptides solubles dérivés de la mésothéline (SMRP).....	56
VI.2.1.6 L'ostéopontine.....	57
 <b><u>DEUXIEME PARTIE: Travaux de Recherche</u></b>	
<b>Introduction .....</b>	<b>61</b>
<b>Article I .....</b>	<b>65</b>
<b>Article II.....</b>	<b>72</b>
<b>Article III .....</b>	<b>81</b>
<b>Article IV.....</b>	<b>94</b>
<b>Article V .....</b>	<b>109</b>
<b>Résultats non publiés .....</b>	<b>123</b>
<b>Article VI.....</b>	<b>136</b>
<b>Article VII.....</b>	<b>143</b>
<b>Article VIII.....</b>	<b>150</b>
<b>Discussion et perspectives.....</b>	<b>178</b>
<b>RÉFÉRENCES.....</b>	<b>184</b>

## Résumé

Une tumeur comprend non seulement des cellules cancéreuses mais aussi leur environnement qui apporte les nutriments, les facteurs de croissance nécessaires, et fournit le support sur lequel les cellules tumorales se développent.

Endocan, une molécule de cet environnement tumoral, est un protéoglycane sécrété spécifiquement par la cellule endothéliale et dont l'expression, à l'état normal, est limitée à l'endothélium pulmonaire et rénal. Endocan, par son glycane, interagit avec les facteurs de croissance et stimule la prolifération des cellules épithéliales. Endocan pourrait également intervenir dans la régulation de la migration leucocytaire trans-endothéliale en modulant l'interaction des intégrines (comme par exemple le LFA-1) avec leur ligand. Endocan est surexprimé dans un nombre important de localisations tumorales comme le poumon, le sein, le colon et le rein. Dans le cancer du poumon et du sein, endocan fait partie d'un cluster de gènes de mauvais pronostic, sa surexpression étant liée à une mortalité plus précoce ou à des métastases plus fréquentes.

Nous avons montré qu'endocan a un effet de promotion de la croissance tumorale et que cette fonction est dépendante de l'interaction de son glycane avec les facteurs de croissance du microenvironnement tumoral.

Dans les modèles expérimentaux de cancer chez la souris SCID, nous avons démontré que le blocage d'endocan par l'intermédiaire d'anticorps monoclonaux freine la croissance tumorale, et que ce freinage est associé à un recrutement de leucocytes intra-tumoraux.

Dans les cancers broncho-pulmonaires humains nous avons démontré qu'endocan est surexprimé de manière importante et que son expression est corrélée avec celle du VEGF. Les taux circulants d'endocan sont également corrélés avec le pronostic. Ainsi, les patients avec des taux élevés d'endocan ont une survie plus courte. Les taux d'endocan sont corrélés avec la présence de métastases à distance et au niveau ganglionnaire mais pas avec la taille de la tumeur. Endocan pourrait être le reflet de la stimulation angiogénique tumorale et représenter un marqueur pronostique pour les cancers bronchopulmonaires.

Nous nous sommes également intéressés à d'autres pathologies néoplasiques pulmonaires : le mésothéliome pleural et les métastases pleurales des carcinomes. Nous avons montré que les taux sériques d'endocan sont liés au pronostic dans les carcinomes métastasés à la plèvre mais pas dans le mésothéliome pleural. Nous avons également montré que les peptides solubles dérivés de la mésothéline (SMRP) sont un bon marqueur diagnostique du mésothéliome pleural épithélioïde. En revanche, l'ostéopontine (une molécule pléiotrope impliquée, entre autres, dans l'adhésion et la survie cellulaire), qui a été proposée comme marqueur pour le diagnostic précoce du mésothéliome pleural malin, n'a que peu d'utilité dans le diagnostic des pleurésies chez les patients exposés à l'amiante. Par contre l'ostéopontine, comme d'ailleurs la SMRP, est un facteur indépendant de pronostic pour le mésothéliome pleural.

# **I. INTRODUCTION**

Le cancer, et notamment les tumeurs broncho-pulmonaires, est l'une des causes principales de mortalité dans le monde et plus particulièrement dans les pays développés. Actuellement les cancers broncho-pulmonaires sont la neuvième cause de mortalité dans le monde (soit à eux seuls 2,2% de la mortalité globale) et sont attendus d'atteindre la 7ème place d'ici 2030 [1]. Dans les pays développés, comme d'ailleurs en Roumanie, où la mortalité périnatale, par maladies diarrhéiques aiguës et autres maladies infectieuses (HIV inclus) reste faible en chiffres absolus, les cancers représentent la deuxième cause de décès derrière les maladies cardiovasculaires (accidents cérébro-vasculaires inclus) [2-4]. Le cancer broncho-pulmonaire reste la deuxième localisation néoplasique la plus fréquente chez l'homme (après le cancer de la prostate) et est parmi les quatre premières localisations chez la femme [2-4]. Par contre, en terme de mortalité, le cancer broncho-pulmonaire occupe la première place tant chez l'homme que chez la femme avec un nombre de décès par an supérieur à 160.000 cas aux USA en 2005 [2], 27.000 en France [3], et 14.000 en Roumanie [4]. Ces chiffres très élevés témoignent des avancées modestes obtenues ces dernières années dans le traitement de cette maladie. Malgré des progrès incontestables concernant la compréhension de la biologie des tumeurs et l'apparition de nouvelles options thérapeutiques, la mortalité de ces cancers reste très élevée, avec moins de 15 % de survie à 5 ans, tous stades confondus [5].

La seule thérapeutique qui offre actuellement une chance significative de guérison est la chirurgie précoce, mais elle n'est applicable que dans moins de 10% des cas de cancer broncho-pulmonaire [6]. Contrairement à d'autres localisations néoplasiques, comme par



exemple le col utérin [7], le dépistage du cancer du poumon est inefficace pour diminuer la mortalité de cette maladie [8, 9]. Les raisons pour lesquelles les résultats des traitements actuels sont si décevants, sont probablement multiples. Elles tiennent autant aux limites de nos connaissances sur la biologie de la maladie qu'aux moyens thérapeutiques non spécifiques destinés à enlever (chirurgie), à contrôler l'évolution locale (radiothérapie) ou à détruire les cellules en division rapide (la chimiothérapie). Néanmoins, la découverte des modifications génétiques des cellules cancéreuses et la compréhension de leur rôle dans la fonction cellulaire et le développement tumoral ont permis l'émergence du concept de thérapie ciblée. Ce terme désigne un nouveau groupe d'agents thérapeutiques dirigés contre des cibles moléculaires précises impliquées dans le développement de la cellule cancéreuse [10]. Toutefois, l'effet de ces traitements reste pour le moment modeste, avec une action principalement palliative. De plus il nous faut encore déterminer la population cible pour chaque médicament et trouver des marqueurs de leur efficacité. Le marqueur idéal serait une molécule circulante, facile à doser et qui pourrait prédire précocement l'efficacité du traitement.

Le mésothéliome pleural malin est une tumeur primitive maligne de la plèvre. Son incidence augmente de manière continue ces dernières années, conséquence directe de l'exposition professionnelle à l'amiante [11-13]. Bien que d'autres éléments favorisant le développement du mésothéliome ont été mis en évidence (notamment une prédisposition génétique dans certaines familles ou l'infection par le virus SV40) [14], l'exposition à l'amiante reste le facteur étiologique principal. Le pronostic de cette maladie est très sévère puisque à ce jour il n'y a pas de stratégie thérapeutique consensuelle qui puisse offrir une espérance raisonnable de guérison aux malades. La radiothérapie a seulement un rôle palliatif et la tumeur est peu sensible à la chimiothérapie. Les meilleures associations de chimiothérapiques n'offrent qu'une amélioration modeste mais réelle de la survie [15]. L'ablation chirurgicale peut offrir parfois une survie prolongée, mais n'est possible que dans un nombre extrêmement limité de cas (moins de 10%), avec une tumeur très limitée [16].

Il est donc nécessaire, tant pour le mésothéliome que pour le cancer du poumon, de mieux comprendre leur biologie et de développer des marqueurs de la maladie qui permettront peut-être :

- un diagnostic plus précoce de la tumeur ou de la récurrence
- un suivi des patients avec l'évaluation de l'efficacité du traitement
- une meilleure évaluation de l'extension à distance et du pronostic
- d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques

Le développement d'un cancer n'implique pas seulement la cellule néoplasique mais aussi son environnement qui croît avec la tumeur. Nous nous sommes intéressés à une nouvelle molécule provenant de cet environnement tumoral. Cette molécule dénommée endocan ou ESM-1 (acronyme de Endothelial Specific Molecule -1), a été clonée dans le laboratoire. Les données *in vitro* ainsi que des résultats préliminaires impliquaient endocan dans la croissance des tumeurs solides, notamment des cancers broncho-pulmonaires. Nous avons donc étudié l'implication d'endocan dans la croissance tumorale et son rôle comme marqueur diagnostique et pronostique dans différents cancers thoraciques. Nous avons également étudié sur une série de mésothéliomes pleuraux l'utilité clinique de deux nouveaux marqueurs : la mésothéline et l'ostéopontine.

## **II. BIOLOGIE DE LA CELLULE**

### **TUMORALE**

Le cancer était vu classiquement comme la progression d'une cellule normale vers un phénotype aberrant à la suite de mutations successives [17]. Il est intéressant de voir que les concepts qui sont aujourd'hui à la base de la compréhension de la biologie des tumeurs ont été évoqués depuis plus de 100 ans. Ainsi, en 1914, Theodor Boveri, qui a permis de comprendre que le chromosome représente le support de l'information génétique, suggère que la croissance illimitée des tumeurs pourrait être le résultat d'une ségrégation anormale des chromosomes. Ultérieurement, Boveri prédit l'existence des points de contrôle du cycle cellulaire, des gènes suppresseurs de tumeurs, des oncogènes, la progression vers un phénotype tumoral par accumulation des modifications génétiques, le caractère clonal des tumeurs et l'héritage d'une prédisposition au développement des cancers par la transmission de chromosomes (lire gènes) anormaux (revue dans [18]). Toutes ces prédictions ont été confirmées ultérieurement par la découverte des translocations chromosomiales dans les leucémies myéloïdes chroniques [19], l'apparition de l'hypothèse des mutations séquentielles [20, 21] expliquant le développement des cancers et la découverte des premiers oncogènes [22-24] d'abord d'origine virale puis d'origine humaine. Plus récemment la découverte de mutations des gènes APC puis BRCA1 mettent les bases de la susceptibilité génétique des tumeurs.

## ***II.1 Caractéristiques communes des cellules tumorales***

Au fil du temps, il devient évident que les tumeurs ont besoin de plusieurs éléments pour pouvoir se développer. Malgré l'existence de plus d'une centaine de types de cancers humains, toutes les cellules néoplasiques partagent des caractéristiques communes [25].

### ***A) Indépendance vis-à-vis des signaux de croissance externes***

La survie et la prolifération de toute cellule, soit-elle normale ou néoplasique, dépend des signaux de croissance du milieu. En l'absence de ces signaux, dont les supports sont les facteurs de croissance et les protéines de l'environnement, la cellule meurt. Ces signaux sont transmis à la cellule par l'intermédiaire des récepteurs de membrane. Par exemple, les différents types de cellules normales sont très difficiles à cultiver. Cela nécessite des milieux complexes supplémentés par de nombreux facteurs de croissance ou par des extraits de tissus (qui apportent ces mêmes facteurs de croissance) dont la composition est parfois mal connue. Les cellules tumorales sont bien moins critiques de ce point de vue. L'explication de ce comportement est que, au fil de leur transformation néoplasique, les cellules développent des mécanismes d'autosuffisance qui rentrent dans trois catégories :

- habilité à sécréter les facteurs de croissance nécessaires à leur développement, qui ensuite vont avoir un effet autocrine [26] ;
- altération des récepteurs de surface qui transmettent les signaux de croissance : surexpression ou mutation des séquences codant pour la fonction tyrosine-kinase [27-29] avec une stimulation continue en dehors de la présence du ligand ;
- altération des cascades intracellulaires de signalisation, la cellule acquérant une activation continue de ces voies, ce qui permet une stimulation en dehors des signaux externes [30].

### ***B) Perte de l'inhibition de croissance***

Une deuxième anomalie nécessaire au développement des cellules néoplasiques est la perte de l'inhibition de croissance suite aux signaux de l'environnement. Ces signaux sont soit des médiateurs solubles soit des signaux de contact provenant de la matrice extracellulaire ou des cellules environnantes [31].

### ***C) Inhibition des voies de la mort cellulaire programmée***

Toutes les cellules ont des mécanismes de contrôle de la survie cellulaire qui engagent le processus de mort cellulaire programmée (apoptose) soit en cas d'altération importante de la cellule soit sous l'influence des facteurs externes [32]. Virtuellement toutes les cellules cancéreuses ont des anomalies dans une des voies impliquées dans l'apoptose.

#### *D) Capacité illimitée de prolifération*

Afin de générer efficacement des tumeurs, les cellules néoplasiques doivent acquérir une capacité illimitée de prolifération. Cela fait partie intégrante des modifications présentes dans divers cancers [33, 34]. En effet, les cellules normales ont un mécanisme de contrôle qui limite le nombre maximal de divisions. Ce mécanisme est basé sur le raccourcissement progressif des télomères qui sont impliqués dans la stabilité des chromosomes. En l'absence d'une synthèse continue de ces télomères, après un nombre déterminé de divisions, il résulte une sénescence des cellules et l'apoptose. L'activité des télomérases (enzymes impliquées dans la synthèse des télomères) est réprimée dans les cellules normales mais est activée dans les cellules immortalisées ou néoplasiques [34].

#### *E) Capacité à acquérir une vascularisation efficace*

Les cellules tumorales ont un métabolisme extrêmement actif et elles ont besoin de nutriments et d'oxygène pour pouvoir croître. En 1971, Folkman propose le concept suivant lequel les tumeurs dépendent de leur capacité à stimuler la formation de nouveaux vaisseaux (angiogénèse) pour pouvoir croître [35]. Cette hypothèse, combattue à l'époque, est universellement admise aujourd'hui [36]. La croissance des tumeurs solides et de leurs métastases au delà de la tumeur *in situ* (de l'ordre du millimètre) est dépendante du processus d'angiogénèse [35-37]. Cette thèse a été démontrée non seulement pour les tumeurs solides mais aussi par exemple pour les leucémies [38]. De nombreuses molécules impliquées dans le processus d'angiogénèse tumoral ou physiologique ont été décrites au fil du temps ; parmi celles-ci on retrouve des facteurs de croissance de la famille des FGF, le HGF/SF, le VEGF, etc. En même temps, de nombreuses molécules inhibant le processus d'angiogénèse ont été découvertes : angiostatine, endostatine, thrombospondine, vasostatine, troponine I [39]. L'angiogénèse est considérée aujourd'hui comme un processus hautement régulé par l'équilibre entre les facteurs angiogéniques et les facteurs anti-angiogéniques.

Néanmoins l'acquisition de ces caractéristiques phénotypiques par les cellules tumorales n'est pas synonyme de développement tumoral. En effet la cellule néoplasique a besoin d'un milieu propice pour pouvoir croître, la cellule stimulant le développement de ce milieu qui, à son tour, peut moduler le devenir de la cellule tumorale.

## ***II.2 Le microenvironnement tumoral***

Dans la littérature les termes microenvironnement (ou environnement tumoral) et stroma sont utilisées fréquemment de manière interchangeable. Nous utiliseront le terme d'environnement (ou microenvironnement, sans distinction sémantique entre ces deux entités)

pour nous référer aux éléments de la tumeur à l'exclusion des cellules tumorales elles mêmes (incluant ici les éléments acellulaires de la matrice extracellulaire, les cellules non-cancéreuses de la tumeur – cellules endothéliales, fibroblastes et cellules inflammatoires, et les médiateurs solubles de cet environnement – enzymes, facteurs de croissance). Le terme de stroma sera utilisé pour nous référer à la composante extracellulaire de la tumeur.

L'acquisition des caractéristiques obligatoires à la tumorigénicité par les cellules tumorales ne représente qu'une partie du tableau global qui permet d'expliquer le processus de croissance des cancers. En effet, la tumeur ne croît pas « toute seule » mais au sein d'un tissu/organe/organisme avec lesquels elle entretient des relations étroites. La tumeur est en fait elle-même un tissu à part, dans lequel la cellule tumorale est interconnectée avec son microenvironnement [40]. La présence des mutations multiples avec l'altération des voies de contrôle de la croissance cellulaire n'est pas en soi suffisante pour donner naissance à des tumeurs [41]. En fait, l'architecture et la fonction du tissu tumoral sont créées et maintenues par une interaction dynamique entre les cellules et leur microenvironnement.

Le rôle de l'environnement tumoral a été magistralement pressenti par Paget qui, dans l'un des premiers numéros du Lancet, lance en 1889 l'hypothèse du « seed and soil » [42]. Son hypothèse est formulée initialement pour expliquer les métastases sélectives dans certains organes des cancers du sein, mais s'applique aussi aux tumeurs primitives. La question légitime que se pose ce chirurgien est « Qui décide quels seront les organes qui seront atteints dans les cancers disséminés? ». La réponse donnée il y a plus de 100 ans reste valable aujourd'hui et explique que pour se développer les cellules tumorales ont besoin d'un environnement propice. Les premières démonstrations expérimentales de ce concept viendront beaucoup plus tard. En 1975 Mintz et al se posent la question du devenir des cellules tumorales lors qu'elles sont intégrées dans un environnement normal. Leur expérience consiste à intégrer des cellules de tératocarcinome murin (qui ne présentaient pas d'anomalies chromosomiques) dans des embryons de souris au stade de blastocystes. A leur grande surprise, le résultat n'est pas la formation d'une tumeur mais plutôt le développement de souris normales qui intègrent les cellules tumorales dans leurs différents tissus, lignées germinales incluses [43]. Ce travail montre l'importance de l'environnement dans lequel « évolue » la cellule tumorale. Cet environnement n'a donc pas seulement un rôle « passif » destiné à soutenir la croissance tumorale. L'environnement n'a pas seulement le rôle de « sélectionner » des cellules tumorales « compatibles » qui sont capables de se développer en son sein, mais peut influencer de manière directe le développement de ces cellules. Ce travail suggère aussi qu'il n'y a pas de raison de croire que le processus de tumorigénèse soit

irréversible (du moins dans ses étapes initiales) et qu'en modifiant sélectivement cet environnement on pourrait prévenir l'évolution des cellules tumorales vers une tumeur invasive. Ultérieurement, plusieurs auteurs démontrent que la tumorigénicité du RSV (Rous Sarcoma Virus – un virus dont la tumorigénicité est liée à la présence de l'oncogène v-src) est absente dans les phases initiales de l'embryogenèse [44, 45]. Dans le cancer du sein, il a été également montré que des anomalies génétiques nécessaires au développement tumoral existent aussi dans les zones microscopiquement normales, à distance des zones tumorales. Ceci suggère que le comportement des cellules épithéliales anormales, ayant un potentiel tumoral, est réprimé par l'environnement normal [46-48]. Au niveau du sein, les cellules épithéliales luminales sont considérées comme les cellules à l'origine du développement tumoral. Il a été démontré que les cellules myoépithéliales, qui se situent au contact immédiat des cellules luminales, expriment un certain nombre de protéines (comme  $\alpha$ -actine, la cytokératine 5, l'intégrine  $\alpha 6$ , la caveoline 1, la connexine 43, TIMP 1, la relaxine, l'activine) qui peuvent réprimer la transformation maligne des cellules épithéliales [49-51].

Il devient évident que l'apparition du cancer-maladie nécessite deux phases distinctes. Dans la première, l'acquisition de manière séquentielle des mutations somatiques permet de transformer une cellule normale en une cellule cancéreuse ayant un potentiel élevé de prolifération. Une deuxième étape, survenant très tôt, fait intervenir une interaction de ces cellules anormales avec l'environnement. D'une part les cellules stimulent la formation et la modification de l'environnement normal, le recrutement de vaisseaux sanguins et la production de facteurs de croissance et de cytokines par l'environnement [50, 52-54]. D'autre part, l'environnement de ces cellules modifie la prolifération et l'invasivité des cellules tumorales [55]. L'altération des interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules épithéliales peut moduler le comportement de ces dernières et induire une transformation tumorale [56-58]. L'environnement peut ainsi favoriser ou bloquer le développement des tumeurs [59].

L'état d'activation du stroma est important dans l'apparition et la progression tumorale [60]. La littérature médicale depuis plus de un siècle contient de nombreuses références concernant la relation entre le cancer et les processus de remodelage/réparation tissulaire (comme par exemple les fibroses pulmonaires). Il est bien connu que l'incidence de l'hépatocarcinome est nettement plus élevée chez les patients ayant une fibrose hépatique dans le cadre d'une cirrhose. Il a également été démontré que l'apparition de tumeurs après inoculation de cellules tumorales dans la graisse pér mammaire des rats dépend de l'âge et de la parité des animaux. Les jeunes rats ainsi que les rats nullipares donnent naissance plus

fréquemment à des tumeurs que les rats âgés ou multipares [61]. Cette susceptibilité différente dépend vraisemblablement du degré de remodelage qui existe au niveau du tissu péri-mammaire qui est plus important chez les jeunes animaux et chez les nullipares. De manière intéressante cette période de vulnérabilité à l'implantation des tumeurs coïncide aussi avec la période de vulnérabilité à la carcinogenèse chimique [62]. Chez l'homme (ou plutôt la femme) il a été clairement démontré qu'il existe une relation étroite entre grossesse et risque de cancer du sein. Globalement le risque de développer un cancer du sein est plus élevé chez les nullipares. Néanmoins, cette relation est bimodale avec une augmentation du risque de cancer dans les 6 à 10 années après l'accouchement et un effet protecteur ensuite. De plus cette modification du risque est dépendante de l'âge de la patiente (revue générale dans [63]) Barcellos et al ont démontré que le fait d'irradier les cellules stromales mammaires augmente le potentiel à générer des tumeurs par des cellules épithéliales non irradiées qui sont implantées ensuite dans cet environnement. Il a été aussi démontré que l'injection de cellules stromales anormales et/ou d'extrait de stroma néoplasique avec des cellules cancéreuses augmente la tumorigénicité et la vitesse de croissance des tumeurs [64].

L'apparition des carcinomes *in situ* est associée à une réaction stromale similaire à celle des processus de réparation tissulaire [50, 65]. Il existe actuellement des indications fortes qui montrent que le stroma « communique » avec les cellules tumorales dès l'étape de la tumeur *in situ*. Ainsi, chez les poulets infectés par le RSV (Rous Sarcoma Virus) la création d'une lésion tissulaire mécanique génère localement des carcinomes invasifs, alors que sans lésion initiale, le même tissu reste indemne de tumeur. Ceci démontre que le stroma génère des signaux qui peuvent faciliter la tumorigénèse [66, 67].

En situation normale (physiologique) le stroma joue un rôle important dans le développement et au maintien de la polarité des cellules épithéliales. Ces cellules reçoivent un nombre important de signaux de l'environnement qui leur permet d'acquérir une polarité (différentiation spécifique aux cellules épithéliales) avec un pôle basal et un pôle apical. La perte de la polarité génère une augmentation de la prolifération cellulaire et de la tumorigénèse [68].

Durant le développement des cancers, il existe également un développement du microenvironnement de la tumeur. Ce processus qui a été globalement dénommé « stromagenèse » [69] est parallèle au développement tumoral [70] et a des ressemblances frappantes avec le processus de réparation, Dvorak comparant les tumeurs à des blessures qui ne guérissent pas [71]. Si dans les stades initiaux du développement tumoral il est probable



que le microenvironnement tumoral freine le développement [72], dans les stades avancés celui-ci a plutôt un effet de soutien de la croissance tumorale [58, 73].

Ces hypothèses sont confortées par le fait que des lésions tumorales minimales sont retrouvées de manière fortuite lors des autopsies de patients. Ainsi sur les études autopsiques, jusqu'à un tiers des femmes de plus de quarante ans ont des cancers *in situ* au niveau du sein, tandis que moins de 1% des femmes du même âge développent un cancer invasif [74]. Cette situation se retrouve aussi chez l'homme avec le cancer de la prostate. Toute lésion néoplasique ne donne donc pas forcément naissance à un cancer [59], l'environnement tumoral agissant comme un facteur de contrôle puissant du développement de ces lésions. Les études réalisées par exemple dans les cancers du sein, ont démontré également que l'évolution des lésions de cancer *in situ* vers l'invasion ne se fait pas dans un environnement normal mais modifié, qui est capable, entre autres, d'assurer l'apport vasculaire nécessaire à la croissance tumorale [53].

Ceci a une conséquence clinique directe et majeure. En effet, avec les moyens diagnostiques modernes, on découvre de plus en plus fréquemment des lésions néoplasiques précoces dont on connaît mal l'histoire et l'évolution naturelle [75]. Néanmoins, à ce jour on ne connaît encore pas les mécanismes moléculaires (de la tumeur comme du stroma) qui font qu'un carcinome *in situ* évolue vers une forme invasive ou reste limité à l'épithélium [25, 76].

Dans ces conditions le traitement à proposer aux patients ayant des lésions préneoplasiques ou néoplasiques précoces est à discuter puisque à ce jour, en simplifiant à l'extrême, le traitement curatif de la majorité des cancers solides est basé sur l'exérèse des lésions. L'environnement tumoral est donc actuellement considéré comme un acteur majeur de l'invasion locale et du processus métastatique [54].

L'intérêt pour cet environnement tumoral n'est pas seulement scientifique mais aussi diagnostique car il sera peut être possible de mieux préciser l'évolution des lésions *in situ* vers des lésions invasives. On commence également à voir apparaître des thérapeutiques dirigées contre les molécules ou même les cellules de cet environnement tumoral. L'utilisation des cibles thérapeutiques de l'environnement tumoral présente en théorie l'avantage potentiel d'être non génotoxique et de s'adresser à une cellule qui est plus stable génétiquement minimisant ainsi le risque de développer une résistance au traitement. En outre, l'effet de la thérapie est double, jouant sur la croissance tumorale et les autres compartiments de la tumeur [77-79].

## **II.2.1 Composition de l'environnement tumoral**

L'environnement tumoral fait partie intégrante de la néoformation tumorale dont il représente la partie non épithéliale. L'environnement de la cellule tumorale est composé d'un stroma (composante extracellulaire comprenant des protéines et des carbohydrates ainsi que des protéoglycanes) dans lequel on retrouve une composante cellulaire avec des fibroblastes et des cellules immunes et des vaisseaux. Tous ces éléments sont dans un dialogue intense basé sur les facteurs de croissance, les cytokines et les molécules d'adhésion. Les interactions dynamiques entre les cellules épithéliales et stromales sont un point clé dans des processus aussi différents que l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire.

### ***II.2.1.1 Les fibroblastes tumoraux***

Les fibroblastes constituent la composante cellulaire la plus importante du microenvironnement tumoral. Ils sont inclus dans la matrice extracellulaire et sont en grande partie responsables de la synthèse de celle-ci. Les fibroblastes synthétisent les composants de la matrice extracellulaire comme les collagènes (type I, III, V) et la fibronectine. Ils contribuent également à la synthèse des membranes basales en sécrétant la laminine et le collagène IV. Les fibroblastes sont impliqués dans le contrôle de la différenciation épithéliale, la régulation de l'inflammation locale et dans les processus de remodelage tissulaire [80, 81]. Ils sont une source importante de metalloprotéases, qui sont responsables de la dégradation et le turnover de la matrice extracellulaire, processus impliqué dans le développement tissulaire normal [82] mais aussi dans la cancérogénèse [83, 84].

Le stroma normal contient un nombre réduit de fibroblastes. Le stroma réactionnel des tumeurs contient un nombre plus élevé de fibroblastes [50, 85]. En plus ces fibroblastes ont un phénotype anormal qui a été décrit dès les années 70. On retrouve chez ces cellules une sécrétion de facteurs de croissance spécifiques, une motilité anormale, un taux de prolifération plus élevé et l'expression de l' $\alpha$ -actine [86-89]. Ces fibroblastes sont dénommés myofibroblastes et expriment également la vimentine, le récepteur c-MET, les cyclooxygénases COX-1 et -2 et la N-cadherine [90].

Il a été également démontré que les fibroblastes provenant de patients ayant une forte prédisposition pour le cancer nécessitent des conditions moins critiques en facteurs de croissance pour pouvoir proliférer [91]. De plus, l'inoculation chez la souris de fibroblastes provenant d'une tumeur prostatique avec des cellules prostatiques épithéliales immortalisées promeut la croissance et le développement de ces cellules vers un phénotype tumoral tandis

que la culture avec des fibroblastes normaux ne génère pas de tumeurs [92]. Il a été également montré que les fibroblastes tumoraux permettent l'acquisition d'un phénotype invasif à des cellules tumorales qui initialement n'ont pas de pouvoir invasif [93]. Le volume des tumeurs qui résulte après une inoculation simultanée de cellules tumorales avec des fibroblastes tumoraux est plus important que les tumeurs témoin [64]. Ceci indique que les fibroblastes normaux sont nécessaires pour le maintien de l'homéostasie épithéliale tandis que les fibroblastes tumoraux (ou « seulement » anormaux) ont le pouvoir d'initier et de promouvoir les altérations qui aboutiront à la formation de tumeurs par les cellules épithéliales.

L'existence d'un phénotype anormal des fibroblastes tumoraux est renforcée par la présence d'anomalies génétiques dans ces cellules de manière similaire aux cellules tumorales [94, 95]. Néanmoins ces anomalies sont rarement identiques à celles retrouvées dans les cellules tumorales [96].

### ***II.2.1.2 La matrice extracellulaire***

La matrice extracellulaire est essentielle à la création et au maintien de la fonction d'un tissu/organe. Elle permet une organisation tridimensionnelle du tissu qui va moduler l'expression de gènes nécessaires à la création et au maintien de la fonction de ce tissu. Ce réseau de protéines extracellulaires permet aux cellules épithéliales d'adhérer, de migrer, de moduler leur prolifération ou d'induire leur apoptose [97].

Initialement considéré comme une simple structure passive de soutien, la matrice extracellulaire est capable d'envoyer des signaux vers les cellules en son sein et de moduler leur comportement. Elle peut activer spécifiquement des cascades de signalisation par l'intermédiaire des récepteurs d'adhérence et de moduler l'expression des gènes dans les cellules épithéliales ou les fibroblastes [98].

L'abondance relative de la matrice extracellulaire tumorale est variable en fonction du type tumoral et cette variable n'est pas corrélée à l'agressivité du cancer [99, 100]. La composition de cette matrice extracellulaire est différente dans les cancers par rapports aux tissus normaux.

Les protéines composantes de la matrice extracellulaire tumorale peuvent être sécrétées par les cellules tumorales mais sont principalement le produit des fibroblastes de l'environnement tumoral. La composition de cette matrice extracellulaire (comme d'ailleurs la membrane basale sur laquelle les cellules se développent initialement) est complexe et comprend principalement des collagènes et des protéoglycanes.

La matrice extracellulaire peut être divisée en deux composantes principales : d'une part la membrane basale et d'autre part la matrice extracellulaire proprement dite.

La membrane basale est une forme spécialisée de matrice extracellulaire qui a un rôle de soutien aux cellules épithéliales et contribue à leur différenciation et à l'acquisition et au maintien d'une polarisation des cellules épithéliales [101]. La membrane basale est une structure dynamique et les changements de sa composition génère des modifications de la forme et du comportement des cellules épithéliales [102] en altérant l'affinité et la distribution des récepteurs de surface et la réponse de ces cellules aux facteurs solubles de l'environnement [29, 103].

Les composantes des membranes basales à l'état physiologique sont le collagène de type IV, la laminine, les protéoglycanes de type héparane sulfate (ou HSPG) et le nidogène mais aussi l'agrine (un autre HSPG), l'ostéopontine et d'autres types de collagènes (XV et XVIII par exemple). Bien que morphologiquement l'aspect de la membrane basale soit uniforme, sa composition est différente dans chaque tissu. Les cellules endothéliales qui sont attachées à leur membrane basale ont une activité proliférative extrêmement réduite avec un turnover qui dépasse les 100 jours contrairement par exemple aux cellules de la moelle osseuse pour lesquelles ce temps est réduit à environ 5 jours [104]. Néanmoins, en cas de stimulation les cellules endothéliales peuvent proliférer très rapidement. Les composantes de la membrane basale sont nécessaires à l'initiation et à l'arrêt du processus d'angiogénèse qui implique une prolifération importante des cellules endothéliales. La prolifération endothéliale est associée à la dégradation de la membrane basale avec comme résultante la formation de nouveaux vaisseaux. Cela montre que les signaux médiés par la membrane basale sont des régulateurs puissants du comportement des cellules endothéliales. Les facteurs angiogéniques, comme par exemple le FGF-2, altèrent l'adhésivité et l'intégrité de la membrane basale et de la matrice extracellulaire et participe à la régulation de la croissance et de la différenciation des cellules endothéliales durant l'angiogénèse [105]. La dégradation des membranes basales et de la matrice extracellulaire est induite par des enzymes telles que les metalloprotéases de la matrice (Matrix Metalloproteases ou MMP). Ces molécules sont produites par les cellules tumorales mais aussi par les cellules stromales et les cellules endothéliales elles-mêmes [83]. La dégradation des membranes basales permet non seulement de « libérer » les cellules de leurs attaches à la matrice (principalement les intégrines) mais aussi de libérer des facteurs de croissance « séquestrés » par les protéoglycanes. Les cellules endothéliales ainsi libérées vont être en contact avec une matrice jeune composée de collagène de type I, de vitronectine, fibronectine et thrombine. La production de ces composants est stimulée par les facteurs

angiogéniques [106]. Cette matrice « provisoire » va transmettre des signaux prolifératifs aux cellules endothéliales tandis que la membrane basale normale induit une quiescence de ces mêmes cellules.

Il faut également prendre en compte que la dégradation de la matrice extracellulaire génère des fragments provenant des molécules qui entrent dans sa structure. Ces fragments peuvent avoir un pouvoir régulateur négatif important sur l'angiogénèse comme par exemple l'endostatine (fragment du collagène XVIII) [107] ou les fragments du collagène IV [108]. L'organisme dispose ainsi d'un mécanisme puissant de régulation de l'angiogénèse.

La matrice extracellulaire tumorale contient une quantité plus élevée des collagènes de type I, III et V et de fibrine [54, 76] et une quantité réduite de laminine, protéine qui intervient dans l'organisation architecturale des tissus normaux et des membranes basales [109]. La sécrétion de ce type de protéines est également rencontrée lors des processus de réparation ou d'inflammation [110]. Les protéoglycanes sont des composants importants de la matrice extracellulaire et ils sont impliqués dans les processus d'invasion locale et de métastase tumorale [111-115]. La composition (quantitative et qualitative) en protéoglycanes du stroma tumoral varie dans les tumeurs par rapport aux tissus normaux. Ces molécules jouent également un rôle important dans la biologie des vaisseaux.

#### **II.2.1.2.1 Les protéoglycanes**

Les protéoglycanes sont une famille hétérogène de macromolécules qui comportent une chaîne protéique sur laquelle est greffée au moins une chaîne glycanique. Le nombre et la structure de ces chaînes latérales glycaniques sont variables d'une molécule à l'autre mais parfois aussi d'un tissu à l'autre ou d'une situation pathologique à une autre au sein d'une même molécule. Dans certains cas physiologiques et/ou pathologiques la chaîne glycanique peut manquer. On parle alors de protéoglycanes « part time », qui ne reçoivent une chaîne latérale que de manière facultative.

Il existe des protéoglycanes extracellulaires qu'on retrouve dans la matrice extracellulaire, des protéoglycanes ancrées dans les membranes cellulaires mais aussi, plus rarement, des protéoglycanes intracellulaires. Parfois ces protéoglycanes sont retrouvés aussi dans la circulation.

La longueur de la chaîne protéique d'un protéoglycane peut varier de 1 à plus de 500 kD. La chaîne glycanique latérale peut être unique ou multiple (jusqu'à 100 chaînes/molécule). Du point de vue structural, la chaîne glycanique est composée d'un "*linker*" (unité d'encrage dans la protéine composée de quatre monosaccharides xylose - galactose - galactose - acide

glucuronique) suivi de la répétition de deux monosaccharides (une hexosamine et un acide uronique) dont le type définit les sous familles de protéoglycanes. Il existe quatre types principaux glycosaminoglycanes : l'acide hyaluronique (HA), l'héparane sulfate (HS) et l'héparine (HP), le chondroïtine sulfate (CS) et le dermatane sulfate (DS) (tableau I) [116].

La diversité des protéoglycanes est assurée non seulement par la structure de la chaîne protéique mais aussi par la chaîne glycanique latérale. Cette dernière peut avoir une longueur et des motifs de sulfatation variables en fonction des molécules. La diversité structurale et fonctionnelle des chaînes glycaniques se fait par plusieurs mécanismes :

- d'une part la succession des différents résidus osidiques n'est pas uniforme sur toute la longueur de la chaîne glycanique ;
- le degré de sulfatation de chaque résidu est variable (de zéro à trois résidus sulfate) ;
- le degré de sulfatation n'est pas uniforme sur la longueur de la chaîne glycanique, avec des zones non sulfatées et des zones hypersulfatées.

Les fonctions de ces molécules et la régulation de leur structure sont encore mal connues. La succession des différents résidus osidiques et le degré variable de sulfatation créent au niveau des chaînes glycaniques des motifs spécifiques qui permettent la fixation des protéines basiques comme les facteurs de croissance, les cytokines ou les chimiokines. La fixation sur le glycane joue un rôle dans l'effet biologique de ces molécules [117]. Ainsi, certains protéoglycanes ont un rôle de corécepteur, favorisant la stabilisation du complexe facteur de croissance - récepteur. Ils permettent, en outre, l'immobilisation des facteurs de croissance au niveau du stroma, créant ainsi un pool de stockage qui peut être libéré lors d'agressions (libération induite par exemple par l'activation des enzymes protéolytiques comme les metalloprotéases et les glycosidases) [118]. Ils peuvent aussi avoir un rôle de protection de ces facteurs contre la dégradation protéolytique [119]. Les protéoglycanes peuvent également lier certaines molécules d'adhérence, comme les intégrines.

Tableau I : Classification des protéoglycanes en fonction de la composition en résidus osidiques de leur chaîne glycanique

		Hexose-amine	
		N-acetyl-Glucosamine	N-acetyl-Galactosamine
Acide uronique	Ac glucuronique	Acide hyaluronique	Chondroïtine sulfate
	Ac glucuronique /Ac iduronique	Héparane sulfate/Héparine	Dermatane Sulfate

Les protéoglycanes interviennent dans la stabilisation de la paroi vasculaire, la prolifération, la migration des cellules endothéliales et l'angiogénèse [120, 121].

#### *La décorine*

Parmi les protéoglycanes de la matrice extracellulaire la décorine fait partie de la famille des « small leucine rich proteoglycans » (SLRP). Cette famille contient de manière prédominante des chondroïtines et des dermatanes sulfate. La décorine est impliquée dans la régulation de l'adhésion, la prolifération et la migration cellulaire. Une down-régulation de l'expression de la décorine a été décrite dans le stroma des carcinomes hépatocellulaires [122] et dans le cancer du sein [123, 124]. Dans les cancers du côlon, il existe une surexpression de la décorine qui est limitée à la tumeur et qui résulte d'une hypo-méthylation du gène [125]; ceci est retrouvé également dans les cancers du pancréas [126]. Dans les modèles expérimentaux, la surexpression de la décorine réduit la tumorigénicité des cellules tumorales par l'intermédiaire des interactions avec le TGF $\beta$  [127]. La décorine a été aussi impliquée dans le contrôle de la prolifération tumorale. La surexpression de cette molécule est associée à une croissance tumorale plus lente [128]. La décorine interagit également avec le récepteur à l'EGF (*epidermal growth factor*) et régule négativement la prolifération cellulaire [129]. La surexpression de la décorine dans les modèles expérimentaux permet également d'améliorer la sensibilité des cellules tumorales à la chimiothérapie [130]. Néanmoins, dans d'autres modèles, comme le mélanome malin, l'expression de la décorine n'influence pas l'agressivité de ces cellules. Dans ce cas, la forme exprimée de la décorine est différente de la forme « wild-type » et les mutations subies lui font perdre sa capacité d'inhibition de la croissance tumorale [131]. Le mécanisme par lequel la décorine agit sur la croissance tumorale reste à déterminer, mais, dans les cancers du sein, où l'expression de la décorine est diminuée [124] il a été démontré que la décorine a un rôle de corécepteur pour le « Epidermal growth factor » (EGF) et est capable d'inhiber par la suite la signalisation induite par l'EGF [132, 133]. La surexpression de la décorine diminue la migration, l'attachement des cellules endothéliales et montre un effet négatif sur le développement de structures tubulaires [134]. De plus, des tumeurs xénogéniques surexprimant la décorine ont une croissance et une néo-vascularisation réduites. *In vivo*, sur les modèles animaux, une tumeur primaire mammaire surexprimant la décorine voit son volume tumoral réduit de 70% [135]. Par ailleurs, le traitement par la décorine de différentes lignées tumorales réduit leur vitesse de croissance *in vitro* [128]. Ce mécanisme est dépendant du VEGF, dont l'expression est réduite en présence de la décorine [136].

### *Le perlecan*

Le perlecan est un autre protéoglycane impliqué dans la croissance tumorale. Le perlecan est un composant majeur des membranes basales et des vaisseaux sanguins [137]. Il est présent normalement dans la membrane basale des vaisseaux sanguins de la peau, du sein, du cœur, du thymus, de la prostate, du côlon, du poumon, du rein et du placenta [138]. Il est sécrété par les cellules épithéliales, endothéliales, les muscles lisses, les fibroblastes et les chondrocytes [139-144]. Il a été montré que son expression est augmentée pendant le processus de transformation tumorale et qu'elle est corrélée positivement avec le potentiel invasif/métastatique de ces cancers [114, 145-147]. Le rôle potentiel du perlecan dans la progression tumorale est probablement expliqué par sa capacité d'être un ligand des facteurs de croissance de la famille des FGF (FGF-2 et FGF-7). La fixation du FGF-2 à son récepteur nécessite l'intervention d'un protéoglycane qui le présente de manière efficace. L'inhibition de la production de perlecan par des oligonucléotides antisens diminue la croissance tumorale ainsi que l'invasion locale et les métastases [148, 149]. De plus, l'inhibition de la synthèse du perlecan dans un modèle de cancer du côlon est accompagnée par une diminution de la densité microvasculaire intra- et péri-tumorale [150].

Le perlecan est impliqué dans des processus de différenciation cellulaire, de morphogénèse tissulaire et d'embryogénèse, médiés tant par le corps protéique que par les chaînes de glycosaminoglycanes [151]. Au niveau de l'endothélium, le perlecan favorise la prolifération des cellules endothéliales via sa liaison avec le FGF-2. Le perlecan protège le FGF-2 contre la dégradation et maintient ainsi la capacité de prolifération des cellules endothéliales. Le perlecan permet également de garder un stock de FGF-2 dans la matrice extracellulaire pour permettre ensuite une libération progressive. Le perlecan promeut également l'angiogénèse tumorale [146, 152]. Son expression est augmentée dans le cancer du sein [153, 154]. Dans les métastases de mélanome malin l'expression du perlecan est associée avec une forte agressivité de ces tumeurs [145, 155].

Récemment, il a été montré que l'expression stable d'un ADN complémentaire anti-sens du perlecan dans des cellules de mélanome métastatique aboutissait à une suppression des réponses cellulaires au FGF-2. Il a été également constaté que ce type de stratégie de suppression d'expression du perlecan permet de bloquer l'angiogénèse et d'inhiber fortement la croissance d'une xénotransplante de tumeur colique chez la souris. Les auteurs suggèrent que cet effet est médié par le blocage de l'activité du FGF-2 et du FGF-7 [150].



### *Les glypicans*

Les glypicans constituent une famille de protéoglycanes de type héparane sulfate qui sont attachés à la membrane cellulaire via une ancre glycosylphosphatidyl inositol [156]. Ils ont un rôle de co-recepteurs pour les membres de la famille du TGF- $\beta$  et pour d'autres facteurs de croissance se fixant aux protéoglycanes de type héparane sulfate [157]. L'effet sur la croissance tumorale est variable en fonction de la molécule exprimée, certains glypicans (par ex le GPC-1) ayant un effet pro-tumoral tandis que d'autres (le GPC-3) inhibent la croissance tumorale [158].

### *Les syndecans*

D'autres protéoglycanes dont l'expression varie dans les tumeurs sont les syndecans [159]. Cette famille de protéoglycanes membranaires est capable d'interagir avec des protéines de la matrice extracellulaire (collagènes, fibronectine, thrombospondine, ténascine). Ils lient, via leur glycosaminoglycane, différents facteurs de croissance tels que l'EGF, le VEGF, le FGF-2 et des membres de la famille du TGF- $\beta$  [160, 161]. Les syndecans interviennent dans le contrôle de l'activité du FGF-2 dont il peut contrôler la stabilité et la biodisponibilité par crinopexie (potentialisation de l'activité, régulation de la biodisponibilité et de la stabilité) [162, 163]

Le syndecan-1, le membre le plus important de cette famille, est exprimé préférentiellement au niveau des tissus épithéliaux et mésenchymateux. Il a été montré que l'expression du syndecan-1 est diminuée dans de nombreux types de cancers comme les tumeurs épidermoïdes de l'œsophage, du poumon, du larynx et de la peau et les adénocarcinomes digestifs. La perte d'expression du syndecan-1 est corrélée avec le grade histologique de la tumeur, son pouvoir métastatique [164] et représente un marqueur indépendant du pronostic pour les cancers épidermoïdes du poumon ou les adénocarcinomes gastriques et coliques [165-167].

Le syndecan-2 est exprimé au niveau des tissus d'origine mésenchymateuse (comme la cellule endothéliale et les fibroblastes et les cellules nerveuses). Son expression est fortement augmentée dans les cellules de carcinome du côlon [168]. L'expression du syndecan-2 affecte l'adhérence, la prolifération et l'activité tumorigène de cellules de carcinome du côlon [168, 169]. Le syndecan-2 semble jouer un rôle dans la migration des cellules tumorales mais aussi des cellules endothéliales et donc dans le processus angiogénique [170]. Ceci est valable également pour la forme soluble sans chaîne glycanique, démontrant l'implication du corps

protéique dans les mécanismes d'action des syndecans [171]. Le syndecan-3 est presque exclusivement exprimé au niveau des tissus nerveux et musculo-squelettique. Le syndecan-4 est exprimé de manière ubiquitaire [111, 161, 172]. Le syndecan-4 possède une activité anti-migratrice/anti-invasive, le classant comme suppresseur de tumeurs. La surexpression du syndecan-4 inhibe la migration de la lignée CHO-K1 [173, 174]. L'expression du syndecan-4 est réprimée dans les cellules de carcinome du côlon [168, 175].

#### *Le versican*

Le versican est un protéoglycane sécrété par la cellule endothéliale [176] et les muscles lisses vasculaires [177]. Il est le principal protéoglycane de type chondroïtin/dermatane sulfate de la matrice extracellulaire de nombreux tissus [178-180]. Il appartient à la famille des hyalectans (avec l'aggrécan, le neurocan, et le brévican) [181]. Il existe plusieurs isoformes générées par épissage alternatif [182]. Le nombre et la taille des chaînes glycaniques varient en fonction du tissu [183]. Au niveau des cellules endothéliales, le versican stimule la prolifération, la migration cellulaire et l'adhérence [184]. L'expression du versican est augmentée au cours des cancers du cerveau [185], du sein [53, 186], de la peau [187], de la prostate [188] et du poumon [189]. Au niveau des mélanomes, la différenciation de la cellule néoplasique modifie les isoformes du versican exprimées [190].

#### *Le CD44*

Le CD44 est un protéoglycane membranaire impliqué dans les interactions cellule-cellule, et intervenant dans la domiciliation et l'activation lymphocytaire, l'hématopoïèse, la migration cellulaire et la progression tumorale et l'activation des cellules endothéliales [191]. Il existe une grande diversité d'isoformes générées par épissage alternatif. L'expression du CD44 est augmentée par le FGF-2 et le VEGF, suggérant un rôle dans l'angiogénèse tumorale [191]. Le CD44 ne semble toutefois pas être impliqué dans le développement des tumeurs mais faciliterait plutôt l'apparition de métastases [192].

#### *La thrombomoduline*

La thrombomoduline est un protéoglycane membranaire de type chondroïtin sulfate. Elle est exprimée constitutivement par la cellule endothéliale vasculaire et lymphatique, les mégacaryocytes, les monocytes, les polynucléaires neutrophiles et certaines cellules tumorales de cancer de l'oropharynx, de l'œsophage et du poumon [193, 194]. Sur le plan tumoral,

l'expression de la thrombomoduline est inversement corrélée à la prolifération de cellules de mélanome et sa surexpression diminue la prolifération cellulaire *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo* [193]. La perte de l'expression de la thrombomoduline est corrélée à un stade avancé et à un mauvais pronostic. Les taux sériques de la forme soluble augmentent avec l'évolution de ce type de cancer [194].

Cette liste de protéoglycanes impliqués dans la croissance tumorale est loin d'être complète mais illustre l'extrême diversité de ces molécules et leur implication dans la croissance tumorale.

Malgré cette diversité quelques éléments communs peuvent être dégagés [114]. Ainsi, avec la transformation maligne, on retrouve généralement une diminution de la synthèse de protéoglycanes de type héparane sulfate [195, 196] ou dans certains cas seulement une diminution de la sulfatation de la chaîne glycanique [195]. Des modifications de structure de la chaîne glycanique ont été également décrites [197]. Dans certains cancers on peut observer également une augmentation de la concentration des héparanes sulfates qui est associée à une augmentation du pouvoir métastatique des cellules [114, 155, 198, 199]. L'augmentation de l'expression des protéoglycanes, comme par exemple dans les tumeurs pancréatiques, vont augmenter la signalisation médiée par le FGF-2 [200]. Il est connu que les héparanes sulfates sont impliqués comme corécepteurs dans un nombre important de voies de stimulation externe comme celles médiées par les FGF, HGF/SF ou Wnt. Ce rôle de corécepteurs est rempli par l'intermédiaire de séquences courtes de la chaîne glycanique latérale ayant un schéma de sulfatation bien défini. L'altération du degré de sulfatation des héparanes sulfates modifie donc la biodisponibilité et les signaux transmis par ces molécules [201]. En parallèle, la diminution de la quantité d'héparanes sulfates est accompagnée par une augmentation de la quantité de chondroïtine sulfate.

Les enzymes impliquées dans la synthèse ou la dégradation des protéoglycanes sont aussi impliquées dans la progression des lésions tumorales. Ainsi l'héparanase, une des enzymes majeures impliquées dans la dégradation des héparanes sulfates est surexprimée au niveau du front d'invasion, dans les lésions métastatiques ganglionnaires ou tissulaires. Elle participe ainsi à la dégradation de la matrice extracellulaire et donc à la progression locale et métastatique des tumeurs. L'absence d'expression de l'héparanase a été corrélée avec une meilleure survie dans certains cancers [162].

Les protéoglycanes jouent donc un rôle important dans la progression locale et métastatique des lésions tumorales (revue générale par Fuster [202]), mais le rôle exact de

chaque molécule dans la croissance des cancers et les possibilités pratiques de les utiliser comme cibles anti-tumorales restent encore à définir.

Endocan est aussi un membre de la famille des protéoglycanes avec une chaîne latérale de type dermatane sulfate. Il partage des fonctions communes avec l'ensemble des protéoglycanes dont l'interaction avec les facteurs de croissance et les intégrines, deux caractéristiques qui vont influencer sur ses fonctions.

### ***II.2.1.3 Interaction de la matrice avec les cellules tumorales***

Le rôle des protéoglycanes ne se limite pas à l'interaction avec les facteurs de croissance et à la fonction de soutien. En tant que composantes de la matrice extracellulaire ils interagissent avec les autres molécules de cette structure et les molécules de la surface cellulaire.

En effet, les protéoglycanes peuvent également lier certaines molécules d'adhérence, comme les intégrines. Ces dernières sont des hétérodimères composés d'une sous-unité  $\alpha$  et une sous-unité  $\beta$ . Il existe huit types de chaînes beta et dix-huit types de chaînes alpha pouvant créer plus de 25 types différents d'intégrines. Chaque combinaison forme un récepteur ayant une spécificité étroite pour un groupe de ligands [203].

Les intégrines peuvent transmettre des signaux externes vers la cellule par l'intermédiaire de la queue intracytoplasmique de la chaîne beta (phénomène dénommé « outside-in signaling »). L'activation des cascades de signalisation intracellulaire génère une modification des gènes exprimés, une réorganisation du cytosquelette, modifie l'adhésion et la survie des cellules [204]. Les intégrines interviennent dans l'attachement de cellules aux membranes basales ou aux autres cellules, mais peuvent également influencer l'entrée ou la sortie du cycle cellulaire [205] ou la motilité cellulaire après avoir fixé différents ligands présents dans la matrice extracellulaire [206]. Elles ont un rôle dans les maladies inflammatoires (intervenant dans la migration leucocytaire) mais aussi dans le cancer [207-209]. Il existe de nombreuses anomalies de l'expression des intégrines dans les cancers [210, 211]. L'intégrine  $\alpha v \beta 3$  est actuellement considérée comme un marqueur des mélanomes invasifs [212, 213] et son expression augmente le potentiel métastatique des cellules melanomateuses [214]. La surexpression de l'intégrine  $\beta 4$  induit un arrêt de la croissance cellulaire par l'intermédiaire de la surexpression d'inhibiteurs des « cyclin dependent kinases » (Cdk) [215]. L'expression de l'intégrine  $\alpha 2 \beta 1$  dans des cellules de cancer du sein faiblement différenciées induit un arrêt de la croissance cellulaire et la réversibilité du

phénotype tumoral [216]. Les intégrines transmettent également des signaux nécessaires à la survie cellulaire [204]. L'inhibition des interactions des intégrines avec leurs ligands inhibent la croissance cellulaire tumorale et peuvent induire une apoptose [217-220]. Les intégrines notamment l' $\alpha 5\beta 2$ , ont été également impliquées dans le contrôle de la formation de la matrice extracellulaire [221].

Les intégrines peuvent modifier le comportement de la cellule par rapport à son environnement en fonction de signaux internes à la cellule. Ce phénomène dénommé « inside-out signaling » consiste à réguler sur la membrane le nombre, la densité et l'affinité des intégrines pour leurs ligands extracellulaires en fonction de l'état intracellulaire et ainsi réguler la migration et l'invasivité des cellules [222]. Les intégrines de type  $\alpha v\beta 3$  et  $\alpha 6\beta 4$  ont été impliquées dans ce processus [223].

#### ***II.2.1.4 Composante inflammatoire de l'environnement tumoral***

Le microenvironnement tumoral comprend également des cellules inflammatoires impliquées dans la croissance ou la réponse immune anti-tumorale. Cet infiltrat inflammatoire comprend des cellules de la lignée myéloïde (neutrophiles, macrophages, cellules dendritiques, mastocytes et éosinophiles) ainsi que des lymphocytes [224]. La présence de ces cellules a été interprétée comme un signe de la réponse immunitaire anti tumorale. Toutefois, dans les modèles animaux la présence de ce type d'infiltrat est plus liée à la stimulation secondaire à la xénogreffe (même si il s'agit d'animaux immunodéprimés) qu'à une réponse immune anti-tumorale efficace. La présence de leucocytes intra-tumoraux est parfois un facteur de pronostic favorable [225]. Les leucocytes intra-tumoraux peuvent être aussi impliqués dans la progression tumorale [226-228]. En fait, les données actuelles montrent que l'immunogénicité des tumeurs reste faible et qu'elles développent des mécanismes complexes d'évasion de la réponse immune [229].

La relation entre inflammation et cancer a été noté depuis plus de 150 ans. Ainsi, Virchow en 1863 note que les cancers sont plus fréquents dans les sites où il existe une inflammation chronique [226]. Il est également connu qu'environ 15% des cancers sont le résultat d'une inflammation persistante [226], conséquence directe d'une infection chronique comme c'est le cas pour les tumeurs gastriques [230] ou celles du col utérin [231]. D'ailleurs, récemment un vaccin contre le papillomavirus a été mis sur le marché pour la prévention du cancer du col de l'utérus. Il a été également démontré que les traitements anti inflammatoires peuvent réduire le risque de certains cancers [232] comme les cancers colorectaux [233].

Les interactions entre l'inflammation et la tumorigénèse peuvent se réaliser à des niveaux multiples. Initialement il a été postulé que la toxicité induite par les radicaux libres, induits par l'inflammation, génère des lésions cellulaires capables de favoriser le développement de clones cellulaires anormaux [234]. Nous comprenons aujourd'hui que l'apparition des tumeurs dans les zones d'inflammation n'est pas la résultante directe de la prolifération des cellules au niveau local. Néanmoins, le risque de transformation néoplasique augmente chez ces cellules en prolifération rapide qui évoluent dans un environnement riche en médiateurs (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines et enzymes protéolytiques) et facteurs potentiellement génotoxiques. Ce microenvironnement cellulaire est très similaire dans l'inflammation et la tumorigénèse [71, 235].

Les études sur les tumeurs humaines montrent qu'il existe une corrélation positive entre l'infiltration par les cellules de l'immunité innée (notamment les mastocytes et les macrophages) et la densité vasculaire et que ces cellules expriment des facteurs de croissance pro-angiogéniques [236, 237]. Dans les tumeurs humaines l'intensité de l'infiltration par ces mêmes cellules est corrélée à l'angiogénèse et au développement tumoral [227].

#### **II.2.1.4.1 Les macrophages associés aux tumeurs**

De toutes les cellules inflammatoires impliquées dans la progression tumorale, les données les plus convaincantes sont disponibles pour les macrophages. Les macrophages tissulaires ont comme origine les monocytes circulants immatures qui vont migrer au niveau des différents tissus où ils subissent une maturation. Ces macrophages tissulaires ont des fonctions cytotoxiques et participent au remodelage tissulaire. Ils secrètent également un éventail large de cytokines, facteurs de croissance et de protéases. Le processus inflammatoire est initié par les macrophages résidents dans les tissus en réponse d'une stimulation locale bactérienne, chimique ou mécanique.

Les macrophages peuvent avoir un effet cytotoxique et intervenir dans l'immunité anti-tumorale. Néanmoins, pour que ces cellules deviennent cytotoxiques elles ont besoin d'être activées (comme par exemple par l'interféron gamma – IFN $\gamma$  ou le lipopolysaccharide – LPS). La toxicité des macrophages peut se réaliser soit directement, soit être médiée par les anticorps. On sait que l'immunogénicité des tumeurs reste modeste et que les anticorps anti-tumoraux, même si ils sont présents dans un bon nombre de localisations tumorales, sont insuffisants pour monter une défense efficace. Dans les modèles animaux, l'apparition d'une cytotoxicité tumorale efficace par les différentes cellules immunitaires nécessite généralement l'administration de cytokines comme l'IL12 qui augmente la réponse antitumorale par un

mécanisme dépendent de l'IFN $\gamma$  [238]. On sait actuellement que les tumeurs sont capables de modifier le profil de cytokines sécrétées par les macrophages, de diminuer leur sécrétion de cytokines cytotoxiques ou d'induire l'apparition de macrophages ayant un effet suppresseur [239]. Ainsi, la sécrétion de l'IL-10 et de prostaglandine E2 (PGE2) participe à la suppression de la réponse immune anti tumorale [239].

Dans les tumeurs, la présence d'une infiltration macrophagique intense est associée en général à un mauvais pronostic [240, 241] bien que quelques publications apportent des arguments contraires comme par exemple dans le cancer bronchique à non petites cellules [242]. Globalement, la majorité des publications montrent que ce type cellulaire semble être très important pour la croissance tumorale [243]. L'inoculation de tumeurs humaines chez des souris knock-out qui ne peuvent pas recruter des macrophages intra-tumoraux (par blocage de la sécrétion du CSF-1- Macrophage colony stimulating factor ou M-CSF) réduit fortement l'incidence des tumeurs invasives et inhibe presque totalement leur pouvoir métastatique [244, 245]. Néanmoins l'incidence des tumeurs *in situ* n'est pas modifiée. Les mécanismes précis qui impliquent le macrophage dans la progression tumorale sont encore mal connus mais font intervenir plusieurs médiateurs solubles. Cet effet semble être médié par la production de CSF-1 (Macrophage colony stimulating factor ou M-CSF). Dans les modèles animaux de tumeurs mammaires primitives chez la souris et le rat, les cellules tumorales et les macrophages migrent ensemble vers les vaisseaux. Ce mécanisme est dépendant du CSF-1 et de l'EGF puisque l'inhibition du CSF-1 ou de la signalisation intracellulaire par le récepteur de l'EGF abolit ce phénomène *in vivo* [246] et réduit la croissance tumorale [244]. La surexpression du CSF-1 permet de d'obtenir une accélération de la croissance tumorale tant dans les modèles de souris déficientes en CSF-1 que chez des souris normales [244]. Ceci suggère qu'il existe très probablement au niveau tumoral une boucle paracrine impliquant l'EGF et le CSF-1. *In vitro*, la stimulation des cellules tumorales par l'EGF ou des macrophages par le CSF-1 induit la formation de pseudopodes. Chaque type cellulaire augmente ainsi sa capacité de remodelage de la matrice et son invasivité locale [247]. De manière similaire, la chimiokine CCL2 (ou Monocyte Chemoattractant Protein-1 ou MCP-1) a été impliqué comme facteur majeur intervenant dans le recrutement intra-tumoral des macrophages dans plusieurs localisations tumorales dont les cancers du poumon [248]. Il est intéressant de noter que dans toutes les localisations tumorales où les macrophages ont été impliqués dans la croissance tumorale il existe également des données abondantes concernant la surexpression des facteur de croissance/chimiokines spécifiques aux macrophages [245].

Les macrophages soutiennent la croissance tumorale par leurs capacités d'intervenir dans le remodelage tissulaire, la production de facteurs de croissance et facteurs pro-angiogéniques [235]. Dans les étapes initiales de la tumorigénèse, les macrophages sont retrouvés au niveau de la membrane basale dans les zones de discontinuité de celle-ci. Ils sont également présents dans les tumeurs avancées au niveau du front d'invasion [243]. Ceci suggère que les tumeurs exploitent les capacités des macrophages à dégrader la matrice extracellulaire, leur permettant ensuite d'envahir les tissus environnants [241, 245, 249]. Il a été prouvé qu'il existe des relations étroites entre les cellules tumorales, les macrophages et les vaisseaux sanguins soutenant ainsi l'hypothèse que les macrophages augmentent les capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales [250]. Les macrophages augmentent la capacité des cellules tumorales de quitter la tumeur primitive et de pénétrer dans les vaisseaux (phénomène dénommé intravasation - qui est essentiel dans le processus de métastase) [249]. Les macrophages contrôlent donc la migration et l'extravasation des cellules tumorales expliquant ainsi dans les modèles animaux l'importance des macrophages dans le processus métastatique [241]. Ces données expérimentales expliquent pourquoi, dans le cancer du sein, la surexpression de CSF-1 et de l'EGF sont des facteurs indépendants de mauvais pronostic [241, 251].

Les macrophages sont également impliqués dans le processus d'angiogénèse. Les études sur les tumeurs humaines montrent qu'il existe une association entre la densité macrophagique locale et l'angiogénèse quantifiée par la densité micro-vasculaire [251, 252]. Dans certains modèles de cancer du sein la déplétion en macrophages réduit le switch angiogénique et le remodelage vasculaire [243]. Les macrophages produisent des facteurs angiogéniques comme le VEGF, l'endothéline-2 et l'activateur du plasminogène (uPA) [245, 253-255] et des facteurs inducteurs comme l'IL-1 qui stimule la transcription du VEGF [116]. Les signaux dérivés de la tumeur semblent recruter une population macrophagique particulière (exprimant le marqueur endothelial Tie2) qui est responsable du processus d'angiogénèse. La déplétion de cette population réduit l'angiogénèse et génère une régression tumorale [256].

#### **II.2.1.4.2 Rôle des neutrophiles infiltrant la tumeur**

Les neutrophiles représentent une autre population cellulaire qui est recrutée précocement dans le processus inflammatoire. Les données qui associent les neutrophiles et la progression tumorale sont moins nombreuses que pour les macrophages [224] et sont encore assez contradictoires. Les neutrophiles ont une fonction cytotoxique importante (notamment



dans les processus de rejet de greffe) et sont considérés comme des effecteurs importants de l'immunité innée antitumorale.

Les neutrophiles ont néanmoins été associés au processus d'instabilité génétique des tumeurs [257]. La présence d'une infiltration neutrophile importante a été associée à un pronostic défavorable dans les carcinomes bronchiques de type bronchiolo-alvéolaire [258] tandis que dans les carcinomes gastriques elle serait plutôt associée à un meilleur pronostic [259]. Dans les modèles animaux, l'élimination des neutrophiles par un anticorps monoclonal freine la croissance tumorale suggérant une action pro-tumorale de cette population [260]. Cette action pro-tumorale serait médiée par le recrutement actif de neutrophiles par la tumeur via des CXC – chimiokines [258] et l'inhibition de leur apoptose par l'intermédiaire des facteurs de croissance hématopoïétiques (G-CSF et GM-CSF) produits par la cellule tumorale [261]. Ces neutrophiles produisent des facteurs de croissance (comme le HGF/SF) qui augmentent la capacité de migration (et d'invasion locale) des cellules tumorales. Les niveaux élevés de HGF/SF et l'infiltration intense de la tumeur avec des neutrophiles sont associés à une survie plus courte des patients ayant un carcinome bronchiolo-alvéolaire [262]. Il a été également démontré que les neutrophiles tumoraux participent au processus d'angiogénèse par la production de VEGF et d'IL-8 [263] et par l'activation des metalloprotéases [264].

Malgré ces éléments d'autres études montrent que les neutrophiles interviennent dans la réponse antitumorale. Ainsi la déplétion des neutrophiles augmente l'efficacité des carcinogènes chimiques [265] et le recrutement de neutrophiles par G-CSF induit plutôt une diminution du pouvoir métastatique [266] ou réduit la tumorigénicité de certaines lignées tumorales [267]. Globalement le neutrophile est vu aujourd'hui comme un effecteur antitumoral important [268]. Néanmoins, les études de cette population restent peu nombreuses car la majorité se focalisent sur la réponse adaptative de cellules T.

#### **II.2.1.4.3 Les lymphocytes intra-tumoraux**

Le système immunitaire adaptatif intervient dans le contrôle du développement tumoral. [269] mais son rôle exact reste encore à définir. Il faut noter que les études épidémiologiques qui ont étudié l'incidence des tumeurs chez les patients immunodéprimés montrent que pour certaines localisations l'incidence des cancers diminue avec l'immunosuppression tandis que pour d'autres localisations elle augmente (revue par [269]). Le rôle du système immunitaire adaptatif est la reconnaissance du « non-soi » et de permettre la destruction rapide des cellules/organismes qui ne répondent pas à cette définition. Ce système est composé de cellules qui capturent et assurent le traitement de l'antigène et le présentent ensuite aux

cellules effectrices. Ces cellules (les lymphocytes T et B) subissent un processus de sélection et de maturation, sous l'influence des cellules présentatrices d'antigène et des facteurs solubles, donnant naissance à des cellules mémoire et aux cellules effectrices. L'activation de ces cellules devrait permettre une réponse efficace aboutissant à l'élimination de l'élément anormal, dans notre cas la cellule tumorale. Deux écueils majeurs réduisent l'efficacité de la réponse immune adaptative contre les tumeurs. Premièrement il est nécessaire que les tumeurs expriment à leur surface un antigène qui puisse être reconnu. L'apparition de ce type de néo-antigène n'est pas facile et de plus ils sont faiblement immunogènes. Le deuxième point concerne l'environnement tumoral qui n'est pas propice au développement d'une réponse immune efficace.

Il existe au niveau tumoral des mécanismes inducteurs de la tolérance immune qui diminuent ou même abolissent la réponse antitumorale. La faible immunogénicité des cellules tumorales entraîne un défaut d'induction ou de maintien de la réponse immunitaire ou même l'apparition d'une tolérance. En effet on observe au niveau de certaines tumeurs la présence des lymphocytes immunorégulateurs  $CD4^+ CD25^+$  (dits T régulateurs naturels) qui représentent jusqu'à 30% de l'infiltrat leucocytaire intra-tumoral [270]. Par ailleurs, des cytokines ayant des effets inhibiteurs sur la réponse immune (comme le *Transforming growth factor beta*-  $TGF\beta$  ou l'IL-10) peuvent également être produites localement par les cellules tumorales et par le stroma tumoral. Cet environnement peut alors favoriser la différenciation en lymphocytes T sécréteurs de cytokines anti-inflammatoires ou encore en lymphocytes à fonction régulatrice [271].

Actuellement, le système immunitaire adaptatif, à l'exclusion de cellules régulatrices, est vu comme ayant un rôle dans la limitation de la progression tumorale. Dans les années 50, Burnet propose le concept d'immunosurveillance [272]. Selon cette théorie, le système immunitaire est capable de reconnaître et de détruire les clones cellulaires anormaux qui sont produits continuellement dans l'organisme. Bien que cette théorie ait reçu certains arguments expérimentaux pour la soutenir [273] elle reste encore controversée.

Plusieurs éléments expérimentaux soutiennent l'effet positif de l'immunité adaptative dans la réponse anti-tumorale. *In vitro*, les lymphocytes  $CD8^+$  sont capables d'avoir un effet cytotoxique en reconnaissant les antigènes tumoraux via le MHC de classe I et tuent les cellules tumorales par lyse cellulaire. Les  $CD4^+$  peuvent également avoir une action anti-angiogénique, par le biais de l'IL-4 et de l'Interféron (IFN)- $\gamma$  [274]. De multiples modèles animaux ont montré qu'une manipulation de la réaction immune (injection de cellules dendritiques stimulées par l'antigène tumoral, injection de cytokines stimulant la réponse immune – IL2, IL12, ou le

transfert passif de cellules T effectrices) peut être efficace voire avoir un effet curatif en tant que thérapie anticancéreuse. Enfin, en clinique, on constate que la présence de leucocytes intratumoraux est associée, dans certaines localisations, avec un meilleur pronostic tumoral [225, 275-280].

Malgré des bases théoriques solides, les résultats très encourageants obtenus sur les modèles animaux et des réponses parfois spectaculaires sur des cas isolés, les études cliniques ont montré jusqu'à maintenant un effet modeste de la manipulation de la réponse immune dans le traitement des cancers. A ce jour, les modalités optimales de stimulation de l'immunité ou la population cible à qui ce traitement pourrait être utile restent encore à définir [281, 282].

### **III. ANGIOGENESE TUMORALE**

Il est facile d'oublier que le cancer n'est pas une maladie unique mais un ensemble complexe de maladies qui partagent des caractéristiques communes. Les travaux réalisés depuis plus de 50 ans ont permis néanmoins de caractériser les principes communs qui sont à la base du développement tumoral [25]. En dehors des modifications génétiques et épigénétiques qui touchent les mécanismes de contrôle de la croissance et de la mort cellulaire, toutes les tumeurs ont besoin d'un élément supplémentaire pour pouvoir croître et se développer – l'induction et la formation de vaisseaux sanguins ou angiogénèse. L'angiogénèse représente le processus de formation et de branchement de nouveaux vaisseaux à partir des vaisseaux préexistants. Ce processus est le résultat de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales. En effet, comme tout tissu normal ou pathologique les tumeurs ont besoin d'un apport adéquat en oxygène et d'assurer l'élimination de leurs produits métaboliques. Ces nécessités sont variables d'une tumeur à une autre et peuvent changer en fonction de l'étape évolutive de la tumeur. La formation de nouveaux vaisseaux et la densité microvasculaire de chaque tumeur a été considéré classiquement comme un marqueur de la stimulation angiogénique. Bien que ce paramètre soit parfois un élément d'évaluation du pronostic il dépend principalement de l'intensité du métabolisme de la cellule tumorale [283]. L'accès à une vascularisation efficace est essentielle pour qu'une tumeur dépasse le stade *in situ* [35] et est un des facteurs limitants de la croissance tumorale [284, 285]. En dehors d'une angiogénèse efficace les tumeurs restent au stade *in situ* et sont incapables de se développer [59, 286, 287]. Le développement tumoral macroscopique est régulé (du moins dans les stades initiaux) par l'intensité de l'angiogénèse et non pas par la

capacité proliférative des cellules tumorales [288]. Le développement d'une néo-vascularisation n'est pas spécifique au développement tumoral mais est un processus commun à de multiples pathologies non tumorales comme le psoriasis, la rétinopathie diabétique ou même l'obésité, l'athérosclérose et certaines maladies infectieuses [289]. La régulation de ce processus est faite par une balance entre les stimuli pro-angiogéniques et ceux anti-angiogéniques. L'induction de l'angiogénèse dépend de l'équilibre de cette balance. Chez l'adulte, la cellule endothéliale a un turnover extrêmement réduit (avec moins de 0,01% de cellules en phase de prolifération et une demi-vie de plus de cent voire mille jours). Sous l'influence des facteurs pro-angiogéniques, ces cellules peuvent proliférer rapidement avec un turnover de moins de 5 jours. L'initiation de ce processus d'angiogénèse, qui résulte du déséquilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques, porte le nom de « switch » angiogénique et intègre une série complexe d'événements comme la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, l'activation des cellules endothéliales, la sécrétion d'enzymes protéolytiques suivie par la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire, la prolifération des cellules endothéliales, leur migration et la formation de néo-capillaires.

Les cellules tumorales ne sont pas la seule source de facteurs pro-angiogéniques, les cellules stromales sécrétant des quantités importantes de ces facteurs. On connaît à ce jour plusieurs molécules angiogéniques (Tableau II). Ces facteurs angiogéniques entrent dans trois catégories majeures [290, 291] :

- les facteurs de croissance pléiotropes qui ont un effet angiogénique important
- les facteurs spécifiques de la cellule endothéliale
- les facteurs agissant par des mécanismes indirects en stimulant les autres facteurs angiogéniques.

En dehors de la sécrétion de ces médiateurs angiogéniques, des tumeurs particulières ont développé d'autres mécanismes originaux, pour s'assurer d'un apport nutritionnel suffisant. Ces tumeurs ont soit centré leur développements sur un réseau vasculaire existant soit participent à la formation de pseudo-capillaires sans intervention des cellules endothéliales.

Plusieurs revues générales récentes font le point sur les mécanismes et les facteurs solubles impliqués dans l'angiogénèse tumorale [290, 292-295]. Nous nous limiterons à énumérer les plus connus et ceux pour lesquels un lien avec endocan a été évoqué.

### ***III.1 Les FGF***

Le premier facteur angiogénique à être caractérisé a été le FGF-2 (ou le basic Fibroblast Growth Factor) [296] qui fait partie d'une famille comprenant plus de 19 membres. Il existe également plusieurs iso-formes générées par épissage alternatif. Cette molécule est un puissant mitogène pour les cellules endothéliales [297] mais elle agit aussi en stimulant la sécrétion du VEGF par les cellules stromales [298] et induit la formation de tubules dans les modèles d'angiogénèse *in vitro* (culture en 3D sur gel de collagène). Le FGF-2 a une action pro-angiogénique et augmente la croissance tumorale [299]. L'action biologique du FGF-2 (comme tous les membres de sa famille) est dépendante de sa fixation aux héparanes sulfate qui servent de corécepteurs et amplifient l'action mitogénique du FGF-2 sur les cellules cibles. Ainsi, la modification de la composition en protéoglycanes du stroma module l'action pro-angiogénique du FGF-2. Le FGF-2 est un facteur pléiotrope sans aucune spécificité pour la cellule tumorale ou endothéliale [300]. Une expression élevée de FGF-2 est présente dans différentes tumeurs tant au niveau local que dans le sang, surtout dans les cancers évolués [301-303]. Des études limitées suggèrent également que le FGF-2 pourrait être un facteur de pronostic indépendant des adénocarcinomes pulmonaires [304].

### ***III.2 Le VEGF***

Les facteurs agissant spécifiquement sur les cellules endothéliales comprennent la famille de VEGF (revues générales par Hicklin [305] et Ferrara [306]) et les angiopoïétines. Le VEGF appartient à une famille de facteurs de croissance qui comprend six membres : le VEGF-A (ou VEGF), PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et VEGF-E. Le VEGF (ou VEGF-A, initialement connu comme VPF - Vascular Permeability Factor avant sa caractérisation complète) est essentiel au développement embryonnaire puisque la perte d'un seul allèle induit une létalité embryonnaire secondaire aux altérations du développement vasculaire [307]. Les données *in vitro* montrent que le VEGF stimule la dégradation de la matrice extracellulaire, la prolifération, la migration et la formation de tubules par les cellules endothéliales et induit l'expression par ces cellules du uPA et de la MMP-1. *In vivo*, le VEGF augmente la perméabilité capillaire, étape importante du processus d'angiogénèse [308]. La production de VEGF est induite par le PDGF, l'EGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  [309] mais aussi par l'hypoxie [310].

Le VEGF ne représente toutefois pas une seule molécule. L'ARNm du VEGF subit un épissage alternatif donnant naissance à six isoformes contenant 121, 145, 165, 183, 189 ou

206 aminoacides [311]. La forme de 121 aminoacides ne se fixe pas sur l'héparine et elle diffuse librement. Les autres isoformes ont une affinité pour les glycanes qui augmente avec leur poids moléculaire. Cette affinité importante pour les glycanes fait que les formes VEGF<sup>189</sup> et VEGF<sup>206</sup> ne sont retrouvées que séquestrées dans la matrice extracellulaire et ne sont actives qu'après digestion par des protéases de la matrice extracellulaire (par la MMP-9 par exemple) ou après clivage de leur fragment C-terminal (par la plasmine) [312].

La forme produite de manière prédominante (notamment dans les cancers broncho-pulmonaires) est la forme contenant 165 aminoacides [299]. Le VEGF-B et le PlGF (Placental Growth Factor) semblent moins critiques pour le processus d'angiogénèse puisque la délétion de ces gènes ne génère pas d'anomalies de développement des souris. Il est donc possible que ces facteurs jouent un rôle redondant dans la vasculogénèse en suppléant le VEGF. Néanmoins, les souris déficientes en VEGF-B ou PlGF ont des anomalies de l'angiogénèse durant les processus d'ischémie, inflammation, réparation tissulaire et de croissance tumorale ce qui suggère que ces gènes interviennent principalement à l'âge adulte [313]. Par contre, les VEGF-C et -D jouent un rôle essentiel dans le processus de lymphangiogénèse et la délétion de ces gènes est létale. Le VEGF-E n'est pas une protéine animale mais une protéine virale du paroxavirus Orf. Il stimule de manière intense le VEGFR-2 (KDR/Flk-1).

### ***III.3 Les récepteurs du VEGF***

On connaît à ce jour deux récepteurs de haute affinité pour le VEGF-A: le VEGFR-1 (ou Flt-1) et le VEGFR-2 (KDR ou Flk-1 chez la souris). Il existe également un troisième récepteur de la même famille, le VEGFR-3 (ou Flt-4), mais il ne fixe pas le VEGF-A mais plutôt les VEGF-C et VEGF-D [314]. Les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 ont une homologie d'environ 44% de leur séquence protéique. Le récepteur VEGFR-2 semble exprimé sur toutes les cellules endothéliales tandis que le VEGFR-1 et VEGFR-3 semblent avoir une spécificité d'organe [305]. Le rôle exact du VEGFR-1 dans l'angiogénèse reste encore obscur. En effet, la signalisation par ce récepteur reste faible par rapport au VEGFR-2 et initialement il a été considéré comme un régulateur négatif de la signalisation par le VEGFR-2. Le VEGFR-2 est responsable de la majorité des effets du VEGF-A dans l'angiogénèse.

Le VEGF induit sur les cellules endothéliales plusieurs effets importants. Il induit une augmentation importante de la perméabilité vasculaire, étant plus de 50.000 fois plus puissant que l'histamine [308]. Cette augmentation de la perméabilité semble être importante pour l'angiogénèse puisque elle induit le dépôt de fibrine dans les espaces extravasculaires et

stimule les capacités pro-angiogénique du stroma [315]. Le VEGF induit également l'activation des cellules endothéliales en induisant l'expression d'un nombre important de gènes incluant des protéases impliquées dans la coagulation, des MMP, des intégrines et des mitogènes [305]. De manière intéressante, la stimulation des cellules endothéliales induit également l'expression d'endocan tant au niveau de l'ARN messenger [316, 317] que de la protéine [317]. Le VEGF induit également la prolifération des cellules endothéliales par l'intermédiaire du VEGFR-2 [318] et augmente la survie et la migration de ces cellules [306]. Tous ces éléments font actuellement du VEGF la cible principale des traitements anti-angiogénèse qui sont en cours d'étude préclinique, en phase de test clinique ou même en utilisation courante (Bevacizumab – Avastin®) - revue générale par Ferrara et Kerbel ref [319]. Néanmoins, il est également clair à ce jour qu'il existe une résistance à ces traitements soit par le développement de voies alternes permettant de soutenir l'angiogénèse soit par une instabilité génétique des cellules endothéliales qui peuvent elles aussi présenter des anomalies génétiques similaires aux cellules cancéreuses [320, 321]. Il n'existe à ce jour aucun marqueur permettant d'évaluer la réponse à ces traitements anti-angiogéniques [322, 323].

### ***III.4 Les angiopoïétines***

Malgré le rôle majeur du VEGF dans la biologie vasculaire, celui-ci agit de concert avec d'autres facteurs. Les angiopoïétines semblent être une classe importante de partenaires du VEGF. Ces protéines sont des ligands des récepteurs Tie qui sont une famille de récepteurs à activité tyrosine-kinase exprimés sur les cellules endothéliales. On connaît quatre membres de la famille des angiopoïétines (Ang 1 à 4). Les données expérimentales sont encore réduites sur ces molécules. Il semble que le récepteur primaire de ces molécules soit Tie2 tandis que Tie1 est engagé dans le cadre d'un complexe récepteur hétérodimère. La fonction d'Ang1 semble être de stabiliser la structure vasculaire et d'augmenter le diamètre vasculaire, tandis que le VEGF augmente principalement le nombre des vaisseaux. La protéine Ang2 semble être agoniste ou antagoniste du récepteur Tie2 en fonction du modèle utilisé [324].

### ***III.5 Autres facteurs angiogéniques***

Parmi les facteurs ayant un mode d'action indirect les mieux étudiés sont le TNF- $\alpha$  et le TGF- $\beta$ . Le TGF- $\beta$  induit l'angiogénèse et stimule l'expression du TNF- $\alpha$ , du FGF-2, du PDGF et du VEGF par les cellules inflammatoires recrutées au niveau de la tumeur [290, 325]. Le TNF- $\alpha$  augmente l'expression du VEGF et de ses récepteurs, de l'IL-8, et du FGF-2 par les cellules endothéliales expliquant ainsi ses propriétés angiogéniques [326, 327].



Tableau II Facteurs endogènes impliqués dans le contrôle de l'angiogénèse

Facteurs Pro-angiogéniques	Facteurs anti-angiogéniques
Facteurs de Croissance : VEGF, récepteurs du VEGF, FGF2, EGF, PDGF, PlGF, HGF/SF, TGF $\alpha$ et $\beta$ , TNF- $\alpha$	Glycoprotéines de la matrice : Trombospondine 1 et 2
Protéases : Cathepsine, metalloprotéases, uPA	Fragments de dégradation du collagène : angiostatine, endostatine, tumstatine, canstatine
Cytokines : IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1	Cytokines : IFN- $\alpha$ et - $\beta$ , IP-10, IL-12, IL-18
Autres : Angiopoietine 1, intégrines, hypoxie	Inhibiteurs des facteurs de croissance : Récepteurs solubles du VEGFR, angiopoietine 2
	Autres : PF4

### ***III.6 Le mimétisme vasculaire***

Même s'il est clair aujourd'hui que toute tumeur a besoin d'un support vasculaire suffisant pour pouvoir croître, il existe cependant des cancers qui ont « résolu » ce problème d'une manière différente. Ainsi l'astrocytome, une tumeur cérébrale très invasive, ne recrute pas de nouveaux vaisseaux tumoraux mais dirige plutôt son extension autour des axes vasculaires préexistants. Un autre mécanisme original qui participe à l'apport sanguin tumoral est le mimétisme vasculaire. Il s'agit de la capacité des cellules de certaines tumeurs d'acquies un phénotype qui leur permet de créer des structures tubulaires similaires aux vaisseaux sanguins. L'apparition de ces pseudo-vaisseaux n'est pas un phénomène vasculaire puisqu'ils n'intègrent pas de cellules endothéliales, la paroi de ces structures étant composée uniquement de cellules tumorales. Ce phénomène a été mis en évidence par Maniotis et al [328] sur des mélanomes. Il est intéressant de constater que ce phénomène de mimétisme vasculaire est associé à une invasivité et un pouvoir métastatique plus élevés des tumeurs ou lignées tumorales qui l'expriment. L'analyse transcriptionnelle de ces tumeurs /ou lignées tumorales montrent qu'elles surexpriment un certain nombre de gènes associés à l'angiogénèse (Tie-1, Thrombospondine, certaines formes de VEGF – B et C) ou permettant à ces cellules de s'assembler en pseudo-tubules (comme la VE-cadhérine, EphA2 ou la laminine) – pour une analyse détaillée de l'expression des gènes voire les références [329, 330]. Il est intéressant de noter que le VEGF (ou VEGF-A) n'est pas retrouvé parmi les gènes surexprimés. Par contre, endocan est surexprimé de manière extrêmement importante (plus de 40 fois) dans ces tumeurs agressives. Il s'agit d'une des rares exceptions de cellule tumorale qui exprime endocan (expression qui est associée à un phénotype pseudo-endothelial), cette molécule étant normalement exprimée seulement par les cellules endothéliales.

Des phénomènes similaires au mimétisme vasculaire ont été caractérisés également dans des xénogreffes de sarcomes [331] ou carcinomes mammaires de rat [332]. Il n'est pas clair si dans ces situations, la formation de ces pseudo-vaisseaux est la résultante d'un processus tumoral actif ou des forces hémodynamiques qui « sculptent » des passages dans la tumeur [333]. Il est également possible que les aspects de mimétisme vasculaire représentent un processus plus général puisque certains auteurs ont montré que les parois des vaisseaux intra-tumoraux composées de cellules tumorales (et donc dépourvues de cellules endothéliales) peuvent représenter jusqu'à 25% de la surface vasculaire [334]. Malgré les données expérimentales assez solides cette théorie du mimétisme vasculaire reste encore controversée [335, 336] et il est nécessaire de clarifier si elle est spécifique aux mélanomes ou est présente dans plusieurs localisations tumorales.

## **IV. MARQUEURS ENDOTHELIAUX**

### **TUMORAUX**

L'angiogénèse est un des processus fondamentaux impliqués dans la croissance tumorale et des efforts importants ont été fournis pour développer des thérapeutiques ciblant l'angiogénèse et/ou la cellule endothéliale. Beaucoup d'éléments théoriques et expérimentaux apportent des arguments pour l'utilité de ce type de thérapie [337]. En premier lieu, les cellules endothéliales sont au contact direct du sang ce qui facilite la délivrance de la thérapie et permet d'utiliser des molécules ayant un poids moléculaire élevé comme les protéines recombinantes ou les anticorps monoclonaux. Deuxièmement, le ciblage de l'endothélium pourrait permettre de toucher indirectement un grand nombre de cellules tumorales car chaque neo-capillaire nourrit plusieurs centaines voire plusieurs milliers de cellules. On peut aussi espérer qu'une thérapie anti-endothéliale permettrait d'éviter l'écueil constitué par l'hétérogénéité des cellules tumorales. Une thérapie anti-endothéliale, donc dirigée contre des cellules considérées comme « génétiquement stables » minimiserait également le risque d'apparition d'une résistance à la thérapie. Enfin, le fait de concevoir une thérapie contre un mécanisme commun à une grande variété de tumeurs et/ou de stades évolutifs fait espérer que cette thérapie soit efficace dans un grand nombre de situations cliniques.

### ***IV.1 Stratégies thérapeutiques ciblant la cellule endothéliale***

Une première approche possible est de cibler les molécules angiogéniques connues comme les VEGF. Cette approche a eu comme résultat (entre autres) le développement du Bevacizumab (Avastin®) un anticorps anti-VEGF qui est actuellement utilisé en clinique pour le traitement des cancers du colon métastatiques [338]. Malheureusement, à ce jour, il n'existe aucun marqueur fiable qui puisse indiquer qu'une tumeur est ou non sensible à une thérapie angiogénique, ni d'évaluer l'efficacité de ce type de traitement [322, 323]. Même si ce type de traitement semble efficace pour augmenter la survie de certaines catégories de cancers, comme ceux du colon et du rein [339], il est clair que ces tumeurs continuent de croître malgré cette thérapeutique tandis que dans d'autres localisations comme le sein l'effet semble plus modeste voire inexistant [340]. La solution à ce type de problème est soit d'imaginer des moyens plus efficaces d'inhiber les molécules angiogéniques [341] soit d'utiliser le vaisseau tumoral comme cible directe de médicaments cytotoxiques puissants. Cette stratégie dénommée « ciblage vasculaire » (ou « vascular targeting ») consiste à délivrer de manière spécifique aux néo-vaisseaux tumoraux des agents cytotoxiques puissants. En pratique il s'agit d'identifier des molécules très spécifiques de la cible voulue et qui sont exprimées à sa surface avec une intensité suffisante. Ensuite on doit trouver un mécanisme d'adressage spécifique pour cette cible (généralement des anticorps monoclonaux mais aussi des séquences peptidiques courtes ayant une forte affinité pour leur récepteur – la cible). On peut ensuite conjuguer ces molécules (qui servent de transporteur) avec une autre molécule capable d'induire une cytotoxicité importante : toxines bactériennes, chimiothérapie, molécules radioactives, ou inhibiteurs spécifiques des certaines voies métaboliques). On peut ainsi espérer obtenir une distribution très localisée de la molécule thérapeutique avec une atteinte minimale des autres tissus/cellules.

Il serait donc intéressant de disposer de marqueurs endothéliaux spécifiques voire de marqueurs spécifiques à l'endothélium tumoral ou même spécifiques d'un certain type de tumeur. Ce type de marqueur pourrait être également utile pour surveiller au cours du traitement le développement de la vascularisation tumorale.

### ***IV.2 Identité de l'endothélium tumoral***

Il est donc nécessaire, avant de créer et de tester une thérapie basée sur un ciblage vasculaire, d'identifier des marqueurs spécifiques à la cellule endothéliale tumorale. La première question est de démontrer que les cellules endothéliales expriment des marqueurs

qui lui sont spécifiques. Ainsi, l'endothélium des organes lymphoïdes exprime des récepteurs spécifiques permettant une domiciliation sélective des différentes populations lymphocytaires et certains autres organes comme le poumon par exemple, expriment des antigènes spécifiques au niveau endothélial [342, 343]. La preuve du concept que les cellules endothéliales de chaque organe ont des caractéristiques spécifiques a été apportée par l'équipe de Ruoslahti (pour une revue générale voir références [344] et [345]). Ces auteurs utilisent la technique du phage-display pour montrer qu'il existe des peptides capables de se fixer dans différents organes/ tissus - incluant ici le tissu tumoral. Toutefois, l'affinité de liaison entre la cible endothéliale et les peptides obtenus reste modeste et il est ensuite difficile d'identifier précisément la cible.

L'utilité de ces marqueurs spécifiques de l'endothélium pourrait être également diagnostique et pronostique. En effet, puisque l'angiogénèse est une condition *sine qua non* de l'invasivité des tumeurs et conditionne leur pouvoir invasif/métastatique on pourrait imaginer d'utiliser ces marqueurs pour le diagnostic de tumeurs microinvasives ou pour l'évaluation du pronostic en identifiant les tumeurs très angiogéniques.

Dans les vaisseaux tumoraux l'expression spécifique de certains gènes est principalement due au processus d'angiogénèse. Toutefois ces gènes peuvent être surexprimés indépendamment de la stimulation angiogénique en raison seulement de l'hypoxie locale [346], des contraintes hémodynamiques liées à la circulation chaotique dans un réseau vasculaire désorganisé [284] ou comme résultat de la stimulation engendrée par les diverses cytokines ou autres facteurs solubles relâchés dans l'environnement par les cellules tumorales ou inflammatoires.

Du point de vue pratique l'identification de ce type de marqueurs spécifiques de l'endothélium se heurte à trois écueils :

- la difficulté d'isoler des cellules endothéliales pures à partir d'un tissu/tumeur sans passer par une étape de culture qui pourrait altérer l'expression de différents marqueurs de surface ;
- trouver une modalité permettant d'analyser un grand nombre de gènes de manière simultanée
- trouver un modèle animal dans lequel l'expression de ces mêmes molécules est conservée afin de pouvoir tester *in vivo* les hypothèses générées à partir des résultats *in vitro*.

La première publication qui a permis d'identifier un grand nombre de cibles endothéliales spécifiques aux tumeurs est faite par St croix en 2000. Après purification des

cellules endothéliales, ces auteurs utilisent la technique SAGE qui permet d'identifier des « tags » spécifiques aux gènes exprimés par l'endothélium [347]. Bien que cette technique peut introduire des biais dans la quantification exacte du nombre relatif de copies de gènes exprimés [348] elle permet d'étudier simultanément un grand nombre de gènes (comme d'ailleurs les biopuces ADN ou microarrays) sans avoir besoin de connaître à priori les gènes impliqués. Cette approche a permis d'identifier plus de 90 séquences de gènes ayant une modulation de leur expression dans l'endothélium et surtout 46 séquences appartenant à des gènes ayant une surexpression importante dans l'endothélium tumoral (ou TEM – tumor endothelial marker). Une partie de ces séquences correspondaient à des EST (expressed sequence tags) de gènes non identifiés donc sans qu'on puisse connaître leur fonction. Cette approche a permis d'identifier et de choisir pour étude ultérieure 10 séquences correspondant à des marqueurs tumoraux endothéliaux très spécifiques.

La spécificité endothéliale et tumorale de ces marqueurs a été ensuite confirmée par la même équipe mais aussi par d'autres publications qui évoquent également un intérêt pronostique éventuel de ces marqueurs [349, 350].

Dans un autre travail ces mêmes auteurs démontrent que ces marqueurs endothéliaux tumoraux sont conservés tout au long de l'évolution puisque ils sont en grande partie communs à l'homme et à la souris [351].

Ainsi, ces travaux et les études ultérieures sur les marqueurs endothéliaux tumoraux, ont permis de démontrer que des cibles endothéliales spécifiques aux tumeurs existent. Ils ont également permis l'identification d'un certain nombre de cibles pertinentes et ont évalué leur valeur diagnostique et pronostique.

Il est intéressant de noter qu'endocan fait partie des marqueurs spécifiques de l'endothélium [352] et qu'il est exprimé aux niveaux de l'endothélium de diverses tumeurs [353, 354].

# **V. ENDOCAN MOLECULE**

## **ENDOTHELIALE**

Endocan ou ESM-1 pour *Endothelial Specific Molecule-1* est un protéoglycane original cloné dans notre laboratoire en 1996. Son expression préférentielle par l'endothélium pulmonaire et sa régulation par des facteurs de croissance et des cytokines, lui confèrent un rôle dans les pathologies tumorales et inflammatoires.

### ***V.1 Structure***

#### **V.1.1 Le gène et l'ADNc**

Le clonage d'endocan a été fait de manière fortuite, par criblage d'une banque d'ADNc d'HUVEC, dans le but d'isoler l'ADNc codant pour un auto-antigène de 55 kDa potentiellement impliqué dans une forme sévère d'asthme. Un sérum immun dirigé contre cet antigène a été obtenu chez le lapin et utilisé pour le criblage. Un ADNc de 2 kb fut isolé, correspondant à un ARNm de séquence inconnue et dont l'expression est apparue restreinte aux cellules endothéliales, d'où sa première dénomination, *Endothelial Specific Molecule-1*, ESM-1 [355]. Bien que le clonage d'endocan ait été réalisé à partir d'HUVEC (cellules endothéliales humaines des veines ombilicales), celui-ci est exprimé dans tous les types de cellules endothéliales (pulmonaires, du derme, des artères coronaires et pulmonaires) [356].

Le gène *esm1*, cloné dans le laboratoire, est unique et il est localisé sur la partie proximale du bras long du chromosome 5 (5q11.2). Il s'étale sur 12 kb [355]. Le promoteur

est composé de 3888 pb et contient les boîtes CAAT, GC et TATA (<sup>-39</sup>TATAAAA) caractéristiques. Il est composé de nombreux sites putatifs de liaisons aux facteurs de transcription dans les 420 premiers nucléotides avant le site de début de la transcription: trois sites GATA dont 1 dit palindromique (GATATC), deux sites AP1, trois sites AP4, un site NF1, trois sites Ets dont 1 dans l'exon 1 (+16) et un site CRE-like (dit CREB/ATF). Un palindrome de 6 pb est également retrouvé dans ses premiers nucléotides (<sup>-58</sup>GCATGC)[356]. Enfin, un site Smad3/Runx2 a été identifié plus loin (-1172) [357]. La région -81 à +58 du promoteur porte la spécificité d'expression endothéliale [356].

L'ADNc d'endocan de 2006 pb contient un cadre fermé de lecture de 552 nucléotides débutant par un codon d'initiation ATG au sein d'une séquence consensus Kozak (AAC<sup>+1</sup>ATGA). La région 3' non codante de 1398 nucléotides contient des domaines AREs (domaines riches en AUUUA) et contient 66% de A+U, impliqués dans la stabilité de l'ARNm [355]. Ces motifs sont impliqués dans le contrôle de la dégradation de l'ARNm avec probablement une dégradation rapide pour l'ARNm d'endocan. Cependant, des protéines se fixant à l'ARNm comme la protéine HuR peuvent stabiliser l'ARNm d'endocan [358]. Cette région contient également 5 sites de polyadénylation mais seul le dernier semble être fonctionnel [355].

Alors que par Northern blot un seul ARNm avait été détecté dans les cellules endothéliales primaires issues d'HUVEC [355], Aitkenhead et collaborateurs ont observé la présence de 2 ADNc issus des cellules endothéliales. Ces deux ADNc ont 150 pb de différence et sont le résultat d'un épissage alternatif qui implique l'exon2 d'endocan [359].

Des orthologues d'endocan ont été retrouvés chez le singe, la souris, le rat, le chien, la vache et le lapin. L'analyse par Southern-blot indique que les gènes sont uniques et hautement conservés [355]. Chez le poulet et la levure aucun orthologue n'a été détecté. L'analyse du promoteur de l'orthologue chez la souris montre que tous les sites putatifs de liaisons aux facteurs de transcription sont présents et que la région régissant la spécificité pour l'endothélium (-81 à +58) est hautement conservée (91% d'homologie) [356]. De même, l'ADNc de l'orthologue du rat, composé de 2000 nucléotides contient un cadre de lecture fermé de 552 pb et une longue région 3' non codante d'environ 1,4 kb très semblable à la région 3' non codante humaine [360].

Récemment il a été démontré que la protéine Hhex, un répresseur de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'angiogénèse (VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR/Flk-1, Tie-1, Tie-2, neuropiline-1), est aussi un répresseur de l'expression d'endocan. Le promoteur du gène ESM-1 contient 10 séquences putatives de liaison de Hhex dont une, située dans la



position 5' entre -8835 et -8828, semble être la plus importante pour le contrôle de l'expression d'endocan [361].

### V.1.2 Structure protéique

L'ADNc code pour une protéine de 184 acides aminés. Le clivage du peptide signal NH<sub>2</sub>-terminal hydrophobe de 19 acides aminés donne lieu à un polypeptide mature de 165 acides aminés qui est sécrété. L'analyse de la séquence montre une région N-terminale riche en cystéine (18 sur les 110 premiers acides aminés), une région riche en acides aminés aromatiques (<sup>113</sup>FPFFQY, dénommée la région F-rich) et une région C-terminale de 34 acides aminés. Trois sites putatifs de O-glycosylation, 1 site putatif de N-myristoylation, des sites de phosphorylation, dont 3 pour la protéine kinase C, et 5 pour la kinase *caseique II* ont été identifiés par analyse bioinformatique de la séquence du polypeptide [354]. Aucun site de N-glycosylation n'a été observé [355]. La modélisation en trois dimensions, à partir de structures connues, prédit un polypeptide avec une face électronégative et une autre électropositive similaire à un dipôle [354]. Les mutations des phénylalanines 115 et/ou 116 réduisent la capacité d'endocan à se fixer sur la Phenyl-Sepharose, suggérant une localisation de la région F-rich accessible à la surface de la molécule [362]. L'orthologue chez le rat (dénommé initialement PG25 et isolé initialement à partir de l'hypophyse) montre une forte homologie de séquence peptidique de 74 % [360].

Le polypeptide entier ne montre pas d'homologie suffisante avec d'autres molécules pour le classer dans une famille connue. Néanmoins, le domaine N-terminal montre une homologie entre 15 et 28% avec des membres de la famille IGFBP (*Insulin-like Growth Factor Binding-Protein*), caractérisée de part leur haute teneur en cystéines et de par leur affinité pour l'IGF [354]. Cependant il faut noter qu'il n'a pas été démontré qu'endocan fixe ces molécules, et cela le classerait dans la sous-famille des IGFB-rP (*Insulin-like growth factor binding related protein*) et est ainsi dénommé IGFB-rP6 [363]. Une séquence EGF-like est également observée dans la région riche en cystéines. Enfin, la séquence d'endocan montre des similitudes avec la séquence des intégrines β2 [355].

Dans le lysat cellulaire de cellules endothéliales (HUVEC et SV1), endocan apparaît sous la forme de deux doublets de 14 et 18 kDa en condition non réduite correspondant aux deux isoformes résultant de l'épissage alternatif. Le poids moléculaire du polypeptide déterminé par gel-filtration est de 21,8 kDa, concordant avec le poids moléculaire théorique ainsi qu'avec le poids moléculaire apparent d'endocan de 20 kDa en condition réduite dans un gel de polyacrylamide. La différence de poids moléculaire apparent entre la condition réduite

et non réduite suggère la présence de ponts disulfures dans la structure secondaire d'endocan [364].

Dans le surnageant d'HUVEC et dans le plasma, le poids moléculaire apparent d'endocan par gel filtration est de 400 kDa tandis que le poids moléculaire apparent en western blot est de 50 kDa, suggérant une modification post-traductionnelle de la protéine. La présence d'un agent réducteur ne modifie pas le poids moléculaire apparent, suggérant qu'il n'y a pas de multimérisation via des ponts disulfures entre polypeptides [355]. La détection d'endocan en bleu Alcian et non pas en bleu de Coomassie indique un état glycosylé de la protéine [355]. Parmi les trois sites putatifs de O-glycosylation, seule la mutation de la sérine 137 montre un changement de poids moléculaire du produit sécrété de 50 kDa à 20 kDa, concordant avec le poids moléculaire du polypeptide seul. Endocan subi donc une modification posttranscriptionnelle par O-glycosylation au niveau de la sérine en position 137.

La caractérisation du GAG d'endocan, par digestion enzymatique, a montré que celui-ci appartenait à la famille des chondroïtines sulfates. La présence d'acide iduronique dans la composition du GAG ainsi que la susceptibilité à la chondroïtinase B permet de préciser sa nature exacte en tant que dermatane sulfate. Les acides iduroniques sont relativement rares, représentant 5,8% de résidus osidiques. Le GAG est hautement sulfaté (97,8%), principalement mono-4-O sulfaté (66,5%) [365].

En conclusion, endocan est un protéoglycane composé d'un polypeptide de 20 kDa et d'une chaîne de type dermatane sulfate lié de manière covalente au niveau de la sérine 137.

## ***V.2 Expression de l'ARNm et régulation de l'expression***

L'ARNm d'endocan est exprimé préférentiellement par l'endothélium [355]. L'expression d'endocan est constitutive dans les cellules endothéliales [352]. La région -81 à +58 du promoteur et plus particulièrement le premier motif Ets (-77) et le motif CRE-like (-68), portent cette spécificité d'expression. Ces deux motifs sont également retrouvés dans des promoteurs de gènes spécifiques de l'endothélium tels que la eNOS ou l'ICAM-2 ou le VEGFR-1 (Flt-1). Cependant, l'expression endothéliale d'endocan est plus forte et plus spécifique que pour le eNOS, le facteur de Von Willebrand et l'ICAM-2 [356].

L'ARNm d'endocan a été originellement décrit comme spécifique du poumon et du rein, mais la protéine est exprimée aussi au niveau des vaisseaux du colon [355]. Aucune expression n'avait pu être détecté dans le cœur, le cerveau, le placenta et le pancréas qui sont

pourtant des organes hautement vascularisés [355]. Récemment, l'expression d'endocan à des niveaux beaucoup plus faibles que dans le poumon et le rein a été mise en évidence au niveau des adipocytes isolés, et des extraits de testicules, d'intestin grêle et de rate [359, 366, 367].

L'analyse par immunohistochimie, dans les HUVECs, de l'expression d'endocan montre un marquage diffus dans le cytoplasme mais pas de marquage membranaire. L'expression au niveau du poumon montre une expression constitutive au niveau des veines, des artères et des capillaires alvéolaires, ainsi qu'au niveau des cellules épithéliales des bronches et des glandes sous-muqueuses. Au niveau du rein, l'expression d'endocan est observée au niveau des cellules épithéliales tubulaires. Enfin dans l'intestin, l'expression d'endocan est retrouvée au niveau des capillaires et des veines de la "*lamina propria*". L'expression d'endocan est donc détectée tant au niveau épithélial qu'au niveau endothélial [364]. Lorsque la lignée cellulaire HEK (Human Embryonic Kidney) 293 est transfectée avec l'ADNc d'endocan, outre l'endocan secrété, un marquage diffus cytoplasmique est observé (aucun marquage sur la membrane) [362]. De même, au niveau des adipocytes l'expression d'endocan est localisé dans le compartiment intracellulaire [366].

L'expression d'endocan est modulée par les cytokines pro-inflammatoires [355]. La stimulation des HUVEC par le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$  augmente l'expression d'endocan avec un pic à 18 heures; l'IL-4 et l'IFN $\gamma$  ne modifient pas cette expression. De manière surprenante, l'interféron gamma (IFN $\gamma$ ) inhibe la stimulation induite par le TNF- $\alpha$  [355]. Le TGF- $\beta$ 1 (et non le TGF- $\beta$ 2) a également été montré comme inducteur de l'expression de l'ARNm d'endocan [357, 368]. Ceci est en concordance avec le motif Smad3/Runx2 de réponse au TGF- $\beta$ 1 identifié dans le promoteur d'endocan [357]. Le LPS induit l'expression d'endocan par certaines lignées cellulaires endothéliales [369]. L'expression de l'ARNm d'endocan est également induite dans les cellules endothéliales par les acides gras libres produits par la lipolyse des VLDL (Very Low Density Lipoproteins) par la lipoprotéine lipase [370]. Ces produits de lipolyse induisent également l'expression d'autres molécules pro-inflammatoires comme le VCAM-1 ou l'IL-8 [371]. Le mécanisme impliqué est probablement une stabilisation de l'ARNm par interaction avec les séquences riches en A et U de la partie 3' non traduite [370]. L'expression de l'ARNm d'endocan (humain et rat) dans les adipocytes est modulée par les phorbol-esters et par l'acide rétinoïque [366]. Ces deux agents induisent la voie PKC activant le facteur de transcription AP-1 qui a deux sites de liaison dans le promoteur d'endocan [356, 366]. De même, l'hydrocortisone et l'insuline diminuent

l'expression de l'ARNm d'endocan dans les adipocytes. De manière surprenante, le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 ne modifient pas l'expression de l'ARNm d'endocan dans ce type cellulaire [367].

Il est également intéressant de noter qu'au niveau de l'ARNm, endocan est l'une des molécules qui est surexprimé de manière très importante (>25 fois) par la cellule endothéliale en cas d'exposition à un flux sanguin non laminaire [372]. Corroboré au fait que l'expression d'endocan est corrélé de manière négative avec la protéine C réactive chez les patients obèses cet élément suggère qu'endocan pourrait intervenir dans le processus de formation des plaques d'athérosclérose en tant que facteur protecteur.

L'expression d'endocan est également modulée par des facteurs de croissance angiogéniques tels que le VEGF et le FGF-2. Ainsi la stimulation d'HUVEC avec du VEGF pendant 24h augmente l'expression de l'ARNm de 2,4 fois, alors que l'HGF ne la modifie pas [316, 373, 374]. On ne connaît pas à ce jour les récepteurs et les voies impliquées dans la stimulation de la sécrétion d'endocan par le VEGF mais des résultats préliminaires semblent impliquer le VEGFR-2 (Flk-1) et la PKC [375]. Ces résultats lient endocan au processus d'angiogénèse.

En effet, dans un modèle d'angiogénèse *in vitro* de cellules endothéliales stimulées par le VEGF et le FGF-2 et cultivées sur des gels tridimensionnels, endocan est l'un des gènes très nettement surexprimés lors de la formation de pseudo-capillaires [359]. Cependant, le blocage de l'expression d'endocan par des oligonucléotides anti-sens n'altère pas la formation de pseudo-capillaires. Il est donc probable qu'endocan représente un marqueur du processus d'angiogénèse sans jouer un rôle essentiel.

Chez l'homme, de nombreuses études par biopuces ont montré que l'ARNm d'endocan est augmenté dans divers cancers. Dans le cancer du rein endocan est parmi les gènes dont l'expression est la plus augmentée [376-378]. Dans le cancer du poumon endocan fait partie d'un cluster de 42 gènes permettant de prédire un risque plus important de décès dans les 12 mois [379]. Par ailleurs, plusieurs études du transcriptome des cancers du rein montrent une augmentation très fréquente de l'ARNm d'endocan (5 cas sur 14, 8 cas sur 8 et 86 sur 88 patients) [359, 376-378]. De manière surprenante, certains tissus n'expriment pas endocan en condition physiologique l'expriment en condition pathologique néoplasique. Dans le cancer du sein, une étude sur 78 patientes a permis de définir un panel de 70 gènes qui prédit un risque élevé de développer des métastases et de décès à 5 ans, endocan étant l'un des gènes les plus surexprimés [380]. Dans le cancer de la prostate, l'expression d'endocan (associé à 9 autres gènes) a été décrite comme une signature des tumeurs métastatiques [381]. Enfin, dans une étude sur 30 lignées cellulaires de mélanome humain, l'ARNm d'endocan est

surexprimé par les cellules mélanomateuses hautement invasives. L'expression d'endocan (ainsi que d'autres gènes associés à l'angiogénèse) est associée dans ces cas au processus de mimétisme vasculaire [329, 382].

Le taux d'ARNm d'endocan a pu être corrélé avec l'agressivité et la vascularisation de la tumeur. Ainsi, des données préliminaires sur des petits groupes de patients ont montré que l'ARNm d'endocan pouvait être considéré comme un marqueur de l'angiogénèse dans les cancers du rein, du sein, de l'utérus, de l'estomac et du rectum [359]. De même, une forte corrélation a pu être mise en évidence entre les taux d'ARNm d'endocan et ceux du VEGF et du VEGFR2 (KDR). Ainsi, endocan pourrait être un marqueur de l'état de stimulation angiogénique d'une tumeur [359].

### ***V.3 Expression protéique***

*In vivo*, endocan est détecté dans le courant circulatoire. Le taux moyen d'endocan sérique est d'environ 1 ng/ml chez les sujets sains [364]. Les taux sériques d'endocan sont nettement plus élevés dans diverses pathologies où il existe une stimulation endothéliale. Sur une petite série de 8 patients atteints de choc septique, les taux sériques moyens d'endocan étaient significativement augmentés à 7,8 ng/ml [364]. Une autre étude portant sur 50 patients atteints d'un cancer pulmonaire montre une élévation significative des taux sériques d'endocan ( $3.34 \pm 0.37$  ng/ml) par rapport aux témoins sains [362].

### ***V.4 Fonctions d'endocan***

La nature protéoglycanique d'endocan indique une certaine bivalence fonctionnelle attribuée de manière distincte à la partie glycanique ou la partie protéique.

*In vitro*, endocan se fixe aux lymphocytes et aux monocytes circulants ainsi qu'à des lignées lymphoblastoïdes humaines Jurkat et SI-B1 [383]. La liaison physique avec la famille des intégrines  $\beta 2$ , molécules membranaires présentes à la surface de ces cellules, a été confirmée par la coimmuno-précipitation du LFA-1 et d'endocan. Avec une constante d'affinité de  $18,7 \times 10^{-9}$  M, cette liaison induit une inhibition de la fixation de l'ICAM-1 sur le LFA-1 de 64 %. Cela suggère qu'endocan pourrait intervenir dans le contrôle du recrutement leucocytaire en tant que compétiteur de l'ICAM-1 dans l'interaction LFA-1/ICAM-1 [383].

Le facteur de croissance HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor) peut se fixer sur endocan avec une constante d'affinité de  $6,6 \times 10^{-9}$  M. Cette fixation forte est dite monophasique, c'est à dire qu'il n'y a qu'un seul site de liaison de l'HGF/SF sur endocan. L'HGF/SF induit une augmentation de la prolifération de cellules épithéliales (HEK 293).

Alors qu'endocan n'a pas d'effet mitogène sur cette lignée, il amplifie l'effet proliférateur de l'HGF/SF, de manière similaire à l'héparine. Cette deuxième propriété indique un rôle potentiel d'endocan dans la régulation de la prolifération cellulaire induite par les facteurs de croissance [365]. Cette propriété d'endocan de se lier aux facteurs de croissance et son l'activité pro-tumorale potentielle est portée par la chaîne glycanique latérale. Les données *in vitro* montrent que l'effet amplificateur d'endocan sur la prolifération induite par l'HGF/SF de la lignée HEK 293, est portée par la partie glycanique qui reproduit seule l'activité comitogène d'endocan [365]. Par ailleurs, le mutant non glycosylable d'endocan, endocan/S137A (donc la protéine « nue »), est incapable de promouvoir la prolifération des cellules HEK 293 *in vitro* ou la formation de tumeurs par cette même lignée *in vivo* [362]. Ainsi, par la possibilité de fixer les facteurs de croissance, le glycanes d'endocan est un élément clef dans son activité protumorale.

Outre le rôle du glycanes dans l'effet protumoral d'endocan, le corps protéique joue également un rôle dans ce processus. En effet, l'utilisation d'un anticorps anti endocan (contre son polypeptide) prévient la formation de tumeurs par la lignée HEK-293 transfecté par endocan. Par ailleurs, la mutation de la phénylalanine 116 (contenue dans la région riche en acides aminés aromatiques) abolit la croissance tumorale induite par endocan [362].

Les données *in vitro* montrent qu'endocan n'intervient pas dans le processus de coagulation [365], ni dans la modulation de l'effet du FGF-2 sur la prolifération endothéliale [362], ni dans l'angiogénèse [359].

En conclusion, endocan produit par la cellule endothéliale est capable d'intervenir, via son glycanes, dans la prolifération cellulaire notamment dans un contexte tumoral. Parallèlement, cette molécule pourrait participer à la limitation de la transmigration endothéliale des cellules inflammatoires, et donc pourrait limiter l'inflammation dans les tissus.

# **VI. LE MESOTHELIOME PLEURAL**

## ***VI.1 Introduction***

Le mésothéliome est une tumeur primitive des séreuses qui se développe à partir des cellules mésothéliales qui les tapissent. La majorité des mésothéliomes sont localisés au niveau de la plèvre suivie par le péritoine, le péricarde et exceptionnellement au testicule ou à l'ovaire. Cette tumeur est extrêmement agressive et à ce jour universellement fatale. L'exposition à l'amiante, généralement de nature professionnelle, reste la cause principale de cette maladie. Le mésothéliome est actuellement la maladie néoplasique pour laquelle la relation avec l'agent carcinogène reste la plus étroite et la mieux documentée. L'accroissement rapide des cas de mésothéliome ainsi qu'une médiatisation, parfois excessive, a eu comme résultat une prise de conscience concernant l'importance et la gravité de cette maladie. L'utilisation de l'amiante a été interdite dans de nombreux pays mais elle reste largement utilisée dans les pays en voie de développement. En conséquence, l'incidence de cette maladie continue de croître dans les pays en voie de développement tandis que dans les pays développés le pic d'incidence sera atteint dans les 5-10 années à venir. Plusieurs excellentes revues générales sur le mésothéliome malin ont été publiées récemment [11-13, 384-386] et cette pathologie a fait l'objet en France d'une conférence de consensus de la part de la Société de Pneumologie de Langue Française [387]. Nous ne discuterons pas les détails de la physiopathologie ou de la prise en charge de cette maladie. Nous allons essayer de nous focaliser sur les problèmes diagnostiques posés par le mésothéliome pleural.

## ***VI.2 Diagnostic du mésothéliome pleural malin***

Il n'y a pas à ce jour de stratégie thérapeutique curative pour le mésothéliome bien qu'une prise en charge agressive chez des patients extrêmement sélectionnés avec une maladie localisée puisse aboutir à une survie prolongée [388]. La tumeur est résistante à la radiothérapie et la chimiothérapie. Les nouvelles stratégies thérapeutiques comme la thérapie cellulaire, la thérapie génique [389-391] ou de nouvelles drogues plus efficaces [392] sont encore aux stades d'évaluation préclinique ou clinique. Bien qu'il n'y ait à ce jour aucune étude clinique randomisée le prouvant, la majorité des auteurs pensent qu'une chirurgie précoce dans les stades très localisés de la maladie pourrait offrir une espérance raisonnable de guérison [16, 393]. La présentation clinique est extrêmement peu spécifique et associée en général une dyspnée et une douleur thoracique pariétale à des signes cliniques d'épanchement pleural. En conséquence le délai entre le début des symptômes et le diagnostic est généralement de plusieurs mois. De plus, même en cas de diagnostic rapide par rapport au début des symptômes, les tumeurs sont généralement évoluées, de telle sorte que moins de 10% des patients sont candidats à une chirurgie.

Le dépistage et le diagnostic du mésothéliome pleural malin restent donc très difficiles car (a) la tumeur apparaît plus de 20 à 40 ans après l'exposition initiale, (b) la tumeur touche moins de 5% de la totalité des patients exposés et (c) il faut faire le diagnostic différentiel avec les lésions pleurales bénignes induites par l'amiante et les métastases pleurales de divers carcinomes qui sont nettement plus fréquentes [394]. Les connaissances cliniques et épidémiologiques actuelles ne nous permettent pas de cibler, parmi la population exposée à l'amiante, un groupe à très haut risque de maladie, hormis les patients avec une forte exposition cumulée. Il n'existe à ce jour aucune stratégie utile pour le dépistage de cette maladie. L'ancien consensus français sur l'amiante avait retenu l'indication d'un scanner thoracique (tous les 6 ans) seulement pour les expositions fortes et tous les dix ans pour les expositions intermédiaires [395] mais le bénéfice de cette attitude est incertain. Le consensus anglais sur le mésothéliome malin ne mentionne même pas le dépistage [396].

A ce jour, il n'y a pas de marqueur sérique établi qui permet d'aider au diagnostic du mésothéliome pleural ou mieux pourrait être utile pour un dépistage de la maladie dans la population exposée à l'amiante. Des publications récentes ont soulevé l'intérêt pour des marqueurs diagnostiques potentiels du mésothéliome : le MPF - Megacaryocyte Potentiation Factor [397], les peptides dérivés de la mésothéline (ou soluble mesothelin-related peptides - SMRP) [398-403] et l'ostéopontine [404].



## **VI.2.1 Marqueurs diagnostiques du MPM**

Au fil du temps plusieurs marqueurs sériques ou pleuraux ont été proposés dans le diagnostic des pleurésies néoplasiques.

### **VI.2.1.1 L'ACE**

L'Antigène Carcino-Embryonnaire (ou ACE) est une molécule appartenant à un groupe de 29 protéines faisant partie de la superfamille des immunoglobulines (revue générale dans [405]). L'ACE est une molécule membranaire exprimée sélectivement par l'épithélium. L'ACE est également un marqueur tumoral de certains cancers notamment les cancers colorectaux mais aussi les adénocarcinomes pulmonaires, gastriques ou ovariens. Les taux d'ACE sont faibles chez les témoins sains, généralement inférieurs à 2 ng/ml avec des valeurs médianes de 1 ng/ml. Les valeurs dans le liquide pleural non tumoral sont également basses [406]. Les concentrations de l'ACE augmentent dans les cancers métastatiques de la plèvre tant dans le sérum que dans le liquide pleural mais elles sont basses en cas de mésothéliome pleural [407, 408]. En conséquence, dans le mésothéliome pleural, l'ACE ne peut être utilisé que pour exclure le diagnostic. Des valeurs de l'ACE supérieures à 3 voire 10 ng/ml chez un patient avec un épanchement pleural dont la nature néoplasique est confirmée, a une spécificité très élevée [407, 409].

### **VI.2.1.2 Le Cyfra 21-1**

Le Cyfra 21-1 est un fragment de la cytokératine 19 qui est exprimée par une gamme très large de tumeurs [410]. Les valeurs du Cyfra 21-1 sont plus élevés dans le mésothéliome (dans le sang mais surtout dans le liquide pleural) que chez les patients ayant des pleurésies exsudatives d'étiologie non-néoplasique mais dans les meilleures séries la spécificité et la sensibilité de ce marqueur sont d'environ 80% [408]. Cependant ces séries incluent un nombre limités de patients avec surtout très peu de mésothéliomes. De plus, les valeurs sériques semblent plus basses dans le mésothéliome que dans les pleurésies métastatiques. Le pouvoir diagnostique de ce marqueur reste modeste avec des surfaces sous la courbe ROC (*receiver operator characteristic curve*) inférieures à 0.65 [407].

### **VI.2.1.3 Le TPA**

Le TPA (Tissue Polypeptide Antigen) est une autre molécule dérivée des cytokératines dont les taux sériques et pleuraux sont élevés en cas d'atteinte néoplasique de la plèvre mais sa capacité à distinguer les mésothéliomes des adénocarcinomes est modeste voire nulle

[407]. Une valeur pronostique a été également attribuée à ce marqueur mais le nombre de patients inclus dans l'étude reste limité [411].

#### ***VI.2.1.4 L'acide hyaluronique***

L'acide hyaluronique a été proposé comme marqueur diagnostique du mésothéliome en raison des taux élevés dans le liquide pleural chez certains patients ayant un mésothéliome malin [412-414]. Historiquement, le dosage de cette molécule était difficile nécessitant soit l'utilisation de l'HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) ou une technique radioimmunologique (RIA) mais actuellement un dosage plus simple, similaire à une technique ELISA est disponible (Pharmacia). Ce dosage donne des résultats ayant une très bonne corrélation avec les autres techniques. Le dosage de l'acide hyaluronique peut être augmenté dans de multiples situations pathologiques comme une insuffisance hépatocellulaire, la polyarthrite rhumatoïde, des maladies inflammatoires diverses, le sepsis ou même l'insuffisance cardiaque [415, 416]. Il existe également de nombreux cas de mésothéliomes qui ne secrètent pas d'acide hyaluronique [417, 418]. Dans le sérum des patients ayant un mésothéliome malin ce dosage ne semble d'aucune utilité puisque les valeurs ne sont pas différentes par rapport à d'autres causes de pleurésie [407, 415, 419]. Des valeurs élevées sont notées seulement tardivement dans l'évolution de la maladie [419]. Dans le liquide pleural les valeurs élevées (de plus de 100 mg/L pratiquement dans toutes les publications) semblent être spécifiques du mésothéliome. Malgré une surface sous la courbe ROC assez élevée (0,752 par Fuhrman et col. [407]), la sensibilité du test reste modeste (de 40 à 70% au maximum) [415, 420-422] pour un seuil de 100 mg/L environ. En deçà de ce seuil la spécificité décroît très très vite. Néanmoins, il a été suggéré que la sécrétion d'acide hyaluronique est associée à un phénotype plus invasif des cellules de mésothéliome [423] et ce marqueur pourrait être utile comme facteur pronostique dans le mésothéliome pleural malin [422].

#### ***VI.2.1.5 La mésothéline***

La mésothéline est une glycoprotéine de 40kDa fixée à la membrane cellulaire par une ancre GPI (glycosylphosphatidyl inositol). Cette protéine n'est pas spécifique à une tumeur particulière mais représente plutôt un antigène de différenciation qui est normalement exprimé à la surface des cellules mésothéliales [424]. La protéine a été clonée en 1996 à partir d'une banque de cDNA provenant de la lignée d'adénocarcinome de col utérin HeLa [425] en utilisant pour le criblage un anticorps monoclonal spécifique à un antigène exprimé par les

cellules de carcinome ovarien OVCAR-3 et les cellules mésothéliales normales [424, 426-431]. Cette molécule est également exprimé à la surface de différentes tumeurs comme le mésothéliome malin [425, 432], les cancers du pancréas [433-436], ovariens [425, 428, 437-440], digestifs [438, 440, 441], pulmonaires [394, 438, 440, 442] ou même certains sarcomes [435].

Le séquençage du cDNA a identifié plusieurs isoformes dont on ne connaît pas toujours la signification biologique [443]:

- une forme prédominante qui constitue plus de 90% des transcrits et qui est la forme liée à la membrane cellulaire ;
- une seconde forme qui contient un insert de 24 paires de bases a été mise en évidence parmi les séquences clonées. Cette forme semble être très rarement exprimé car une recherche dans les bases de données d'EST ne retrouve qu'une seule séquence concordant parfaitement [444, 445] ;
- une troisième forme qui contient une insertion de 82 paires de bases en C terminal. Cette forme pourrait apparaître à la suite d'un épissage alternatif qui retient l'intron 16. Néanmoins, d'après certains auteurs, elle pourrait représenter un artefact du à un ARNm incomplètement maturé [443-445]. La séquence complète de cette forme n'est pas retrouvée dans les bases de données et pourrait représenter une forme très rarement exprimé. L'analyse de la protéine montre qu'elle ne contient pas la séquence C-terminale nécessaire à la formation de l'ancre GPI mais contient une queue hydrophile ce qui suggère que cette protéine pourrait être sécrétée.

La traduction de la forme prédominante produit un précurseur de 69 kDa qui contient un site de clivage pour la furine. Le clivage génère un fragment de 40kDa ancré à la surface (la mésothéline) et une protéine soluble dénommée Megacaryocyte Potentiation Factor (MPF) décrit par Kojima et al [446, 447].

Les fonctions exactes de la mésothéline et du MPF sont inconnues. Ainsi, les souris knock-out pour la mésothéline ont un phénotype normal avec un nombre de plaquettes strictement normal [448]. Il a été également décrit que les cellules surexprimant la mésothéline s'attachent plus fortement aux plaques de culture [425] et que la mésothéline interagit avec le CA 125 et pourrait donc avoir un rôle dans l'adhérence cellulaire [449]. Une surexpression de la mésothéline a été décrite dans les cellules qui ont une mutation du gène suppresseur de tumeurs Tsc2 [450]. Le facteur Wnt-1 induit également une surexpression de

la mésothéline [451] comme d'ailleurs le  $\Delta$ N-TCF-1B [441] mais la signification exacte de la surexpression de cette protéine reste à établir.

Le fait que la mésothéline soit une protéine membranaire hautement surexprimé dans le mésothéliome et certains cancers suggère une possible utilisation comme marqueur en immunohistochimie [432, 435, 436, 452, 453]. La faible expression de la mésothéline sur les tissu normaux et son potentiel immunogène [454] évoque aussi une possible utilisation comme cible d'adressage soit pour des immunotoxines [445, 455, 456] ou la thérapie génique [457].

#### **VI.2.1.5.1 Le megakaryocyte potentiation factor**

Une publication récente montre que le dosage du megakaryocyte potentiation factor (MPF) dans le sérum est faisable par une méthode ELISA classique [397]. Bien que le MPF soit produit normalement par le clivage par la furine à partir du précurseur de la mésothéline, ces auteurs trouvent des taux très bas de MPF dans le sérum des sujets sains. Par contre les taux de MPF semblent être beaucoup plus élevés chez les patients ayant un mésothéliome malin pleural de type épithélioïde. Cette série inclut un nombre importants de mésothéliomes (au total 56) mais il reste à déterminer la capacité de ce nouveau dosage à distinguer des mésothéliomes des localisations pleurales secondaires d'un carcinome.

#### **VI.2.1.5.2 Les peptides solubles dérivés de la mésothéline (SMRP)**

Bien que la mésothéline soit membranaire, les anticorps monoclonaux dirigés contre cette protéine permettent de détecter une molécule similaire dans le sérum des patients présentant divers cancers [438]. Cette forme soluble est différente du MPF et a une séquence très similaire à la mésothéline fixée à la membrane [438]. On ne connaît pas à ce jour le mécanisme qui permet de produire cette forme. Les hypothèses actuelles sont soit la sécrétion d'une forme mutée qui n'a pas la séquence nécessaire à la formation de l'ancre GPI (la troisième forme décrite plus haut) soit le clivage de la mésothéline membranaire par une protéase [445]. Cette molécule (ou molécules) soluble dérivée de la mésothéline est dénommée actuellement Soluble Mesothelin Related Peptide (SMRP). Il existe plusieurs anticorps qui reconnaissent spécifiquement ce peptide dont la paire OV569 et 4H3 a permis le développement d'un test ELISA qui va être lancé sur le marché (MESOMARK™, Fujirebio Diagnostics Inc).

Les taux sériques de SMRP sont bas chez les sujets sains même en cas d'exposition à l'amiante [400, 401]. Par contre des taux élevés ont été décrits chez les patients atteints de cancer de l'ovaire [402, 438, 458] ou de mésothéliome malin [398, 400, 402, 403, 459].

L'analyse de ces résultats montre que la SMRP est élevée seulement chez les patients ayant un mésothéliome de type épithélioïde et qu'elle est probablement corrélée au volume tumoral [400]. La SMRP pourrait être utile comme marqueur de diagnostic précoce, puisque dans la série de Robinson chez quatre des sept patients asymptomatiques exposés à l'amiante qui avaient des taux élevés de SMRP, un mésothéliome malin est diagnostiqué dans les 5 années suivantes [400]. Il a été également montré que les taux de SMRP ne sont pas modifiés par la chimiothérapie mais diminuent en cas de réduction importante du volume tumoral par voie chirurgicale [398-400]. Les capacités diagnostiques de ce test paraissent très prometteuses avec une aire sous la courbe ROC supérieure à 0.750 rapporté par Pass [398] et une spécificité supérieure à 90% pour une sensibilité supérieure à 80% dans la série de Robinson [400]. Malgré ces études prometteuses, les données concernant les taux de SMRP dans le liquide pleural restent peu nombreuses et on ne connaissait pas les taux sériques et pleuraux chez les patients ayant une pleurésie bénigne liée à l'exposition à l'amiante. Il est également à noter que ces études, malgré le fait d'inclure un nombre significatif de patients, étaient rétrospectives recrutant de cas sélectionnés dans des centres tertiaires. Il est donc possible que ce mode de recrutement introduise un biais en faveur du test (meilleurs résultats).

#### ***VI.2.1.6 L'ostéopontine***

L'ostéopontine est une molécule décrite comme présente dans la matrice extracellulaire de l'os et considérée comme intervenant dans l'attachement des cellules à la matrice. Sa dénomination officielle est SPP-1 (Secreted Phosphoprotein 1) mais elle est également connue sous les noms d'Eta-1 (Early T antigen) et d'ostéopontine qui est utilisé le plus fréquemment. L'ostéopontine appartient à la famille des protéines SIBLING (Small Integrin Binding Ligand N linked Glycoproteins). Plusieurs revues générales sur cette molécule ont été publiées ces dernières années sur le sujet [460-468].

Il existe en fait plusieurs formes d'ostéopontine qui résultent d'un épissage alternatif et surtout à la suite de nombreuses modifications post-traductionnelles (glycosylation variable, phosphorylation trans-glutamination). Il existe des formes intra- ou extracellulaires, liées à différentes protéines de la matrice (comme dans l'os) ou libres. L'ostéopontine a deux séquences de liaison aux intégrines dont une qui n'est fonctionnelle qu'après clivage de la molécule par la thrombine.

Les fonctions de l'ostéopontine sont pléiotropes et elle a été impliquée dans la prolifération et la survie des cellules, comme facteur chimiotactique et cytokine de type Th1. Elle intervient dans l'inhibition de la minéralisation osseuse ou de la plaque d'athérome [469]. L'ostéopontine a été également impliqué comme une cytokine clé de la réponse immune cellulaire de type I [470] mais aussi dans le développement métastatique des cellules tumorales [463]. En fait la première description de l'ostéopontine est faite comme molécule sécrétée par les cellules épithéliales malignes [471].

L'ostéopontine est surexprimée dans divers cancers [472-475] et des taux sériques élevés sont décrits dans des localisations tumorales diverses comme la prostate [467], le pancréas [476], le colon [477], le cancers ovariens [478] ou du poumon [479-481].

En effet, l'inoculation intraveineuse de cellules tumorales chez une souris knock-out pour l'ostéopontine induit moins de métastases pulmonaires et osseuses que chez la souris normale [482]. L'ostéopontine est capable de stimuler la migration et l'invasivité des cellules néoplasiques ainsi que la croissance de ces cellules indépendamment des signaux d'encrage [483]. L'ostéopontine stimule directement la prolifération des cellules néoplasiques et les protège de l'apoptose [467, 484]. L'ostéopontine est également capable de se fixer sur et d'activer les metalloprotéases. Elle permet de prévenir la lyse des cellules tumorales par le complément en fixant le facteur H [485, 486].

Les données concernant l'expression de l'ostéopontine dans les mésothéliomes malins pleuraux sont beaucoup moins étoffées et proviennent d'une seule publication récente par Pass et col [404]. Ces auteurs démontrent que l'ostéopontine est exprimée en immunohistochimie dans la majorité des cas de mésothéliome pleural malin (36 sur 38). Cette expression est intense comparée aux cellules stromales. De manière intéressante cette expression est retrouvée dans tous les sous-types de mésothéliomes contrairement à la mésothéline. Au niveau sérique les taux d'ostéopontine sont plus élevés chez les patients ayant un mésothéliome pleural que chez les patients exposés à l'amiante et que chez des témoins sains. Les taux sériques d'ostéopontine sont corrélés à la durée de l'exposition (qui est utilisé comme reflétant l'exposition globale). L'ostéopontine paraît spécialement intéressante comme marqueur car elle est élevée même chez les patients ayant un mésothéliome de stade I et pourrait donc représenter un marqueur de diagnostic très précoce [404].

Néanmoins beaucoup d'interrogations concernant l'utilisation pratique de ce marqueur persistent [487]. Etant donné la large expression de l'ostéopontine dans les pathologies néoplasiques et inflammatoires il est peu probable que l'ostéopontine ait une spécificité

suffisante pour une utilisation dans le dépistage de la maladie [472]. On ne connaît pas à ce jour quelles sont les valeurs sériques de l'ostéopontine chez les patients ayant une pleurésie bénigne liée à l'exposition à l'amiante. Les données disponibles concernant les valeurs dans le liquide pleural des mésothéliomes sont également très réduites [488].

En conclusion, il n'existe pas à ce jour de marqueur confirmé utilisable pour le diagnostic, l'évaluation du pronostic ou de la réponse au traitement du mésothéliome pleural malin. Les anciens marqueurs comme l'acide hyaluronique ou le Cyfra 21-1 ne sont pas assez spécifiques et sensibles. L'antigène carcino-embryonnaire ne peut être utilisé que pour l'exclusion du diagnostic. L'ostéopontine pourrait être un marqueur intéressant pour le dépistage mais son manque de spécificité est à envisager. La mésothéline est un marqueur diagnostic intéressant mais nous avons encore besoin d'une évaluation plus approfondie de cette molécule sur des séries plus importantes qui doivent comprendre des patients non sélectionnés. Enfin les données sur le MPF sont encore très préliminaires.

DEUXIEME PARTIE  
TRAVAUX DE RECHERCHE



# **INTRODUCTION**

Le but du travail réalisé pendant la thèse a été de mettre en évidence l'implication d'endocan dans la croissance des tumeurs solides, notamment broncho-pulmonaires et d'essayer de comprendre son mécanisme d'action. Etant donné qu'endocan semblait refléter un état d'activation endothéliale, nous avons également étudié l'expression de cette molécule au niveau sérique dans le sepsis. Je me suis également intéressé à deux autres marqueurs qui pourraient être utiles dans une autre pathologie néoplasique : le mésothéliome pleural.

A mon arrivée dans l'équipe de recherche dirigée par le Dr. Philippe Lassalle, endocan avait été cloné depuis environ 7 ans. L'équipe avait développé une série d'outils, notamment une batterie d'anticorps monoclonaux dirigés contre les formes humaines et murines d'endocan et des lignées tumorales qui exprimaient endocan ainsi que différents mutants étaient disponibles. Il y avait néanmoins très peu de données concernant l'activité de cette molécule. Il avait été démontré qu'endocan pouvait intervenir par son glycane en tant que co-mitogène pour certains facteurs de croissance comme le HGF/SF et une étude en cours concernait la capacité d'endocan à promouvoir la croissance tumorale. Nous avons démontré que *in vivo*, dans un modèle de tumeur sous-cutanée chez la SCID, endocan promeut la formation de tumeurs par les lignées cellulaires non tumorigènes et qu'il augmente la vitesse de croissance des tumeurs provenant de lignées cellulaires tumorigènes. (Article I, page 65).

Ce travail a permis de créer et de tester le modèle animal de xénogreffe sous-cutanée qui sera utilisé pendant le reste de la thèse. Il a permis également d'étudier l'expression d'endocan dans ces modèles murins. Néanmoins il nous paraissait indispensable d'étudier

l'expression d'endocan dans les tumeurs humaines (cancers broncho-pulmonaires à non petites cellules). En effet, plusieurs publications montraient qu'endocan est surexprimé dans un panel très large de tumeurs et que dans certaines localisations cette surexpression permettait d'identifier un phénotype très invasif. Néanmoins, aucune de ces études n'avait pu étudier l'expression de la protéine tant au niveau local (endothélium tumoral) que circulant, en raison du manque d'outils spécifiques. Nous avons pu montrer qu'endocan est surexprimé de manière importante au niveau endothélial et que cette expression peut être facilement étudiée par immunohistochimie. Cette expression locale est corrélée à la stimulation angiogénique de la tumeur, notamment au VEGF. Nous avons démontré que le VEGF est un puissant inducteur de la sécrétion d'endocan. Les taux sériques d'endocan étaient fortement corrélés à la survie des patients et notamment à la présence de métastases à distance et possiblement à une invasion ganglionnaire. (Article II, Page 72)

Dans la littérature, ainsi que dans les travaux que nous avons menés, malgré une très forte homologie entre les formes humaine et murine, il apparaissait qu'endocan murin ne subissait pas d'épissage alternatif comme la molécule humaine. Nous nous sommes donc intéressés à cette forme humaine qui subit un épissage alternatif et qui a été dénommée endocan $\Delta$ 2. Dans l'article explorant l'expression d'endocan dans les cancers broncho-pulmonaires à non petites cellules nous avons pu constater que cette forme (endocan $\Delta$ 2) est nettement moins surexprimé qu'endocan. J'ai ensuite démontré que cette forme n'est pas tumorigène et en collaboration avec Florence Depontieu, une autre étudiante en thèse du laboratoire nous avons caractérisé cette molécule. (Article III page 81).

L'équipe s'est ensuite intéressée à la forme murine d'endocan. Nous avons voulu étudier l'expression d'endocan murin dans différentes lignées cellulaires, étudier le degré de glycosylation d'endocan murin ainsi que ses capacités tumorigènes. J'ai démontré au cours de ce travail qu'endocan murin n'est que partiellement glycosylé. Dans les modèles animaux j'ai pu mettre en évidence que seulement la forme glycosylé d'endocan humain a un effet pro-tumoral. Par contre les formes non glycosylées (comme d'ailleurs les mutants non glycosilables) murines et humaines ont une forte capacité anti-tumorale. (Article IV, page 94)

Au vu de ces résultats nous pouvons donc affirmer qu'endocan exerce un effet pro-tumoral important. Nous avons donc essayé de voir si un traitement par des anticorps monoclonaux antiendocan pourrait avoir un effet antitumoral. Le modèle utilisé est une xénogreffe souscutanée de cellules HT29 et A549 non transfectées. Un traitement par des anticorps monoclonaux anti-endocan murin a été fait dès l'inoculation des cellules tumorales. Nous avons pu démontrer que ces anticorps ont un effet de freinage de la croissance tumorale

et que cet effet est médié par le recrutement de cellules NK dans les tumeurs expérimentales. Dans un autre modèle réalisé en collaboration avec l'équipe du Professeur Rémy Nevière du Département de Physiologie de l'Université de Lille nous avons pu montrer que ces anticorps monoclonaux augmentent *in vivo* de manière significative l'attachement des leucocytes à l'endothélium. (Article V, Page 109).

Tous ces résultats confirment l'implication d'endocan dans le processus de tumorigénèse et évoquent l'utilisation d'endocan comme cible anti-tumorale. Il serait donc intéressant de pouvoir disposer d'un antagoniste puissant de cette molécule afin d'étudier son effet sur la croissance tumorale. Nos résultats avaient montré que la surexpression de la protéine seule a un effet anti-tumoral significatif (au moins aussi important que les anticorps monoclonaux) retardant de manière importante la croissance tumorale. Pour expliquer ces résultats, il est possible de spéculer que la protéine pourrait avoir un effet antagoniste de l'endocan glycosylé endogène. Nous savions également d'après nos premiers résultats *in vivo* que la structure protéique était également importante dans le processus de tumorigénèse, et plus précisément les résidus de phénylalanine situés en position 115 et 116. Nous avons donc étudié la croissance tumorale de tumeurs HT29 qui surexpriment différentes formes d'endocan portant des mutations de cette zone riche en phénylalanine. Nous avons pu constater que la surexpression de la protéine non-glycosylée et portant une mutation de la phénylalanine en position 116 a un puissant effet anti-tumoral. (résultats non publiés, page 123)

Un deuxième centre d'intérêt pendant cette thèse a été l'étude d'endocan comme marqueur de différentes pathologies inflammatoires. En effet, les données expérimentales antérieures, ainsi que les dosages sur de courtes séries de patients, montraient que la production d'endocan était stimulé par certaines cytokines proinflammatoires et que les valeurs sériques étaient élevées chez les patients présentant un sepsis. Nous avons donc étudié les taux sériques d'endocan dans une série prospective de 63 patients admis en réanimation avec une suspicion de sepsis. Dans cette étude nous avons pu démontrer qu'endocan pourrait représenter un nouveau marqueur de la dysfonction endothéliale dans le sepsis. Les taux d'endocan dans cette étude étaient corrélés aux taux de facteur von Willebrandt (vWF), un autre marqueur endothélial. Les taux d'endocan étaient également corrélés avec la gravité et la mortalité des malades et endocan était un meilleur marqueur pronostique que la procalcitonine, l'IL-6 ou le vWF (Article VI, Page 136).

Une troisième direction d'étude pendant la thèse a été le mésothéliome pleural. Nous avons étudié la valeur diagnostique de deux nouveaux marqueurs : les peptides solubles

dérivés de la mésothéline (ou SMRP) et l'ostéopontine sur une série prospective de patients ayant un épanchement pleural et une suspicion de mésothéliome pleural, recrutés au niveau régional. Nous avons pu montrer sur cette série de plus de 180 patients que la SMRP (au niveau sérique mais aussi pleural) était un bon marqueur des mésothéliomes épithélioïdes. Par contre les mésothéliomes sarcomatoïdes ou mixtes avaient des taux très bas de ce marqueur. Nous avons également démontré que l'ostéopontine, était élevée dans le sang et le liquide pleural dans tous les cas d'atteinte pleurale. Les taux étaient néanmoins plus élevés en cas d'atteinte néoplasique. L'ostéopontine était très sensible pour différencier les patients ayant une atteinte pleurale des sujets sains exposés à l'amiante mais était moins performante pour préciser le type d'atteinte. Les deux marqueurs (ostéopontine et mésothéline) avaient une signification pronostique dans cette série. (Article VII, page 143 et VIII, page 150).

En conclusion, au cours de ces trois dernières années nous avons pu démontrer qu'endocan joue un rôle important dans la croissance tumorale et que son effet protumoral est dépendant de son glycan. Le mécanisme potentiel par lequel endocan stimule la croissance tumorale est probablement double : l'interaction avec les facteurs de croissance et la limitation du recrutement de cellules immunitaires au niveau tumoral. Néanmoins les données expérimentales obtenues sont essentiellement des éléments indirects et restent insuffisantes pour préciser le mécanisme d'action d'endocan. Nous avons pu également démontrer qu'endocan pourrait représenter un marqueur de la stimulation angiogénique tumorale et il serait très intéressant d'évaluer cette molécule comme marqueur d'efficacité des traitements anti-angiogéniques. De manière générale endocan pourrait représenter un marqueur d'activation de l'endothélium et pourrait avoir un intérêt essentiellement pronostique dans le cancer et le sepsis. Nous avons pu également montrer qu'endocan pourrait être une cible anti-tumorale soit en utilisant des anticorps monoclonaux soit des protéines recombinantes mutées dérivant d'endocan. Enfin nous avons étudié l'intérêt diagnostique et pronostique dans le mésothéliome pleural malin de deux nouveaux marqueurs la SMRP et l'ostéopontine.

# **ARTICLE I**

## **Overexpression of Endocan Induces Tumor Formation**

Arnaud Scherpereel, Thibaut Gentina, Bogdan Grigoriu, Stephanie Senechal, Anne Janin, Anne Tsicopoulos, Francois Plenat, David Bechard, Andre-Bernard Tonnel et Philippe Lassalle

CANCER RESEARCH 63, 6084–6089.

# Overexpression of Endocan Induces Tumor Formation<sup>1</sup>

Arnaud Scherpereel,<sup>2</sup> Thibaut Gentina,<sup>2</sup> Bogdan Grigoriu, Stéphanie Sénéchal, Anne Janin, Anne Tscopoulos, François Plénat, David Béchar, André-Bernard Tonnel, and Philippe Lassalle<sup>3</sup>

INSERM U416, Institut Pasteur de Lille, 59019 Lille Cedex [A. S., T. G., B. G., S. S., A. T., A-B. T., P. L.]; Service de Pneumologie et d'Immuno-Allergologie, Hôpital Albert Calmette, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille, 59037 Lille cedex [A. S., A-B. T.]; Laboratoire de Recherche de Pathologie, Université Paris VII EA 2378 et INSERM ERIT-M, Hôpital Saint Louis, 75 010 Paris, [A. J.]; Service d'Anatomie Pathologique, Hôpital Brabois Adulte, 54511 Vandoeuvre Cedex [F. P.]; and Endotis Pharma, Parc Eurasanté, 59120 Loos [D. B.], France

## ABSTRACT

Endocan is a proteoglycan specifically secreted by endothelial cells. Through its glycan domains, endocan binds to hepatocyte growth factor and increases its mitogenic activity. Here, we show that human embryonic kidney 293 cells, which have been genetically engineered to overexpress endocan, form tumors when injected s.c. in SCID mice. Both the glycan and a phenylalanine-rich region of endocan are necessary for mediating tumor growth activity. Blocking the phenylalanine-rich region with a monoclonal antibody results in a marked reduction of tumor growth. Finally, we report that circulating levels of endocan are increased in mice with the endocan-expressing human embryonic kidney 293 cell tumors and in a series of adult patients with lung cancer. Taken together, these results suggest that (a) endothelial-derived endocan induces tumor growth, (b) antibodies to endocan may have therapeutic potential, and (c) circulating levels of endocan may eventually represent a novel marker for cancer.

## INTRODUCTION

PGs<sup>4</sup> play an important role in vascular biology (1–3). Most PGs that are associated with the vascular wall are synthesized by endothelial cells and localized to the subendothelial basement membrane of capillaries. These include perlecan (4), members of syndecan family and glypican-1 (5, 6), small leucine-rich chondroitin/DS PG biglycan (7), and decorin (8, 9). Collectively, these PGs serve to stabilize the blood vessel wall, support migrating and proliferating endothelial cells, and induce angiogenesis by modulating the activity and bioavailability of growth factors (10, 11). We have recently identified a novel endothelial cell-specific PGs, termed endocan (12, 13). Endocan contains a single chain of DS. In contrast to most PGs, endocan does not localize to the subendothelial basement membrane but rather circulates freely in the blood (14). Endocan has been shown to bind to LFA-1, thereby reducing LFA-1-mediated leukocyte activation (15). Moreover, we recently reported that endocan binds to and promotes the mitogenic activity of hepatocyte growth factor, a property that was mapped to the DS chain of the PG (13). On the basis of these observations, we hypothesized that endocan may be involved in mediating tumor growth.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture

Wild-type and transfected HEK 293 and HT29 cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FCS, L-glutamine (2 mM), penicillin (100

units/ml), and streptomycin (100 µg/ml). Endocan mutants were purified from stably transfected HEK 293 cells cultured in serum-free 293-SFM medium (Life Technologies, Inc., Cergy-Pontoise, France). MEP 08 and MEP 14 mAbs (14) were produced in hybridoma cell clones cultured in Hybridoma SFM medium (Life Technologies, Inc.). HUVECs were routinely provided as described previously (16). HS was bought from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

### Vectors, Mutagenesis, and Stable Transfection

The full-length endocan cDNA previously inserted into pcDNA3 expression vector was used as substrate for mutagenesis (12). The mutated endocan/S137A (13), endocan/F115A, endocan/F116A, and endocan/F115A-F116A were obtained by PCR with the QuickChange site-directed mutagenesis kit, according to the manufacturer's instructions (Stratagene, Cambridge, United Kingdom) and confirmed by sequencing on an ABI Prism 377 automated DNA sequencer (PE Biosystems, Courtaboeuf, France). These constructs were transfected into HEK 293 and HT29 cell lines with Lipofectamin (Life Technologies, Inc.), followed by selection by G418 (300 and 500 µg/ml, respectively) and cloning by limited dilution.

### Animals

CB-17 scid/scid homozygous SCID mice (male, 5–6 weeks of age) were obtained from Pasteur Institute of Lille. These mice were continuously housed in a germ-free laminar-airflow facility inside a temperature- and light-controlled room. To eliminate the NK cell activity, mice received an i.p. injection of antiasialo GM1 antibody (Wako Chemicals, Neuss, Germany) 1 day before s.c. injection (dorsal, anterior-interscapular) of HEK 293- (10<sup>6</sup> cells/injection) or HT29-transfected cells (2 × 10<sup>5</sup> cells/injection). Tumor size was assessed once a week, and the animals were killed when the tumor diameter reached up to 1 cm. Tumor volume was calculated by the formula  $V = (4\pi/3) \times (abc/8)$  or its simplified form:  $abc/2$ , where a, b, and c are the orthogonal diameters. Mouse blood endocan levels were measured by ELISA. The antibody treatment consisted of a weekly i.p. injection of 400 µg of purified MEP 08 or MEP 14 in 200 µl of endotoxin-free and sterile PBS.

Animal experiments were carefully studied with the help of the newly formed Ethical Committee for the Use of Laboratory Animals in Saint-Louis Hospital. *In vivo* experiments have been limited to the part of experimental work that couldn't be performed *in vitro*. The number of mice used has been strictly limited to the number necessary for the validation of statistical analysis and the controls. For ethical considerations, animals were sacrificed when the tumor reached 1 cm diameter and were considered as dead.

### Pathological Analysis

Mice were killed and dissected with systematic macroscopic analysis of all organs. All tumoral localizations were photographed, measured, and systematically removed for additional microscopical analysis. Selected organ specimens were cut into three parts. One part was fixed in 4% buffered formaldehyde for 2 h and additionally processed for paraffin embedding. Three-µm thick paraffin sections were stained with H&E, Masson's trichrome, and reticulin stain. The other part was fixed in 2% glutaraldehyde in cacodylate buffer and additionally processed for electron microscopic analysis. The third part was immediately snap-frozen and cryopreserved in liquid nitrogen for additional immunohistochemical studies or nucleic acid extractions. Immunohistochemical studies were performed either on cell pellets or on tumor section by an indirect immunoperoxidase method using the primary antibody directed against endocan, at a dilution of 1/200.

Received 4/19/02; revised 6/4/03; accepted 7/21/03.

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.

<sup>1</sup> This work was funded, in part, by PROGRES Research Program from INSERM and the Societé d'Enseignement et de Recherche en Pneumologie et Allergie.

<sup>2</sup> Both authors have contributed equally.

<sup>3</sup> To whom requests for reprints should be addressed, at E-mail: philippe.lassalle@pasteur-lille.fr.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: PG, proteoglycan; DS, dermatan sulfate; LFA-1, leukotactic factor activity 1; mAb, monoclonal antibody; HEK, human embryonic kidney; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell; HS, heparan sulfate; FGF-2, fibroblast growth factor 2; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; HGF/SF = hepatocyte growth factor/scatter factor.

**Counts of Microvessels, Apoptotic, Mitotic, and Inflammatory Cells**

Microvessels were stained by an indirect immunoperoxidase method on paraffin sections, using antihuman CD31 (Novocastra, Newcastle, United Kingdom) as primary antibody, with controls by omitting the first antibody and by using an irrelevant antibody of identical isotype. Apoptotic bodies were detected using the terminal deoxynucleotidyltransferase-mediated nick end labeling assay on paraffin sections, treated with proteinase K (20 μg/ml) for 15 min at room temperature, with the Apoptag Peroxydase *in situ* Apoptosis Detection Kit (Intergen). Count of mitoses were performed on tumor cells in paraffin sections stained with H&E. Count of inflammatory cells took into account neutrophils and eosinophils, lymphocytes, plasma cells on H&E, and May Grunwald Giemsa stains. Pathological quantitative data were obtained blindly by two pathologists on four different fields at magnification ×400 on an Olympus AX 70 microscope, with wide-field eyepiece number 26.5, providing a field size of 0.344 mm<sup>2</sup> at magnification ×400. Results were expressed as the mean number of microvessel sections, apoptotic cells, mitoses, and inflammatory cells counted in the four different fields observed at magnification ×400.

**Purification of Endocan and Endocan Mutants**

The nonglycanated endocan/S137A is purified in one-step affinity chromatography. Endocan/F115A, endocan/F116A, and endocan/F115A-F116A were purified by ion-exchange and affinity chromatographies exactly as previously described for endocan (13).

**mAb Purification**

The MEP 08 (IgG2a,K) and MEP 14 (IgG2a,K) hybridoma cell cultures conditioned in serum-free medium were applied to a column (1 × 8 cm) of protein G-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France). The column was washed with 0.05 M sodium phosphate (pH 7) and eluted with 3 M MgCl<sub>2</sub>, concentrated and dialyzed against PBS using an Ultrafree M, 30,000 molecular weight cutoff membrane (Millipore, Bedford, MA).

**Endocan ELISA**

Specific ELISA for endocan was performed as previously described (14). The mutations did not modify the antibody reactivity in the sandwich assay.

**Western Blotting**

One-hundred nanograms purified of wild-type and mutated forms of endocan were analyzed by Western blot using MEP 08 or MEP 14 as described previously (13).

**Cell Proliferation Assays**

**HEK 293 Cell Proliferation Assay.** The cell growth was determined by measuring [Methyl<sup>3</sup>H]thymidine uptake into HEK 293 cell clones. Cells were seeded at a density of 1 × 10<sup>4</sup>/well in 96-well microplates and cultured in either complete medium, including 10% FCS or DMEM supplemented with transferrin, insulin, and 50 ng/ml recombinant human HGF/SF (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom). Ten μg/ml purified mAbs MEP 08 and MEP 14 were added. After 56 h of culture, cells were pulsed with 0.5 μCi of [Methyl<sup>3</sup>H]thymidine/well for 16 h and [Methyl<sup>3</sup>H]thymidine incorporation in to DNA was determined on a TopCount Microplate Scintillation Counter (Packard, Rungis, France). Assays were performed in quadruplicate.

**HUVEC Proliferation Assay.** The cell growth was determined by measuring [Methyl<sup>3</sup>H]thymidine uptake and by the reduction of MTT in a MTT viability assay (17). Briefly, HUVECs were seeded at a density of 5 × 10<sup>3</sup>/well in fibronectin-coated 96-well microplates in basal medium containing RPMI 1640 plus 2% FCS supplemented for some experiments with 5 ng/ml FGF-2 (R&D Systems) and 1 μg/ml endocan or 1 μg/ml HS. After 18, 32, 56, and 70 h of cell culture, HUVECs were pulsed with 0.5 μCi of [Methyl<sup>3</sup>H]thymidine/well for 16 h. The MTT viability assay was performed after 96 h culture.

**Fluorescent Cell Sorter Analysis**

Cell surface binding of endocan was evaluated by fluorescence-activated cell sorting as previously described (15), except that 24 h before fluorescence-

activated cell sorting, adherent HEK 293 cells were enzymatically detached and cultured 24 h in 293-SFM II cell suspension medium (Life Technologies, Inc.) to reconstitute trypsin-sensitive cell membrane proteins.

**Subjects and Patients**

The study was conducted in the department of Pneumology of the University Hospital of Lille (France). Serum from patients with lung cancer was collected at the moment of diagnosis. Patients were included before any cancer treatment; on the contrary, patients with clinical symptoms or biological signs of infection were excluded. Sera were collected from each subject, spun down 15 min at 1500 × g, then kept at -20°C before assays. The protocol was approved by the local ethical committee.

**RESULTS**

**HEK 293 Cells Overexpressing Endocan Form Tumors in SCID Mice.** Full-length human endocan cDNA was cloned into the pcDNA3 vector, and the resulting construct was stably transfected into HEK 293 cells. The transfected cells were selected in G-418-containing medium, and resistant clones were assayed for endocan secretion by ELISA. Two separate clones that secreted 762 ± 211 ng endocan/day/10<sup>6</sup> cells or control clones (transfected with vector alone) were injected s.c. into the flank of male SCID mice. Each of the two endocan-expressing HEK 293 cell clones developed into tumors at the site of injection, whereas the control clones had no such effect (Fig. 1A). Two additional HEK 293-endocan cell clones injected in 8 mice also formed tumors, clearly avoiding clonal selection artifacts. In keeping with its

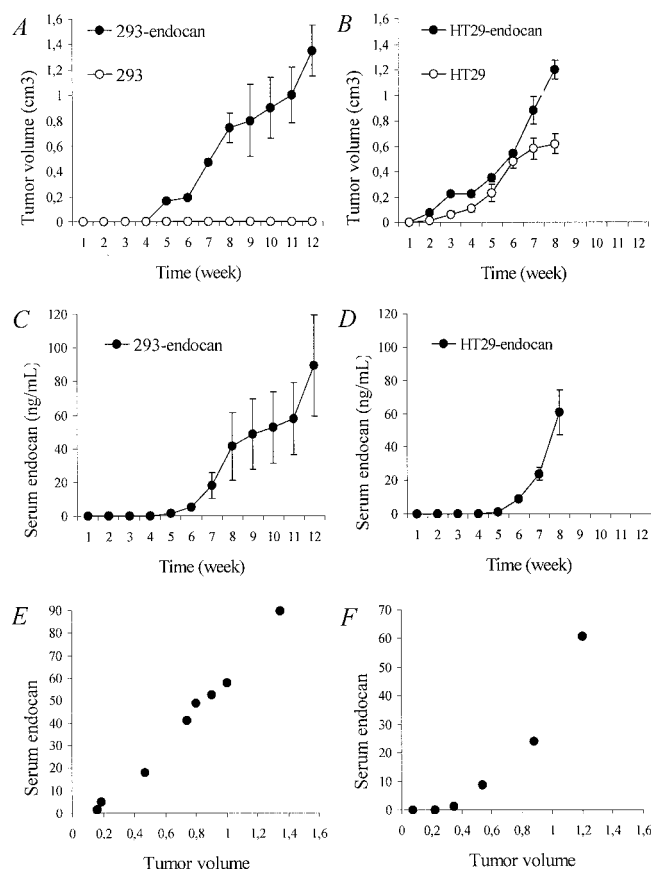


Fig. 1. Kinetics of tumor growth and serum endocan levels. In A, kinetics of 293-endocan cell growth (mean ± SE of 13 tumors). In B, kinetics of HT29-endocan cell growth (mean ± SE of 10 tumors). In C, kinetics of serum endocan in 293-endocan cell tumors. In D, kinetics of serum endocan in HT29-endocan cell tumors. In E and F, relationships between serum endocan value and tumor volume with 293-endocan cells (E) and in HT29-endocan cells (F).

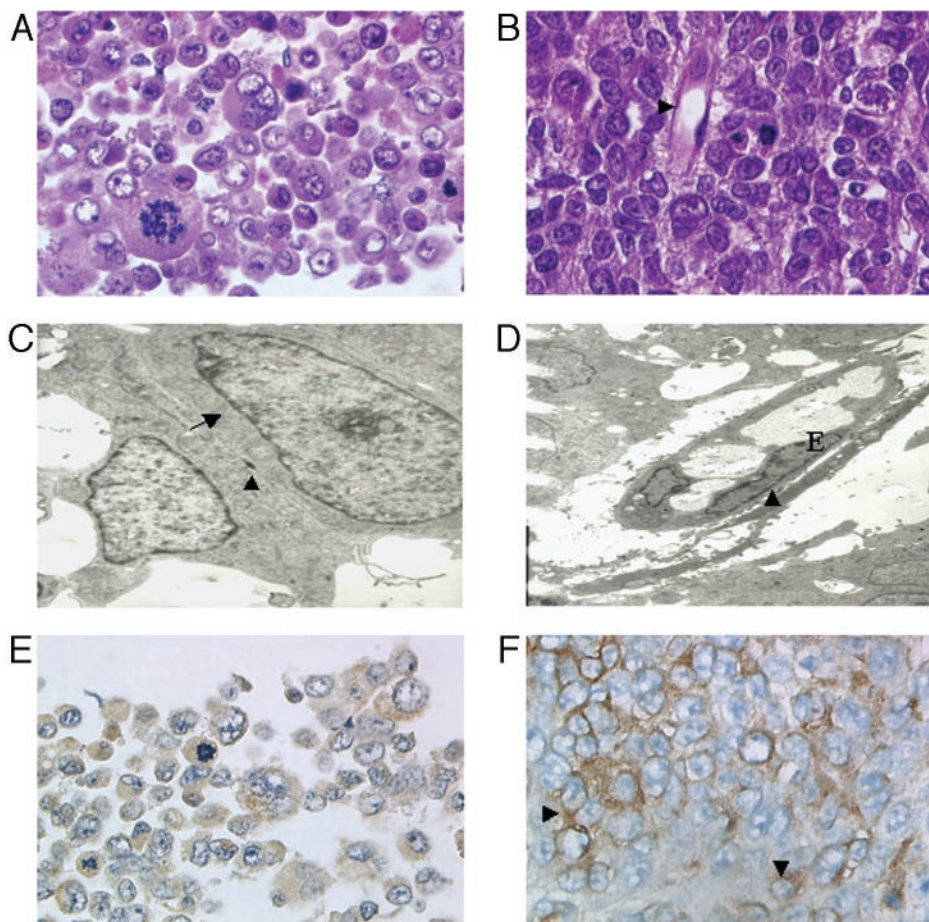


Fig. 2. Pathological analysis of 293-endocan tumors. In A, histological section of a pellet of 293-endocan cells stained with H&E: presence of tumoral cells with high nuclear/cytoplasmic ratio, multinucleated cells and abnormal mitoses,  $\times 400$ . In B, histological section of the tumor showing a nontumoral well-differentiated capillary (arrowhead),  $\times 400$ . In C, electron microscopic view of tumoral cells showing intracytoplasmic filaments (arrows) and a junctional structure (arrowhead). In D, electron microscopic view of a capillary within the tumor, with well-defined basement membrane (arrowhead) and normal endothelial cells (E). In E, histological section of a pellet of 293-endocan cells marked with an antibody directed against endocan: the staining is distributed throughout the whole cytoplasmic area. Indirect immunoperoxidase,  $\times 400$ . In F, indirect immunoperoxidase with MEP 08 in a tumor section: staining within tumor cells (arrowheads),  $\times 400$ .

function as a secreted PG, endocan was detected in the serum of mice that formed tumors (Fig. 1C). Importantly, circulating levels of endocan increased over time and correlated positively with tumor size ( $r = 0.96$ ,  $P < 0.001$ , Spearman correlation test; Fig. 1E).

**Pathology.** Clinically, a round, s.c. tumor was found at the site of cell injection. When compared with mice having been injected with HEK cells, tumor-bearing mice looked leaner, but the comparison of weight curves did not show any significant difference because the weight of the developing tumor compensated the weight loss of the mice with tumors. At the dissection, the tumor did not adhere to the skin or to adjacent organs. The section showed a whitish, polylobulated tumor, with some necrotic areas. Additional dissection did not show lymph node involvement, nor metastatic dissemination, except for an isolated nodule in the kidney in 1 case. Microscopically, pelleted 293-endocan cells showed a high index of mitotic cells, some of them multinucleated or with irregular chromatin distribution (Fig. 2A). Histological analysis showed sheets of cells of irregular shape and distribution, with a high mitotic index and nuclear abnormalities. Vessels of small caliber could be found, intermingled with neoplastic cells, and the borders of the tumor were ill-defined (Fig. 2B). Quantitative analyses from six tumors showed  $12.5 \pm 2.9$  mitotics cells/mm<sup>2</sup>,  $7.3 \pm 2.3$  apoptotic cells/mm<sup>2</sup>, and  $12.5 \pm 2.9$  vessels/mm<sup>2</sup>, indicating a high degree of proliferation and tumor development contrasting with a virtually no leukocyte infiltrate ( $1.4 \pm 1.4$  inflammatory cells/mm<sup>2</sup>). Electron microscopic study of the tumors showed that all of them had neoplastic cells with desmosomes and tonofilaments, two characteristics of epithelial cells (Fig. 2C). Moreover, the vessels observed within the tumors had an endothelium and a basement membrane that could be clearly identified (Fig. 2D). Immunohistological analysis of HEK 293 cell patches showed that the expression of

endocan within 293-endocan cells is only cytoplasmic (Fig. 2E). In the corresponding tumors, antiendocan antibodies only marked the cytoplasmic areas (Fig. 2F). Thus, transfection of cDNA of endocan in human kidney epithelial cells HEK 293 give them an oncogenic potential with occurrence of an epithelial carcinoma at the site of injections.

**Endocan-Promoting Tumor Growth Is Not Specific to HEK 293 Cells.** In the next set of experiments, HT29 cells were stably transfected with the endocan cDNA construct, and G418-resistant cell clones were selected for their ability to secrete endocan. HT29 do not normally express endocan and, in contrast to HEK 293 cells, are spontaneously tumorigenic *in vivo*. HT29-endocan cell clones that secreted  $34 \pm 7$  ng endocan/day/10<sup>6</sup> cells or control vector-transfected clones were injected s.c. into SCID mice. The HT29-endocan clones exhibited greater tumor growth, compared with control clones (Fig. 1B). Macroscopic analysis of tumor HT29-endocan showed a whitish nonadherent nodule, with necrotic areas. No satellite lymph node involvement and no metastatic dissemination could be found. Again, serum endocan levels increased with time (Fig. 1D) and correlated with tumor size ( $r = 0.72$ ,  $P < 0.01$ ; Fig. 1F). Taken together with the HEK 293 results, these data demonstrate that endocan induces tumor growth of otherwise nontumorigenic cells and increases the growth potential of tumorigenic cells.

**The Glycan from Endocan Is Required for Tumor Cell Growth.** To determine whether the glycan chain plays a role in mediating tumor growth, we generated a nonglycanated form of endocan by mutagenesis of serine 137 to alanine (endocan/S137A). HEK 293 cell clones expressing this cDNA mutant were selected and screened for mutant endocan secretion. Each of two endocan/S137A clones that secreted 2023 ng/ml  $\pm$  360 ng endocan/day/10<sup>6</sup> cells was injected s.c. into groups of 4



SCID mice in three separate experiments and systematically compared with the positive control group receiving endocan-expressing HEK 293 cells developing consistently a tumor (cumulative frequency of 32 tumors among 34 mice in eight distinct experiments). Endocan/S137A-expressing clones did not give rise to tumors (0 tumor/12 mice). These results are consistent with a previous study in which the S137A mutation abrogated the positive effect of endocan on HGF/SF-mediated proliferation of cultured HEK 293 cells (13). These findings suggest that the glycan moiety of endocan is necessary for tumor cell proliferation under both *in vitro* and *in vivo* conditions.

**A Phenylalanine-rich Region of Endocan Polypeptide Is Required for Tumor Growth.** To determine the role of the protein core of endocan in mediating tumor growth, we mutated the phenylalanine at positions 115 and/or 116 to alanine. Expression of these mutants in HEK 293 cells resulted in fully glycanated forms of endocan but with reduced ability to bind to phenyl-Sepharose. Endocan/F115A and endocan/F116A demonstrated half normal binding, whereas the combined mutation (endocan/F115A-F116A) did not bind at all. We established several HEK 293 cell clones expressing these mutants (665–1545 ng endocan/day/10<sup>6</sup> cells), and we injected these cells *s.c.* into SCID mice, as described above. All SCID mice grafted with HEK 293-endocan/F115A cells developed tumors at the site of inoculation (4 tumors/4 mice and 4 of 4). Serum endocan levels increased in parallel with tumor growth. Surprisingly, the HEK 293 cells, which expressed endocan/F116A or endocan/F115A-F116A, did not form any tumor despite the presence of the glycan (0 of 4 and 0 of 4 with HEK 293-endocan/F116A; 0 of 5 and 0 of 5 with HEK 293-endocan/F115A-F116A). Taken together, these results suggest that in addition to the glycan moiety, the endocan polypeptide plays a significant role in promoting tumor growth. The phenylalanine at position 116 is particularly critical for this effect.

**MEP 08 mAb Directed against the Phenylalanine-rich Region Blocks the Tumor-Promoting Activity of HEK 293 Cells Over-expressing Endocan.** To confirm the role of the endocan polypeptide in mediating tumor growth, we tested antiendocan mAbs as blocking agents. We focused on two mAbs, one that recognizes the region spanning the F116A (MEP 08) and one that recognizes the COOH-terminal portion of endocan (MEP 14). Mice were injected with 400  $\mu$ g of purified mAb on a weekly basis. Serum antibodies were still detectable in large excess 7 days after *i.p.* injection of mAb. In a first series of experiments, mice were inoculated with HEK 293-endocan cells and received weekly injections of MEP 08 or MEP 14 starting at week 2 and continuing until week 12. Of the 13 mice that received MEP 08 in three separate experiments, 5 did not develop a tumor and 7 survived (Fig. 3A), which represents a clearly different feature from that of untreated groups of mice that develop tumors, except for 1 case (4 of 4, 4 of 4, and 3 of 4). Of the mice that received MEP 14, 1 did not develop a tumor, whereas the remaining 9 died from tumor formation. Administration of MEP 14 at the moment of the tumor cell inoculation did not change the survival 12 weeks after (1 of 6 and 0 of 4). These results suggest that MEP 08 recognizes an epitope that is a critical determinant for tumor growth. As MEP 08 epitope encompasses the phenylalanine-rich region, the data suggest that this region is critically involved in mediating tumor growth.

**MEP 08 Prevents Tumor Appearance and Slows Tumor Growth.** To examine the efficiency of MEP 08 on macroscopically established tumors, we initiated a second series of experiments, starting MEP 08 injections either on the same day of tumor cell inoculation (group 0), or 2, 4, or 6 weeks after tumor cell inoculation (groups 2, 4, and 6, respectively). Sixty percent of mice in groups 0 and 2 survived, whereas 31 and 22% of groups 4 and 6 survived, respectively, as compared with 13% in the untreated control group (Fig. 3B). Thus, the MEP 08 is most effective in the early stages of tumor

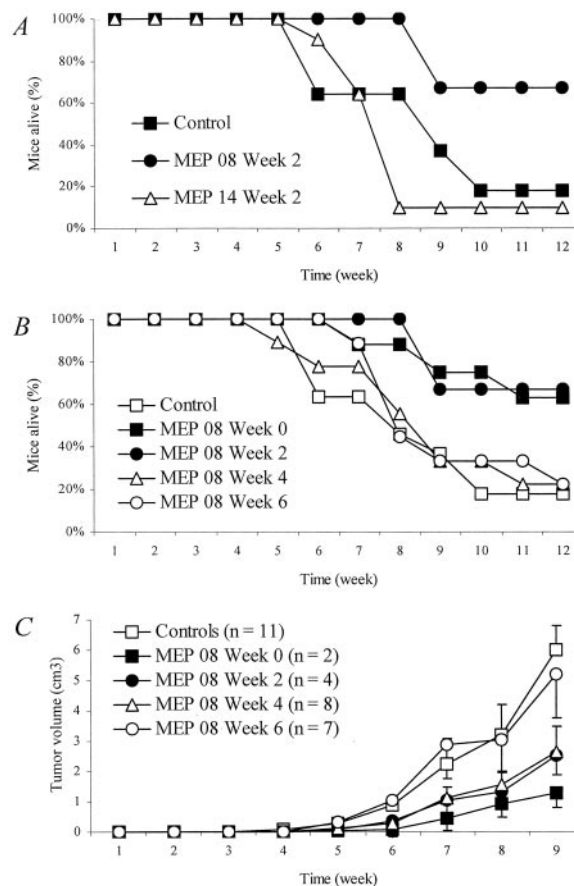


Fig. 3. Treatment with antiendocan mAb MEP 08 reduces tumor incidence and delays tumor appearance. In A, kinetics of survival of mice not treated (□) or treated with MEP 08 mAb (●) or MEP 14 mAb (▲). In B, relationships between survival and the beginning of the mAb treatment. In C, MEP 08 therapy slows down tumor growth (mean  $\pm$  SE of tumor volume).

development. To determine the effect of the antibody on the kinetics of tumor growth, we recorded weekly the tumor size of mice under treatment with MEP 08. In groups 0 and 2, the tumors appeared 2 weeks later than in the control group (Fig. 3C). The delayed appearance of the tumors correlated with a delayed detection of serum endocan (data not shown). At the ninth week, we observed a reduced mean tumor volume in groups 0, 2, and 4 (Fig. 3C). Taken together, these findings suggest that MEP 08 mAb exerts an antitumor activity on xenografted tumors of small sizes.

**No Effect of MEP 08 on HEK 293-Endocan Cell Proliferation.** To elucidate the antitumor effect of MEP 08, we examined if MEP 08 could bind to HEK 293 cells or influence HEK 293 cell proliferation. Using fluorescent analysis on cell sorter, cell surface-bound endocan could not be detected on either parental HEK 293 cells charged with endocan or HEK 293-endocan cells, even in the presence of divalent ions (data not shown). In addition, high doses of MEP 08 did not change the rate of [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation by HEK 293 cell clones expressing the control vector, endocan, or endocan/S137A (Table 1), which was confirmed by the MTT cytotoxicity assay. These results indicated that the antitumor effect of MEP 08 does not appear to be mediated by direct cytostatic or cytotoxic activities on tumor cells.

**No Effect of MEP 08 on Endothelial Cell Proliferation.** Another question was to study if MEP 08 possesses antiproliferative effect on HUVECs. FGF-2 is a well-known angiogenic factor that induces proliferation of HUVEC, and glycans are known to greatly influence FGF-2 activity. The fact that endothelial cells secrete endocan could therefore influence the net FGF-2 effect on HUVECs. Surprisingly,

Table 1 Effect of MEP 08 and MEP 14 on [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation by HEK 293 cell clones

Cells	Medium	cpm
293	-	327 ± 60
	+MEP08	297 ± 69
	+MEP14	300 ± 55
293 clone 1	-	522 ± 87
	+MEP08	630 ± 198
	+MEP14	540 ± 117
293-clone 2	-	667 ± 83
	+MEP08	710 ± 153
	+MEP14	671 ± 123
293-endocan clone 1	-	1443 ± 387
	+MEP08	1209 ± 588
	+MEP14	1095 ± 666
293-endocan clone 3	-	3841 ± 484
	+MEP08	3066 ± 721
	+MEP14	3279 ± 1026
293-endocan clone 8	-	873 ± 162
	+MEP08	1020 ± 342
	+MEP14	1074 ± 120
293-endocan/S137A clone 2	-	1551 ± 485
	+MEP08	1924 ± 377
	+MEP14	1654 ± 293
293-endocan/S137A clone 4	-	970 ± 170
	+MEP08	1194 ± 357
	+MEP14	1182 ± 513
293-endocan/S137A clone 5	-	2688 ± 985
	+MEP08	3704 ± 1019
	+MEP14	2973 ± 839

addition of recombinant endocan in HUVEC cultures did not modify the FGF-2-induced [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation (Fig. 4A) despite doses 100-fold greater than that secreted. By contrast, addition of HS still increased [<sup>3</sup>H]thymidine uptake (Fig. 4A). On the other hand, addition of 10 μg/ml MEP 08 or MEP 14 has no cytotoxic effect on HUVECs and did not modify cell proliferation induced by FGF-2 as judged by MTT cytotoxicity assay (Fig. 4B).

**Serum Endocan Is Increased in Patients with Lung Cancer.** We explored the hypothesis that serum endocan may be increased in human cancer. Fifty patients admitted in the hospital for lung cancer were studied and compared with 25 healthy volunteers. Endocan's blood level was increased in patients (3.34 ± 0.37; mean ± SE) as compared with healthy subjects (0.63 ± 0.06, *P* < 0.0001, Mann-Whitney test; Fig. 4C). According to the international classification, the highest levels of serum endocan were found in patients with extended forms of cancer. These results suggest that endocan may represent a marker of human cancer.

**DISCUSSION**

PGs consist of a core protein to which are attached one or more glycosaminoglycan chains. They are mainly found associated to the cell membrane and the extracellular matrix (1–3). There is now evidence that these PGs can stimulate or inhibit tumor cell growth (18–24). We previously cloned and characterized a novel PG called endocan that is specifically synthesized by endothelial cells. One distinguishing point from the other PGs is that endocan is neither associated to the cell membrane nor to the extracellular matrix but released in a soluble form that circulates into the bloodstream (14). We previously showed that endocan binds to HGF/SF and promotes HGF-induced [<sup>3</sup>H]thymidine uptake by HEK 293 cells (13). Here, we demonstrate the capacity of endocan to promote tumor growth. To establish our hypothesis, we engineered human tumor cells to express human endocan and used them in a tumor xenograft mouse model. We took advantage of the fact that endocan is a secreted molecule, reducing thus the importance of its cellular origin. Importantly, endocan is expressed locally, within the tumor, produced in our mouse model by the transfected cells.

Consistent with our *in vitro* results, the glycan moiety of endocan was necessary for mediating tumor formation. A more surprising

finding was that the protein core of endocan is also an important determinant of tumor growth. Specifically, the F115 and F116 residues in the phenylalanine-rich region were shown to support binding of endocan to phenyl-Sepharose and to mediate tumor growth. These findings were additionally supported by the observation that MEP 08, an antiendocan mAb, specifically directed against the phenylalanine-rich region, blocked the effect of endocan on tumor growth.

The fact that the polypeptide itself is not involved in the modulation of the mitogenic effects of growth factors but is indispensable for tumor growth suggests that it functions *in vivo* through another host component. One host receptor candidate is represented by the leukocyte integrin LFA-1. LFA-1 (CD11a/CD18) is a heterodimeric transmembrane molecule constituted of β2 and αL chains. LFA-1 plays an important role in leukocyte adhesion, migration and activation. Leukocytes from mice lacking CD11a displayed selective impairments in alloantigen triggered T-cell proliferation, cytotoxicity and tumor rejection (25–27). Previously, endocan was shown to bind to LFA-1 and to reduce LFA-1-ICAM-1 interactions (15), so endocan may inhibit infiltration and activation of leukocytes into the tumor xenograft, as suggested by the absence of leukocyte infiltrates in the tissue sections of tumors.

An important finding was that therapy with MEP 08 antibody reduced

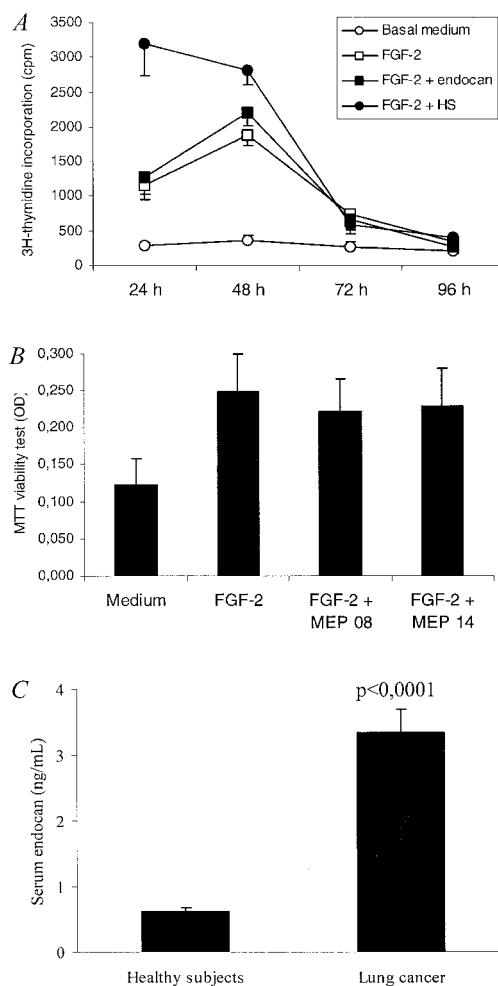


Fig. 4. No effects of endocan and MEP 08 on FGF-2-induced HUVEC proliferation. In A, kinetics of [methyl]<sup>3</sup>H thymidine uptake in HUVEC treated with 5 ng/ml FGF-2 (□), FGF-2 + 1 μg/ml endocan (■), FGF-2 + 1 μg/ml heparan sulfate (●). Data are mean ± SE of three experiments. In B, MTT viability test of HUVECs treated for 96 h with 5 ng/ml FGF-2, FGF-2 + 10 μg/ml MEP 08, and FGF-2 + 10 μg/ml MEP 14 (mean ± SD of one representative experiment of two done in quadruplicate). In C, increased levels of serum endocan in patients with lung cancer (mean ± SE of 50 patients versus 25 healthy individuals, *P* < 0.0001, Mann-Whitney test).

growth of macroscopic tumors. Interestingly, optimal antitumor activity was observed when MEP 08 was injected 2 weeks after tumor cell inoculation, indicating a potent curative effect. Several findings argue against a direct cytotoxic role of MEP 08. First, endocan is not expressed at the surface of HEK 293 cells. Second, MEP 08 does not bind to the surface of HEK 293-endocan cells. Third, MEP 08 has no effect on endocan-mediated proliferation of HEK 293 cells under *in vitro* conditions. Thus, one surprising point is that the antiproliferative activity of MEP 08 antibody does not require specific recognition of tumor cells. Another point is that the MEP 08 antitumor activity does not depend on angiostatic effects under *in vitro* conditions. First, addition of blocking (MEP 08) or nonblocking (MEP 14) antibodies exhibited no cytotoxic nor cytostatic activities on cultured HUVECs pulsed with FGF-2. Interestingly, antisense inhibition of endocan mRNA does not block vasculogenesis *in vitro*, despite its increase level of synthesis (28). Generally, a nonspecific antitumoral activity of antibodies requires Fc receptor engagement (29–31). Interestingly, two different antiendocan mAbs of the same isotype exhibited different antiproliferate capacity, which is not supporting a role for Fc receptor in MEP 08 activity. In these conditions, the MEP 08 antitumor activity may be more related to the blockade of a specific and functionally important domain within the endocan molecule, resulting in a reduction of tumor growth.

Finally, we observed a clear increase of serum level of endocan in patients with a diagnosis of lung cancer. The cellular origin of endocan has to be discussed: in our mouse tumor model, endocan expression in the HEK 293 cells is under the control of the strong cytomegalovirus enhancer/promoter, explaining why serum endocan levels are increased during the development of the tumor. In this situation, serum levels of endocan were directly correlated with the size of the tumor. In human beings, we know at present that endocan is mainly produced by the vascular endothelial cells (12, 14). It seems logical to postulate that the increased serum endocan in patients with lung cancer might both reflect the activation of tumor vascular bed and perhaps the tumoral proliferation. However, it is too early for considering that circulating endocan may already represent an useful marker for cancer in humans. Additional investigations are needed to evaluate this point.

In conclusion, our results suggest that: (a) endocan promotes tumor growth; and (b) its activity involves interactions with growth factors through the glycan and with the effector cells of the immune response through the polypeptide. Taken together these data raise the concept that in response to angiogenic factors, the vascular endothelial cells from solid tumors may secrete endocan, which, in turn, may result in a powerful control of the tumor development. So endocan might represent in the future an original and a novel target for anticancer therapy and additionally a marker for some kinds of solid tumors.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gwenola Kervoaze for her assistance in cell culture, Genevieve Marchandise for endocan ELISA, and Philippe Marquillies for his help in animal facility.

## REFERENCES

- Kjellen, L., and Lindahl, U. Proteoglycans: structures and interactions. *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 443–475, 1991.
- Iozzo, R. V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.*, 67: 609–652, 1998.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J., and Zako, M. Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Biochem.*, 68: 729–777, 1999.
- Saku, T., and Furthmayr, H. Characterization of the major heparan sulfate proteoglycan secreted by bovine aortic endothelial cells in culture. Homology to the large molecular weight molecule of basement membranes. *J. Biol. Chem.*, 264: 3514–3523, 1989.
- Mertens, G., Cassiman, J. J., Van den Bergh, H., Vermeylen, J., and David, G. Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. *J. Biol. Chem.*, 267: 20435–43, 1992.
- Kojima, T., Shworak, N. W., and Rosenberg, R. D. Molecular cloning and expression of two distinct cDNA-encoding heparan sulfate proteoglycan core proteins from a rat endothelial cell line. *J. Biol. Chem.*, 267: 4870–4877, 1992.
- Jarvelainen, H. T., Kinsella, M. G., Wight, T. N., and Sandell, L. J. Differential expression of small chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans, PG-I/biglycan and PG-II/decamin, by vascular smooth muscle and endothelial cells in culture. *J. Biol. Chem.*, 266: 23274–81, 1991.
- Jarvelainen, H. T., Iruela-Arispe, M. L., Kinsella, M. G., Sandell, L. J., Sage, E. H., and Wight, T. N. Expression of decorin by sprouting bovine aortic endothelial cells exhibiting angiogenesis *in vitro*. *Exp. Cell Res.*, 203: 395–401, 1992.
- Nelimaarkka, L., Salminen, H., Kuopio, T., Nikkari, S., Ekfors, T., Laine, J., Pelliniemi, L., and Jarvelainen, H. Decorin is produced by capillary endothelial cells in inflammation-associated angiogenesis. *Am. J. Pathol.*, 158: 345–353, 2001.
- Nelson, R. M., Venot, A., Bevilacqua, M. P., Linhardt, R. J., and Stamenkovic, I. Carbohydrate-protein interactions in vascular biology. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 11: 601–631, 1995.
- Delehedde, M., Lyon, M., Sergeant, N., Rahmoune, H., and Fernig, D. G. Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*, 6: 253–273, 2001.
- Lassalle, P., Molet, S., Janin, A., Heyden, J. V., Tavernier, J., Fiers, W., Devos, R., Vazeux, R., Riche, C., Degand, P., Jude, B., Janin, A., Fernig, D. G., Tonnel, A. B., and Lassalle, P. Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J. Biol. Chem.*, 276: 48341–9, 2001.
- Bechard, D., Meignin, V., Scherpereel, A., Oudin, S., Kervoaze, G., Bertheau, P., Janin, A., Tonnel, A., and Lassalle, P. Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J. Vasc. Res.*, 37: 417–425, 2000.
- Bechard, D., Scherpereel, A., Hammad, H., Gentina, T., Tsicopoulos, A., Aumercier, M., Pestel, J., Dessaint, J. P., Tonnel, A. B., and Lassalle, P. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol.*, 167: 3099–3106, 2001.
- Lassalle, P., LaGrou, C., Delneste, Y., Sanceau, J., Coll, J., Torpier, G., Wietzerbin, J., Stehelin, D., Tonnel, A. B., and Capron, A. Human endothelial cells transfected by SV40 T antigens: characterization and potential use as a source of normal endothelial factors. *Eur. J. Immunol.*, 22: 425–431, 1992.
- Sladowski, D., Steer, S. J., Clothier, R. H., and Balls, M. An improved MTT assay. *J. Immunol. Methods*, 157 (1–2): 203–207, 1993.
- Alexander, C. M., Reichman, F., Hinkes, M. T., Lincecum, J., Becker, K. A., Cumberland, S., and Bernfield, M. Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat. Genet.*, 25: 329–332, 2000.
- Kleeff, J., Wildi, S., Kumbasar, A., Friess, H., Lander, A. D., and Korc, M. Stable transfection of a glypican-1 antisense construct decreases tumorigenicity in PANC-1 pancreatic carcinoma cells. *Pancreas*, 19: 281–288, 1999.
- Lin, H., Huber, R., Schlessinger, D., and Morin, P. J. Frequent silencing of the GPC3 gene in ovarian cancer cell lines. *Cancer Res.*, 59: 807–810, 1999.
- Santra, M., Mann, D. M., Mercer, E. W., Skorski, T., Calabretta, B., and Iozzo, R. V. Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J. Clin. Invest.*, 100: 149–157, 1997.
- Mathiak, M., Yenisey, C., Grant, D. S., Sharma, B., and Iozzo, R. V. A role for perlecan in the suppression of growth and invasion in fibrosarcoma cells. *Cancer Res.*, 57: 2130–2136, 1997.
- Marchisone, C., Del Grosso, F., Masiello, L., Prat, M., Santi, L., and Noonan, D. M. Phenotypic alterations in Kaposi's sarcoma cells by antisense reduction of perlecan. *Pathol. Oncol. Res.*, 6: 10–17, 2000.
- Sharma, B., Handler, M., Eichstetter, I., Whitelock, J. M., Nugent, M. A., and Iozzo, R. V. Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis *in vivo*. *J. Clin. Invest.*, 102: 1599–608, 1998.
- Schmits, R., Kundig, T. M., Baker, D. M., Shumaker, G., Simard, J. J., Duncan, G., Wakeham, A., Shahinian, A., van der Heiden, A., Bachmann, M. F., Ohashi, P. S., Mak, T. W., and Hickstein, D. D. LFA-1-deficient mice show normal CTL responses to virus but fail to reject immunogenic tumor. *J. Exp. Med.*, 183: 1415–1426, 1996.
- Shier, P., Otulakowski, G., Ngo, K., Panakos, J., Chourmouzis, E., Christjansen, L., Lau, C. Y., and Fung-Leung, W. P. Impaired immune responses toward alloantigens and tumor cells but normal thymic selection in mice deficient in the  $\beta 2$  integrin leukocyte function-associated antigen-1. *J. Immunol.*, 157: 5375–5386, 1996.
- Shier, P., Ngo, K., and Fung-Leung, W. P. Defective CD8+ T-cell activation and cytolytic function in the absence of LFA-1 cannot be restored by increased TCR signaling. *J. Immunol.*, 163: 4826–4832, 1999.
- Aitkenhead, M., Wang, S. J., Nakatsu, M. N., Mestas, J., Heard, C., and Hughes, C. C. Identification of endothelial cell genes expressed in an *in vitro* model of angiogenesis: induction of ESM-1,  $\beta$ ig-h3, and NrCAM. *Microvasc. Res.*, 63: 159–171, 2002.
- Clynes, R., Takechi, Y., Moroi, Y., Houghton, A., and Ravetch, J. V. Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 652–656, 1998.
- Isaacs, J. D., Greenwood, J., and Waldmann, H. Therapy with monoclonal antibodies. II. The contribution of Fc  $\gamma$  receptor binding and the influence of C(H)1 and C(H)3 domains on *in vivo* effector function. *J. Immunol.*, 161: 3862–3869, 1998.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nat. Med.*, 6: 443–446, 2000.

## **ARTICLE II**

### **Endocan Expression and Relationship with Survival in Human Non Small Cell Lung Cancer**

Bogdan Dragos Grigoriu\*, Florence Depontieu\*, Arnaud Scherpereel, Delphine Gourcerol, Patrick Devos, Taoufik Ouatas, Jean-Jacques Lafitte, Marie-Christine Copin, Andre-Bernard Tonnel, Philippe Lassalle

\* Both authors contributed equally to this work

Clin Cancer Res 2006;12:4575-4582

## **Endocan Expression and Relationship with Survival in Human Non – Small Cell Lung Cancer**

Bogdan Dragos Grigoriu,<sup>1,2,6</sup> Florence Depontieu,<sup>1,2</sup> Arnaud Scherpereel,<sup>1,2,3</sup> Delphine Gourcerol,<sup>1</sup> Patrick Devos,<sup>5</sup> Taoufik Ouatas,<sup>7</sup> Jean-Jacques Lafitte,<sup>3</sup> Marie-Christine Copin,<sup>4</sup> Andre-Bernard Tonnel,<sup>1,2,3</sup> Philippe Lassalle,<sup>1,2</sup> and The Thoracic Oncology Group

**Abstract Purpose:** We evaluated the expression of endocan, a soluble lung- and kidney-selective endothelial cell-specific dermatan sulfate proteoglycan, in non – small cell lung tumors compared with normal lung and studied the significance of high levels of circulating endocan in patients with non – small cell lung cancer.

**Material and Methods:** Endocan and vascular endothelial growth factor mRNA expression were evaluated by semiquantitative PCR in tumoral and nontumoral lung tissue samples from a first series of 24 patients submitted to curative surgery. Relationships between survival, time to tumor progression, and serum levels of endocan were evaluated in a second series of 30 previously untreated patients addressed for staging.

**Results:** In non – small cell lung cancers, endocan mRNA was overexpressed compared with control lung. Immunohistochemistry shows that endocan was expressed only by tumor endothelium in all cases, especially in the periphery of the tumors, with no differences between adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. Endocan and vascular endothelial growth factor mRNA expression was positively correlated in lung tumors. Serum endocan levels, as well as tumor, node, and metastasis status, were correlated with both survival and time to tumor progression. However, endocan serum level was not an independent prognostic factor due to its correlation with the presence of metastasis.

**Conclusion:** Endocan is overexpressed in non – small cell lung tumors compared with healthy lung and probably represents a response of tumoral endothelium to proangiogenic growth factor stimulation. Circulating levels of endocan might reflect tumor angiogenic stimulation and present prognostic significance.

Lung cancer is the leading cause of cancer mortality with, for example, >170,000 diagnosed cases, resulting in >160,000 deaths in the United States in 2005 (1) and a corresponding 28,000 diagnosed cases in France. Of these, 80% represent cases of non – small cell lung cancer (NSCLC). Despite multimodal therapy, prognosis is still dismal with an overall 5-year survival

of 15% (1). Thus, efforts toward finding new potential therapeutic targets are important research directions.

Recently, we have shown that endocan, a lung- and kidney-selective endothelial cell-specific dermatan sulfate proteoglycan, binds through its glycan moiety to hepatocyte growth factor/scatter factor. *In vitro*, binding to endocan amplifies the growth factor mitogenic effect on cells of epithelial origin (2). *In vivo*, endocan overexpression by nontumorigenic epithelial cells induces tumor formation, whereas overexpression by tumorigenic cells sharply increases the growth rate of resulting tumors (3). Although the tumorigenic effect requires the presence of the glycan chain, it also depends on the protein structure, as specific protein mutation results in loss of the tumor growth promotion effect (3).

Endocan also binds to the integrin lymphocyte function-associated antigen-1 and has been implicated in inhibiting the lymphocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction (4), an important step in the firm adhesion of leukocytes to the endothelium, and thus could be involved in regulating leukocyte migration into tissues. Interaction between intercellular adhesion molecule-1 and lymphocyte function-associated antigen-1 has also been implicated in the binding of cytotoxic lymphocytes and natural killer cells to tumor cells, resulting in cell lysis (5). Intercellular adhesion molecule-1 expression plays an important role in

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U774; <sup>2</sup>Institut Pasteur de Lille; <sup>3</sup>Pulmonary and Thoracic Oncology Department and <sup>4</sup>Department of Pathology, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille; <sup>5</sup>Statistics Department, Medical School of Lille, Université de Lille 2, Lille, France; <sup>6</sup>Department of Pulmonary Diseases, University of Medicine and Pharmacy, Iasi, Romania; and <sup>7</sup>Endotis Pharma, Loos, France  
Received 1/26/06; revised 5/19/06; accepted 5/25/06.

**Grant support:** Programme Hospitalier de Recherche Clinique (2002), France (A. Scherpereel) and Société de Pneumologie de Langue Française research grant and International Union Against Cancer Yamagiwa-Yoshida Memorial International Cancer Study grant (B.D. Grigoriu).

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.

**Note:** B.D. Grigoriu and F. Depontieu contributed equally.

**Requests for reprints:** Bogdan Dragos Grigoriu, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U416, Rue du Professeur Calmette, 59000 Lille, France. Phone: 33-6-26-76-29-37; E-mail: b.grigoriu@hotmail.com.

© 2006 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0185

tumor development and its overexpression in tumor xenografts is associated with slower growth and higher tumor infiltration by lymphocytes (6). Thus endocan, by its dual roles in modulating cell growth activity and leukocyte function, could potentially be involved in tumor growth control.

Endocan is overexpressed during *in vitro* angiogenesis (7), but antisense knockout of endocan does not prevent this process, suggesting only an accessory role in angiogenesis.

Microarray studies have shown an increased endocan mRNA expression in various tumor locations, such as kidney (8), breast (9), and lung (10), as well as in highly invasive melanoma cell lines (11). In kidney tumors, endocan expression has been correlated with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression (7). These studies revealed that elevated transcription of the endocan gene represents one of the molecular signatures of bad prognosis in both lung (10) and breast (9) cancers. Consistently, elevated blood levels of endocan were observed in patients with lung cancer (3). However, little is known about the expression of endocan protein in human tumors and the significance of endocan levels in the blood.

The human endocan gene is transcribed into two alternatively spliced variants, which either retain (i.e., endocan) or exclude (i.e., endocan $\Delta$ 2) exon 2 (7). No data exists to date about relative expression of the two isoforms in human tumors. As endocan is preferentially expressed in lung tissue, a major question for evaluation is its involvement in the development of NSCLC. We show here that (a) endocan is strongly expressed in the tumor vessels, (b) that serum endocan levels have prognostic value in NSCLC, (c) that VEGF and endocan levels are linked in NSCLC tissues, and (d) that VEGF represents a powerful inducer of endocan secretion.

## Materials and Methods

**Patients and samples.** Two groups of patients were recruited. The first consisted of 24 patients undergoing surgery for NSCLC between October 2003 and January 2005 in one of the surgical centers participating in the Thoracic Oncology Group (see Appendix A). Immediately after surgical resection, the pathologist sampled both the tumor and the lung distant from the tumor. Each sample was then cut into two pieces. One was immediately frozen at  $-20^{\circ}\text{C}$  in Trizol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for later RNA extraction. The other one was fixed in alcohol-formaldehyde-acetic acid (Labonord, Templemars, France) for 2 hours and then processed for paraffin embedding. The second group comprised 30 previously untreated patients with NSCLC who had undergone an initial evaluation for tumor staging in the Department of Thoracic Oncology at the Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille (Lille, France) in 1996. Five milliliters of serum derived from the blood drawn for routine biochemical analysis were immediately frozen and conserved at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed for endocan. The physicians in charge of the patients were not aware of the results of the endocan assay. Appropriate antitumoral treatment was chosen according to tumor staging. Patients were then followed up as either in- or out-patients, and survival data were recorded. Staging was compliant with the fifth International Union Against Cancer guidelines (12).

Both the protocol and the use of human tissues were approved by the local ethics committee, and the patients gave informed consent. Only patients with a clear histologic classification as NSCLC and also without any previous treatment were included in the study.

**Cell isolation and culture.** Primary human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) were derived from the veins of umbilical

cords as described previously (13). Second passage HUVECs were cultured on fibronectin-coated, 48-well culture plates (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) in RPMI 1640 containing 20% FCS, endothelial cell growth supplement (Sigma-Aldrich, Lyon, France), 5 IU/mL heparin (Sanofi-Synthelabo, Gentilly, France), and 2 mmol/L L-glutamine (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). At confluency, the cells were washed once and incubated in fresh RPMI 1640 containing 2% FCS and 2 mmol/L L-glutamine for 18 hours and then washed once again with the same medium just before stimulation. Recombinant human VEGF<sup>165</sup>, fibroblast growth factor-2, or tumor necrosis factor- $\alpha$  (R&D Systems, Abingdon, United Kingdom), all at final concentrations of 20 ng/mL, were then added to appropriate wells. In inhibition experiments, VEGF<sup>165</sup> was incubated with an anti-VEGF monoclonal antibody (R&D Systems) for 1 hour before addition to culture medium. The cell supernatants were centrifuged and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until endocan quantitation by ELISA. Cell viability was evaluated by a colorimetric method using the reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl-tetrazolium bromide (Sigma-Aldrich). At the end of the experiment, cell number was quantified by assaying lactate dehydrogenase release after cell lysis using the Cytotox 96 lactate dehydrogenase release assay (Promega, Charbonieres, France). In some experiments, cells were retrieved in 1 mL Trizol reagent and then processed for total RNA extraction.

**Reverse transcription-PCR.** Total RNA extraction was done on Trizol-treated samples according to the manufacturer's recommendations. Two micrograms of the resulting total RNA were converted to first strand cDNA by use of random hexamer primers and Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. PCR was done using 1 unit HotMaster Taq DNA Polymerase (Eppendorf, Le Pecq, France) and 1:20 of the reverse transcription reaction, with an initial hotstart of two minutes at  $94^{\circ}\text{C}$  followed by 30 seconds annealing and 1 minute extension at  $65^{\circ}\text{C}$ . Primers, annealing temperatures, and number of cycles used (chosen for being in the exponential phase of PCR amplification) were as follows:

- (a) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (sense): GTCTTCA-CCACCATGGAGA,  $55^{\circ}\text{C}$ , 22 cycles, 204-bp amplicon;
- (b) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (antisense): CCAAAGTTGTCATGGATGACC;
- (c) RS9 (sense): CAGGCGACACGGTGAAGC,  $60^{\circ}\text{C}$ , 29 cycles, 411-bp amplicon;
- (d) RS9 (antisense): CGCGAGCGTGGTGGATGGAC;
- (e) Endocan (sense): GCTACCGCACAGTCTCAGG,  $60^{\circ}\text{C}$ , 32 cycles, bands of 633 (endocan) and 463-bp (endocan $\Delta$ 2);
- (f) Endocan (antisense): ATTGCATTTTTAGTTCTTGAGTGT;
- (g) Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (sense): AGGG-GACCAGCTGCACATTAGG,  $55^{\circ}\text{C}$ , 30 cycles, 450-bp amplicon;
- (h) Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (antisense): AGGCCGCTTCTCTTGACCACT;
- (i) VEGF (sense): TGGATCCATGAACITTTCTGCTGTC,  $59^{\circ}\text{C}$ , 32 cycles; and
- (j) VEGF (antisense): TCACCGCCTTGGCTTGCTCACTT.

Three bands were detected at 452, 584, and 656 bp corresponding to the VEGF isoforms 121, 165, and 189, respectively (14).

PCR products were migrated on 1.5% agarose gels with 0.01% GelStar (Cambrex Bioscience, Rockland). Band intensities were measured under UV light using Gel Analyst software (Clara Vision, Orsay, France). For semiquantitative analysis, the band intensity for endocan was normalized to platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 as an endothelial-specific gene and VEGF was normalized to RS9.

**Antibody production and purification.** Production of anti-endocan antibodies was done as described previously (15). Two different hybridoma cell clones MEP14 and MEP08 directed against antigenic determinants derived from endocan exon 3 and exon 1, respectively, were selected. Hybridoma cell lines were grown in conditioned medium

without FCS (Hybridoma serum-free medium, Life Technologies). Supernatants were purified on a protein G-Sepharose column (Amersham, Orsay, France). Antibodies were eluted in 3 mol/L MgCl<sub>2</sub>, dialyzed against PBS, and then concentrated by centrifugation over Amicon Ultra 30-kDa molecular weight cutoff filters (Millipore, Molsheim, France). Protein was quantified using the Bio-Rad protein assay (Bio-Rad, Marne la Coquette, France), its purity by Coomassie blue staining after SDS-PAGE, and endocan reactivity by ELISA.

**ELISA.** Serum endocan levels were quantified using a sandwich immunoassay described previously (15, 16). The monoclonal antibodies used recognize both endocan isoforms. Successive incubations with biotin-conjugated anti-mouse IgG1 antibody (PharMingen, Le Pont-de-Claix, France) and streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (Clinisciences, Montrouge, France) were followed by visualization using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (Sigma-Aldrich).

**Immunohistochemistry.** Tissues from lung carcinoma and the corresponding nontumoral lung were analyzed under standard procedures. Staining was conducted using an automated immunostainer (Benchmark, Ventana Medical Systems, Illkirch, France) on 3- $\mu$ m-thick sections of paraffin-embedded tissue, mounted on Superfrost adhesive slides. Cell conditioning solution (CC1), which is a Tris-based buffer with a slightly basic pH, was used as a pretreatment step at 98°C for 48 minutes. Sections were then incubated with primary anti-endocan monoclonal antibody MEP08 (2 mg/mL; 1:500 dilution) or MEP14 (1 mg/mL; 1:200 dilution) for 32 minutes. The immunohistochemistry method used is a three-step indirect process based on the biotin-streptavidin complex. Slides were counterstained with hematoxylin. Endogenous peroxidase activity was suppressed by initially incubating specimens in 3% hydrogen peroxide. Positive and negative controls, excluding primary and/or secondary antibodies, were included in each automated immunohistochemistry run.

**Statistical analysis.** All data are presented as median values with 25th and 75th centiles reported in parentheses. Data from semiquantitative evaluation of endocan expression levels in tumors were compared with those in normal lung parenchyma from the same patient using an exact Wilcoxon test. A two-sided  $P < 0.05$  was considered significant. The log-rank test statistic was used to compare differences in survival between groups. Patients still alive at the end of the follow-up period were considered censored observations. A stepwise Cox proportional hazard model was then used to examine associations between the various prognostic factors and survival. Age was introduced as a continuous variable, whereas node (grouped as N<sub>0</sub> and N<sub>1</sub> or N<sub>2</sub> and N<sub>3</sub>) and metastasis status were introduced as binary variables. Tumor extension was taken into account either by stage (I-IV) or by using separate tumor, necrosis, and metastasis descriptors. Serum endocan was used either as a continuous variable or as a binary variable. The cutoff value for serum endocan, which best differentiate survivors and nonsurvivors, was determined by an algorithm of maximization of hazard ratio (17, 18). Statistical analyses were done with SPSS 12.0 software (SPSS, Inc., Paris La Defense, France) and the SAS system (version 8.2; SAS Institute, Inc., Cary, NC).

## Results

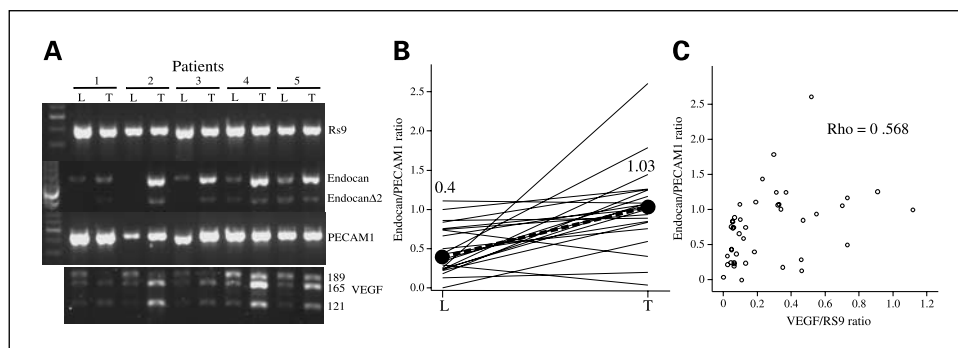
**Endocan mRNA levels are increased in lung tumors.** A total of 24 patients were recruited for the mRNA study. As endocan is an endothelial cell-specific molecule, the endocan band intensity was normalized to that of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31 antigen), used as an endothelial cell marker. By semiquantitative PCR analysis, we found that the level of the exon 2-containing endocan mRNA was increased in lung tumor tissue, with an average 2.5-fold increase ( $P = 0.029$ ) over that in lung tissue sampled at a distance from the tumor (Fig. 1A and B). Across the 24 lung tumor samples, endocan mRNA increased in 20 cases did not change in two and slightly decreased in two. No differences in endocan expression were seen between squamous cell carcinomas and adenocarcinomas. Contrary to the endocan mRNA data, we observed only a small increase in the tumor levels of the exon 2-deleted endocan $\Delta$ 2 mRNA, difference that did not reach statistical significance in our series ( $P = 0.09$ ).

Thus, there is an overexpression of the endocan mRNA in NSCLC compared with distant lung parenchyma.

**Intratumoral and peritumoral vessels exhibit strong endocan protein expression.** To understand expression pattern of endocan in the tumor microenvironment and to determine the specificity of endocan to tumor-associated vessels, we did immunohistochemical studies. These showed that endocan protein was detected in the endothelium of all tumors studied (example in Fig. 2A). The intratumoral vessels within the cancer nests exhibited endothelial staining for endocan, with expression present in ~80% of the vessels identified by anti-CD34 staining. Interestingly, endocan expression was more intense in the tumor periphery and in the lung parenchyma immediately lining the tumor, where most vessels expressed endocan (Fig. 2B). Moreover, endocan was strongly expressed by intratumoral vessels in areas of pleural invasion, bronchial infiltration, and lymph node metastasis. Only rarely vessels in the healthy visceral pleura were stained by the anti-endocan antibody. Vessels in normal bronchial mucosa distant from the carcinoma also lacked staining. No staining was observed in tumoral cells in all cases studied.

The same staining pattern was observed whichever antibody (MEP08 or MEP14) was used. These two antibodies, which recognize epitopes within exon 1 or exon 3 respectively, thus recognize both endocan and endocan  $\Delta$ 2, and their reactivity is also independent of endocan glycanation. Thus, the staining confirms that both epitopes are equally distributed within NSCLC tissues. No differences were seen

**Fig. 1.** Expression of endocan mRNA in lung tumors. **A**, typical PCR from 5 patients. L, normal lung; T, tumor. **B**, semiquantitative analysis of endocan expression in human tumors; each line is an individual patient. Solid circles with a bold line between them are the median values for each group. **C**, correlation between endocan and VEGF expression evaluated by semiquantitative PCR in lung tumors. Spearman  $\rho = 0.568$ ;  $P = 0.006$ .

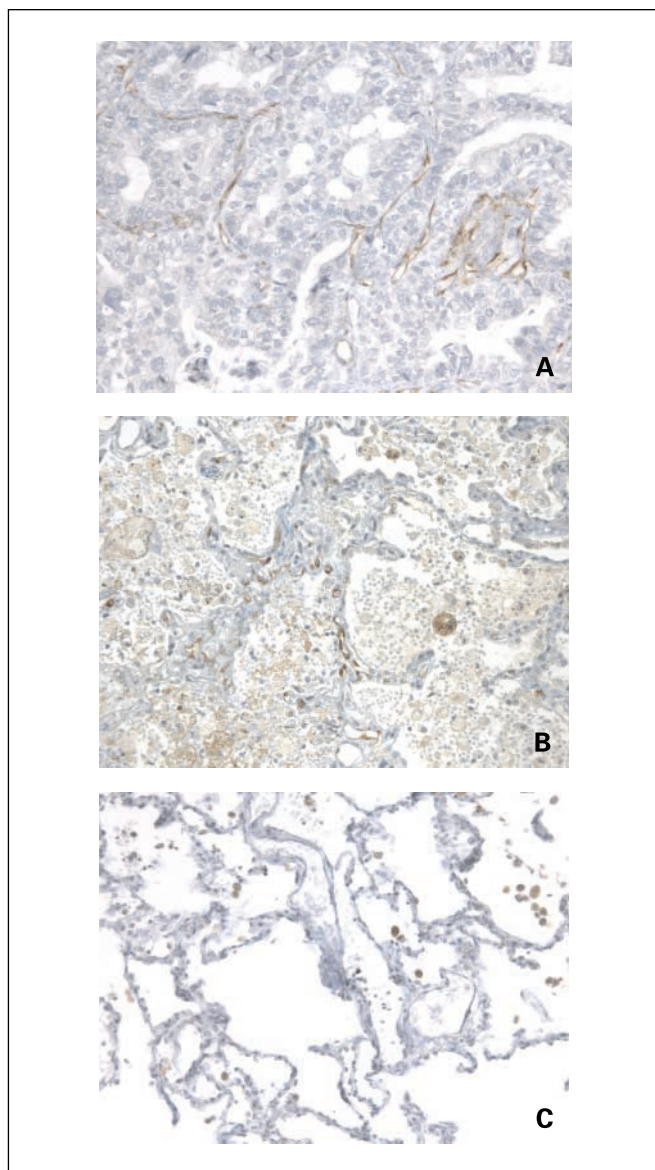


between adenocarcinomas and small cell carcinomas, either in intensity of staining or the number of stained vessels.

Despite the fact that endocan is normally expressed at the mRNA level by endothelial cells in the normal lung, immunohistochemistry showed only a weak signal for endocan in very few vessels in the normal lung (Fig. 2C). Therefore, in normal lung vessels, endocan protein is not expressed at sufficient levels to give a clear signal in immunohistochemistry.

Thus, intratumoral and peritumoral endothelial cells represent the main source of endocan in the vicinity of the tumor. In addition, the low expression of endocan by normal lung vessels confers on this molecule a special interest as a potential marker of intratumoral vasculature.

**VEGF stimulates endocan secretion from endothelial cells and correlates with endocan expression in NSCLC.** As endocan is



**Fig. 2.** Immunohistochemical staining for endocan. Lung adenocarcinoma shows a strong anti-endocan staining of endothelial cells in the tumor (A) and peritumoral area (B) compared with a negative staining of normal lung (C). For all images, MEPO8 anti-endocan monoclonal antibody staining and hematoxylin counterstaining were done. Magnification,  $\times 200$ .

expressed in vessels from tumor periphery, we searched potential factors involved in up-regulation of endocan expression at the endothelial level. VEGF is one of the main mediators involved in the formation and activation of tumor vessels (19, 20). Previous results indicated a correlation between endocan and VEGF mRNA expression in kidney tumors (7). We therefore focused on VEGF as an angiogenic mediator that might up-regulate endocan mRNA *in situ*. To prove a direct effect of VEGF on endocan production by tumor endothelial cells, we studied whether VEGF induced endocan secretion in HUVECs *in vitro*. HUVECs spontaneously secrete low levels of endocan. On stimulation with 20 ng/mL VEGF<sup>165</sup>, HUVEC supernatants exhibited 3-fold increased levels of endocan (Fig. 3A). An increase was already observed after 24 hours and continued for the 4 days of stimulation. By comparison, VEGF stimulation was at least as efficient as fibroblast growth factor-2 (another known angiogenic growth factor) or tumor necrosis factor- $\alpha$ , which has been already reported to induce an increase in endocan secretion (21). Consistently, VEGF-stimulated HUVECs also showed a substantial increase in endocan mRNA expression, mostly of the larger transcript (Fig. 3C). We also tested whether blocking anti-VEGF antibodies could inhibit VEGF-induced endocan expression. Addition of an anti-VEGF antibody induced a dose-dependent inhibition of VEGF-induced endocan secretion by endothelial cell with an almost complete (95%) inhibition at 0.1  $\mu$ g/mL and a 50% neutralization dose of 0.02  $\mu$ g/mL, which is the range of the antiproliferative effect reported by the manufacturer for this antibody (Fig. 3B).

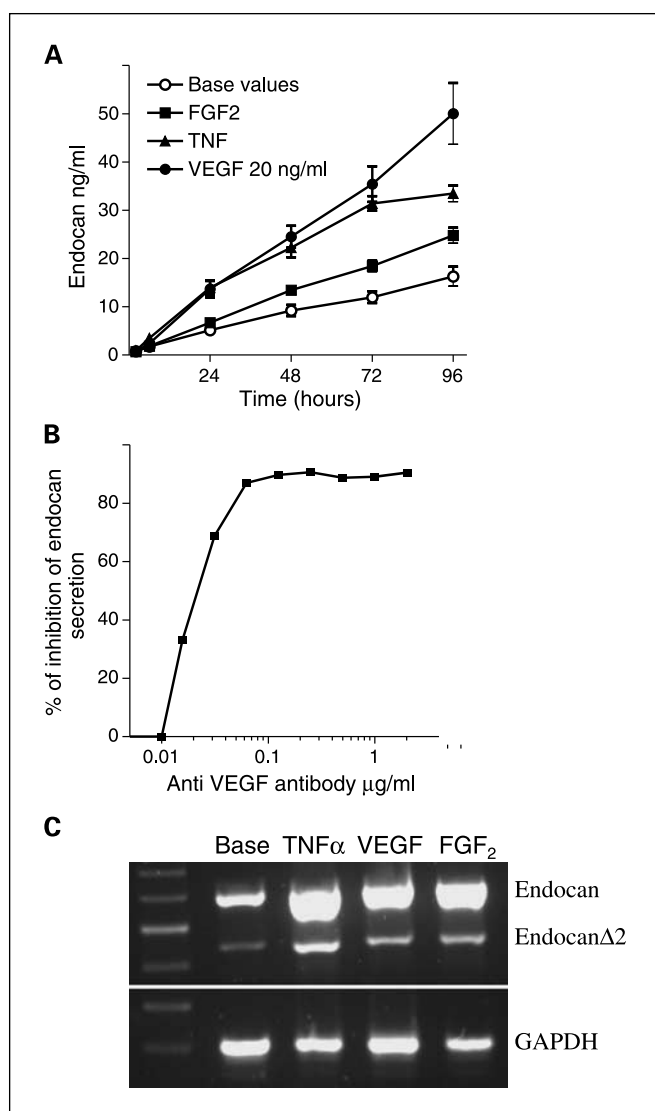
In our lung tumor samples, we found that VEGF mRNA is increased compared with the distant lung tissue (Fig. 1A), especially VEGF<sup>165</sup>, which is one of the dominant VEGF isoforms expressed in lung tumors (20). Statistical comparisons between the mRNA levels of the endocan and VEGF<sup>165</sup> revealed a significant positive correlation (Spearman  $\rho = 0.568$ ;  $P = 0.006$ ; Fig. 1C).

Thus, from these results, VEGF, a major angiogenic factor involved in tumoral angiogenesis, induces a sustained increase in both endocan mRNA expression and subsequent endocan protein secretion by primary cultured human endothelial cells, which could explain the similar endocan overexpression observed in tumor vessels *in vivo*.

**Prognostic value of serum endocan in patients with NSCLC.** In an earlier preliminary study, we found elevated serum levels of endocan in patients with lung cancer (3). Moreover, endocan now seems to be a marker of tumor vessels. Bearing in mind the fact that tumor vessel density represents one key determinant of tumor aggressiveness and poor prognosis (22), we may speculate that elevated serum endocan might reflect tumor angiogenesis and thus might be a potential prognostic factor.

Our first approach to test this hypothesis was to look for any correlation between serum endocan levels and survival. We followed up 30 patients with NSCLC for a median of 10 months (25th-75th centiles of 4-24 months). All but four patients died during the follow-up period. The demographic characteristics of the patients are reported in Table 1. The endocan median serum titer (25th-75th centiles) was significantly higher ( $P < 0.001$ , Mann-Whitney  $U$  test) for cancer patients [1.74 ng/mL (1.21-4.3 ng/mL)] compared with that for a group of 20 healthy volunteers [0.77 ng/mL





**Fig. 3.** Kinetics of induced endocan secretion in HUVECs. *A*, VEGF and fibroblast growth factor-2 induce endocan secretion. HUVECs at confluence were cultured in RPMI 1640 containing 2% FCS. The supernatants were collected and endocan was evaluated by ELISA. Points, mean of seven separate experiments; bars, SE. Experimental conditions: ○, base values and after addition of 20 ng/mL; ●, VEGF<sup>165</sup>; ■, fibroblast growth factor-2; ▲, tumor necrosis factor- $\alpha$ . HUVECs viability evaluated by a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide test showed no difference over time in all experimental conditions (data not shown). No statistically significant difference in cell number was found after 96 hours of stimulation as measured by lactate dehydrogenase release after cell lysis. *B*, dose-dependent inhibition of endocan secretion by a blocking anti-VEGF monoclonal antibody after 48 hours of culture; similar results were obtained at all time points. Experiments were done in quadruplicate. *C*, typical PCR of endocan mRNA expression in HUVECs at 24 hours after stimulation.

(0.51-0.95 ng/mL)] reported previously by us (16). By univariate analysis, overall survival was statistically significantly associated with serum endocan levels ( $P = 0.013$ ), N<sub>2</sub> or N<sub>3</sub> status ( $P = 0.03$ ), M<sub>1</sub> status ( $P = 0.002$ ), and tumor stage ( $P = 0.011$ ) but not with sex, age, or histologic subtype (adenocarcinoma/squamous cell carcinoma). The latter variables were subsequently not introduced into the multivariate analysis (Table 2). Significant correlations were found between endocan levels and the presence of metastasis ( $P = 0.025$ ) but not with tumor grade ( $P = 0.26$ ) or node status ( $P = 0.09$ ).

However, our study included only 30 patients, and eventually in a larger series, significant correlations could be shown especially with node status. The best cutoff level for endocan that differentiated between survivors and nonsurvivors was 1.3 ng/mL. The Cox regression analysis revealed that endocan of >1.3 ng/mL was a significant predictor of overall survival only when tumor-node-metastasis classification of tumor extension was not taken into account. When only tumor and node descriptors for tumor extension were taken into account, endocan was still predictive of overall survival but not after introduction of metastasis status into the model. As expected, the tumor tumor-node-metastasis stage descriptor remained the strongest predictor of survival ( $P = 0.002$ ).

Based on the above indicators, we divided the patients into two groups according to a serum endocan cutoff level of 1.3 ng/mL. Median survival was significantly different ( $P = 0.016$ , log-rank test) between the two groups: 6 months (95% confidence interval, 1-11 months) for the high endocan group

**Table 1.** Demographic data of recruited patients for survival analysis

	mRNA study ( <i>n</i> = 24)	Prognostic study ( <i>n</i> = 30)*
Age (y) median (25-75th centiles)	61 (54-68)	61 (55-67)
Male sex (%)	20 (83.3)	24 (80)
Karnofsky index median (25th-75th centiles)	100	90 (80-90)
Histologic type, <i>n</i> (%)		
Adenocarcinoma	17 (70.8)	16 (53.3)
Squamous cell carcinoma	7 (29.2)	12 (40)
Large cell carcinoma		2 (6.6)
Staging, <i>n</i> (%)		
I	9 (37.5)	3 (10)
IIA and IIB	7 (29.2)	4 (13.3)
IIIA	8 (33.3)	3 (10)
IIIB	—	4 (13.3)
IV	—	16 (53.3)
Tumor classification, <i>n</i> (%)		
T <sub>1</sub>	10 (41.7)	4 (13.3)
T <sub>2</sub>	12 (50)	12 (40)
T <sub>3</sub>	2 (8.3)	7 (23.3)
T <sub>4</sub>		6 (20)
Node classification, <i>n</i> (%)		
N <sub>0</sub>	10 (41.7)	7 (23.3)
N <sub>1</sub>	6 (25)	3 (10)
N <sub>2</sub>	8 (33.3)	12 (40)
N <sub>3</sub>	—	7 (23.3)
Treatment offered, <i>n</i> (%)		
Surgery	24 (100)	8 (26.6)
Radiotherapy		16 (53.3)
Chemotherapy		24 (80)

NOTE: Staging is reported as clinical tumor-node-metastasis.  
\*Evaluation of tumor and node for one M<sub>1</sub> patient is missing.

[endocan median, 3.78 ng/mL (1.62-4.99 ng/mL)] versus 33 months (95% confidence interval, 9-56 months) for the low endocan group [endocan median, 1 ng/mL (0.55-1.2 ng/mL); Fig. 4A]. Similar results were obtained when considering the time to tumor progression [i.e., a significantly longer time (11 months; 95% confidence interval, 9-56 months) in the low endocan group compared with that in the high-endocan group (4 months; 95% confidence interval, 3-9 months; Fig. 4B)].

Therefore, high serum endocan levels seem to be a predictor of bad prognosis in NSCLC, albeit it is not an independent prognostic factor.

### Discussion

Lung cancer is the leading cause of death by cancer in developed countries (1). The increasing incidence, the absence of blood markers of the disease, and the poor prognosis underline the need to search for new strategies for diagnosis, follow-up, and treatment. The development of solid tumors involves early angiogenesis and reorganization of the microenvironment that is pivotal for tumor growth. Both stromal cells and extracellular matrix components contribute to host-tumor relationships and to the successful growth of the tumor (23–25). It is now accepted that the growth of solid tumors is dependent on their capacity to acquire a blood supply, and much effort has been directed toward the development of agents that disrupt this process (26).

Endocan is a secreted endothelial cell-restricted dermatan sulfate proteoglycan (27), which is preferentially expressed in lung and kidney tissues (21), and exhibits growth-promoting activities both *in vitro* and *in vivo* (2, 3). Endocan interacts with growth factors, such as hepatocyte growth factor/scatter factor, through its glycan chain, thereby eliciting epithelial cell growth *in vitro* (2). The crucial role of the glycan chain was further shown when 293 cells transfected with wild-type endocan, but not when transfected by its nonglycanated mutant, formed tumors in the skin of severe combined immunodeficient mice. However, these *in vivo* results also revealed that growth-

promoting activity is also dependent on the protein core of endocan, in particular, a phenylalanine-rich region centered on amino acid residues 115 and 116 (3). So, endocan that is a molecule sustaining tumorigenesis (3) seems to be a potential target for antitumor therapy.

VEGF is a major player in angiogenesis by virtue of its ability to induce vascular permeability, to induce and sustain endothelial cell division and survival, and to initiate the sprouting of new blood vessels to supply tumors with oxygen and nutrients. VEGF expression has been described as an important prognostic factor in NSCLC (28). As already described in the literature (29), we found that VEGF is also overexpressed in the NSCLC samples studied but also that it correlates with endocan expression. To confirm a direct link between VEGF and endocan, we looked at the possible up-regulation of endocan by VEGF. We have shown *in vitro*, that VEGF induces endocan expression in endothelial cells at both mRNA and protein levels. Moreover, anti-VEGF antibodies inhibit VEGF-induced endocan secretion by endothelial cells. With this data in mind, it could be interesting to assess serum endocan kinetics in patients treated with various combination schemes especially with antiangiogenic therapy.

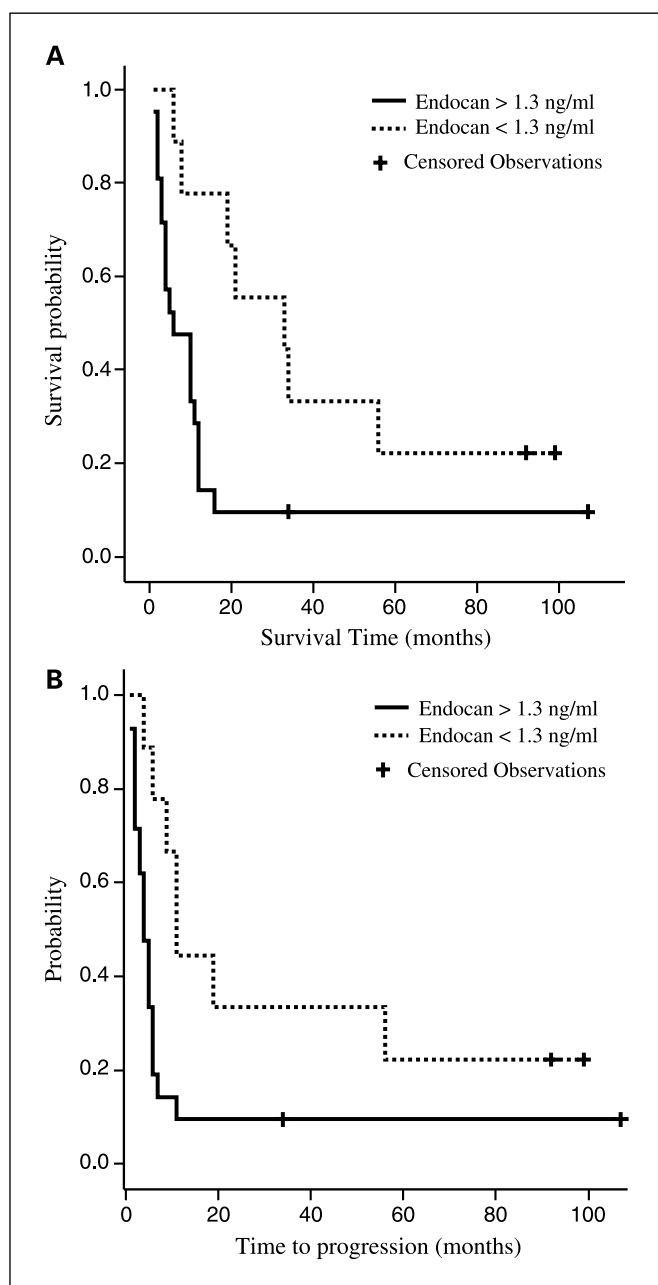
An important point concerns the potential role of endocan in the process of tumor angiogenesis. Inhibition of endocan expression by antisense oligonucleotides does not modify *in vitro* angiogenesis (7). In addition, endocan is not involved in fibroblast growth factor-2-induced endothelial cell proliferation as it is not inhibited by anti-endocan antibodies (3). Therefore, the cellular target of endocan seems to be the malignant epithelial cell rather than the endothelium itself. We could speculate that endocan acts locally in a paracrine positive feedback loop and could be an important player in supporting tumor growth (i.e., angiogenic growth factors stimulate endothelial cells to secrete endocan), which in turn acts by amplifying the effect of protumoral growth factors (2) and by inhibiting effective immune cell migration into the tumor (4). This putative role of endocan is also sustained by data obtained from mouse models, in which anti-endocan antibodies prevent

**Table 2.** Analysis of factors influencing survival

Factors	Categories	Univariate analysis	Multivariate analysis		Multivariate analysis without M status	
		P	P	Hazard ratio	P	Hazard ratio
Histologic type*	Adenocarcinoma	0.35	0.9614			
	Squamous cell carcinoma					
Stage †	I-III A	0.002	0.002		33.6	
	III B-IV					
Endocan level (ng/mL)	≤1.3	0.013	0.58		0.04	2.94
	>1.3					
Tumor status †	T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub>	0.011	0.04		2.4	0.03
	T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>					
Node status †	N <sub>0</sub> /N <sub>1</sub>	0.03	0.13		0.07	
	N <sub>2</sub> /N <sub>3</sub>					
Metastasis status †	M <sub>0</sub>	0.002	0.09			
	M <sub>1</sub>					

\*Two patients with large cell carcinomas were not included in the analysis.

† Either stage or separate tumor, node, and metastasis descriptors were introduced in the model.



**Fig. 4.** Endocan as a prognostic factor in NSCLC patients ( $n = 30$ ). A statistically significant difference was found between groups of patients divided by a cutoff of serum endocan of 1.3 ng/mL for (A) overall survival ( $P = 0.018$ , log-rank test) and (B) time to progression ( $P = 0.02$ , log-rank test). *Solid line*, high serum endocan group (endocan,  $>1.3$  ng/mL); *dotted line*, low serum endocan group.

or slow down the growth of endocan-expressing xenografts in severe combined immunodeficient mice (3) without any direct *in vitro* antiproliferative effect. The fact that endocan is highly expressed at the protein level, as detected by immunohistochemistry, in the immediate vicinity of the tumor as well as in areas of pleural and nodal invasion, also argues for a local paracrine effect of endocan. Moreover, this role of endocan would not be restricted solely to bronchopulmonary tumors but would be shared by other tumoral localizations, and indeed, it has been identified and linked to prognosis in cancers other than those of the lung (9, 10).

The involvement of endocan in tumor development and its preferential expression in lung has led us to explore the expression of endocan in lung cancer. Recent data suggested that endocan mRNA is intensely overexpressed in several tumors (8–11). In lung cancer, endocan overexpression has been linked to worst prognosis as part of a 30-gene cluster predicting shorter survival (10). In breast cancer, endocan overexpression has been identified along with another 70-gene signatures as a marker of early (<5 years) development of metastasis (9). Moreover, in human melanoma cell lines, the overexpression of endocan was associated with a highly invasive phenotype (11).

In the present work, it has been shown that endocan mRNA is overexpressed in lung tumors compared with normal lung tissue from the same individuals, in agreement with the data obtained from microarray analysis (10). This overexpression concerned mainly the exon 2-containing isoform of endocan, which has been shown to specifically exert a protumoral effect (3). On the contrary, the increase of the endocan $\Delta 2$  isoform in tumors, compared with the corresponding normal lung, was relatively small and did not reach statistical significance. Similarly, *in vitro* stimulation of endothelial cells by VEGF results mainly in an elevation of expression of endocan mRNA. Thus, both *in vitro* and *in vivo* data consistently show that endocan mRNA overexpression predominantly involves the full-length form of endocan.

We also showed that the elevated mRNA expression translates into endocan protein production by endothelial cells in all tumors studied. The intense expression of endocan at the invasion front (adjacent to lung nontumoral parenchyma and visceral pleura) and in lymph node metastasis also suggests that endocan is expressed preferentially in areas of intense tumor growth. The strong expression of endocan in nontumoral lung adjacent to carcinoma could reflect the role that vessels in nontumoral lung, but located in the relatively close vicinity of carcinoma cells, could have on tumor growth, and argues for a potential paracrine effect of endocan on tumoral cells.

Endocan could therefore represent a marker of endothelial cell activation in response to proangiogenic signals in tumors, its overexpression being correlated with a more rapid tumor growth. Interestingly, overexpression of endocan mRNA, as evaluated by microarray technology, has already been described as belonging to the molecular signature of bad prognosis in lung (10) and breast cancers (9). As endocan is a secreted protein, it can be quantified in blood by ELISA (15). We show that, in a small group of NSCLC patients who have not received any previous therapy, serum endocan values were significantly elevated compared with healthy controls. High endocan values were significantly correlated with the presence of metastasis and with limited survival. However, in this small group, endocan was not an independent prognostic factor. A trend exists, also linking high serum endocan levels and distant nodal invasion (N2-N3), a known factor of bad prognosis, but due to the limited number of cases in our patient series it fails to reach statistical significance.

Contrary to tumor status, the presence of distant nodal invasion and metastasis is not always easy to evaluate in daily practice, even if they represent critical determinants of survival in NSCLC (12). Moreover, in NSCLC, up to 40% of those patients who are subjected to surgery with curative intent die of

distant metastases in the first 24 months after surgery (30). As serum endocan is correlated with distant spread of the tumor, this blood marker might be useful as an adjunct in the evaluation of the extension of lung cancer or possibly even for early detection of recurrence after attempted treatment. However, our patient sample was not large enough and a more thorough investigation in a larger series of patients will be necessary to confirm the use of this new variable.

In conclusion, we show that endocan is overexpressed in NSCLC, both at mRNA and protein levels, and might reflect angiogenesis mediator-induced activation of tumor endothelium. Serum endocan level is a prognostic factor, albeit not an independent one, and might reflect the intensity of the tumoral angiogenic stimulation.

## Appendix A

The Thoracic Oncology Group includes Arnaud Scherpereel as the coordinator; Benoît Wallaert, Charles-Hugo Marquette, Jean-Jacques Lafitte, Philippe Ramon, Isabelle Tillie-Leblond,

and André-Bernard Tonnel (Clinique des Maladies Respiratoires, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille); Alain Wurst, Henri Porte, and Massimo Conti (Service de Chirurgie Thoracique, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille); Bernard Gosselin and Marie Christine Copin (Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques, Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille); Eric Mensier and Michel Debaert (Polyclinique La Louvière, Lille, France); Jean-Marie Faillon and Sophie Jaillard (Clinique du Bois, Lille, France); Nicolas Just and François Steenhouver (Hôpital V Provo, Roubaix, France); and Jean-Paul Grignet (Centre Hospitalier de Denain, Denain, France).

## Acknowledgments

We thank Anne Tsicopoulos, Catherine Duez, and Philippe Gosset (Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U774, Lille, France) for their helpful critical reading and suggestions; Han Vornig and Genevieve Marchandise for their kind technical help in these investigations; and Dr. Malcolm Lyon (Patterson Institute for Cancer Research, Manchester, United Kingdom) for his helpful suggestions.

## References

- Jemal A, Murray T, Ward E, et al. Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 2005;55:10–30.
- Bechard D, Gentina T, Delehedde M, et al. Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J Biol Chem* 2001;276:48341–9.
- Scherpereel A, Gentina T, Grigoriu B, et al. Overexpression of endocan induces tumor formation. *Cancer Res* 2003;63:6084–9.
- Bechard D, Scherpereel A, Hammad H, et al. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 2001;167:3099–106.
- Hildreth JE, Gotch FM, Hildreth PD, McMichael AJ. A human lymphocyte-associated antigen involved in cell-mediated lympholysis. *Eur J Immunol* 1983;13:202–8.
- Tachimori A, Yamada N, Sakate Y, et al. Up regulation of ICAM-1 gene expression inhibits tumour growth and liver metastasis in colorectal carcinoma. *Eur J Cancer* 2005;41:1802–10.
- Aitkenhead M, Wang SJ, Nakatsu MN, et al. Identification of endothelial cell genes expressed in an *in vitro* model of angiogenesis: induction of ESM-1, (β)ig-h3, and NrCAM. *Microvasc Res* 2002;63:159–71.
- Lenburg ME, Liou LS, Gerry NP, et al. Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer* 2003;3:31.
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530–6.
- Borczuk AC, Shah L, Pearson GD, et al. Molecular signatures in biopsy specimens of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:167–74.
- Seftor EA, Meltzer PS, Schattman GC, et al. Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;44:17–27.
- Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 1997;111:1710–7.
- Lassalle P, Lagrou C, Delneste Y, et al. Human endothelial cells transfected by SV40 Tantigens: characterization and potential use as a source of normal endothelial factors. *Eur J Immunol* 1992;22:425–31.
- Fontanini G, Boldrini L, Chine S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer* 1999;79:363–9.
- Bechard D, Meignin V, Scherpereel A, et al. Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J Vasc Res* 2000;37:417–25.
- Scherpereel A, Depontieu F, Grigoriu B, et al. Endocan, a new endothelial marker in human sepsis. *Crit Care Med* 2006;34:532–7.
- Contal C, O'Quigley J. An application of changepoint methods in studying the effect of age on survival in breast cancer. *Computational Statistics Data Analysis* 1999;30:253–70.
- Mandrekar JN, Mandrekar SJ, Cha SS. Cutpoint determination methods in survival analysis using SAS®. In: SAS User Group 28. Seattle, Washington; March 30-April 2, 2003 1999. Paper 261–28.
- Ferrara N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 1995;36:127–37.
- Cox G, Jones JL, Walker RA, Steward WP, O'Byrne KJ. Angiogenesis and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2000;27:81–100.
- Lassalle P, Molet S, Janin A, et al. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem* 1996;271:20458–64.
- Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992;340:145–6.
- Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, et al. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med* 2000;6:100–2.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.
- Tlsty TD, Coussens LM. Tumor stroma and regulation of cancer development. *Ann Rev Pathol. Mech of Disease* 2006;1:119–50.
- Neri D, Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer* 2005;5:436–46.
- Ho M, Yang E, Matcuk G, et al. Identification of endothelial cell genes by combined database mining and microarray analysis. *Physiol Genomics* 2003;13:249–62.
- Herbst RS, Onn A, Sandler A. Angiogenesis and lung cancer: prognostic and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005;23:3243–56.
- Boldrini L, Calcinai A, Silvestri V, et al. Quantitation by competitive PCR assay of vascular endothelial growth factor in non-small cell lung carcinomas. *Int J Oncol* 1999;14:161–8.
- Choi YS, Shim YM, Kim J, Kim K. Recurrence-free survival and prognostic factors in resected pN2 non-small cell lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg* 2002;22:695–700.

# **ARTICLE III**

## **Exon 2 Of The Endocan Gene Contributes To Tumorigenesis**

Florence Depontieu\*, Bogdan Grigoriu\*, Arnaud Scherpereel, Estelle Adam, Maryse Delehedde, Malcolm Lyon, André-Bernard Tonnel, Anne Tsicopoulos, Philippe Lassalle

\* Both authors contributed equally to this work

Article Soumis

## EXON 2 OF THE ENDOCAN GENE CONTRIBUTES TO TUMORIGENESIS

Florence Depontieu<sup>‡¶1</sup>, Bogdan Grigoriu<sup>‡¶1</sup>, Arnaud Scherpereel<sup>‡¶||</sup>, Estelle Adam<sup>‡¶§</sup>, Maryse Delehedde<sup>§</sup>, Malcolm Lyon<sup>§</sup>, André-Bernard Tonnel<sup>‡¶||</sup>, Anne Tsicopoulos<sup>‡¶†</sup>, Philippe Lassalle<sup>‡¶†2</sup>

From <sup>‡</sup> Inserm, U774, Lille, F-59019, France; <sup>¶</sup> Inst Pasteur de Lille, Lille, F-59019, France;

<sup>†</sup> Univ Lille II, Lille, 59000 France; <sup>°</sup> University of Medicine and Pharmacy, Iasi, 700111 Romania,

<sup>||</sup> Clinique des Maladies Respiratoires, CHRU Hôpital A Calmette, Lille, 59037 France, <sup>§</sup> Endotis Pharma, Parc Eurasanté, Loos 59120 France, and <sup>§</sup> Cancer Research UK Department of Medical Oncology, Christie Hospital NHS Trust, M20 4BX, Manchester, U.K.

Running title: Critical role of exon 2 in tumorigenesis of endocan

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work

<sup>2</sup> Address correspondence to: Philippe Lassalle, INSERM U774, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Dr A Calmette, 59019 Lille Cedex, France; Tel. 333-20-87-77-39; Fax. 333-20-87-73-45; E-Mail: philippe.lassalle@pasteur-lille.fr

**Endocan was originally described as a lung and endothelial cell specific dermatan sulfate proteoglycan found freely circulating in the blood. Endocan promote tumor formation by human embryonic kidney 293 cells implanted in the skin of severe combined immunodeficient mice. In the present study we identified, and functionally characterized, an alternative spliced product of the endocan gene: the exon 2-deleted endocan, called endocan $\Delta$ 2 (GenBank Accession Number AJ973643). This alternative splicing of endocan gene is found uniquely in human and monkey lungs but not in mouse and rat lungs. Our results showed that the deletion of exon 2-derived sequence in the central part of endocan's protein (1) impairs the synthesis of the glycan chain, (2) induces disulfide-linked oligomerization, (3) reduces the secretory process, and finally, (4) cancels endocan ability to sustain tumorigenesis *in vivo*. Taken together, our results emphasize a key role for the polypeptide sequence encoded by the exon 2 in promoting tumorigenesis, and suggest that this sequence may represent an interesting target in human lung cancer.**

Primary and secondary tumor growth and progression is a complex multi-step process involving not only the tumor cells but also the stroma surrounding and supporting them. It is well known that the growth of a solid tumor above a few millimeters in diameter requires the development of an intra-tumor blood supply, commonly called angiogenesis (1-3). The tumor stroma, plays a key role in angiogenesis, tumor cell invasion, and metastasis (4). One mechanism

involved in tumorigenesis is angiogenesis resulting from an imbalance between angiogenic and angiostatic factors (5,6). Therefore crucial efforts are needed to identify the key molecular players that orchestrate interactions of stromal cells with the tumor mass, blood neo-vessel recruitment and matrix organisation. Proteoglycans are major constituents of the tumor stroma and vascular bed. They are constituted of a protein core with one or more covalently attached glycosaminoglycan chains. Proteoglycans can modify the structure of the cell surface and the extracellular matrix, and they interact with growth factors, cytokines and integrins, regulating their actions and thereby potentially contributing to tumor growth and progression (7-14).

Proteoglycans are produced by both tumor cells and cells from the tumor stroma such as fibroblasts and endothelial cells. Endocan, previously named ESM-1 (Endothelial Specific Molecule-1)<sup>3</sup>, is a soluble dermatan sulfate proteoglycan which is found freely circulating in the blood (15-17). Endocan is specifically secreted by endothelial cells and preferentially expressed in lung and kidney tissues (18,19). Recently, we have demonstrated the tumorigenic activity of endocan (20). Endocan-overexpressing human embryonic kidney (HEK) 293 cells injected subcutaneously (s.c.) into severe combined immunodeficient (SCID) mice, generate tumors at the site of inoculation in contrast with the non-tumorigenic wild type HEK 293 cells. Specific mutation of serine 137, on which the dermatan sulfate chain is synthesized, gave an endocan that failed to give rise to tumors, emphasizing the importance of the glycan moiety in this process. The role of the protein core, and more particularly of a

Phenylalanine (F)-rich (F-rich) region, is also crucial since F115 and F116 endocan mutants also failed to promote tumor growth in SCID mice (20). Furthermore, endocan-mediated tumor formation was also inhibited by treatment with a specific blocking monoclonal antibody (mAb) targeting the endocan protein core.

Recent microarray analyses identified endocan mRNA overexpression, along with other markers, as being one of the most significant molecular signatures defining a poor prognosis in lung cancer, but also in prostate, breast and kidney cancers (21-23). In the case of endocan, only one mRNA product was originally observed in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) by northern blot (18). However, reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) has revealed in human capillary endothelial cells an alternative spliced form of endocan mRNA with an internal deletion of 150 base pair (bp), suggesting the presence of another form of endocan potentially involved in tumor development (24).

In this report, we show that in human endothelial cells, endocan is alternatively spliced and gives rise to a major form, endocan and a minor form lacking 150 bp corresponding to the complete exon 2, called endocan $\Delta$ 2. We show that endocan $\Delta$ 2 is also observed in monkey but not in mouse and rat lungs. While endocan supports tumorigenesis in the HEK 293 cell tumor model, endocan $\Delta$ 2 does not, due to glycanation impairment, protein oligomerization, and low secretion efficiency. Our results emphasize a key role for the polypeptide sequence encoded by exon 2 in post-transcriptional modifications and functions in tumor development of endocan.

### Experimental Procedures

*Cell culture* - HUVEC derived from umbilical veins (25) were cultured on fibronectin-coated flasks in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) with 20% fetal bovine serum (FCS) (Gibco) - 2 mM L-glutamine - 10  $\mu$ g/ml heparin - 25  $\mu$ g/ml endothelial cell growth supplement (Sigma, St Quentin Fallavier, France). The HEK 293, HEK 293 Flp-In and SV40-transfected human endothelial cells (SV1) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) - 10% FCS - 2mM L-glutamine. Zeocin (100  $\mu$ g/ml,

Invitrogen) was added for HEK 293 Flp-In cells. The Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells were cultured in  $\alpha$ -minimum essential medium (MEM) with 10% FCS - 2 mM L-glutamine.

*Human endocan gene cloning* - 5' and 3' rapid amplification of genomic DNA was performed using cDNA-specific primers. In brief, human genomic DNA was extracted from human blood mononuclear cells (QIAamp<sup>®</sup> DNA blood kit, Qiagen, Courtaboeuf, France). The EcoR I-digested genomic DNA was ligated with an adaptor that includes a cohesive EcoR I end and sequences for adaptor specific primers: 5'-CCATCCTAATACGACTCACTATAGGGC-3' and 5'-ACTCACTATAGGGCTCGAGCGGC-3'. The 5' and 3' EcoR I ends DNA fragments were obtained by nested PCR using couples of gene- and adaptor- specific primers. The aligned sequences matched perfectly with EcoR I-digested human genomic DNA southern blot (18), indicating that these sequences cover the complete human *esm1* gene (GenBank Accession numbers AJ401091, AJ401092).

*RT-PCR and cDNA cloning* - Total RNA from HUVEC, rat, and mouse lung was isolated by TRIzol<sup>®</sup> Reagent as recommended by manufacturer (Invitrogen). Two  $\mu$ g of total RNA were reverse transcribed with Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) Reverse transcriptase (Invitrogen). Rhesus Monkey lung cDNA was purchased from BioCat (Heidelberg, Germany). PCR was performed for 30 cycles with a 2 min hot start at 92°C, 1 min annealing at 55°C, and 30 s extension at 65°C with HotMaster Taq Polymerase (Eppendorf, Le Pecq, France). Endocan cDNAs were amplified with forward (S) and reverse (R) primers hybridizing in exon 1 and exon 3, respectively.

S1: 5'-ATGAAGAGCGTCTTGCTGCTG-3';

S2: 5'-ATGAAGAGCCTCTTGCTGCTG-3';

S3: 5'-ATGAAGAGCCTCTTGCTACTG-3';

R1: 5'-TCAGCGTGGATTTAACCATTT-3';

R2: 5'-TCAGCGCGGATTTAACCATTT-3';

Human and rhesus monkey endocan were amplified with S1/R1; Mouse endocan with S2/R1; and rat endocan with S3/R2. For endocan and endocan $\Delta$ 2 cloning, forward (5'-GAGGCAGCTGGGAAACATGAAG-3') and reverse (5'-GCCTTCTCTCAGAAATCACAG-3') primers were chosen to obtain complete reading frames. PCR products were subcloned in a

pcDNA5/FRT vector (Invitrogen) and inserted into a pcDNA3.1 (+) vector (Invitrogen) (16).

*Cell transfection* - One  $\mu\text{g}$  of endocan-, endocan $\Delta 2$ -, or control- pcDNA5/FRT or pcDNA3.1 (+) DNA was transfected using Lipofectamine 2000 (Life Technologies Inc., Cergy-Pontoise, France) into HEK 293 Flp-In or HEK 293 cells, as recommended by manufacturer. pcDNA5/FRT was cotransfected with the pOG44 vector which results in expression of the Flp recombinase. Upon cotransfection, the Flp recombinase mediates a homologous recombination event between the FRT sites from the HEK 293 Flp In cell genome and the pcDNA5/FRT vector. Stably transfected cells were selected using 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  hygromycin B for HEK 293 Flp-In cells or 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418 and cloned by limit dilution for HEK 293 cells (18). Endocan-pcDNA3.1 (+) was transfected into CHO-K1 cells under the same conditions.

*Endocan and endocan $\Delta 2$  immunoassays* - Endocan and endocan $\Delta 2$  enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) were performed as previously described (16), using in house anti-endocan MEP14 (Imunoglobulin (Ig) gG2a/K, capture) and MEC15 (IgG1/K, detection) mAbs. Subsequent incubations with biotin-conjugated anti-mouse IgG1 (BD Biosciences- Pharmingen, Le Pont de Claix, France) and streptavidin-conjugated horseradish peroxidase (HRP) (Clinisciences, Montrouge, France) were followed by revelation with tetramethylbenzidine (Sigma).

*Immunoprecipitation and western blotting* - Supernatants and cell lysate samples from 2-3  $\times 10^6$  cells, were prepared as previously described (16). The samples were run on 15% acrylamide gels and blotted onto nitrocellulose membranes (Hybond ECL, Amersham, Saclay, France). Detection was performed using MEP14 as primary Ab probe, followed by affinity-purified, HRP-conjugated goat anti-mouse Ab (dilution 1:15,000) (Sigma) and an enhanced chemiluminescence (ECL) detection kit (Amersham).

*Animal models* - One day after receiving 100  $\mu\text{L}$  of anti asialo-GM<sub>1</sub> Ab (Wako Chemicals, Neuss, Germany) intraperitoneally, SCID mice were injected s.c. with  $10^6$  transfected HEK 293 or HEK 293 Flp-In cells resuspended in 200  $\mu\text{L}$  DMEM without FCS (20). Presence of a palpable tumor was assessed once a week, and largest orthogonal diameters were measured using a

Vernier calliper. Tumor volume was estimated using the formula:  $V = a \cdot b^2 / 2$ , where “a” is the largest and “b” the shortest diameter. Mice were euthanized when tumor volume reached 2  $\text{cm}^3$ . A macroscopic analysis was made for each organ and, tumors were removed for microscopical analysis.

*Analysis of endocan isoforms* - The HEK 293 cell supernatant was passed through a 0.2 cm  $\times$  1.3 cm diethylaminoethyl (DEAE)-Sepharose column (BIO-RAD, Marnes la coquette, France) run originally in 20 mM Tris HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl. Bound endocan was eluted with 20 mM Tris HCl pH 7.4, 1 M NaCl, and concentrated in a 0.5 ml 30 kiloDaltons (kDa) molecular weight cut-off Vivaspin concentrator (Vivascience, Hannover, Germany). Samples treated with 1 unit/ml chondroitinase ABC (Sigma) overnight at 37°C and diluted 1:1 in sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) sample buffer without dithiothreitol (DTT) were subjected to PAGE and western blot analysis. Reduced conditions were obtained by addition of 0.1 M DTT in samples.

## RESULTS

*Alternative splicing of the exon 2 of esm1 gene is primate species specific* - Previous results on vascular endothelial growth factor (VEGF)- and fibroblast growth factor (FGF)-2- stimulated primary cultures of human capillary endothelial cells described two endocan-related mRNA species with 150 bp differences (24). To determine if the 150 bp deletion corresponds to an entire exon, we cloned the human *esm1* gene. This gene is organized in 3 exons of 362 bp (exon 1), 1560 bp (exon 3) and an exon 2 of 150 bp, exactly corresponding to the internal deletion of 150 bp (Fig. 1A) (GenBank Accession Numbers AJ401091 and AJ401092). We show here that the two alternative spliced products are also expressed in resting HUVEC (Fig. 1B). This new endocan mRNA species was called endocan $\Delta 2$  (GenBank Accession Number AJ973643). The reading frame was conserved and lead to the same stop codon. Endocan appeared to be more abundant than endocan $\Delta 2$ . The expression of endocan $\Delta 2$  was then studied in mouse, rat and monkey lungs cDNAs. The expression of endocan $\Delta 2$  is observed



in primate (human and monkey) but not in murine (mouse and rat) lungs (Fig. 1B).

The nucleotide sequence of endocan gene predicts that exon 1 encodes for the first 100 amino acids including the signal peptide, exon 2 encodes for 50 amino acids and exon 3 encodes for the last 34 amino acids. Thus, endocan and endocan $\Delta$ 2 cDNA predicted translation products of 165 and 115 amino acids, respectively, with same N- and C-termini (Fig. 2A). This was consistent with immunoprecipitation studies from endothelial cell lysates, which revealed 2 bands at 18 and 14 kDa, the first band corresponding to endocan, the second band was suspected to correspond to the endocan $\Delta$ 2 polypeptide (Fig. 2B lanes 1 and 4). This statement was further confirmed when HEK 293 cells transfected by endocan $\Delta$ 2 cDNA generated specifically the 14 kDa band (Fig. 2B lane 6), but also other bands of 26, 38 and 50 kDa disappearing under reducing conditions (data not shown). These results indicated that endocan $\Delta$ 2 mRNA is primate specific, and is efficiently translated in HUVEC in a 14 kDa protein.

*Exon-2 derived sequence is needed for sustaining tumorigenesis* - We have previously demonstrated that human endocan promotes tumor growth in a tumor xenograft SCID mouse model (20). Here, we wondered if endocan $\Delta$ 2 also exhibited such a tumorigenic activity *in vivo*. We established by homologous recombination HEK 293 F1p-In cells expressing endocan (22 ng / 24h / 10<sup>6</sup> cells), endocan $\Delta$ 2 (0.2 ng / 24h / 10<sup>6</sup> cells), and then injected 10<sup>6</sup> cells into the skin of SCID mice. Every mouse that received endocan expressing HEK 293 F1p-In cells developed a tumor approaching 1 cm<sup>3</sup> in volume by 7 weeks (Fig. 3A). During the same time, mice receiving either control vector or endocan $\Delta$ 2 expressing HEK 293 F1p-In cells developed smaller tumors measuring 0.15 cm<sup>3</sup> and 0.04 cm<sup>3</sup> respectively (Fig. 3A).

In order to discard a potential cell strain effect, a second series of experiments was performed using the HEK 293 cell line, which does not spontaneously form tumors in the SCID model (20). As we previously described, all endocan-expressing HEK 293 cells (560 ng / 24h / 10<sup>6</sup> cells) injected into SCID mice developed tumors by 5 weeks. After 10 weeks, the tumors grew up to 2 cm<sup>3</sup> (Fig. 3B). No tumors were

observed in mice receiving endocan $\Delta$ 2-HEK 293 cells (18 ng / 24h / 10<sup>6</sup> cells) or the control vector-transfected cells (Fig. 3B). These data indicate that the amino acid sequence encoded by exon 2 plays a key role in endocan tumorigenic properties.

*Deletion of exon 2-derived sequence impairs glycanation* - The glycan moiety of endocan is known to play important role in tumorigenesis (20). We thus enquired if exon 2-derived sequence could influence the glycanation of endocan $\Delta$ 2. By virtue of its glycan, human endocan binds to the DEAE-Sepharose ion-exchange chromatography. The same property was observed for endocan $\Delta$ 2 (Fig. 4A). The DEAE-bound endocan $\Delta$ 2 was detected at 40 kDa in reducing conditions (Fig. 4B, lane 3). Treatment with chondroitinase ABC induced a shift from 40 to 14 kDa (Fig. 4B, lane 4), confirming that endocan $\Delta$ 2, as well as endocan, is a proteoglycan with a chondroitin sulfate / dermatan sulfate chain. Surprisingly, not all endocan $\Delta$ 2 is glycanated. This was suspected when 47.4 % (ranging from 42.9 % to 50.2 %) endocan $\Delta$ 2 was recovered in flow through of DEAE-Sepharose (Fig. 4A). This was confirmed using crude supernatants in non reducing conditions revealing two additional bands at 14 and 26 kDa below the glycanated endocan $\Delta$ 2 spanning from 35 to 70 kDa (Fig. 4C, lane 3). Thus, the deletion of the exon 2-derived sequence impairs the glycanation process of endocan $\Delta$ 2 polypeptide, partially explaining the lack of tumorigenic activity.

*Deletion of exon 2-derived sequence induces oligomerisation* - The 14, 26 and 35-70 kDa forms of endocan $\Delta$ 2 from crude supernatants bands suggested some conformational variants of endocan $\Delta$ 2. First, the glycanated endocan $\Delta$ 2 at 35-70 kDa (Fig. 4B, lane 7) resulted in a 40 kDa band under reducing conditions (Fig. 4B, lane 3). Second, chondroitinase ABC treated-endocan $\Delta$ 2 revealed, in addition to the 14 kDa band, other bands at approximately 26, 38 and 50 kDa (Fig. 4B, lane 8), similarly to those observed in lysates from endocan $\Delta$ 2-HEK 293 cell (Fig. 2B, lane 6). Under reducing conditions only the 14 kDa band is observed (Fig. 4B, lane 4). These results suggest that the presence of the exon 2-derived sequence may affect the protein conformation in such a way as to promote a purely monomeric state for endocan, but in its absence oligomerization of endocan $\Delta$ 2 is likely to occur, which may explain

at least partially, the lack of tumorigenic activity of endocan $\Delta$ 2.

*Deletion of exon 2-derived sequence alters protein expression* - Despite identical cytomegalovirus promoter, signal peptide and N-terminal polypeptide of 81 amino acids, the respective secretion levels of endocan and endocan $\Delta$ 2 were surprisingly quite different. In cell supernatants, transient transfection of endocan and endocan $\Delta$ 2 cDNAs in HEK 293 cells resulted in 7.5 fold less secretion of endocan $\Delta$ 2 than endocan (Fig. 4D). In addition, HEK 293 cell clones secreted 31 fold less endocan $\Delta$ 2 than endocan. In cell lysates, levels of endocan $\Delta$ 2 is lower than endocan (Fig. 4D), Thus the exon 2-derived sequence alters the expression and consequently the secretion of endocan $\Delta$ 2, which could explain in part the lack of tumorigenic activity of endocan $\Delta$ 2.

## DISCUSSION

Lung cancer is the leading cause of death by cancer in developed countries (26). The increasing incidence, the absence of blood markers of the disease, and the poor prognosis underline the need to search new strategies for diagnosis, follow-up, and treatment. Endocan is an endothelial cell-derived proteoglycan preferentially expressed in human lung tissue (27). Microarray and subtractive hybridization analyses of the gene expression profiles of several human cancers have identified *esml* as being one of the genes defining either a tumor signature, or associated with poor prognosis in breast and kidney cancers (21,22). In lung cancer, endocan mRNA and protein are described as poor prognostic molecular signatures (23,28). Two endocan mRNAs with 150 bp in difference were previously observed on microvascular endothelial cell lines (24). We show that these are derived from an alternative splicing of exon two. We compared the tumorigenic activity of endocan and its alternatively spliced product endocan $\Delta$ 2. Our results show that the exon 2-derived sequence would impact the secretion, the protein folding, the glycanation and finally the tumorigenic activity of endocan.

We show here that human *esml* gene is organized in 3 exons and translation results in 2 alternative spliced products: a major form

containing the 3 exons, endocan, and a minor form lacking the exon 2, called endocan $\Delta$ 2. These 2 spliced products are both present in HUVEC. Splicing is the result of spliceosome which recognize 5' consensus splice site (EXON-(A/C)AG<sup>gt(a/g)</sup>agt-intron) and 3' splice site composed by three sequences elements: two intronics (a branch site and a polypyrimidine tract) and the 3' consensus splice site (intron-(t/c)ag<sup>G</sup>-EXON) (29). Comparison of 5' consensus exonic splice site sequence between human, monkey, mouse and rat revealed only one nucleotide difference within the 5' consensus splice site of exon 2. However, two cDNA were observed in the monkey lung and only one in mouse and rat lungs. Thus the polymorphism between human and monkey is not involved in the alternative splicing of the exon2.

Alternative splicing is a major mode of regulation of the biological activities in higher eukaryotes. Indeed, two spliced variants or isoforms can have different or opposite roles (30). Variations in the splicing process occur during tumor progression and play a major role in tumorigenesis (31). Here, endocan tumorigenic properties were clearly confirmed, independently of the vector, the subtype of HEK 293 cells, and the levels of secretion (high in HEK 293 cells and weak in HEK 293 Flp-In cells). Unexpectedly, endocan $\Delta$ 2 does not promote tumor growth, emphasizing the role of exon 2-derived sequence. First, exon 2-derived polypeptide seems to stabilize monomeric conformation of endocan, since in its absence endocan $\Delta$ 2 is secreted in distinct disulfide-linked oligomers. Indeed, the deletion of 6 out of the 18 cysteines present in endocan may result in a reorganization of disulfide bonds that alter the balance between mono- and oligo-merization. However, these conformational changes are not observed in HUVEC (15,16), questioning the real role of exon 2-derived sequence in the conformation of endocan. Second, the exon 2-derived sequence contains the so-called F-rich region (F<sup>113</sup>PFFQY<sup>118</sup>), in which replacement of F115 and F116 by alanines abolish endocan induced tumorigenesis (20). Thus, deletion of exon 2 results in the loss of F-rich region, and consequently the loss of endocan property to sustain tumor growth.

Besides direct intervention of the exon 2-derived polypeptide, it could also participate to

tumorigenesis through the regulation of glycanation. The glycan moiety of endocan plays a key role in tumorigenesis (20). Indeed, endocan is fully glycanated (15). Endocan $\Delta$ 2 is secreted as a chondroitin / dermatan sulfate proteoglycan, but surprisingly, as a “part-time” proteoglycan, based on the presence in the cell supernatants of both glycanated and non-glycanated forms. This suggests that exon 2-derived sequence improve glycanation at the S<sup>137</sup>GDG consensus. Similarly, the presence of V4-7 exons in CD44 also allows greater utilization of Ser-Gly assembly sites, and increases glycanation by chondroitin sulphate chains (32). This alternative splicing occurs during tumor progression and may play a major role in tumorigenesis (33). Thus, endocan alternative splicing with exon 2 deletion results in a lower glycanation efficiency, which could affect tumorigenesis.

Another important point is that despite identical signal peptide and N- and C- polypeptide

termini, the extra and intra-cellular levels of endocan $\Delta$ 2 are lower those of endocan in transfected cells. Indeed endocan $\Delta$ 2 cannot be immunoprecipitated from HUVEC supernatants (16). In addition, treatment of endocan, purified from either HUVEC supernatants or normal human serum, with chondroitinase ABC did not reveal the endocan $\Delta$ 2 protein core (15). Thus the exon 2-derived sequence clearly participates in the expression and secretion of endocan. One important consequence is that the vast majority of endocan secreted by endothelial cells contains the exon 2-derived sequence involved in tumorigenesis of endocan.

Our data suggest that the exon 2-derived sequence within the central part of the protein core of endocan may represent an interesting target in human lung cancer.

## REFERENCES

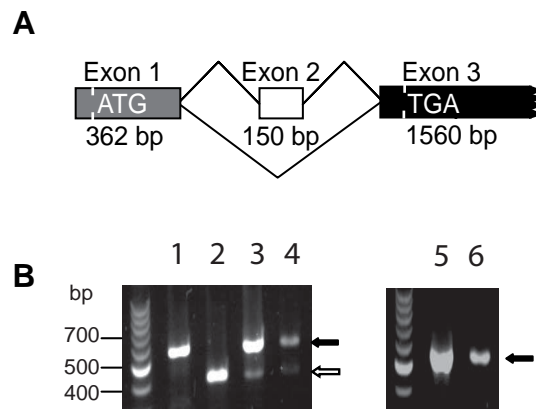
- 1 Folkman, J. (1971) *N. Engl. J. Med.* **285**, 1182-1186
- 2 Carmeliet, P., and Jain, R. K. (2000) *Nature* **407**, 249-257
- 3 Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000) *Cell* **100**, 57-70
- 4 Seljelid, R., Jozefowski, S., and Sveinbjörnsson, B. (1999) *Anticancer Res.* **19**, 4809-482
- 5 Bouck, N., Stellmach, V., and Hsu, S. C. (1996) *Adv. Cancer Res.* **69**, 135-174
- 6 Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E. C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R. K., and Seed, B. (1998) *Cell*, **94**, 715-725
- 7 Strieter, R. M., Polverini, P.J., Arenberg, D. A., Walz, A., Opdenakker, G., Van Damme, J., and Kunkel, S. L. (1995) *J. Leukoc. Biol.*, **57**, 752-762
- 8 Turley, E. A. (1984) *Cancer Metastasis Rev.* **3**, 325-339
- 9 Tumova, S., Woods, A., and Couchman, J. R. (2000) *Int. J Biochem. Cell Biol.* **32**, 269-288
- 10 Perrimon, N., and Bernfield M. (2000) *Nature* **404**, 725-728
- 11 Park, P. W., Reizes, O., and Bernfield M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 29923-29926
- 12 Hulett, M. D., Freeman, C., Hamdorf, B. J., Baker, R. T., Harris, M. J., and Parish C. R. (1999) *Nat. Med.* **5**, 803-809
- 13 Vlodavsky, I., Friedmann, Y., Elkin, M., Aingorn, H., Atzmon, R., Ishai-Michaeli, R., Bitan, M., Pappo, O., Peretz, T., Michal, I., Spector, L., and Pecker I. (1999) *Nat. Med.* **5**, 793-802
- 14 Delehedde, M., Lyon, M., Sergeant, N., Rahmoune, H., and Fernig D. G. (2001) *J. Mammary Gland. Biol. Neoplasia* **6**, 253-273
- 15 Bechard, D., Gentina, T., Delehedde, M., Scherpereel, A., Lyon, M., Aumercier, M., Vazeux, R., Richet, C., Degand, P., Jude, B., Janin, A., Fernig, D. G., Tonnel, A. B., and Lassalle P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 48341-48349
- 16 Bechard, D., Meignin, V., Scherpereel, A., Oudin, S., Kervoaze, G., Bertheau, P., Janin, A., Tonnel, A. B., and Lassalle P. (2000) *J. Vasc. Res.* **37**, 417-425
- 17 Scherpereel A., Depontieu, F., Grigoriu, B., Cavestri, B., Tscopoulos, A., Gentina, T., Jourdain, M., Pugin, J., Tonnel, A. B., and Lassalle P. (2006) *Crit. Care Med.* **34**, 532-537

- 18 Lassalle, P., Molet, S., Janin, A., Heyden, J. V., Tavernier, J., Fiers, W., Devos, R., and Tonnel A. B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20458-20464
- 19 Tsai, J. C., Zhang, J., Minami, T., Voland, C., Zhao, S., Yi, X., Lassalle, P., Oettgen, P., and Aird W. C. (2002) *J. Vasc. Res.* **39**, 148-159
- 20 Scherpereel, A., Gentina, T., Grigoriu, B., Senechal, S., Janin, A., Tsicopoulos, A., Plenat, F., Bechard, D., Tonnel, A. B., and Lassalle P. (2003) *Cancer Res.* **63**, 6084-6089
- 21 van 't Veer, L. J., Dai, H., van de Vijver, M. J., He, Y. D., Hart, A. A., Mao, M., Peterse, H. L., van der Kooy, K., Marton, W. M. J., itteveen, A. T., Schreiber, G. J., Kerkhoven, R. M., Roberts, C., Linsley, P. S., Bernardis, R., and Friend S. H. (2002) *Nature.* **415**, 530-536
- 22 Amatschek, S., U. Koenig, H. Auer, P. Steinlein, M. Pacher, A. Gruenfelder, G. Dekan, S. Vogl, E. Kubista, K. H. Heider, C. Stratowa, M. Schreiber, and W. Sommergruber. (2004) *Cancer Res.*;64:844-56.
- 23 Borczuk, A. C., Shah, L., Pearson, G. D., Walter, K. L., Wang, L., Austin, J. H., Friedman, R. A., and Powell C. A. (2004) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **170**, 167-174
- 24 Aitkenhead, M., Wang, N S. J., akatsu, M. N., Mestas, J., Heard, C., and Hughes C. C. (2002) *Microvasc. Res.* **63**, 159-171
- 25 Lassalle, P., Delneste, Y., Gosset, P., Wallaert, B., Tonnel, A. B., Dessaint, J. P., and Capron A. (1991) *Eur. Respir. J.* **4**, 1251-1257
- 26 Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Smigal C., and Thun M. J. (2006) *CA Cancer J Clin.* **56**, 106-130
- 27 Sarrazin S., Adam, E., Lyon, M., Depontieu, F., Motte, V., Landolfi, C., Lortat-Jacob, H., Bechard, D., Lassalle, P., and Delehedde M. (2006) *Biochim. Biophys. Acta.* **1765**, 25-37
- 28 Grigoriu, B.-D., Depontieu, F., Gourcerol, D., Devos, P., Ouatas, T., Lafitte, J.-J., Copin, M.-C., Tonnel, A.-B., Scherpereel, A., Lassalle P., and the Thoracic Oncology Group. (2006) *Clin. Cancer Res.*
- submitted for publication**
- 29 Black, D.L. (2003) *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 291-336
- 30 Venables, J. P. (2004) *Cancer Res.* **64**, 7647-7654
- 31 Hayes, G. M., Dougherty, S. T., Davis, P. D., and Dougherty G. J. (2004) *Cancer Gene Ther.* **11**, 797-807
- 32 Piepkorn, M., Hovingh, P., Bennett, K. L., Aruffo, A., and Linker, A. (1997) *Biochem. J.* **327**, 499-506
- 33 Timar, J., Lapis, K., Dudas, J., Sebestyen, A., Kopper, L., and Kovalszky, I. (2002) *Semin Cancer Biol.* **12**, 173-86.

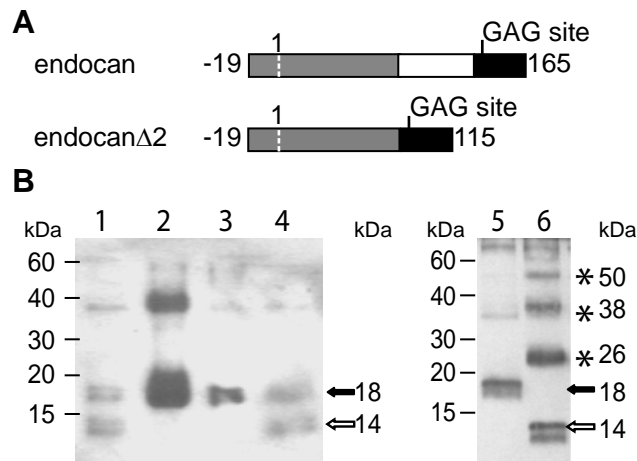
#### FOOTNOTES

We thank Drs Philippe Gosset (INSERM U774, Lille France), Catherine Duez (INSERM U774, Lille France) and Taoufik Ouatas (Endotis Pharma, Loos, France) for their helpful critical readings and suggestions. We also thank Gwenola Kervoaze and Genevieve Marchandise for their kind technical help in these investigations. This work was funded, in part, by PHRC (2002-R19-16), EndotisPharma, Santélys and the Société d'Enseignement et de Recherche en Pneumologie et Allergie.

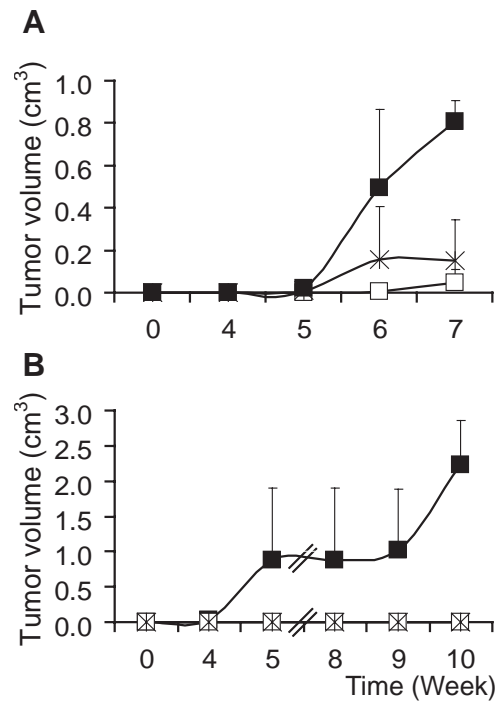
<sup>3</sup> The abbreviations used are: ESM-1, Endothelial cell specific molecule-1; s.c., subcutaneously; SCID, severe combined immunodeficiency; HEK, Human embryonic kidney; F, Phenylalanine; mAb, monoclonal antibody; HUVEC, Human umbilical vein endothelial cells; RT-PCR, reverse-transcriptase polymerase chain reaction; bp, base pair; FCS, fetal bovine serum; SV1, SV40-transfected human endothelial cells; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; CHO, Chinese hamster ovary; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; Ig, Immunoglobulin; HRP, streptavidin-conjugated horseradish peroxidase; DEAE, diethylaminoethyl; kDa, kiloDalton; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; DTT, dithiothreitol; PECAM-1, platelet/endothelial cell adhesion molecule-1; FGF, fibroblast growth factor; GAG, glycosaminoglycan.



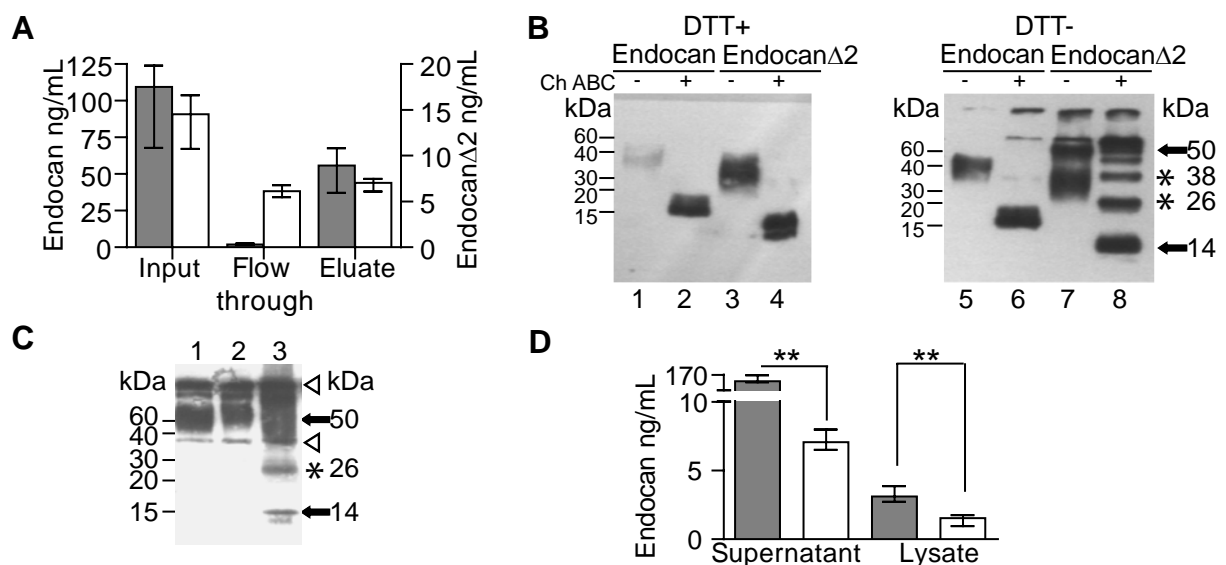
**Fig. 1.** Expression of endocan and endocan $\Delta$ 2 spliced products of *esm1* gene. **A**, Schemes of the cloned human *esm1* gene. Human genomic DNA was extracted from human blood mononuclear cells. The EcoR I-digested genomic DNA was ligated with an adaptor that includes cohesive EcoR I end and sequences for adaptor specific primers. The 5' and 3' EcoR I ends DNA fragments were obtained by nested PCR using couples of gene- and adaptor- specific primers. (GenBank Accession Numbers AJ401091 and AJ401092). **B**, RT-PCR using primers hybridizing in *esm1* exon 1 and 3. Both cDNAs from HUVEC were purified, subcloned and then sequenced. Lane 1: cloned endocan cDNA, lane 2: cloned endocan $\Delta$ 2 cDNA, lane 3: HUVEC, lane 4: monkey lung, lane 5: rat lung, lane 6: mouse lung. The numbers to the left are molecular sizes in bp. Black arrows represent the endocan cDNA and white arrow represents endocan $\Delta$ 2 cDNA.



**Fig. 2.** Endocan and endocan $\Delta$ 2 translated products *A*, Schemes of endocan translation products, deduced from cDNA sequences. Exon 1 derived sequence is represent in grey, exon 2 derived sequence in white and exon 3 derived sequence in black. The first amino acid of the translated products is numbered -19, and the first of the mature translated products +1. The line on the exon 3-derived sequence represents the Ser-Gly glycanation site (Glycosaminoglycan, GAG site). *B*, Cell lysates from endothelial or transfected cells were immunoprecipitated with MEP14 mAb and then subjected to PAGE and western blot analysis. Lane 1: HUVEC; lane 2: endocan-CHO-K1 cells; lanes 3 and 5: endocan-HEK 293 cells; lane 4: SV1 cells; lane 6: endocan $\Delta$ 2-HEK 293 cells. The numbers to the left and right are molecular sizes in kDa. Black arrow indicates the endocan translation product and white arrow the endocan $\Delta$ 2 translation product. Stars indicate the multimeric forms of endocan $\Delta$ 2.



**Fig. 3.** Kinetics of tumor growth **A**, SCID mice were injected with  $10^6$  cells of endocan (black box), endocan $\Delta 2$  (white box) or control vector (stars) transfected Flp-In HEK 293 cells ( $n = 8$  per group). Tumor growth was analyzed in each experiment by measurement of tumor size once a week. Mice were euthanased when the tumor volume reached  $2 \text{ cm}^3$ . **B**, SCID mice were injected with  $10^6$  cells of endocan (black box), endocan $\Delta 2$  (white box) or control vector (stars) transfected HEK 293 cells ( $n = 4$  per group).



**Fig. 4.** *A*, DEAE-sepharose binding property of endocan and endocan $\Delta$ 2. The crude supernatants (Input) of transiently transfected HEK 293 cells with endocan (grey box) or endocan $\Delta$ 2 (white box) were passed through DEAE-Sephacel ( $n = 4$ ). The unbound materials (Flow through) were recovered from the DEAE column, bound materials were eluted in 1 M NaCl (Eluate). Levels of endocan and endocan $\Delta$ 2 were measured by ELISA in each fraction (median, with error bars showing the range). *B*, The eluates from DEAE-Sephacel column were digested overnight with chondroitinase (Ch) ABC. Treated (lanes 2, 4, 6, 8) and untreated (lanes 1, 3, 5, 7) samples were analyzed under 0.1 M DTT reducing (lanes 1-4) or non-reducing (lanes 5-8) conditions. The numbers to the left and right are molecular sizes in kDa. Black arrow indicates the endocan translation product and white arrow the endocan $\Delta$ 2 translation product. Stars indicate the multimeric forms of endocan $\Delta$ 2. *C*, Cell supernatants from endothelial or transfected cells were immunoprecipitated with MEP14 mAb and then subjected to PAGE and western blot analysis. Lane 1: HUVEC; lane 2: endocan-HEK 293; lane 3: endocan $\Delta$ 2-HEK 293. The numbers to the left and right are molecular sizes in kDa. Black arrow indicates the endocan and endocan $\Delta$ 2 translation products. Star indicate the multimeric form of endocan $\Delta$ 2; Arrowheads indicate the non-specific bands originating from the secondary Ab. *D*,  $10^6$  HEK 293 cells were transiently transfected with endocan (grey box) or endocan $\Delta$ 2 (white box). The supernatant and cell lysate were collected 72 hours after and endocan/endocan $\Delta$ 2 were measured by ELISA (median, with error bars showing the range,  $n = 6$ ) \*\*,  $P = 0.022$ .



# **ARTICLE IV**

## **Critical Role Of Glycanation On Endocan's Tumorigenesis In Mouse**

Florence Depontieu, Bogdan Grigoriu, Christophe Leboeuf, Nathalie De Freitas Caires, Delphine Gourcerol, Arnaud Scherpereel<sup>1</sup>, Anne Janin, Philippe Gosset And Philippe Lassalle

Article en préparation

## CRITICAL ROLE OF GLYCANATION ON ENDOCAN'S TUMORIGENESIS IN MOUSE

Florence DEPONTIEU<sup>‡¶†</sup>, Bogdan GRIGORIU<sup>¶†•</sup>, Christophe LEBOEUF<sup>§§°</sup>, Nathalie DE FREITAS CAIRES<sup>‡¶†</sup>, Delphine GOURCEROL<sup>‡¶†</sup>, Arnaud SCHERPEREEL<sup>‡¶†||</sup>, Anne JANIN<sup>§§°</sup>, Philippe GOSSET<sup>‡¶†</sup> and Philippe LASSALLE<sup>‡¶†</sup>

From <sup>‡</sup> Inserm, U774, Lille, F-59019, France; <sup>¶</sup> Inst Pasteur de Lille, Lille, F-59019, France; <sup>†</sup> Univ Lille II, Lille, 59000 France; <sup>•</sup> University of Medicine and Pharmacy, Iasi, 700111 Romania; <sup>§</sup> Inserm, U 728, Paris, F-75010, France; <sup>§</sup> Laboratoire de Pathologie Hôpital Saint Louis, Paris, F-75010, France; <sup>°</sup> Université Paris VII, Paris, F-75010, France; <sup>||</sup> Clinique des Maladies Respiratoires, CHRU Hôpital A Calmette, Lille, 59037 France.

Address correspondence to: Philippe Lassalle, INSERM U774, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Dr A Calmette, 59019 Lille Cedex, France; Tel. 333-20-87-77-39; Fax. 333-20-87-73-45; E-Mail: philippe.lassalle@pasteur-lille.fr

**Key word:** Mouse endocan; part-time proteoglycan; HT-29;

**Abbreviation:** NSCLC non small cell lung cancer; PG: proteoglycan; GAG, glycosaminoglycan; s.c., subcutaneously; SCID, severe combined immunodeficiency; HEK, Human embryonic kidney; F, Phenylalanine; mAb, monoclonal antibody; RT-PCR, reverse-transcriptase polymerase chain reaction; bp, base pair; FCS, fetal bovine serum; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; CHO, Chinese hamster ovary; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; Ig, Immunoglobulin; HRP, streptavidin-conjugated horseradish peroxidase; DEAE, diethylaminoethyl; kDa, kiloDalton; SDS-PAGE, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; DTT, dithiothreitol.

Lung cancer is the leading cause of death by cancer in developed countries. Endocan is an endothelial cell-derived proteoglycan overexpressed in tumor vessels from lung cancer, promoting or increasing growth of tumor xenografts (HEK 293 or HT-29 respectively) in severe combined immunodeficiency mice. To better understand the role of this molecule in the development of solid tumors, we here cloned and identified the mouse *esm-1* gene (GenBank Accession Number AJ249354). Mouse endocan cDNA predict a polypeptide of 184 amino acids, sharing 75% identity with human homolog, and containing same domain structure : (1) the 18 cysteines out of the first 110 amino acids; (2) the F-rich domain (<sup>113</sup>F<sup>118</sup>PF<sup>118</sup>FQY<sup>118</sup>) involved in the tumorigenic activity; (3) and a unique functional O-glycanation site on serine 138 (SGDG). Surprisingly, mouse endocan did not induce tumors when overexpressed in HEK 293 cells. This discrepancy could be explained by the less O-glycanation substitution of mouse endocan, giving a part-time proteoglycan containing 73% (71.1; 74.0) unglycanated forms. We then verify if mouse endocan could

modify the proliferation of the HT-29 tumorigenic cell line. Mouse endocan, as unglycosylable endocan (mouse and human) slowed tumor growth when overexpressed in HT-29 cells, revealing an anti-tumoral activity for endocan polypeptide. These tumors are associated with a tumor stroma reaction. Our results strongly suggest that the glycanation efficiency can generate mouse endocan isoforms with antagonistic functions, both involved in the control of solid tumor growth through interactions with stromal components.

The growth of solid tumors is dependent on their capacity to acquire a blood supply and to reorganize their microenvironment. Both stromal cells and extracellular matrix components contribute to host - tumor relationships and to the success of the growth of the tumor<sup>1,2</sup>. During this inflammatory process, vascular endothelial cells and leukocytes interact closely. This interplay is mainly mediated by two communication systems: the cytokines, released by leukocytes and endothelial cells, and the regulated expression of cell adhesion molecules on the surface of both cell types. These regulatory proteins interact with

proteoglycans (PGs). PGs are produced by both tumor cells and cells from the tumor stroma such as fibroblasts and endothelial cells<sup>3</sup>. Growing evidences suggest that PGs are potential therapeutic targets for cancer<sup>4</sup>.

Among them, endocan is an endothelial cell-specific PG up-regulated by pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , and angiogenic factors like VEGF and FGF-2<sup>5-7</sup>. In non small cell lung cancer (NSCLC), endocan was overexpressed in tumor endothelial cells at both mRNA and protein levels<sup>8,9</sup>. Consistently, many recent microarray analyses identified endocan mRNA, as being one of the most significant molecular signatures defining a poor prognosis in NSCLC<sup>10</sup>, but also in breast and kidney malignancies<sup>11,12</sup>. Moreover, the blood level of endocan is increased in patients with NSCLC and correlates with a bad prognosis<sup>8</sup>.

In SCID mice models of tumor xenograft, human endocan either induces tumor formation when overexpressed in HEK 293 cells -a non spontaneous tumorigenic cell line- or accelerates growth rate when overexpressed in HT-29 cells - a spontaneous tumorigenic cell line<sup>9</sup>. The importance of the glycan moiety in this process was emphasized when HEK 293 cells overexpressing an unglycanable endocan mutant (endocan/S137A) failed to give rise to tumors. The protein core of human endocan also plays a critical role, since blocking endocan with a monoclonal antibody or mutagenesis of phenylalanine (F)115 and F116 abolish endocan-dependent growth of HEK 293 cell tumor xenografts<sup>9</sup>. Endocan binds to LFA-1 and blocks the ICAM-1/LFA-1 interactions involved in many leukocyte functions<sup>13</sup>. The unique GAG chain of human endocan is a chondroitin sulphate / dermatan sulphate chain, O-linked to the serine 137, which interacts with HGF/SF and increases its mitogenic activity *in vitro*<sup>14</sup>.

Here, we cloned the gene and cDNA of murine endocan, and explored the main biochemical characteristics and tumorigenic properties of the translated product. As for human endocan, we demonstrated that mouse endocan is a PG containing a unique chondroitin sulphate /dermatan sulphate chain but is secreted as a part-time PG. While full glycanated human endocan promotes tumor growth, wild type mouse endocan and unglycanable human and mouse endocan inhibit tumor growth of HT-29 cell lines,

underlining the critical role of the glycanation on endocan's tumorigenesis.

## MATERIEL AND METHODS

**Cell culture:** The HEK 293, NIH3T3, B16F10, HT29 cells were routinely cultured in DMEM supplemented with 10% FCS and 2mM L-glutamine. CHO DG44 were routinely cultured in  $\alpha$ -MEM supplemented with 10% FCS, HT-Supp and 2 mM L-glutamine. Clonal hybridoma cells (cells from inguinal lymph nodes fused with sp2/0 myeloma cell line) were cultured in RPMI supplemented with 10% FCS, 5 mM HEPES, HT-Supp or SFM, a conditioned medium without FCS (Hybridoma).

**Cloning of mouse endocan: Mouse endocan cDNA cloning.** Cloning has been performed by PCR, in which primers have been designed within the 100% homologous sequences between human (GenBank Accession Number X89426) and rat endocan (GenBank Accession Number U80818) cDNAs. A 125 bp PCR fragment was obtained from BALB/cByJlco (BALB/c) mouse lung cDNA (Invitrogen) and sequenced with 3730 XL apparatus from Applied Biosystems (Genoscreen). Then 5' and 3' rapid amplification of cDNA ends (RACE) was performed using Marathon Ready on mouse lung cDNA (In vitrogen). The full length mouse endocan sequence was then cloned (GenBank Accession Number AJ249354). **Mouse endocan gene cloning.** 5' and 3' rapid amplification of genomic DNA was performed using cDNA-specific primers. In brief, mouse genomic DNA was extracted from BALB/c splenocytes (Qiagen). The EcoR I-digested genomic DNA was ligated with an adaptor that includes cohesive EcoR I end and specific sequences for PCR-based 5' and 3' amplification. The complete mouse *esm-1* gene was then cloned (GenBank Accession Number AJ416379).

**RT-PCR :** Extraction of mRNA and RT-PCR were performed as previously described<sup>15</sup>. PCR amplification was performed for 35 cycles at 55°C with forward primer localized within the exon 1 (5'gaaacctgctaccgtacagtc3'), and the reverse primer in the exon 3 (5'gattggattactcatcgacag3') in order to obtain the complete reading frames.

**Production of recombinants, mutants and chimerics mouse endocan:** Accordingly with the human sequence, the serine 138 of the mouse

putative O-glycanation site was replaced by an alanine codon by PCR with the Quick-Change site-directed mutagenesis kit, according to the manufacturer's recommendations (Stratagene). Mouse endocan and mouse endocan/S138A cDNAs were amplified with primers including the Hind III and EcoR I restriction sites and inserted into a Hind III - EcoR I-linearized pcDNA3.1 (+) vector (Invitrogen). A chimeric DNA sequence containing the entire reading frame of mouse endocan fused with the Fc domain of human IgG1 was also inserted into pcDNA3.1(+) as previously described above. One microgram of constructs in pcDNA3.1 (+) were transfected into HEK 293, CHO DG44, B16F10 with Fugene (Roche) or Lipofectamine (Lipofectamine) for NIH3T3 and HT29. Stably transfected cells were selected by using G418 (200, 300, 1000 µg/ml for HEK 293, HT29 and CHO DG44 respectively) and cloned by limit dilution as previously described<sup>5</sup>.

**mAb generation and characterization:** mAbs were generated as previously described in lewis rat<sup>5</sup> with purified mouse endocan/Fc from CHO. Clonal hybridoma cells were screened to recognize mouse endocan/Fc by ELISA. Anti-Fc Abs were coated in carbonate buffer. After blocking, mouse endocan/Fc, endocan/Fc, and CD54/Fc were added. Tested supernatants were incubated, then washed and incubated with HRP-anti rat IgG, washed again and developed with OPD as recommended by the manufacturer. Sixteen hybridoma clones designated as GGR were shown to react with mouse endocan/Fc and did not react with CD54/Fc. Different anti-human endocan antibodies were also tested. Among all the anti-endocan mAbs developed in our laboratory, only MEP 14 mAbs, previously described as an anti-human exon 3-derived sequence recognized also mouse endocan. None other mAbs cross-react between human and mouse endocan. mAbs were purified from cell supernatant as previously described<sup>5</sup>.

**ELISA :** Mouse endocan ELISA were performed as human endocan ELISA with some modifications<sup>5</sup>. Briefly, MEP 14 (IgG2a/K) was used as a coated mAb (0.5 µg/ml in carbonate buffer) and the couple of GGR211 and GGR222 (IgG2a/K, 1 µg/ml) as a sandwich mAbs. Mouse endocan standards range from 20 to 0.3 ng/ml.

Subsequent incubations with anti-rat IgG2a-conjugated horseradish peroxidase (HRP) (Pharmingen) were followed by revelation with OPD (Sigma) as recommended by manufacturer.

**Mouse endocan characterisation:** *DEAE sepharose:* The HEK 293 cell supernatant was passed through a 0.2 cm x 1.3 cm DEAE-Sephacel column run originally in 20 mM Tris HCl pH 7.4, containing 0.15 M NaCl (Bio-Rad). Bound endocan was eluted from the DEAE-Sephacel with 20 mM Tris HCl pH 7.4, containing 1 M NaCl, and then concentrated in a 0.5 ml Vivaspinn concentrator with a 30 kD molecular weight cut-off (Vivascience). *Chondroitinase ABC:* The bound DEAE was treated with 1 unit/ml chondroitinase ABC (Sigma) overnight at 37°C. Samples were diluted 1:1 in 2X SDS-PAGE sample buffer and subjected to PAGE and western blot analysis according to standard western blotting procedures using MEP 14 as primary Ab probe, followed by affinity-purified, HRP-conjugated goat anti-mouse Ab (dilution 1:15,000) (Sigma) and an ECL detection kit (Amersham). Reduced conditions were obtained with 0.1 M dithiothreitol. *Q sepharose* To determine the glycanation status of mouse endocan the HEK 293 cell supernatant was passed through a 0.2 cm x 1.3 cm Q-Sepharose column run originally in 20 mM Tris HCl pH 7.4, containing 0.05 M NaCl (Bio-Rad). Mouse endocan was eluted from the Q-Sepharose with 20 mM Tris HCl pH 7.4, containing NaCl gradient from 0.1 to 1 M. Each elution fraction was measured by ELISA. The elution fraction was pooled into two major groups; The first one corresponded to the elution fractions between 0.1 and 0.4 M NaCl and second one between 0.5 and 1 M NaCl. The first peak was then purified on affinity chromatographic column of MEP 14 for ELISA standard, the second elution group was concentrated in a 0.5 ml Vivaspinn concentrator with a 30 kD molecular weight cut-off (Vivascience). Samples were then resuspended in 2X SDS-PAGE sample buffer and subjected to PAGE and western blot analysis. In a second set of experiments, the non glycanated fraction (first elution peak) was evaluated by the elution at 0.4 M NaCl and the glycanated fraction (second elution peak) at 1 M NaCl.

**Mouse models :** Animal experiments were performed as described previously<sup>9</sup>. Briefly, CB-17 scid/scid homozygous SCID mice (male, 5-6 weeks of age) were injected s.c. into the dorsal

interscapular area. Mice received  $10^6$  transfected HEK 293 cells or  $0.25 \times 10^6$  transfected HT29 resuspended in 200  $\mu$ L DMEM without FCS. Twenty-four hours before HEK 293 cells 200  $\mu$ L of anti asialo-GM<sub>1</sub> antibody (Wako Chemicals) were injected intra-peritoneally. Sera were then collected once a week to determine the secretion of mouse endocan by the growing tumor. Mice were also assessed for the presence of palpable tumor once a week. Mice were killed when the tumor volume reached 2 cm<sup>3</sup>. A systematic macroscopic analysis was realized for each organ and tumor, which were then harvested, fixed in AFA (fixing solution containing Ethanol, Formol and acetic acid – LABONORD Templemars France) and processed for paraffin embedding. Three  $\mu$ m thick paraffin slices were stained with hematoxylin eosin.

**Cell proliferation assays:** The cell growth and survival were determined by measuring the BrDU incorporation (Roche) and MTT reduction<sup>16</sup> respectively into HT-29. Cells were seeded at a density of  $0.5 \times 10^4$ /well in 96-well microplates and cultured during 24 hours in complete medium, including 10% FCS. After 24 hours of starvation in medium without FCS, purified recombinant endocan (human endocan, human endocan/S137A, mouse endocan, mouse endocan/S138A) were added in complete medium. After 24 hours of culture, BrDU incorporation and MTT viability assay were performed recommended by manufacturer. Mytomycine (100 ng/mL) was added for control.

## RESULTS

**Mouse endocan is a chondroitin sulfate proteoglycan:** The mouse *esml* gene has been cloned from BALB/c splenocyte genomic DNA (GenBank Accession Number AJ416379). The gene is unique, localized on 13D2.2 and composed of 3 exons and 2 introns as human *esml* gene. Exons are particularly well conserved between human and murine sequences from 61% to 81.7% nucleotide identity (Fig. 1A). Mouse endocan gene codes for only one cDNA with a complete reading frame of 552 bp with 80.7% nucleotide identity with human endocan. A unique mouse gene transcript was detected by RT-PCR in the lung, kidney, heart and brain, but not in the liver, and the spleen (Fig. 1C).

The predicted mouse endocan polypeptide contains 184 amino acids, identical in length with 75% amino acid identity with human polypeptide. Mouse protein sequence predicts same characteristic domain structure: (1) a NH<sub>2</sub>-terminal hydrophobic signal sequence, composed of 19 amino acids; (2) a cysteine-rich region composed of 18 cysteines, which localisation on polypeptide are conserved; (3) a tumorigenic F-rich region (<sup>113</sup>FPFFQY); and (4) an identical O-glycanation site on serine 138 (<sup>138</sup>SGDG) (Fig. 1B).

By virtue of its glycan, human endocan binds to the DEAE-Sepharose ion-exchange chromatography, same property is observed for mouse endocan. The DEAE-bound mouse endocan is detected at 50 kDa (Fig. 1D). After treatment by chondroitinase ABC, the apparent molecular weight of mouse endocan switches to 18 kDa (Fig. 1D), similarly to the human homolog (Fig. 1D), which is highly consistent with the predicted molecular weight of endocan protein core.

These results show that mouse endocan is a proteoglycan containing a chondroitin sulphate chain, as human endocan.

**Low glycanation of mouse endocan impairs tumorigenesis :** We have previously demonstrated that human endocan induces tumor formation when overexpressed in HEK 293 cells<sup>9</sup>. Here, we wonder if mouse endocan also exhibits such a tumorigenic activity *in vivo*. As positive control, all SCID mice receiving HEK 293 cells expressing human endocan ( $n = 4$ ) developed in 10 weeks a tumor at the point of injection. Unexpectedly, SCID mice receiving HEK 293 cells expressing mouse endocan did not develop a tumor ( $n = 4$ ), as negative control SCID mice receiving HEK 293 cells with control vector ( $n = 4$ ).

With in mind the fact that the glycan moiety of human endocan plays a key role in tumorigenesis<sup>9</sup>, we therefore detailed the glycanation level of recombinant mouse endocan produced by HEK 293 cells. In contrast to human endocan, not all mouse endocan produced by HEK 293 cells bind to DEAE-Sepharose (Fig. 2A). Moreover, crude supernatants containing recombinant mouse endocan revealed 2 bands of 50 kDa and 20 kDa (Fig. 2B). The first band corresponded to the glycanated and the DEAE-bound fraction. The second band is not retained by DEAE and is suggested to correspond to the unglycanated mouse endocan. The mouse O-

glycanation site on serine 138 was replaced by an alanine (endocan/S138A), resulting in a non glycanable protein of 20 kDa (Fig. 2B). Consistently endocan/S138A did not bind to DEAE-Sepharose (Fig. 2A).

We take advantage that the DEAE-sepharose separates glycanated from unglycanated forms, and show that the last form (contained in the DEAE flow through) binds to Q-sepharose (Fig. 2A). All mouse endocan and endocan/S138A bind to Q-Sepharose. Consistently, Q-Sepharose step gradient elution profiles of human endocan, endocan/S138A and mouse endocan are different. Human endocan is eluted at 0.7-0.8 M NaCl. Endocan/S138A is eluted at 0.2 M NaCl. Mouse endocan is eluted in two major peaks: a first peak at 0.2 M and a second peak at 0.6-0.7 M NaCl (Fig. 2C). The unglycanated status of the 0.2 M NaCl fraction is confirmed by immunoblot where an apparent molecular weight of 20 kDa is revealed (Fig. 2D). Thus, mouse endocan is a proteoglycan containing a unique GAG chain O-linked to the serine at position 138, but much less glycanated than its human homolog, which may explain its non-tumorigenic effect in 293 tumor cell model.

To examine a possible host-dependent glycanation, we compared the glycanation level of mouse endocan produced by various cell lines like HEK 293, HT-29 and 3 rodent cell lines, like CHO-DG44, NIH3T3 and B16F10. To quantify the proportions of each form, Q sepharose elution was simplified. The unglycanated form was considered eluted at 0.4 M NaCl and the glycanated form by a further elution at 1 M NaCl. Using this assay, mouse endocan derived from HEK 293 cells was 73% (71.1; 74.0,  $n = 4$ ) recovered as non glycanated. This poor glycanation is observed whatever the human or rodent cell strain (Table 1).

Our results demonstrate that, in contrast to human endocan, mouse endocan is secreted mainly in a non glycanated form, and reinforce the key role of endocan's glycan in tumorigenesis.

**Non glycanated endocan exhibits anti-tumor activity:** We then verify if mouse endocan is able to modify the spontaneous proliferation of the HT-29 tumorigenic cell line, *in vivo*. As control, SCID mice subcutaneously injected with HT-29 control vector 1 did form tumor in 6 weeks at the point of injection ( $n = 4$ ). Surprisingly, HT-29 cells

expressing mouse endocan (clone 1, 22.2 ng/24h/10<sup>6</sup> cells) exhibit smaller tumor growth (Fig. 3A). To discard a possible clonal selection, 3 additional distinct HT-29 cell clones (clones 2-4) having similar production levels of mouse endocan [19.6; 28.86; 36.2 ng/24h/10<sup>6</sup> cells], were subcutaneously injected in SCID mice ( $n = 4$  per clone). In the 3 groups, the growth rate of HT-29 tumors was also equally slowed down as compared to the control group (control vector 2) (Fig. 3A). These results revealed a paradoxical anti-tumoral activity of mouse endocan, possibly related to the presence of non glycanated form

To examine if this could be due to endocan protein, we generated HT-29 cell clones overexpressing the unglycanable mouse endocan (endocan/S138A). When these cells were injected s.c. into SCID mice [2 experiences, 4 distinct clones, 4 mice per clone, 20.3 (19.1; 28.2) ng/24h/10<sup>6</sup> cells], all tumors indeed exhibited delayed growth rate and smaller tumor than control vector-HT-29 cell tumors, arguing in favour of our hypothesis (Fig. 3B). Next, we wonder if the unglycanable human endocan/S137A exhibits such an anti-tumor activity. When HT-29 cell clones overexpressing this mutant were injected s.c. into SCID mice [2 experiences, 4 distinct clones, 4 mice per clone, 31.2 (28.5;34.2) ng/24h/10<sup>6</sup> cells] all tumors showed delayed growth rate by comparison with tumors induced with HT-29 (Fig. 3C). Taken together these results suggest that either mouse or human endocan polypeptides exhibit anti-tumor activity.

Clinically, a round, s.c. tumor was found at the site of cell injection in all cases. When compared with mice having been injected with HT-29 cells, human endocan tumor-expressing mice looked leaner, but the comparison of weight curves did not show any significant difference because the weight of the developing tumor compensated the weight loss of the mice with tumors. At the dissection, the tumor did not adhere to the skin or to adjacent organs. Macroscopic and microscopic examination did not show any lymph node or metastatic dissemination. Macroscopic analysis of tumor HT-29 showed a whitish nonadherent nodule, with necrotic areas. Percentage of necrotic areas did not differ between different tumor types. A more abundant stroma and a significant leukocytic infiltrate at the tumor periphery were present in tumors expressing unglycosylable (human or mouse) or mouse

endocan compared to parental HT-29 tumors or human endocan (Fig. 4).

**No effect of mouse endocan on HT-29 cell proliferation:** To explore a direct effect of endocan on HT-29 cell proliferation, cells were cultured with various levels of wild type or unglycanable human or mouse endocan, ranging from 1 ng/mL to 1 µg/mL. Endocan change neither BrDU incorporation nor MTT cytotoxicity assay (Fig. 5). As control the BrDU incorporation is abolished by mytomyecine. This indicates no direct cytostatic or cytotoxic mechanisms on tumor cells for endocan either glycanated or non glycanated, and rather suggests a more indirect effect through modifications of the tumor stroma.

## DISCUSSION

Lung cancer is the leading cause of death by cancer in developed countries<sup>17</sup>. The increasing incidence, the absence of blood markers of the disease, and the poor prognosis underline the need to search new strategies for diagnosis, follow-up, and treatment. Endocan is an endothelial cell-derived proteoglycan preferentially expressed in human lung tissue<sup>6</sup>. In lung cancer, endocan mRNA and protein are increased in tumor vessels<sup>18</sup>, and are described as a poor prognostic molecular signature<sup>9,10</sup>. Moreover, human endocan exhibits growth promoting activity in SCID mouse tumor models<sup>9</sup>. To better understand the role of this molecule in the development of solid tumors, syngenic mouse models are necessary. In this study we cloned and characterized the mouse endocan. We show that mouse endocan gene is translated in a protein core highly similar to its human homolog. Surprisingly, the O-glycanation site is only partially used, which profoundly modify the tumorigenic effect of mouse endocan.

The mouse *esm-1* gene exhibits many close characteristics as its human homolog. The mouse gene is unique and reveals 3 exons genomic organization. The mouse *esm-1* promoter contains a TATA box and same regulatory motifs as in human endocan promoter: two Ets-binding motifs, a CRE-like motif and the 6-bp palindromic sequence. Moreover, the endothelial-cell-specific expression locus (-81 to +58) is highly conserved with 91% overall identity between the human and mouse endocan promoters<sup>7</sup>. Tissue-selective expression of the mouse transcript is also found in lung and kidney, but not in liver. However, while

transcriptional regulation of human endocan gene is subjected to alternative splicing<sup>19</sup>, generating an exon 2-deleted mRNA<sup>15</sup>, no such transcriptional regulation could be seen in mice.

Mouse endocan gene and cDNA predict a polypeptide of 184 amino acids. Endocan sequences from various species have been established, all containing 184 amino acids. Mouse polypeptide (*Mus musculus*, GenBank Accession Number AJ249354) shares 95% homology with rat, named PG25<sup>20</sup> (*Ratus norvegicus*, GenBank Accession Number U80818), 79% with dog (*Canis familiaris*, GenBank Accession Number XM\_546319), 76% with cow (*Bos Taurus*, GenBank Accession Number XM\_588125.2), 75% with human (*Homo sapiens*, GenBank Accession Number X96426) and 75% with chimpanzee (*Pan troglodytes*, GenBank Accession Number XM\_518187). All these polypeptides predict same domain structure : (1) the NH<sub>2</sub>-terminal hydrophobic signal sequence; (2) the 18 cysteines out of the first 110 amino acids; (3) the F-rich domain (<sup>113</sup>F<sup>118</sup>PF<sup>118</sup>FQY<sup>118</sup>) involved in the tumorigenic activity; (4) and a unique functional O-glycanation site on serine 137 or 138 (SGDG).

What explains why mouse endocan is partially glycanated, despite strong sequence homology with human polypeptide? First, the glycanation appears exclusively dependent on endocan sequence, since transfection in human or mouse cells did not change significantly the glycanation level of either mouse endocan, remaining low, or human endocan, remaining high. Second, the O-glycanation site is unique and appears less used than its human homolog, since mutagenesis of serine 138 from mouse O-glycanation site (<sup>138</sup>SGDGN) resulted in completely unglycanable protein without any cryptic glycanation sites, as for S137A mutant in human sequence (<sup>137</sup>SGDGN)<sup>14</sup>. The biosynthesis of GAG is initiated by sequential addition of four monosaccharides, xylose-galactose-galactose-glucuronic acid onto targeted serine residues in the core protein. Subsequently the sugar chains are extended by addition of two alternating monosaccharides, N-acetylgalactosamine /glucuronic acid in chondroitin sulfate/dermatan sulfate. Xylosylation and transfer of the fifth sugar residue are the critical determining steps for PG biosynthesis<sup>21-23</sup>. Few is known about the regulation of these steps but amino acid sequence of the recognition site and protein conformation

are two major regulatory factors proposed to determine the glycanation priorities<sup>24</sup>. Thus, the difference observed in the glycanation efficiency could be due to specific amino acids which distinguish mouse from human sequences.

All these features and the known growth promoting activity of human endocan suggest a similar pro-tumoral activity for mouse homolog<sup>9,18</sup>. However, our results revealed a completely opposite and unexpected effect. Contrary to human endocan, its mouse homolog did not induce tumors when overexpressed in HEK 293 cells. Nevertheless, we have previously shown that only wild type but not unglycanable human endocan promote HEK 293 cell tumor growth<sup>9</sup>. Moreover, the glycan moiety in the endocan's tumorigenesis was also emphasized *in vitro*. Both wild type endocan and its purified dermatan sulfate chain bind to HGF/SF and increase HEK 293 cell proliferation while the unglycanated form alone did not<sup>14</sup>. Thus the fact that mouse endocan (1) is secreted mainly unglycanated and (2) is not able to induce tumor proliferation, strongly reinforce the critical role of the glycan moiety in the tumor growth of HEK 293 cells in our model.

By virtue of the absence of growth promoting effect in HEK 293 cell model, we expected no effect of mouse endocan in another tumor model using spontaneously tumorigenic HT-29 cells. Surprisingly, these transfected cells grew indeed slower than the parental cells. This was not due to a clonal selection since 4 distinct clones secreting similar levels of mouse endocan, each independently show slowing tumor growth rate. Similarly, mice receiving HT-29 cells transfected with unglycanable mouse endocan (endocan/S138A) exhibited same anti-tumor growth property, suggesting that this property is supported by endocan polypeptide.

One important point is that in our SCID mouse tumor model using HT-29 cells, both mouse and human endocan polypeptides exhibit similar anti-tumor growth property. This suggests that the specific amino acids involved in this property are common to both polypeptides. With in mind the

75% homology between mouse and human polypeptides, our results emphasized that mouse models of tumor xenograft could be good models to explore human-based antitumorigenic property of endocan polypeptide.

A second important point is how endocan polypeptide exerts its anti-tumor activity. There are no convincing data, at least *in vitro*, that endocan polypeptide induces HT-29 cell cytotoxicity or inhibits HT-29 cell growth. However, a mechanism has been suggested, that links endocan to the tumor infiltrating leukocytes (TIL)<sup>25</sup>. We previously demonstrated that endocan binds directly to leucocyte integrin LFA-1 and inhibits LFA-1 – ICAM-1 interaction, a critical step in leukocyte adhesion, migration and activation<sup>13</sup>. Second, in human non small cell lung cancer, the presence of endocan was upregulated in blood and is associated with bad prognosis<sup>8</sup>. Then, in HT-29 tumor xenografts, tumor vessel-derived mouse endocan may participate as a TIL's brake, limiting tumor stroma reaction, and facilitating tumor growth. Here, tumors induced by HT-29 cells expressing wild type mouse, mouse or human endocan polypeptides are associated with a tumor stroma reaction. These results lead us to speculate that this TIL's brake should be inhibited by endocan polypeptide, increasing thus TIL recruitment, stromal remodelling, and slowing tumor growth.

Many strategies have been directed towards the development of agents that disrupt the microenvironment and angiogenesis<sup>26</sup>. Growing evidence suggests that proteoglycans are potential therapeutic tumor targets<sup>3,4</sup>. Here, we demonstrated key role for the glycan moiety in endocan's tumorigenesis. We also revealed an unexpected anti-tumor property of polypeptide cores of human and mouse endocan. Finally, our results indicate that the glycanation efficiency can generate a proteoglycan with antagonistic functions, and that control of this glycanation may represent a powerful therapeutic target for solid tumors.

## AKNOWLEDGMENTS

We thank Philippe HAUW, Han VORGN, Gwenola KERVOAZE, and Genevieve MARCHANDISE for their precious technical help. This work was funded, in part, by EndotisPharma and Santélys.

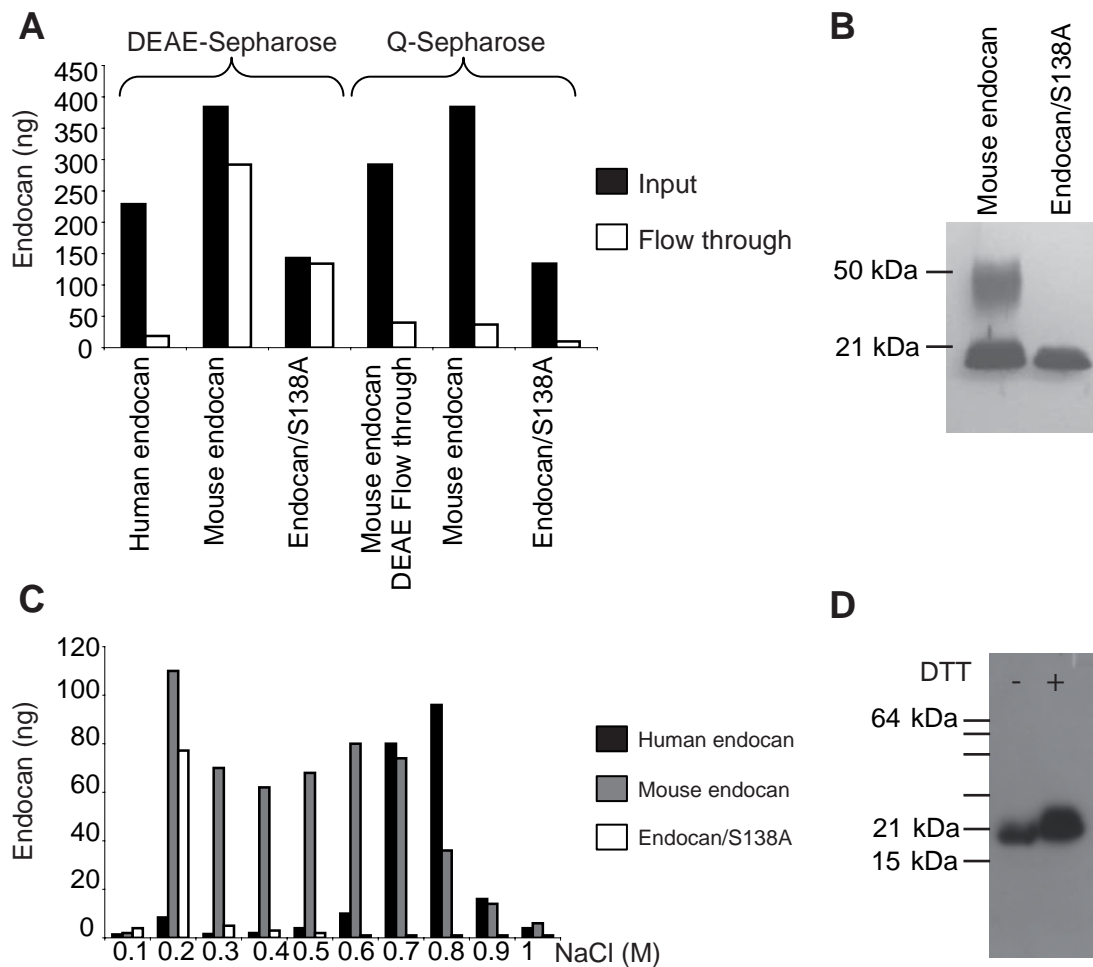


## REFERENCES

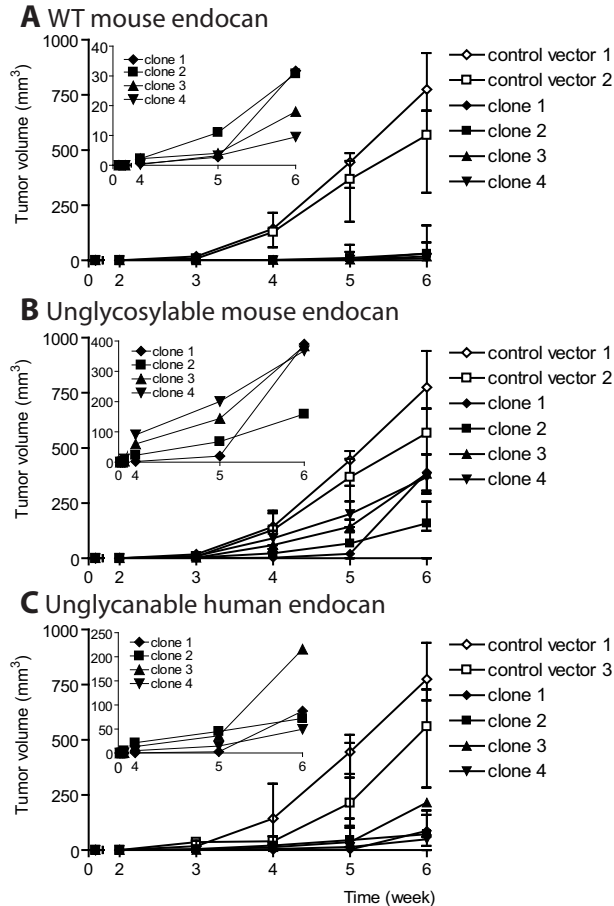
1. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med.* 2000;6:100-102.
2. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
3. Fuster MM, Esko JD. The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:526-542.
4. Dube DH, Bertozzi CR. Glycans in cancer and inflammation--potential for therapeutics and diagnostics. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4:477-488.
5. Bechard D, Meignin V, Scherpereel A, et al. Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J Vasc Res.* 2000;37:417-425.
6. Lassalle P, Molet S, Janin A, et al. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem.* 1996;271:20458-20464.
7. Tsai JC, Zhang J, Minami T, et al. Cloning and characterization of the human lung endothelial-cell-specific molecule-1 promoter. *J Vasc Res.* 2002;39:148-159.
8. Grigoriu B, Depontieu F, Scherpereel A, et al. Endocan expression and relationship with survival in human non small cell lung cancer. *Clinical cancer research.* 2006.
9. Scherpereel A, Gentina T, Grigoriu B, et al. Overexpression of endocan induces tumor formation. *Cancer Res.* 2003;63:6084-6089.
10. Borczuk AC, Shah L, Pearson GD, et al. Molecular signatures in biopsy specimens of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:167-174.
11. Amatschek S, Koenig U, Auer H, et al. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res.* 2004;64:844-856.
12. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415:530-536.
13. Bechard D, Scherpereel A, Hammad H, et al. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol.* 2001;167:3099-3106.
14. Bechard D, Gentina T, Delehedde M, et al. Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J Biol Chem.* 2001;276:48341-48349.
15. Depontieu F, Grigoriu B, Scherpereel A, et al. Exon 2 of endocan gene contributes to tumorigenesis. 2006.
16. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. An improved MTT assay. *J Immunol Methods.* 1993;157:203-207.
17. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 2004;54:8-29.
18. Sarrazin S, Adam E, Lyon M, et al. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): A potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1765:25-37.
19. Aitkenhead M, Wang SJ, Nakatsu MN, Mestas J, Heard C, Hughes CC. Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. *Microvasc Res.* 2002;63:159-171.
20. Wang X, Brownstein MJ, Young WS. PG25, a pineal-specific cDNA, cloned by differential display PCR (DDPCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). *J Neurosci Methods.* 1997;73:187-191.

21. Nadanaka S, Kitagawa H, Sugahara K. Demonstration of the immature glycosaminoglycan tetrasaccharide sequence GlcAbeta1-3Galbeta1-3Galbeta1-4Xyl on recombinant soluble human alpha-thrombomodulin. An oligosaccharide structure on a "part-time" proteoglycan. *J Biol Chem.* 1998;273:33728-33734.
22. Schonherr E, O'Connell BC, Schittny J, et al. Paracrine or virus-mediated induction of decorin expression by endothelial cells contributes to tube formation and prevention of apoptosis in collagen lattices. *Eur J Cell Biol.* 1999;78:44-55.
23. Seo NS, Hocking AM, Hook M, McQuillan DJ. Decorin core protein secretion is regulated by N-linked oligosaccharide and glycosaminoglycan additions. *J Biol Chem.* 2005;280:42774-42784.
24. Brinkmann T, Weilke C, Kleesiek K. Recognition of acceptor proteins by UDP-D-xylose proteoglycan core protein beta-D-xylosyltransferase. *J Biol Chem.* 1997;272:11171-11175.
25. Brigati C, Noonan DM, Albini A, Benelli R. Tumors and inflammatory infiltrates: friends or foes? *Clin Exp Metastasis.* 2002;19:247-258.
26. Neri D, Bicknell R. Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:436-446.

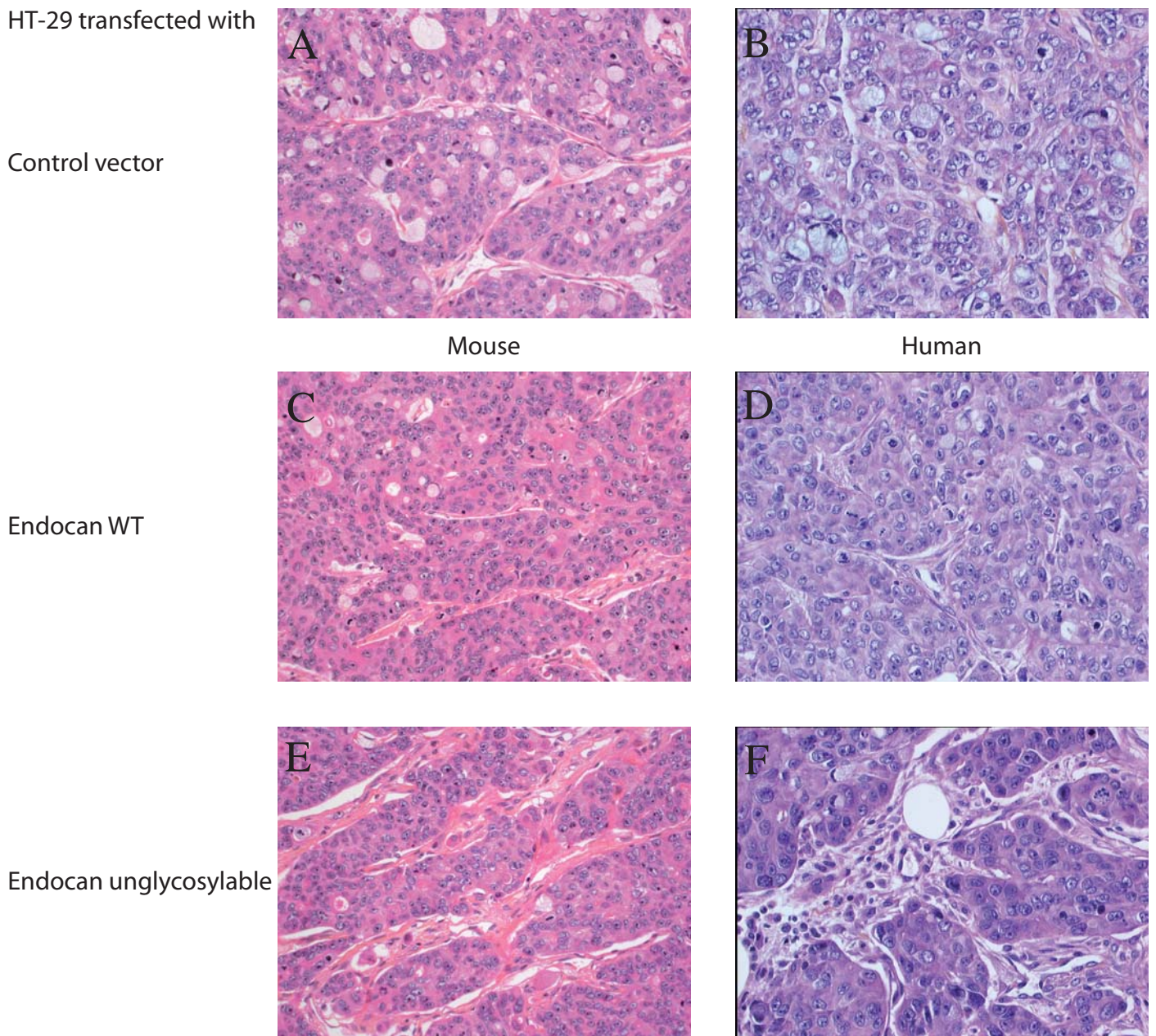




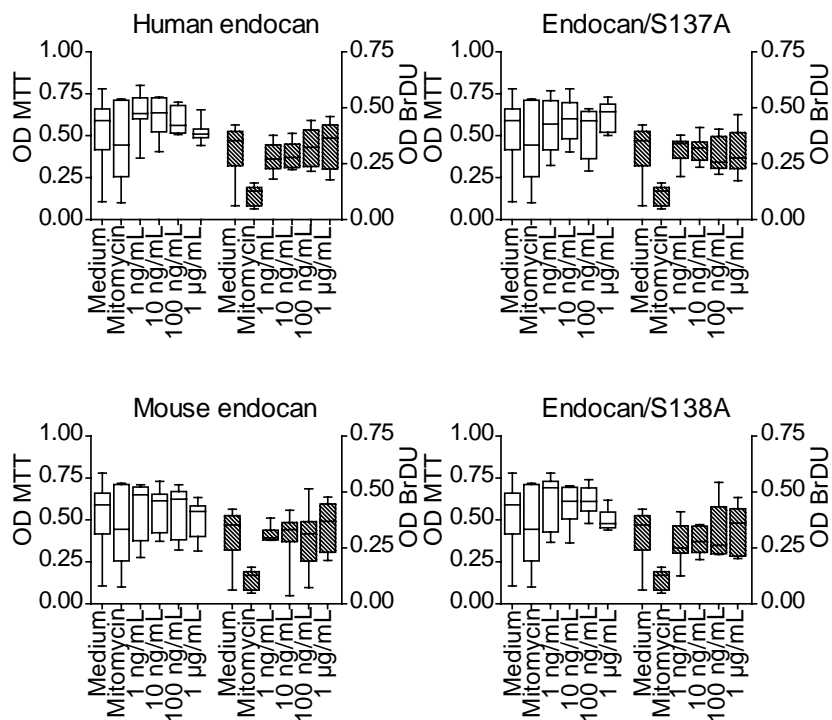
**FIGURE 2: Secretion of mouse endocan is a part-time proteoglycan.** A: The supernatants of human endocan and mouse endocan-293 cells were passed through DEAE- or Q- Sepharose. The amounts of the input (Black boxes) and the flow through (white boxes) were measured by ELISA. The DEAE-Sepharose separates the glycanated from the unglycanated forms. The Q-Sepharose binds both forms. B: Crude supernatant of mouse endocan and mouse endocan/S138A were revealed with MEP14. Two forms were observed for mouse endocan: a glycanated form at 50 kDa and an unglycanated form at 20 kDa. C: Comparison between human, mouse endocan and mouse endocan/S138A supernatants profiles (black, grey and white boxes respectively) on Q-Sepharose. All endocan bound to Q-Sepharose. The bound endocan was then eluted with step NaCl gradient from 0.1 to 1 M. D: 0.2 M NaCl Q-Sepharose elution immunoblotting with MEP 14 antibody. Sample was analyzed under non-reducing (-) or reducing (+) conditions without or with DTT.



**FIGURE 3: Kinetics of mouse endocan-HT-29 cells in SCID mouse.** SCID mice were injected with  $10^6$  cells of endocan- (black box), or control vector- (white box) transfected HT-29 cells ( $n = 4$  per group) in two independent experiences. The first one (lozenge) Four independents clones of mouse endocan-HT-29 transfected cell lines were tested. Tumor growth was analyzed in each experiment by measurement of tumor size once a week. Mice were euthanized when the tumor volume reached  $1000 \text{ mm}^3$ . The results are median  $\pm$  interquartiles. A: Mouse endocan-HT-29 cells; B: Mouse endocan/S138A-HT-29 cells; C: Human endocan/S137A-HT-29 cells.



**FIGURE 4:** Pathological analysis of subcutaneously grown HT 29 tumors A: histological section of an HT 29 tumor transfected with control vector. Presence of a dense tumoral proliferation with little stroma analogous to non transfected HT29 tumors (panel B). C histological section of a HT29 tumor transfected with wild type murine endocan; presence of a more abundant stromal reaction compared to both human wild type endocan transfected tumors (panel D) and control vector-transfected tumors (panel A). E and F: histological sections of HT29 tumors transfected with either murine (panel E) or human (panel F) unglycosylable endocan. For all panels: Hematoxylin-eosin staining x400 magnification



**FIGURE 5:** Effect of endocan on HT-29 cell proliferation *in vitro*. Each panel represent the MTT OD (white box) and the BrDU OD (cross hatch box) after 24 hours of HT-29 culture with medium, mytomycine (100 µg/mL), or various quantities of endocan ranges from 1 ng/mL to 1 µg/mL. Human and mouse wild type (left graphics) and unglycanable (right graphics) endocan were tested. The bottom, median and top lines of the box mark the 25<sup>th</sup>, 50<sup>th</sup>, 75<sup>th</sup> percentiles, respectively. The vertical line shows the range of values comprised between the 5<sup>th</sup> and the 95<sup>th</sup> percentiles.

# **ARTICLE V**

## **Anti-endocan antibodies slow tumor growth in subcutaneous xenografts by recruiting circulating leukocytes**

Bogdan Dragos Grigoriu, Christophe Leboeuf, Xavier Maréchal, Rémi Nevière, Arnaud Scherpereel, Anne Janin, Philippe Lassalle

Article en préparation



## Anti-endocan antibodies slow tumor growth in subcutaneous xenografts by recruiting circulating leukocytes

Bogdan Dragos Grigoriu<sup>1,5</sup>, Christophe Leboeuf<sup>2</sup>, Xavier Maréchal<sup>3</sup>, Rémi Nevière<sup>3</sup>, Arnaud Scherpereel<sup>1,4</sup>, Anne Janin<sup>2</sup>, Philippe Lassalle<sup>1\*</sup>

1 - INSERM U774, Institut Pasteur de Lille, France; 2 - INSERM U728, Université Paris 7, IUH-IFR105, Hopital St. Louis, Assistance Publique Hopitaux de Paris, France; 3 - Department of Physiology - Faculté de Médecine - Université de Lille 2 – Lille; 4 - Department of Thoracic Oncology, University Hospital of Lille, France; 5 - Department of Pulmonary Diseases, University of Medicine and Pharmacy, Iasi, Romania

### Introduction

Tumors larger than the *in situ* stage require a supportive stromal tissue and stimulation of angiogenesis in order to grow (1). Tumors secrete a broad range of mediators as VEGF which drive development of neo-vasculature by stimulated endothelial cells (2). This step is essential in the development of the tumor tissue since non-angiogenic clones from human tumors do not grow and stay dormant even months after their subcutaneous transplantation (3). Thus the structure and function of the tumoral tissue is created by a dynamic interaction between the cancer cells and their environment. Endothelial cells, situated at the interface between tumors and the hosting organism, are an important part of the tumor environment. Endothelial cells contribute to tumor development through mediator secretion, interaction with leukocytes in the blood stream and cells from surrounding tissues and are involved in inflammation and angiogenesis. Endothelial secreted mediators have some potential advantages as targets for anticancer strategies since they target a genetically stable cell component thus

minimizing the risk of apparition of resistance to therapy (4-6).

Endocan, is a soluble endothelial-cell specific proteoglycan (7), implicated in tumor growth. Endocan overexpression induce a tumorigenic potential in non tumoral epithelial cells whereas overexpression by tumor cell lines accelerates tumor growth (8). Endocan tumor growth promotion does not result from a direct effect on tumor or endothelial cells as it does not modify proliferation by itself (8). Endocan amplifies the mitogenic effect of pro-tumoral growth factors such as HGF/SF which binds to its glycanic chain (9). Endocan could also impede immune cell transendothelial migration by blocking LFA-1 – ICAM – 1 interactions (8), an important step in firm adhesion of leukocytes to the endothelium.

Endocan is an active player in tumor growth and is significantly overexpressed both during *in vitro* angiogenesis (10) and in several human tumoral localizations (11-15). Endocan and VEGF expression are correlated in kidney (10) and non small cell lung cancers (15). However, endocan antisense treatment does not inhibit *in vitro* angiogenesis thus raising the possibility that endocan expression is only a consequence of angiogenesis. Endocan gene overexpression has been shown to be part of a bad prognostic gene cluster associated with shorter survival or more frequent metastasis in lung (13) and breast tumors (12). In non small lung cancer, serum endocan levels are significantly correlated with distant spread of the tumors and survival (15).

---

\* Address for correspondence and reprint requests: Dr. Philippe Lassalle, INSERM U774, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, B.P 245, 59019 Lille cedex, FRANCE, Phone: 33 3 20 87 78 80, Fax number: 33 3 20 87 73 45, e-mail: [philippe.lassalle@pasteur-lille.fr](mailto:philippe.lassalle@pasteur-lille.fr)

**Financial Support :** B.G. is recipient of a long term Research fellowship from the European Respiratory Society.

Since endocan promotes tumor growth we hypothesized that endocan inhibition should lead to a reduction of tumor growth rate (8). This work aimed to study endocan expression in experimental tumors, the effect of anti-endocan antibodies on experimental tumor growth.

### **Material And Methods**

#### *Production of moESM-1 molecule and of moESM-1/huFc chimera*

The full length murine endocan (moESM-1) polypeptide and the murine endocan – human Fc chimerae (moESM-1/huFc) were produced and purified as already described for the human homologue (7, 16). Briefly, the full-length murine endocan cDNA generated by PCR was ligated in frame with the Fc domain of human IgG1. Constructions were inserted into the eukaryotic expression vector pcDNA3 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). The plasmids moESM-1/pcDNA3 and moESM-1/huFc/pcDNA3 were transfected in CHO cells to generate stable transfectants. Cells were cloned by limiting dilution in selective media (G418 1200 µg/ml; Gibco BRL). The moESM-1/huFc in cell supernatant was detected by a sandwich assay including coated affinity-purified goat anti-huFc antibodies (sigma) and MEP14, a mouse mAb that recognizes both human and mouse endocan. Then moESM-1/huFc cell clones were expanded and the chimerae were purified through binding to anti-huFc-agarose beads and elution in 4 M MgCl<sub>2</sub>. Rabbit immune serum against moESM-1/huFc was raised by 4 rounds of immunization with 50 µg moESM-1/huFc every 4 weeks. The rabbit antibodies to moESM-1 were obtained by precipitation in 40% ammonium sulfate followed by clearing anti-huFc antibodies on huIgG-agarose beads (sigma). The absence of residual anti-huFc Abs was checked by ELISA on coated human immunoglobulin. Then moESM-1 could be detected by a sandwich assay including coated MEP14 mAb and a rabbit polyclonal anti moESM-1 antibody.

#### *Production and purification of rat monoclonal antibodies to moESM-1*

Three 8 weeks old Lewis rats were immunized with an affinity-purified moESM-1/huFc (20µg with addition of 50 µl complete Freund adjuvant/animal) and boosted 3 times subcutaneously at 3 weeks interval (20 µg protein and 50 µl of incomplete Freund adjuvant/animal). Rat sera were tested in a sandwich ELISA for reactivity to moESM-1/huFc in the presence of 10 µg/mL human immunoglobulin. Three days after the last immunization, 10<sup>8</sup> cells were recovered from the spleen of one animal that was tested positive for the presence of anti-endocan antibodies. The cells were fused with sp2/0 myeloma cell line by addition of PEG as previously described (16). After screening hybridoma supernatants by ELISA, sixteen clones that reacted with endocan/Fc and did not react with ICAM1/Fc were selected, subcloned and further characterized. The isotype of each mAb was determined (rat isotyping kit, BD Pharmingen, San Jose, USA). The mAbs were produced in a serum-free medium (hybridoma SFM II, Gibco BRL) and purified on a protein G-sepharose column (5 cm x 1 cm, Amersham BioSciences) and eluted with 3M MgCl<sub>2</sub>. Purified mAbs were then dialyzed against PBS and concentrated through centrifugation in Amicon Ultra – 15 with a 30kD cutoff limit (Millipore). The total protein amount was assessed with the Biorad protein assay, purity by Coomassie-stained SDS-PAGE under reducing and non reducing conditions and moESM-1 reactivity by ELISA. No conservative was added and purified antibodies were immediately frozen at -20° after purification.

We used two clones of rat anti-murine endocan antibodies termed GGR222 and GGR237. The isotype of both antibodies was determined to be IgG2a. Purity of antibody was >95%. Affinity for murine endocan was present in ELISA at at least 1/800.000 dilution of a 2 mg/ml of protein sample.

### *Quantitation of murine endocan by ELISA*

Murine endocan was quantified using a sandwich immunoassay with MEP 14 (IgG1,k) (a mouse monoclonal antibody raised against human endocan derived from prokaryotic cells generated previously (16)), which also recognize the murine endocan, and GGR237 (rat IgG2a,k) that specifically recognizes murine endocan. MEP 14 mAb was coated overnight in 96-well ELISA plates (Costar) at 5 µg/ml in carbonate buffer, 100 µl/well, and then washed and blocked with saturation buffer (PBS, 0,1% BSA). After a washing step, murine endocan standards ranging from 20 to 0.3 ng/ml or the samples were added. After incubation and washing, GGR237 mAb was added at 0,5 µg/mL and then washed and incubated with the peroxidase-conjugated anti-rat IgG2a MARG2a antibody (Technopharm, Villejuif, France), washed again and developed with 3,3',5'5'-Tetramethylbenzidine (TMB) liquid substrate system (Sigma Aldrich, Lyon, France). All washes and antibody dilutions were done in ELISA buffer (0.1% Tween 20 added to saturation buffer). All antibody incubations were done at room temperature for 1 h. The absorbance was determined at 450 nm with a reference wavelength at 620 nm on a spectrophotometer.

### *Cell Culture*

Wild Type HT-29 (Ref ATCC HTB-38) and A549 (Ref ATCC CCL-185) cells were cultured in complete culture medium (DMEM supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin). Cells were grown as monolayers until they reach 75% confluence, rinsed with 10 ml PBS, detached using 7 ml 0.25% Trypsin with 1 mM EDTA (Gibco Brl), resuspended in DMEM with no FCS and counted before being used in experiments.

### *Viability and proliferation assays*

HT-29 cells were plated on 96 well cultures plates (Falcon Microtest 96 – Becton Dickinson Meylan France) at the appropriate density for each experiment and were cultivated for 24 hours in DMEM

supplemented with 10% FCS, 2 mM L-Glutamine and 200 µg/mL ticarcillin. Cells were then washed twice in DMEM with no FCS and then incubated in the appropriate conditions and duration.

For MTT viability assay, we used a cell density of  $2.5 \times 10^3$  cells/well. The cells were starved for 24 hours in DMEM with no FCS supplemented with L-Glutamine and ticarcillin. After incubating in the appropriate conditions (100 µl total volume/well), 40 µg of MTT (10 µL from a 4 mg/mL solution of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) was added to each well and then incubated for 4 hours at 37°C. Cells were then lysed and absorbance was measured at 570 nm.

The cellular proliferation assay used BrdU incorporation (Cell Proliferation ELISA BrdU – Roche Diagnostics). A cell density of  $20 \times 10^3$  cells/well was used. The cells were starved for 24 hours in DMEM with no FCS supplemented with L-Glutamine and ticarcillin and then incubated in the appropriate conditions. The final well volume was always 100 µl. After adding BrdU at a final concentration of 10 µM/mL for 8 hrs, the plates were processed according to manufacturer instruction.

### *Cytotoxicity assay*

The antibody-dependent cell cytotoxicity assay used LDH release (CytoTox 96 Promega, Charbonnières, France) and was performed according to the manufacturer instructions. HT-29 cells ( $20 \times 10^3$  cell /well) were incubated in 96-well culture plates with effectors cells at a ratio between 5 to 100 effectors per tumor cell. Control wells containing only target- and effector cells were include with each assay. Effector cells were obtained from Balb/c mice. After sacrifice, the spleens from two Balb/c mice 8 weeks old were triturated. The cell suspension was filtered on a 50 µm sterile nylon mesh and erythrocytes were lysed by osmotic shock. Cells were subsequently washed twice in complete DMEM medium and counted.

For the complement dependent cell cytotoxicity, due to the high content of LDH

in mouse serum, we used a slightly modified method of Fischer and al (17) based on fluorescent marking of dead cells. Briefly, HT 29 cells were marked with a green fluorescent dye (PKH -67 Sigma Chemicals) according to manufacturer instructions. Then 100.000 stained cells were incubated one hour with mAbs (at concentrations of 100 and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) and mice serum (10%) in a final volume of 200  $\mu\text{L}$ . Cells were analyzed within 1 h, by flow cytometry, using a FACScan (Becton Dickinson and Co., Mountain View, CA). Dead cells were marked by addition, immediate prior to counting, of propidium iodide (at a final concentration of 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The percent of dead cells was calculated by dividing the number of cells displaying red and green fluorescence by the total number of green marked cells multiplied by 100.

Total RNA extraction was performed from TRIzol included samples according to manufacturer recommendations. After extraction, two micrograms of total RNA were converted to first strand cDNA by use of random hexamer primers and Moloney Murine Leukemia virus reverse transcriptase (M-MLV, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to manufacturer's instructions. The PCR was performed using 1 Unit of HotMaster™ Taq DNA Polymerase (Eppendorf, Le Pecq, France) and 1:20 of the reverse transcription reaction. PCR was performed with an initial hotstart of two minutes at 94° C followed by 30 sec annealing and 1 min extension at 65°C. Primers, annealing temperature and number of cycles used (chosen for being in the exponential phase of PCR amplification) were as follows (s: sense, as: antisense):

**GAPDHs:** GTCTTACCACCATGGAGA,

**GAPDHas:** CCAAAGTTGTCATGGATGACC

Temp 55°C, 22 cycles, 204 bp amplicon

**muESM-1s:**

GAGCCAGCTCGCAGACATGAAG,

**muESM-1as:** GTGACCAACATTGACG

CAACAT Temp 56°C, 36 cycles; primers were

situated in exon one and three with a 629 bp amplicon

*Leukocyte adhesion model:* anesthetized adult male Sprague-Dawley rats (250-300 g; Depre, Saint Doulchard, France) were injected intravenously, via the dorsal penine

vein. After laparotomy, a segment of the distal ileum was gently mounted in an optical chamber and superfused (saline solution at 37°C). Single unbranched mesenteric venules (25-40  $\mu\text{m}$  in diameter) were observed (Eclipse E800; Nikon, Tokyo, Japan). Leukocyte behavior (flux of rolling leukocytes and leukocyte adhesion) was observed after the injection of one milliliter of 1% (w/v) acridine orange (excitation 470 nm; emission 540 nm; full width at half maximum (FWHM) 40 nm). Leukocyte rolling flux was determined offline during playback of videotaped images by counting the number of leukocytes distinguishable from the blood stream passing a line perpendicular to the vessel axis. Flux of rolling leukocytes was measured as the number of white blood cells that could be seen rolling past a fixed perpendicular line in the venule during a 1-min interval. Quantification of venular endothelium leukocyte adherence was performed offline during playback of videotaped images by counting the number of leukocytes that stuck and remained stationary for a period >30 s per 100  $\mu\text{m}$  of venule.

*Tumor models:* CB-17 scid/scid homozygous SCID mice (male, 5-6 weeks of age) were obtained from the Pasteur Institute of Lille. Mice were continuously housed under a germ free environment with temperature and light controlled conditions.

Tumor cells from the HT-29 cell line ( $2.5 \times 10^5$  cells/mice) or the A549 cell line ( $1 \times 10^6$  cells/mice) were injected in the dorsal interscapular region of 6 weeks old SCID mice. In this model there is a 100% tumor engraftment and subcutaneous tumor growth. Tumor size was assessed once per week using external measurement of the two largest orthogonally diameters using a Vernier caliper. Tumor size was calculated using the formula  $V = a*b^2/2$  where "a" being the largest measured diameter and "b" the shortest. Blood sampling was done every week immediately before injection of the antibodies or the carrier solution. Antibody treatment consisted of a weekly i.p. injection of 400  $\mu\text{g}$  of purified mAbs diluted in sterile

PBS; control mice received the same volume of the diluent (PBS).

Animal study protocols were subject to approval by the Ethical Committee for use of Laboratory Animals and were in accordance with the European directive for animal research (18). For ethical considerations animals were euthanized when the tumor diameters exceeded 1 cm and had about 1g of tumor weight (i.e. 5% of animal weight). Upon sacrifice tumors were carefully dissected in order to remove as much as possible of surrounding connective tissue and weighted.

#### *Pathological analysis*

Killed mice were systematically dissected with a macroscopic analysis of all organs. Tumors and selected organs specimens were harvested, fixed in AFA (fixing solution containing Ethanol, Formol and acetic acid – LABONORD Templemars France) and processed for paraffin embedding.

#### *Immunohistochemistry*

Immunohistochemical studies were performed on 3 µm thick paraffin sections by an automated indirect immunoperoxidase method (NexES®, Ventana medical systems, Illkirch, France) using a primary antibody directed against endocan. Appropriate controls (excluding the primary antibody and using an irrelevant primary antibody of the same isotype as well as excluding the secondary antibody) were processed with each staining. We first used a polyclonal rabbit anti murine antibody and confirmed the results with the GGR211 antibody at the same dilution.

For leukocyte staining, an antibody directed against CD45 (BD Pharmingen) was used as a primary antibody at the 1/100 dilution.

Cell Apoptosis was confirmed by *in situ* detection of fragmented DNA, using a TUNEL assay (ApopTag, Chemicon, Hampshire, UK) on deparaffinized five µm thick sections, treated with proteinase K (20 µg/ml) for 15 min at room temperature (19).

Counts for number of endocan-expressing cells, CD45 positive cells, apoptotic cells on TUNEL assay and mitoses were performed

blindly by two pathologists. Pathological quantitative data were obtained on four different microscopic fields at magnification x 400 on an Olympus AX70 microscope with wide field eyepiece number 26.5 providing a field size of 0,344 mm<sup>2</sup> at a magnification of X400. Results were expressed as mean (median) number of events per section (or mm<sup>2</sup>). Stromal areas were assessed on trichrome stained sections using SIS Olympus analysis software and were expressed as a percentage of microscopic field surfaces.

#### *Statistical analysis*

Statistical analysis was performed using non parametric tests with SPPS 12.0 software.

## **Results**

### *Endocan expression in tumor xenografts*

Subcutaneous HT-29 or A549 tumor xenografts were allowed to grow for 5 weeks until reaching a maximum diameter of 1 cm. After animal euthanasia tumor samples were cut into two parts and processed in TRIzol for total RNA extraction and for paraffin embedding.

In non small cell lung tumors and in human endothelial cells, an alternative splicing of endocan mRNA result in two transcripts (10, 15, 20). The corresponding mRNAs, which include or not the exon two, are translated in two proteins with different tumorigenic properties (20). We therefore verified if the same alternative splicing occurs in mice. RT-PCR amplification, even after 36 cycles, resulted in only one amplicon of 629 base-pair in size corresponding to the mRNA which include all three exons (Figure 1 C). Repeated tests done on normal lung, kidneys and multiple tumors samples consistently showed only one transcript in all organs studied. Thus, in contrast to humans cells (Figure 1D) and despite a similar genetic organization of endocan gene with three exons and two introns (Gene Bank accession numbers: AJ401092 and AJ416379), all with a near identical length, the mRNA isoform lacking the exon two is not present in mice.

Immunohistochemical studies were done with both the rabbit polyclonal and the rat monoclonal anti endocan antibodies. A first staining with the rabbit polyclonal anti murine endocan antibody showed an intense expression of endocan at the endothelial and perivascular levels (Figure 1A). Staining with a monoclonal antibody resulted in a less intense signal in the tumor endothelium (Figure 1B). Controls in skin from non tumoral zones did not show any staining for endocan with any antibody (data not shown). Identical results were obtained in both A549 and HT29 xenografts.

Therefore, similarly to human lung tumors (15), endocan is strongly expressed at the tumor endothelial level in mice bearing subcutaneous xenografts. However, in mice, the expression of the alternatively spliced variant corresponding to the non tumorigenic isoform detected in humans is lacking.

We evaluated endocan serum values by ELISA in eight SCID mice at base line before tumor cell inoculation and after 5 weeks of HT-29 tumor growth. Tumor bearing mice had higher levels (mean  $\pm$  SD) of serum endocan ( $3.01 \pm 0.31$  ng/ml) than at baseline ( $0.96 \pm 0.12$  ng/ml). Similarly, patients with broncho-pulmonary carcinomas have significantly higher values for serum endocan than healthy individuals (9). Thus, endocan synthesis and secretion at the endothelial level is stimulated by tumor growth in xenografts and higher values are detected in blood.

#### *Anti-murine endocan antibody GGR222 slows tumor growth*

In order to assess the effect of murine endocan on tumor growth we treated SCID mice with 400  $\mu$ g of monoclonal anti-murine endocan GGR222 antibody, with weekly intra-peritoneal injections starting the same day as tumor cell inoculation. Tumor growth curve showed that HT-29 tumor bearing animals treated with the GGR222 antibody had a slower growth rate (Figure 2A). This slower growth resulted in a 45% lighter tumor weight after 35 days ( $0.70 \pm 0.21$  g versus  $1.33 \pm 0.46$  g in control animals). An equivalent growth delay was observed in

A549 subcutaneous xenografts treated with the GGR222 antibody (figure 2B) where after nine weeks the tumors from treated animals have a mean weight of  $0.6 \pm 0.16$  g versus  $1.25 \pm 0.26$ g in PBS treated animals and  $1 \pm 0.3$  g in GGR 237 treated animals).

Pathological analysis showed that in HT-29 xenografts the GGR222 monoclonal antibody treatment does not modify micro-vascular density ( $11 \pm 2.9$  vessels/field versus  $9.5 \pm 4.1$  in PBS and  $11.7 \pm 2.7$  in GGR237 treated animals). However, GGR222 treated animals have a much higher apoptotic index ( $40 \pm 5.5$  apoptotic bodies/microscopic field versus  $1 \pm 1$  in PBS and  $5 \pm 1$  in GGR237 – treated animals). Similar results were obtained using the A549 cell line in another experiment.

#### *Anti-murine endocan antibodies increases blood endocan levels*

We evaluated serum endocan levels in normal mice after intra-peritoneal injection of the GGR222 anti-endocan antibody. Surprisingly we observed that early (one hour) after antibody injection there was a slight increase in serum endocan compared to control mice which received only a rat IgG2a isotype control (Figure 3A). The very rapid increase in endocan serum values after antibody injection argues against a synthesis process and suggest that endocan is mobilized from a tissue or a blood cell compartments.

Endocan assay in sera from mice bearing HT-29 tumors which received intra-peritoneal injection of anti-endocan antibodies showed higher values than in animals receiving the vehicle only, consistent with the endocan mobilisation effect described just above. We also observed significantly higher values for endocan in GGR237 treated animals. In order to explain differences in tumor growth we also repeated the same ELISA assay but omitting the secondary detection antibody. The result of the assay, expressed in arbitrary optical absorbance units would reflect the presence of murine endocan-antibody complexes present in sera. Surprisingly mice which received GGR237 antibodies had

significantly higher levels of endocan-antibody complexes than those which received GGR222 antibodies. Thus GGR237 antibodies, despite having affinity for endocan, were unable to clear endocan from the circulation.

*The anti-endocan antibody GGR222 does not alter HT-29 cell viability, proliferation, nor mediate tumor cell cytotoxicity.*

To explain the anti-tumor effect of the anti-endocan antibody, we first explored a possible direct effect of the antibody on cytotoxicity against tumor cells (21). In the presence of various concentrations of mAbs, the HT-29 cell viability, assessed by MTT assay, was not altered after 96 hours of culture, and even at the highest dose of antibody (100 $\mu$ g/mL) (figure 5A). Addition of 100 ng/mL murine endocan, together with GGR222 in HT-29 cell culture did not modify the HT-29 cell viability (Figure 5B).

In the next step, we wonder if anti-murine endocan antibody may influence HT-29 cell proliferation. Addition of the anti-endocan antibodies in concentration between 25 and 100  $\mu$ g/mL did not slow BrdU incorporation by HT-29 cells in culture as did mitomycin at 50 $\mu$ g/mL (Figure 5C). Further addition of endocan did not modify the levels of BrdU incorporation (Figure 5D).

In a third step, we examined if anti-endocan antibody could mediate antibody-dependent cell cytotoxicity. Co-incubation of various ratios of effector (mouse splenocytes) and target cells (HT-29) (i.e.: 5:1 to 100:1) with 100  $\mu$ g/mL of murine endocan resulted in no supplemental LDH release from HT-29 cells than that induced by effector cells (Figure 3 E).

As mouse serum contains significant amounts of LDH, we evaluated complement dependent cytotoxicity by a flow cytometry-based cytotoxicity assay (22) which confirmed the absence of cytotoxic effect of the anti-endocan antibody (figure 3F).

Taken together, these results were consistent with no direct inhibition of HT-29 cell growth by anti-endocan antibody GGR222 even complexed with endocan and suggest other more indirect pathways.

*Anti-murine antibody GGR222 induces stromal inflammatory reaction*

To explain the anti-tumor effect of the anti-endocan antibody, we explored a possible indirect mechanism resulting after depriving endocan from the tumor environment. One important observation was that compared to tumors from control mice (figure 4A), tumors from GGR222 antibody-treated mice (figure 4B) had a higher stromal surface (25.2  $\pm$  15.8% versus 9.4  $\pm$  2.7%, in mice receiving PBS, p =0.05).

In this antibody-induced tumor stroma, the number of tumor infiltrating leukocytes (TIL) (evaluated by CD45 staining) was higher in antibody treated animals, especially at the tumor periphery (figures 4 C, 4D). Hematoxylin - eosin examination of TIL showed similar numbers of polymorphonuclear, monocytoïd, and lymphoïd cell types.

Thus, treatment with GGR222 anti-endocan antibody results in a slower tumor growth with a lower tumor weight which is associated of lower rates of tumor cell division, a higher frequency of apoptosis, and an important number of tumor infiltrating leukocytes.

*Anti-endocan antibodies increase leukocyte rolling and adhesion*

Since we observed in our model that treatment of tumor-bearing mice with anti-endocan antibodies are associated with an increase in leukocytes infiltration into the tumor we wonder in this was a direct effect of the anti-endocan antibodies. We therefore used a rat model of isolated mesenteric vessel which allows directly observing and quantifying leukocytes attachment to the vascular endothelium. In animals which received 4 mg of the GGR222 antibody the number of rolling (9,7  $\pm$  4.9 leucocytes/minute) and adherent leukocytes (44  $\pm$  8,3 leucocytes/) was much higher compared to control animals (2,5  $\pm$  0,5 rolling leucocytes/min and 3  $\pm$  1 adherent leucocytes). This effect was present for doses of antibody as low as 0,5 mg /animal (2 mg/kg).

Thus administration of an anti-endocan antibody induced a marked increase in the number of rolling adherent leucocytes to vascular endothelium which explains why this antibody induced an increase in intratumoral leukocyte number.

*Effect of anti-endocan antibody GGR222 is dependent on tumor infiltrating immune cells*

As tumor growth retardation was associated with a higher number of infiltrating leukocytes we therefore investigated if these cells are involved in slowing tumor growth. Our model used SCID mice which have a severe combined immunodeficiency lacking adaptative immune responses. We therefore targeted the innate immune response, especially the NK cells, which remains intact in these animals.

Therefore, in a separate experiment we treated the animals with 100  $\mu$ l/animal/week of Asialo GM1 intra-peritoneally prior to tumor cell and anti-endocan monoclonal antibody inoculation. Controls included a group of anti-Asialo GM1 treated animals and another one which received the anti-endocan monoclonal antibody GGR237 which proved ineffective in prior experiments to reduce tumor growth and which have the same isotype (IgG2a,k) as the GGR222 antibody.

In animals treated with anti-Asialo GM1, the anti-endocan GGR222 antibody has no effect on tumor growth. Indeed these animals exhibit tumor volumes similar with control animals which received either only anti-Asialo GM1 or the GGR237 antibody. Microscopical examination of these tumors does not show any more the high stromal surface and the leukocytes infiltration into the tumor (to be confirmed, on going investigation). In animals which received only the anti-endocan antibody we observed again a slower tumor growth (figure 2C) and in this group a higher stromal area was again observed.

Thus, suppression of NK cells and in a lesser extend monocytes resulted in the lost of anti-tumor activity of the GGR222 antibody.

## Discussion

Endocan is a newly identified proteoglycan which has a restricted expression to the endothelium (7, 23). The physiological role of the protein is not currently known but endocan overexpression has been identified in multiple tumoral localizations as kidney (11, 24, 25) breast (12), lung cancer (13) and even in highly invasive melanoma cell line which show vascular mimicry (14). Moreover endocan mRNA expression is part of a bad prognostic gene cluster which predict shorter survival (13) or rapid metastasis (12).

We have recently shown that both intra- and peri- tumoral vessels of human non small cell lung cancer tissues overexpressed endocan (15, 20). Here, we show for the first time that murine endocan is also overexpressed by the murine endothelium in HT-29 human tumor cell xenografts. In both human and mouse tumors, overexpression of endocan by tumor vessels occurred at both mRNA and protein levels. In contrast to human, the alternatively spliced exon 2-deleted mRNA product is lacking in mouse, despite a similar organization between human and mouse endocan genes. Thus, tumor vasculatures from both human and experimental solid tumors exhibit increased expression of endocan.

Serum levels of endocan are increased in patients with NSCLC and correlate with survival (15). In mice with experimental tumors, we used an endocan-specific mouse/rat ELISA and found that serum levels from xenografted mice exhibit a slightly increase in serum endocan compared with normal mice.

One important question is what is the role of endocan in tumor growth. Endocan ability to sustain tumorigenesis (8) is not linked to angiogenic properties. Although endocan is increased during *in vitro* angiogenesis, antisense treatment does not result in angiogenesis inhibition suggesting that endocan is more a consequence of angiogenic stimulation (10). Thus, other pathways are involved in endocan's tumor growth sustaining properties.



A first mechanism was suggested on the basis that the glycan moiety from endocan modulates the mitogenic activity of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) (9). This has led us to speculate that it can play a role as a paracrine factor in cell proliferation. Indeed, we have shown that endocan promotes tumor formation from non tumorigenic 293 cell line and accelerates growth of HT-29 tumor xenografts, a feature associated with high a vascular density and mitotic index (8). However, the *in vivo* results also revealed that growth promoting activity is also dependent on endocan's protein core, which did not affect directly either endothelial or tumor cells (8).

A second mechanism is here suggested, that links endocan to the tumor infiltrating leukocytes (TIL). Treatment of mice bearing tumor xenografts by anti-endocan antibody induced stromal modifications, in particular the presence of an important infiltration of leukocytes. These TIL are implicated in tumor growth arrest since NK and monocyte depletion results in abolition of the anti-tumor effect of anti-endocan antibodies. We therefore speculate that endocan is an important player in supporting tumor growth not only by amplifying the effect of pro-tumoral growth factors (9) but also by inhibiting effective immune cell migration into the tumor (26). Despite being immunogenic, tumors escape from host immunity in order to keep growing (27) but mechanisms involved are not completely understood. Here we show that endocan could have a role as a “checkpoint” in controlling leukocyte migration into the neoplastic tissue and therefore reduce contact between immune cells and their targets.

Another important point to discuss is the mechanism by which anti-endocan mAbs act. Previous data suggest that antibodies directed against Her2/neu, a receptor for epithelial growth factor, act not only by blocking the receptor but mainly by mediating cellular cytotoxicity (28). We show here that an anti-endocan antibody does mediate neither antibody-dependent cellular cytotoxicity nor

complement-dependent cell cytotoxicity, at least *in vitro*. Moreover this antibody does not influence nor the cell viability after 4 days of *in vitro* culture neither the HT-29 cells proliferation. The absence of a direct effect is also sustained by the fact that we demonstrated that tumor growth reduction properties of anti-endocan antibodies are related to their capacity to clear endocan from circulation. Therefore two mechanisms could be suggested : either a tissue and tumor deprivation of growth factors resulting from inhibiting endocan, or a facilitation of immune cell recruitment into the tumor as observed in our *in vivo* model.

The first mechanism is supported by the fact that in anti-endocan antibody-treated animals we found a lower number of mitoses and a higher number of apoptoses suggesting that anti-endocan treatment results in tumor growth factor deprivation which is concordant with the comitogenic activity demonstrated for the glycanic part of the molecule. Convergenly, blood levels from antibody-treated mice exhibited 5 to 10 fold increase of endocan, all complexed with the antibody. This was not due to the tumor itself or endothelial cell secreted mediators since a similar increase was observed in naïve SCID who received the same antibody. Moreover, the increase within an hour after purified monoclonal antibody injection was consistent with the presence of a pool of endocan stored in the tissue compartment. This result suggests that an anti-endocan antibody could mobilize endocan from tissue to systemic compartments, reducing then the tissue level of active endocan.

The second mechanism is supported by the high degree of leukocyte infiltration into the experimental tumors from antibody-treated animals. We previously showed *in vitro* that endocan can interact with LFA-1 and thus interfere with LFA-1/ICAM-1 interaction, a major mechanism involved in firm adhesion of leukocytes at the endothelial level. By preventing endocan binding to LFA-1 anti-endocan antibodies could therefore prevent LFA-1/ICAM-1 interactions and thus promote firm adhesion

of leukocytes to endothelium and consequently leukocytes infiltration into tumor tissues. The same mechanism could be involved in modulating leukocyte-tumor cell contact as LFA1/ICAM1 interactions are involved tumor cell lysis by competent immune cells (29). Thus endocan inhibition recruits leukocytes that could interact more easily with tumor cell and promote anti-tumoral immunity which is involved in tumor growth restriction in our case.

In conclusion we show here that monoclonal antibodies directed against murine endocan slow the tumor growth thus proving that endothelial secreted endocan is actively involved in sustaining tumor growth. Slower growth was associated a higher number of apoptoses and a higher number of infiltrating leukocytes suggesting that antibody anti-endocan treatment results in tumor growth factor deprivation and facilitates immune cell recruitment into tissues.

## References

1. Folkman J, Kalluri R Tumor Angiogenesis. In: DW Kufe, E Pollock, R Weichselbaum, RJ Bast, T Gansler, J Holland, E Frei III (eds.), *Cancer Medicine*, 6th ed edition. Hamilton (Canada): BC Decker Inc., 2003.
2. Folkman J. Angiogenesis and apoptosis. *Semin Cancer Biol* 2003;13:159-67.
3. Udagawa T, Fernandez A, Achilles EG, Folkman J, D'Amato RJ. Persistence of microscopic human cancers in mice: alterations in the angiogenic balance accompanies loss of tumor dormancy. *Faseb J* 2002;16:1361-70.
4. Carson-Walter EB, Watkins DN, Nanda A, et al. Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. *Cancer Res* 2001;61:6649-55.
5. Kerbel RS. Inhibition of tumor angiogenesis as a strategy to circumvent acquired resistance to anti-cancer therapeutic agents. *Bioessays* 1991;13:31-6.
6. Boehm T, Folkman J, Browder T, O'Reilly MS. Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature* 1997;390:404-7.
7. Lassalle P, Molet S, Janin A, et al. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem* 1996;271:20458-64.
8. Scherpereel A, Gentina T, Grigoriu B, et al. Overexpression of endocan induces tumor formation. *Cancer Res* 2003;63:6084-9.
9. Bechard D, Gentina T, Delehedde M, et al. Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J Biol Chem* 2001;276:48341-9.
10. Aitkenhead M, Wang SJ, Nakatsu MN, et al. Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. *Microvasc Res* 2002;63:159-71.
11. Lenburg ME, Liou LS, Gerry NP, et al. Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer* 2003;3:31.
12. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-6.
13. Boreczuk AC, Shah L, Pearson GD, et al. Molecular signatures in biopsy specimens of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:167-74.
14. Seftor EA, Meltzer PS, Schatteman GC, et al. Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;44:17-27.
15. Grigoriu B, Depontieu F, Scherpereel A, et al. Endocan Expression And Relationship With Survival In Human Non Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* 2006;in press.
16. Bechard D, Meignin V, Scherpereel A, et al. Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J Vasc Res* 2000;37:417-25.
17. Fischer K, Mackensen A. The flow cytometric PKH-26 assay for the determination of T-cell mediated cytotoxic activity. *Methods* 2003;31:135-42.
18. Louhimies S. Directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. *Altern Lab Anim* 2002;30 Suppl 2:217-9.
19. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992;119:493-501.
20. Depontieu F, Grigoriu B, Scherpereel A, et al. Exon 2 of the endocan gene contributes to tumorigenesis and its expression is increased in human lung tumor vascular cells. Submitted.

21. Spiridon CI, Guinn S, Vitetta ES. A Comparison of the in Vitro and in Vivo Activities of IgG and F(ab')<sub>2</sub> Fragments of a Mixture of Three Monoclonal Anti-Her-2 Antibodies. *Clin Cancer Res* 2004;10:3542-51.
22. Flieger D, Gruber R, Schlimok G, et al. A novel non-radioactive cellular cytotoxicity test based on the differential assessment of living and killed target and effector cells. *J Immunol Methods* 1995;180:1-13.
23. Ho M, Yang E, Matcuk G, et al. Identification of endothelial cell genes by combined database mining and microarray analysis. *Physiol Genomics* 2003;13:249-62.
24. Amatschek S, Koenig U, Auer H, et al. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res* 2004;64:844-56.
25. Weinschenk T, Gouttefangeas C, Schirle M, et al. Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res* 2002;62:5818-27.
26. Bechara D, Scherpereel A, Hammad H, et al. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 2001;167:3099-106.
27. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 2002;3:991-8.
28. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 2000;6:443-6.
29. Hildreth JE, Gotch FM, Hildreth PD, McMichael AJ. A human lymphocyte-associated antigen involved in cell-mediated lympholysis. *Eur J Immunol* 1983;13:202-8.

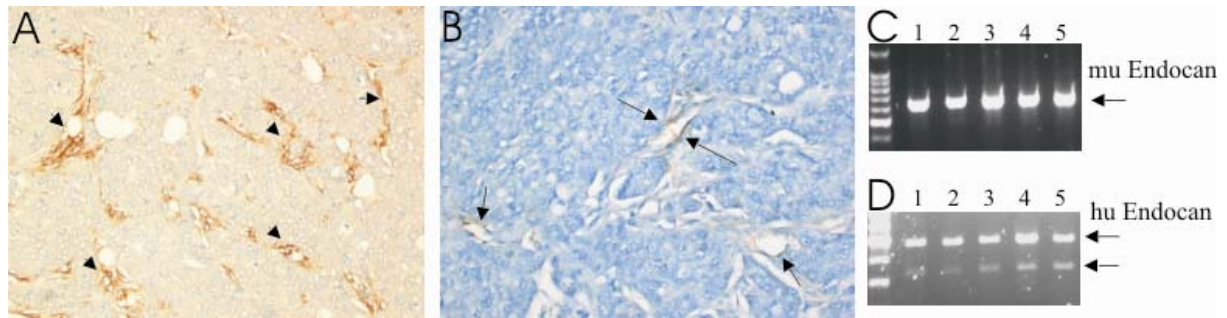


Figure 1. Endocan expression in HT29 subcutaneous xenografts in SCID mice. **A.** Immunostaining using an rabbit polyclonal anti-endocan antibody; Strong signal in the vascular and perivascular area (arrowhead). **B.** Immunostaining with an anti-endocan monoclonal antibody; specific staining in the tumor endothelium. **C.** Murine endocan RT – PCR product which show a single band corresponding to the full length endocan mRNA, while in humans (panel **D**) an alternatively spliced form is present.

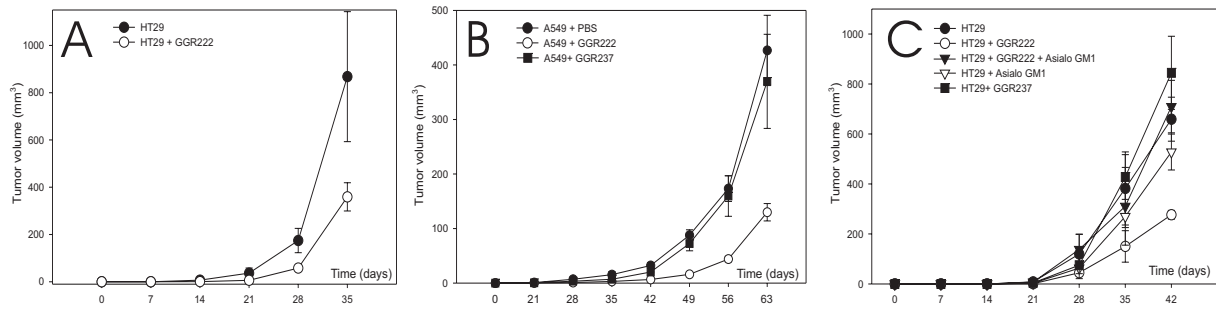


Figure 2. Growth of subcutaneous xenografts in SCID mice after anti endocan antibody injection. **A.** In HT29 Xenografts antibody treated animals ( $\circ$ ) received  $400\mu\text{g}$  of GGR222 anti-endocan weekly starting at inoculation (Day 0). Control animals ( $\bullet$ ) received only the vehicle (PBS); A slower growth is observed in antibody treated animals; 8 mice per group, pooled data from 2 separate experiments **B.** Similar results obtained in A549 xenografts with a slower growth in antibody treated animals ( $\circ$ ) which received  $400\mu\text{g}$  of GGR222 anti-endocan weekly starting at inoculation (Day 0); control animals received either the vehicle( $\bullet$ ) (PBS) or another anti-endocan antibody GGR237 ( $\blacksquare$ ), 4 mice per group. **C.** The effect of the anti endocan GGR222 antibody is dependent on NK cells. Anti endocan GGR222 antibody treated animals ( $\circ$ ) ( $400\mu\text{g}$  weekly) had a slower growth than control groups ( PBS -  $\bullet$  or GGR237 -  $\blacksquare$ ). This growth suppression effect disappears after NK cell depletion with an antiasialo-GM1 antibody. Four mice in each group.

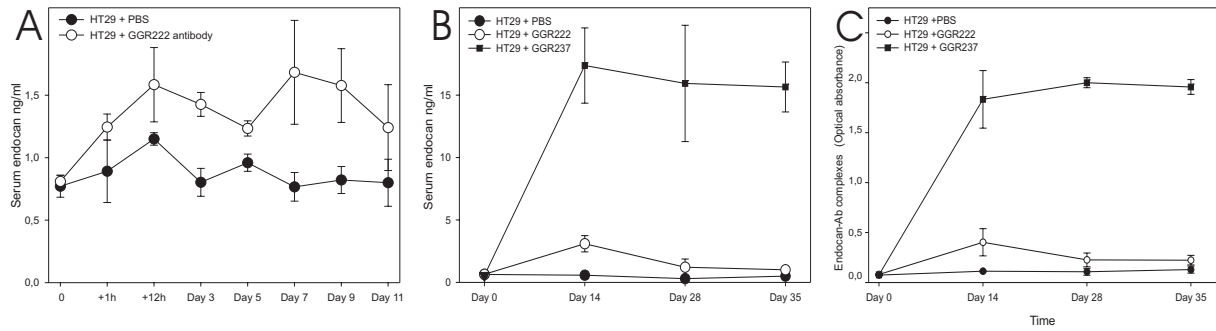


Figure 3 Endocan serum values in SCID mice. **A.** After injection of an the GGR222 anti-endocan antibody we observed an increase in serum endocan values. **B** Serum endocan levels in tumor-bearing mice receiving either PBS, or the GGR222 and GGR237 antiendocan antibodies. We observe an important increase in circulating endocan in GGR237 treated mice and a much little increase in GGR222 treated animals. **C.** Assaying of endocan-anti-endocan immune complexes in mice sera. We observed in increased concentration of immune complexes in GGR237 treated animals consequent with the hypothesis that GGR237 antibodies are not able to efficiently clear endocan from circulation.

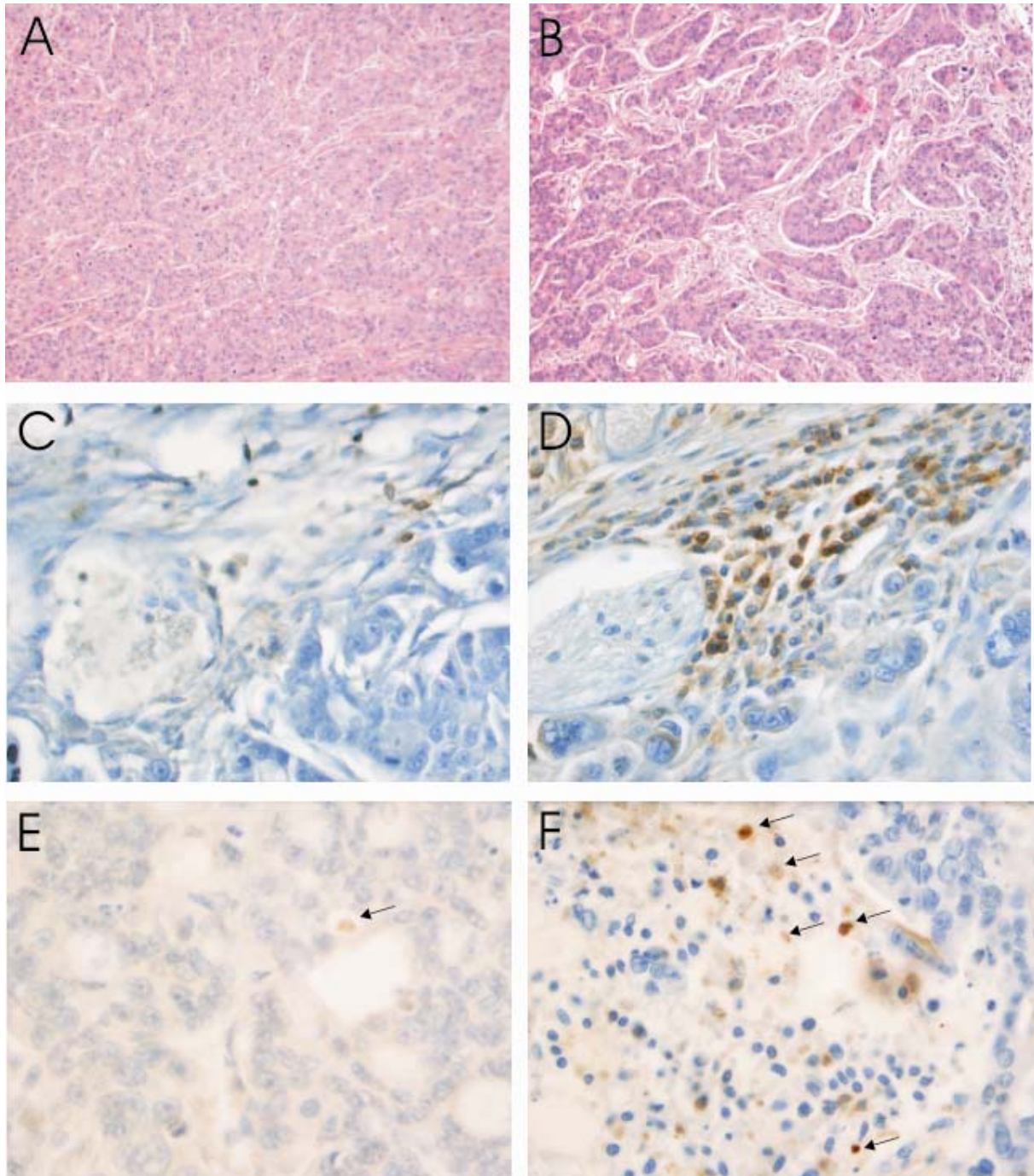


Figure 4. Microscopic appearance of HT29 subcutaneous tumors. HT 29 tumors from mice receiving vehicle only (PBS) have a less abundant stroma (A), a less infiltrating leucocytes (C) and lower number of apoptoses per microscopic field (E) compared with GGR222 treated animals which have a very abundant stromal surface (B), high numbers of infiltrating leucocytes and very frequent apoptoses (F)

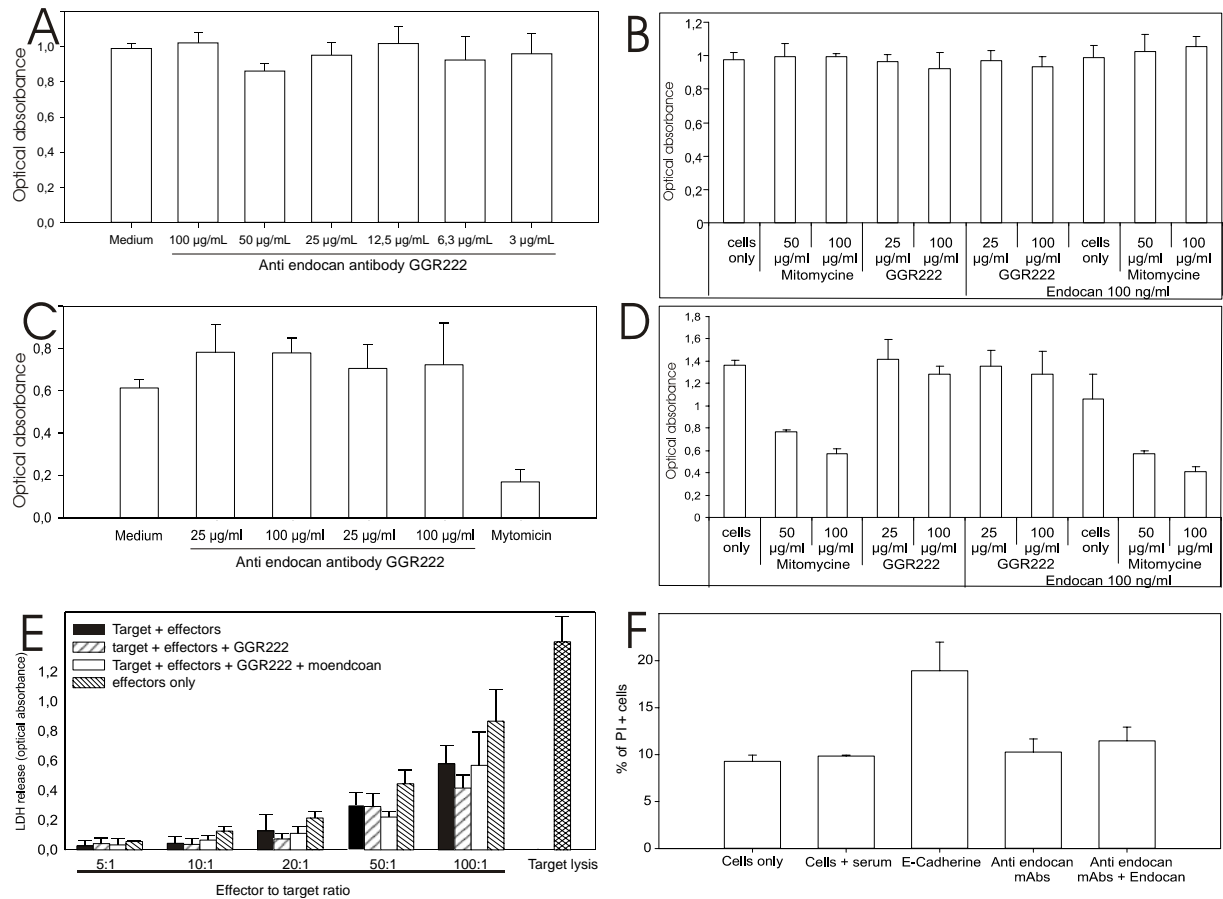


Figure 5 Anti endocan antibodies do not influence HT-29 cell line viability at different concentrations either in absence (A) or in the presence of endocan (B). Similarly, no effect was observed on HT-29 proliferation assayed by BrdU incorporation (C and D). The GGR222 antibodies do not mediate neither antibody dependent cellular cytotoxicity evaluated by LDH release (E) nor complement dependent cellular cytotoxicity evaluated by direct flow cytometric count of dead cells (F)



# **RESULTATS NON PUBLIES**

**Role de l'expression d'endocan et de ses différents mutants sur la  
croissance tumorale**

Bogdan Dragos GRIGORIU

# **OBJECTIFS**

Nous nous sommes proposés d'étudier l'action d'endocan sur la croissance tumorale en utilisant un modèle de xénogreffe tumorale sous cutanée chez la souris SCID.

La lignée choisie est la lignée HT29, provenant d'un carcinome colique humain différencié. Le choix de cette lignée tumorale (par rapport aux expériences précédentes menées avec HEK 293) avec une tumorigénicité plus importante, nous permet d'argumenter sur la non dépendance vis-à-vis d'un type de cellule cancéreuse et sur l'action d'endocan sur une lignée cellulaire spontanément tumorigène.

Les objectifs sont les suivants:

- Confirmer l'action de promotion de la croissance tumorale de la forme native (sauvage) d'endocan suggérée par les données du modèle HEK 293
- Etudier l'action de la forme non glycosylée d'endocan sur la croissance tumorale
- Etudier en histologie classique les modifications de structure tumorale induites par les différentes formes d'endocan
- Etudier le rôle fonctionnel de la région riche en phénylalanine. Nous avons choisi une stratégie utilisant la mutagenèse dirigée.

# **MATERIEL ET METHODES**

## **A. Lignées cellulaires**

La lignée cellulaire utilisée est HT29 (référence ATCC HTB38), dérivée d'un adénocarcinome colique humain différencié. Cette lignée tumorale est spontanément tumorigène chez la souris SCID après injection sous cutanée. La lignée HT29 native ainsi que les clones obtenus après transfection avec différentes formes d'endocan ont été cultivés en milieu DMEM (Dubelco's Modified Eagle's Medium) (Invitrogen Gibco ref. 318856023) supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal (SVF), 1% de glutamine et de la Ticarcilline (0,2 mg/ml). Les cellules sont cultivées jusqu'à confluence puis décollées par de la Trypsine-EDTA 1X (0,5g/l) (Invitrogen Gibco ref 354006019). Ensuite elles sont lavées dans le milieu de culture et comptées sur chambre de Thoma avant d'être utilisées dans les différentes expériences.

## **B. Vecteurs, mutagenèse et transfection**

Les cellules HT29 sont transfectées par l'ADNc d'endocan ou de ses formes mutées. Le vecteur utilisé pour la transfection est un vecteur eucaryote, le pcDNA3. Les mutations sont réalisées par PCR en utilisant le kit QuickChange Site directed mutagenesis Kit (Stratagene ref 200514) puis confirmées par séquençage. La transfection est ensuite réalisée en utilisant la lipofectamine (Invitrogen ref. 11668-027), suivie d'une sélection par G418 (100-400 µg/ml) et d'un clonage par dilution limite. La production d'endocan de chaque clone est vérifiée par un test ELISA mis au point au laboratoire [1]. Ce travail de production et sélection des clones cellulaires a été réalisé en grande partie avant le début du DEA par Gwénola Kervoaze.

## **C. Tests de prolifération *in vitro***

Pour chaque clone HT29 utilisé 10.000 cellules sont déposées en triplets dans une plaque 96 puits (Falcon ref 35-3072 Becton Dickinson) dans du milieu DMEM supplémenté en SVF à différentes concentrations selon les expériences et dans certains cas des facteurs de croissance. Après 72 heures, on ajoute 0,4µCi de thymidine tritiée par puits (Amersham Biosciences ref TRK 565). La lecture se fait après 16h d'incubation sur compteur à scintillation (TopCount Microplate Scintillation Counter, Packard Instrument Co), programme 3H 15s. Pour le test de viabilité cellulaire, l'évaluation se fait au 5<sup>ème</sup> jour par incubation 6 heures avec du 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrazolium bromide (MTT) à 5 mg/ml vol /puits suivie d'une lyse cellulaire et lecture sur spectrophotomètre à  $\lambda=570$ .

## **D. Animaux et biopsies**

Nous avons utilisé des souris portant un déficit immunitaire combiné sévère (souris SCID) de type CB17 scid/scid H2d, obtenues de l'élevage de l'Institut Pasteur de Lille. Ces souris manquent totalement de cellules B et T et sont incapables de générer une réponse immune spécifique à la suite de la mutation d'un gène codant pour une recombinaison responsable du réarrangement nécessaire à la production de toutes les immunoglobulines et des récepteurs des cellules T. Les souris utilisées sont des mâles âgés de 5 à 6 semaines. Les animaux sont hébergés dans un environnement aseptique sous flux laminaire pendant toute la durée de l'expérience. Etant donné que la lignée HT29 est spontanément tumorigène chez cette souche de souris nous n'avons pas utilisé d'anticorps visant à éliminer les cellules NK avant la greffe tumorale (anti asialo-GM1 ou TM  $\beta$ 1). Après une période de quarantaine de 7 jours les souris ont reçu une injection sous cutanée de 250.000 cellules tumorales en inter scapulaire dorsal. Quatre souris par clone tumoral ont été utilisées. Une surveillance hebdomadaire est faite chez toutes les souris avec mesure des dimensions tumorales (2

mesures orthogonales) et une prise de sang. Les souris sont sacrifiées quand le volume tumoral estimé était supérieur à  $1 \text{ cm}^3$ , calculé par la formule  $V=D \times d^2/2$  ( $D$ =le plus grand diamètre  $d$ =le plus petit diamètre). Une autopsie a été pratiquée chez toutes les souris avec examen macroscopique des organes thoraco-abdominaux. Les tumeurs sont fixées dans de l'A.F.A (Carlo Erba ref 526263) pendant 2 heures puis conservées dans du PBS à  $4^\circ$ . Après inclusion en paraffine des sections fines de  $5\mu\text{m}$  sont déposées sur lame et colorées avec Hématoxyline-Eosine (HE) ou analysées par immunohistochimie. Les anticorps utilisés pour l'immunohistochimie sont des Ac polyclonaux de lapin anti endocan humain et murin développés au laboratoire. La révélation est faite par un anticorps marqué à la peroxydase. Il n'y a pas eu de blocage des peroxydases endogènes avant la révélation.

## **E. Contrôle des clones injectés**

### *Extraction ARN*

Un prélèvement de tumeur fraîche a été conservé dans du TRIzol reagent (Invitrogen ref. 15596-018) puis l'ARN total est extrait selon les indications du fabricant. Brièvement, le chloroforme est mélangé au TRIzol ( $200\mu\text{l}/\text{ml}$  de TRIzol) puis on centrifuge à  $12000g$   $15 \text{ min}$  à  $4^\circ\text{C}$  pour séparer les différents constituants. La phase aqueuse contenant les ARN totaux est récupérée et précipitée par de l'isopropanol. Après centrifugation ( $12000g$ ,  $10 \text{ min}$  à  $4^\circ\text{C}$ ) et lavage à l'éthanol  $75\%$ , le culot, séché, est resuspendu dans de l'eau. L'ARN est dosé par spectrophotométrie à  $\lambda=260\text{nm}$  et exprimé en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . La pureté est donnée par le ratio  $DO_{260}/DO_{280}$  qui doit être supérieur à  $1,6$ .

### *Reverse transcription*

Un volume équivalent à  $1\mu\text{g}$  d'ARN total est utilisé pour la reverse transcription (RT). L'étape d'hybridation se fait dans un volume de  $20\mu\text{l}$  avec les oligo-dT ( $0,1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) et la RNasin ( $4 \text{ U}/\mu\text{l}$ , Inhibiteur des Ribonucléases, Promega). Le mélange est incubé  $5 \text{ min}$  à  $70^\circ\text{C}$  puis  $5 \text{ min}$  à  $4^\circ\text{C}$ . L'étape d'élongation se fait en ajoutant le tampon  $5X$  (Tris-HCl, KCl,  $\text{MgCl}_2$ ), les dNTP ( $2\text{mM}$ , PCR Grade, Invitrogen life technologies), la RNasin ( $4\text{U}/\mu\text{l}$ ), le DTT ( $4\text{mM}$ ) et la M-MLV RT ( $200\text{U}/\mu\text{l}$ , Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, GIBCO BRL). La solution est de nouveau incubée  $1 \text{ heure}$  à  $42^\circ\text{C}$  puis  $5 \text{ min}$  à  $95^\circ\text{C}$  dans le thermocycleur. L'ADNc est précipité à l'acétate de sodium ( $300\text{mM}$ ) et à l'isopropanol. Le mélange est incubé  $15\text{min}$  à  $-70^\circ$ . Après centrifugation à  $12000g$ , le surnageant est éliminé et le culot lavé à l'éthanol  $75\%$ . Le culot, séché, est resuspendu dans  $50\mu\text{l}$  d'eau.

Tableau I Amorces utilisées et conditions de réalisations de la PCR

GENE	AMORCES	MgCl <sub>2</sub> (mM)	T (°C)	Nb cycles	Taille produit (pb)
GAPDH (Genset)	<b>Sens</b> : 5'-GTC TTC ACC ACC ATG GAG A-3' <b>Anti-sens</b> : 5'-CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC-3'	1	55	25	300
Endocan humain	<b>Sens</b> : 5'-TGC CCT CAA CAC TGT GAC AGC -3' <b>Anti-sens</b> : 5'-TCT CCA GAT GCC ATG TCA TGC-3'	1	55	27	400

### La PCR

L'échantillon d'ADNc est dilué 1 : 10 (v : v) soit 1µl dans 9µl d'eau pour la première PCR en utilisant des primers pour le gène GAPDH (Glycéraldéhyde Phosphate déshydrogénase, gène de référence, Genset) – gène de ménage utilisé comme contrôle de la qualité de la retrotranscription.

Le mélange est constitué de tampon 10X (Tris-HCl, KCl), des dNTP (0,2mM), du MgCl<sub>2</sub> (1 ou 1,5mM), les amorces du gène à amplifier (0,5µM), puis de l'enzyme Platinum Taq DNA polymérase (0,04U/µl, Invitrogen life technologies). Le mélange est complété avec de l'eau pour obtenir un volume final de 15µl. Les 10µl d'échantillon sont mélangés aux 15 µl du mix ci dessus puis placés dans un thermocycleur. La dénaturation de l'ADNc (2min à 94°C) est suivie d'un nombre variable de cycles de polymérisation en chaîne: hybridation (1min à température variable selon les amorces), élongation (1min à 72°C), dénaturation (1 min à 94°C). Après l'amplification, les ADNc obtenus sont déposés sur un gel d'agarose 1,5% avec du gelstar (5 µl pour 50ml, FMCbioproduct), agent intercalant permettant de le rendre visible sous lumière UV. La migration se fait sous l'influence d'un courant électrique.

La visualisation des ADNc amplifiés se fait sous UV. L'acquisition de l'image est faite grâce à un logiciel muni d'une caméra.

### Clonage

Le produit de PCR est cloné puis envoyé pour séquençage afin de vérifier le clone tumoral injecté. Nous avons utilisé le kit TOPO XL PCR Cloning avec un vecteur pCR XL-TOPO cloné ensuite dans des bactéries TOP 10 chimiquement compétentes selon les indications du constructeur (Invitrogen ref K4750-10).

# RESULTATS

## F. Caractérisation des clones utilisés

Dans un premier temps nous avons évalué la production des différentes formes d'endocan par les clones cellulaires afin d'éviter d'éventuelles variations de croissance tumorale due à une production différente d'endocan. L'évaluation de la production journalière d'endocan a été réalisée en tenant compte du nombre moyen de cellules et du temps d'incubation. Les résultats, exprimés en ng/24h/10<sup>6</sup> cellules montrent un taux de sécrétion moyen de 31,7±14 ng/ml - médiane 29,8 (12,7-59,3) variant peu selon les clones - tableau II.

## G. Prolifération *in vitro*

Dans un second temps nous avons étudié les éventuelles différences de réponse proliférative entre chaque clone. Des tests de prolifération *in vitro* par incorporation de thymidine tritiée ou par MTT ont été réalisés avec les clones cellulaires utilisés ultérieurement *in vivo*. Nous nous sommes intéressés à l'influence de la quantité de sérum de veau fœtal (SVF) dans le milieu de culture et de certains facteurs de croissance sur la prolifération cellulaire.

### 1. Profil de croissance des différents clones en fonction du SVF

Un test de prolifération par incorporation de thymidine tritiée a comparé les 10 clones tumoraux suivants : HT 29, HT29 – BL10 (2 clones), HT29 – BL11 (2 clones), HT 29 – BL15 (2 clones), HT29 – BL16 (2 clones), HT29 – BL17 (1 clone). Les résultats (figure 1) montrent

Tableau II. - Production d'endocan par les différents clones cellulaires utilisés

	<i>Endocan (ng/24h/10<sup>6</sup> cell)</i>	
	<i>Moyenne</i>	<i>SD</i>
HT29 BL10-1	20,1	13,9
HT29 BL10-3	22,0	12,3
HT29 BL10-5	16,2	7,9
HT29 BL11-1	28,5	11,1
HT29 BL11-2	51,4	17,6
HT29 BL11-3	16,8	5,5
HT29 BL11-5	31,1	8,2
HT29 BL15-10	12,7	4,6
HT29 BL15-2	43,7	21,1
HT29 BL15-8	25,7	10,1
HT29 BL16-1	43,5	18,53
HT29 BL16-18	35,2	5,5
HT29 BL17-18	59,3	25,1
HT29 BL17-24	38,5	10,6

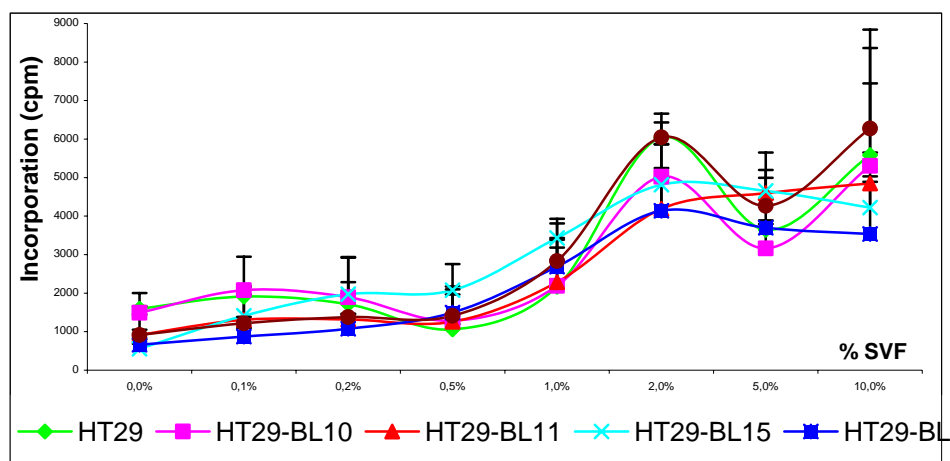
un profil de prolifération similaire entre les différents clones utilisés. L'incorporation de thymidine dépend de la concentration de SVF dans le milieu de culture avec un effet dose réponse entre 0,5 % et 2% de SVF. Les concentrations de SVF inférieures à 0,5% paraissent insuffisantes pour soutenir la croissance cellulaire et les concentrations de plus de 2% ne génèrent pas de prolifération plus importante. Si on compare le profil de croissance des différents clones entre eux (données non illustrées), on ne retrouve pas de différences significatives.

### 2. Effets des facteurs de croissance sur la prolifération cellulaire

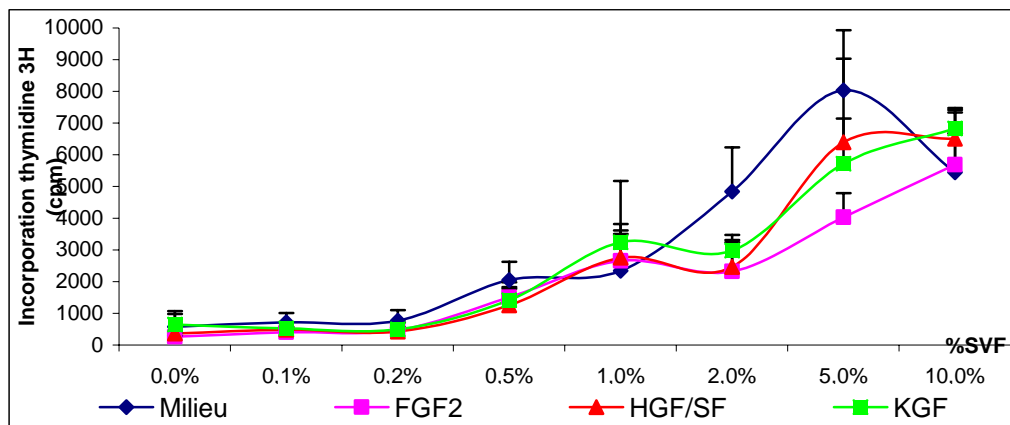
Un test de viabilité cellulaire mesurée par réduction du 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphényltetrazolium bromide (MTT) (4mg/ml, 25 µl/puits - données non illustrées) et un test de prolifération par incorporation de thymidine tritié ont été réalisés sur la lignée HT29 en présence de facteurs de croissance (HGF/SF 50 ng/ml, FGF2 5 ng/ml, KGF 5 ng/ml) figure 2. Les résultats ne montrent pas de différences statistiquement significatives entre les différents facteurs de croissance sur la lignée HT29 tant en viabilité cellulaire qu'en prolifération.

### 3. Effets d'endocan sur la prolifération induite par les facteurs de croissance

Un test d'incorporation de thymidine tritié en présence de 1% SVF et de FGF2 ou HGF/SF a été réalisé pour tous clones cellulaires utilisés. Les facteurs de croissance sont ajoutés après 12h de culture pour une concentration finale de 50 ng/ml HGF/SF et 5 ng/ml FGF2. Les résultats ne montrent pas d'effet significatif des facteurs de croissance testées sur la prolifération cellulaire - figure 3. On ne retrouve pas de variations significatives quelque soient les molécules recombinantes produites ou les facteurs de croissance ajoutés.



**Figure 1 : Test de prolifération par incorporation de thymidine tritiée** ; résultats représentatifs de deux expériences consécutives; les valeurs représentent la moyenne du nombre de coups/minute sur trois puits pour chaque clone cellulaire HT 29, HT29 – BL10 (2 clones), HT29 – BL11 (2 clones), HT 29 – BL15 (2 clones), HT29 – BL16 (2 clones), HT29 – BL17 (1 clone) ; les barres verticales représentent les déviations standard



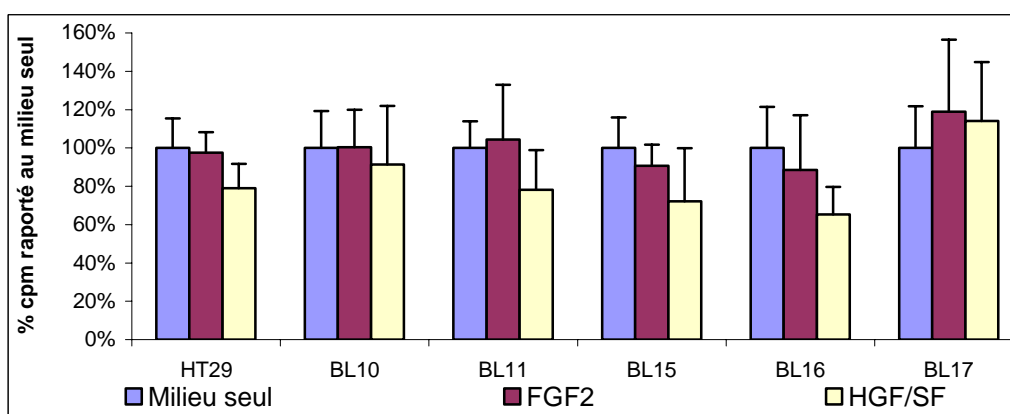
**Figure 2 : Effets des facteurs de croissance sur la prolifération de la lignée HT29 ;** Incorporation de thymidine tritiée ; les moyennes de trois déterminations, les barres verticales la déviation standard.

## H. Croissance des tumeurs *in vivo*

Dans un troisième temps nous avons étudié *in vivo* la tumorigénicité et le profil de croissance des clones exprimant différentes formes d'endocan. Les cellules HT 29 parentales ainsi que celles transfectées avec endocan ou ses différents mutants ont été injectées en sous-cutané chez la souris SCID.

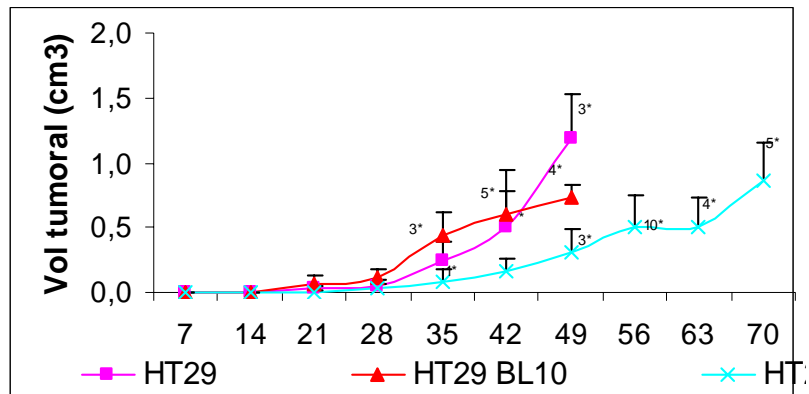
### 1. Croissance tumorale des tumeurs exprimant endocan sauvage et non glycosylé

Les courbes de croissance montrent que les tumeurs HT29-BL10 ont une croissance plus rapide et les souris doivent être sacrifiées plus rapidement que dans le groupe HT29 (figure 4). L'effet est retrouvé chez tous les clones testés (n=4). Par contre la cinétique de croissance des clones HT29-BL11 est plus lente. Cet effet est aussi retrouvé quelque soit le clone testé (n=4). L'effet est donc indépendant du lieu d'insertion des constructions utilisées.



**Figure 3 Effet du FGF2 et du HGF/SF sur la prolifération *in vitro*.** Les résultats sont en pourcentage du nombre de coups rapporté au milieu seul avec 1% de SVF ; triples déterminations lors de la même expérience. Les barres verticales représentent la déviation standard ; FGF2 = 5 ng/ml ; HGF/SF = 50ng/ml





**Figure 4** Courbes de croissance tumorale pour les tumeurs HT29, HT29-BL10 et HT29-BL11; moyennes des volumes tumoraux chez 4 souris pour HT29, 16 souris pour HT29 BL10 (4 clones x 4 souris/clone) et 23 souris pour HT29 BL11 (5 groupes de 4 souris, 4 clones différents, 1 souris décède lors de la prise de sang a J21). Les barres verticales représentent la déviation standard. \*= le nombre de décès chaque semaine.

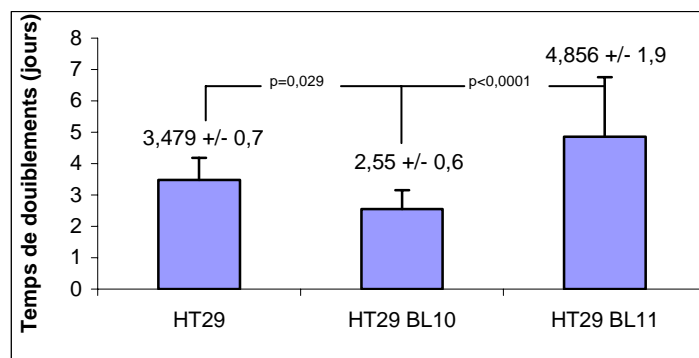
En s'appuyant sur un modèle de croissance exponentielle pour ces trois tumeurs, hypothèse réaliste étant donné leur volume encore réduit [2, 3], le temps de doublement du volume tumoral est de  $3,48 \pm 0,7$  jours pour les tumeurs HT 29,  $2,55 \pm 0,6$  jours pour les tumeurs HT29-BL10 et  $4,85 \pm 1,9$  jours pour les tumeurs HT29-BL-11 (figure 5). Un test de Kruskal-Wallis montre qu'il s'agit de 3 populations différentes ( $p=0,0002$ ). Si on compare deux par deux les trois classes (test de Mann-Withney) on retrouve une différence significative entre les tumeurs BL11 et BL10. La différence entre les tumeurs HT29 et HT29-BL10 n'atteint pas la significativité statistique après application de la correction Bonferoni pour comparaisons multiples ( $p=0,029$ ).

## 2. Histologie tumorale

L'examen des coupes histologiques montre que les tumeurs HT29 parentales ont un stroma tumoral très grêle et qu'il n'y a pratiquement pas d'infiltrat inflammatoire. Le marquage anti-endocan humain est négatif et le marquage anti-endocan murin montre une expression intense au niveau stromal, plus particulièrement au niveau vasculaire. L'aspect microscopique des tumeurs HT29-BL10 est similaire à l'exception d'une composante différenciée mucipare plus importante et d'une expression d'endocan humain au niveau des cellules tumorales.

L'aspect des tumeurs HT29-BL11 montre un stroma beaucoup plus important que dans les autres tumeurs et un infiltrat inflammatoire pan-leucocytaire. Il existe des plages étendues de mort cellulaire. A fort grossissement on montre qu'il s'agit d'une apoptose des cellules individuelles avec parfois une partie hémorragique.

Un autre élément notable est la présence d'une composante mucipare plus importante chez toutes les tumeurs exprimant endocan (glycosylé ou non).



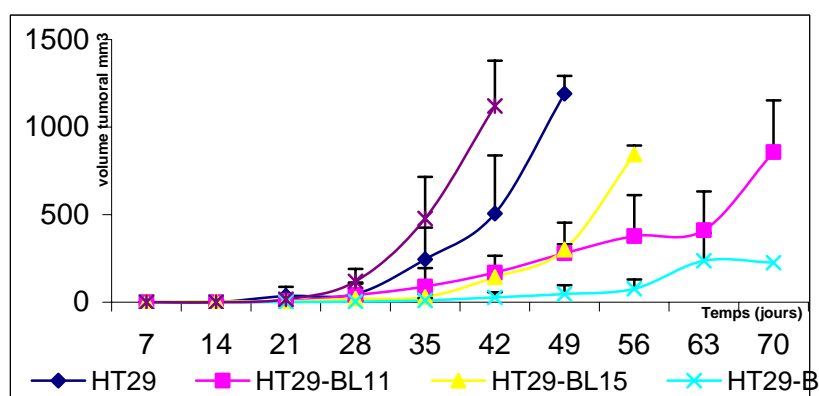
**Figure 5 Temps de doublement du volume tumoral des tumeurs HT 29, HT29-BL10, HT29-BL11.** Les valeurs sont exprimées en jours +/- DS.

## I. Corrélations structure fonction

### *Corrélation structure et croissance tumorale*

Nous avons réalisé des mutations dirigées de la région riche en phénylalanine d'endocan (positions 115 et 116) en partant de la forme portant déjà la mutation S137A (forme non glycosylée). On obtient donc des molécules portant 2 ou 3 mutations nommées BL15, BL16 et BL17.

Les courbes de croissance tumorale (figure 6) montrent que la double mutation F115A/F116A (BL17) fait perdre tout effet antitumoral à la forme non glycosylée, la vitesse de croissance de ces tumeurs étant similaire aux tumeurs HT29. La mutation de la phénylalanine en position 115 seule ne semble pas influencer de manière significative la croissance tumorale. Par contre la mutation de la phénylalanine en position 116 renforce l'effet antitumoral de la forme non glycosylée BL11. Ces modifications de croissance tumorale s'accompagnent de modifications histologiques significatives.



**Figure 6. Courbes de croissance des tumeurs HT29-BL15, HT29-BL16 et HT29-BL17.** Les valeurs représentent le volume tumoral moyen de chaque groupe de souris (4 souris /groupe sauf HT-BL10 - 16 souris et BL11 23 souris) Les barres verticales représentent les déviations standard

### Corrélation structure et anatomie pathologique

Les tumeurs exprimant BL17 présentent une composante mucipare, mais moins abondante que pour les autres clones exprimant endocan. Ces cellules mucipares sont assez petites et peu apoptotiques. On note un index mitotique qui est nettement plus élevé que sur toutes les autres tumeurs et un stroma grêle qui ne comporte pas d'infiltrat inflammatoire.

Les tumeurs exprimant BL15 présentent des plages de mort cellulaire très étendues, bordées par des polynucléaires neutrophiles en grand nombre. Il existe également des polynucléaires neutrophiles non altérés dans le stroma en dehors des zones de mort cellulaire. Le stroma est épais et on retrouve un infiltrat inflammatoire pan-leucocytaire. Comme sur toutes les tumeurs exprimant endocan il existe une quantité importante de cellules mucipares.

Les tumeurs BL16 présentent des plages tumorales avec de la mort cellulaire et surtout un stroma extrêmement épais. Il existe également une très grande quantité de cellules mucipares et un infiltrat pan-leucocytaire (Planche N°4).

## J. Taux sériques d'endocan murin et humain dans les tumeurs expérimentales

Les taux sériques d'endocan ont été mesurés toutes les deux semaines. Les taux d'endocan humain ont une évolution parallèle au volume tumoral (figure 7). Les taux d'endocan murin ont été inférieurs à la limite de sensibilité de l'ELISA (environ 0,5 ng/ml).

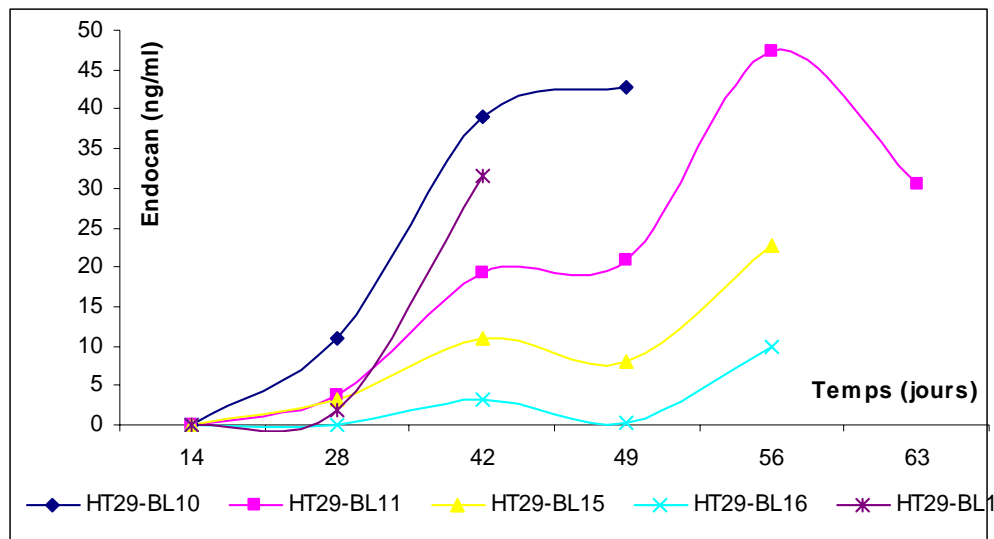


Figure 7 Taux sériques d'endocan humain chez les différents types de tumeurs Les valeurs représentent les moyennes pour chaque groupe de souris

# DISCUSSION

Les protéoglycanes remplissent de multiples fonctions dans l'organisme et ils ont été impliqués dans le processus de croissance tumorale [4-6]. Nous avons identifié en 1996 un nouveau protéoglycane soluble appelé endocan. Les résultats préliminaires impliquent cette molécule dans la promotion de la croissance tumorale dans un modèle de xéno greffe tumorale de cellules 293 chez la souris SCID [7]. Nous montrons ici le rôle promoteur d'endocan dans un autre modèle de xéno greffe tumorale. Les résultats permettent de distinguer l'importance respective des parties protéique et glycanique.

Ce travail démontre le rôle de la forme sauvage d'endocan sur la promotion de la croissance des tumeurs HT29. Ceci confirme les résultats obtenus sur la lignée 293 et indique que l'action promotrice d'endocan est indépendante de la lignée cellulaire utilisée et dépendante de sa chaîne glycanique. La question qui se pose est de savoir par quel mécanisme endocan exerce cet effet. Les différences de profils de croissance des tumeurs HT29 ne sont pas expliquées par les données *in vitro* qui ne montrent aucune action mitogène ou co-mitogène d'endocan. L'absence d'effet co-mitogène, en apparence contradiction avec les résultats obtenus sur les cellules HEK293 [8], suggère l'intervention d'autres facteurs de croissance murins présents *in vivo* mais non testés *in vitro*. Néanmoins, ces résultats confirment le rôle des structures glycaniques dans le développement des tumeurs.

Le modèle de xéno greffe cellulaire n'est pas représentatif de la situation clinique réelle. Il ne reproduit pas l'hétérogénéité cellulaire à l'intérieur de la tumeur et ne conduit que de manière très rare au décès de l'animal puisque dans la plupart des cas la tumeur reste localisée. D'ailleurs nous n'avons pas mis en évidence de métastases macroscopiques dans les organes thoraco-abdominaux des souris sacrifiées. La mortalité des animaux n'est donc pas le meilleur paramètre à suivre dans ces modèles. Cependant, ces modèles permettent d'étudier *in vivo* l'implication de différentes molécules dans la croissance tumorale et de tester rapidement l'efficacité de certaines approches thérapeutiques. L'extrapolation de ces résultats à l'homme nécessite l'exploration d'autres modèles de tumeurs orthotopiques et/ou avec implantations de pièces de biopsie de tumeurs humaines. Ces modèles seraient plus représentatifs pour évaluer correctement l'impact thérapeutique d'endocan.

De manière surprenante nos données montrent que la protéine seule exerce un effet de freinage de la croissance tumorale. Cet effet ne pouvait pas être observé dans le modèle HEK293 car la tumorigénicité réduite de cette lignée ne permet pas de mettre en évidence ce

type d'effet. Ces résultats sont confortés par le fait que la mutation des deux phénylalanines en position 115/116 fait perdre toute action anti-tumorale à la protéine. De manière surprenante les mutations individuelles de 115 et 116 ont un effet différent. La mutation de la phénylalanine en 115 n'influence pas la croissance tumorale. La mutation de la phénylalanine en position 116 renforce l'effet anti-tumoral de la protéine.

Sur le plan anatomopathologique les résultats montrent que l'action pro-cancéreuse d'endocan est associée à une augmentation de l'index mitotique et sans modification stromale : le stroma restant grêle sans infiltrat inflammatoire ; alors que l'effet de freinage de la croissance tumorale de la protéine seule est associé à une modification stromale importante essentiellement constituée d'une infiltration leucocytaire.

La double mutation indique clairement que cette région protéique, riche en phénylalanine, joue un rôle clé dans le freinage de la croissance tumorale laissant penser qu'endocan pourrait interagir *in vivo* avec d'autres molécules par l'intermédiaire des interactions hydrophobes. L'explication de l'effet différent des deux mutations fait actuellement défaut. On peut toutefois remarquer que sur toutes les tumeurs que nous avons examinées il existe une association entre la vitesse de croissance tumorale et la quantité de stroma tumoral, le nombre de cellules inflammatoires et le nombre d'apoptoses.

Le mécanisme exact par lequel endocan exerce ces actions reste inconnu. Le fait que la protéine seule ne modifie pas *in vitro* la prolifération des cellules HEK 293 et des cellules HT29 suggère un mécanisme d'action indirect. Il a été montré précédemment qu'endocan se fixe sur le LFA-1 et diminue l'interaction avec ICAM-1, suggérant un rôle modulateur d'endocan dans l'adhésion, la migration ou l'activation leucocytaire [9]. Nos résultats corroborent cette hypothèse à travers la surexpression d'endocan murin au niveau du stroma des tumeurs HT29 et HT29-BL10 et l'absence d'infiltrat leucocytaire sur les sections histologiques. Suivant cette hypothèse, la forme non glycosylée (BL11) pourrait agir soit en recrutant directement les leucocytes circulants, soit comme inhibiteur compétitif de la forme murine sécrétée par l'endothélium vasculaire néoformé. Elle pourrait ainsi favoriser le recrutement leucocytaire dans la tumeur, ce qui a d'ailleurs été observé sur les sections histologiques *in vivo*.

En conclusion, nos données suggèrent que (i) endocan promeut la croissance tumorale, (ii) son mécanisme d'action est indirect, (iii) implique l'interaction avec les facteurs de croissance par sa partie glycanique et (iv) favorise le recrutement leucocytaire intra tumoral par sa partie peptidique. Endocan pourrait être une cible intéressante de thérapie anti-tumorale.

# **BIBLIOGRAPHIE**

1. Bechard, D., Meignin, V., Scherpereel, A., Oudin, S., Kervoaze, G., Bertheau, P., Janin, A., Tonnel, A., Lassalle, P., Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J Vasc Res*, 2000. **37**(5): p. 417-425.
2. Gilewski, T., Norton, L., *Cytkinetics of Neoplasia*, in *Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn, J., Editor. 2001, W. B. Saunders: Philadelphia. p. 143-171.
3. Norton, L., Simon, R., Growth curve of an experimental solid tumor following radiotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 1977. **58**(6): p. 1735-1741.
4. Alexander, C.M., Reichsman, F., Hinkes, M.T., Lincecum, J., Becker, K.A., Cumberland, S., Bernfield, M., Syndecan-1 is required for Wnt-1-induced mammary tumorigenesis in mice. *Nat Genet*, 2000. **25**(3): p. 329-332.
5. Kleeff, J., Wildi, S., Kumbasar, A., Friess, H., Lander, A.D., Korc, M., Stable transfection of a glypican-1 antisense construct decreases tumorigenicity in PANC-1 pancreatic carcinoma cells. *Pancreas*, 1999. **19**(3): p. 281-288.
6. Mathiak, M., Yenisey, C., Grant, D.S., Sharma, B., Iozzo, R.V., A role for perlecan in the suppression of growth and invasion in fibrosarcoma cells. *Cancer Res*, 1997. **57**(11): p. 2130-2136.
7. Scherpereel, A., Gentina, T., Grigoriu, B., Sénéchal, S., Janin, A., A, T., Plénat, F., Béchard, D., Tonnel, A.B., Lassalle, P., Overexpression of Endocan Induces Tumor Formation. submitted.
8. Bechard, D., Gentina, T., Delehedde, M., Scherpereel, A., Lyon, M., Aumercier, M., Vazeux, R., Richet, C., Degand, P., Jude, B., Janin, A., Fernig, D.G., Tonnel, A.B., Lassalle, P., Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J Biol Chem*, 2001. **276**(51): p. 48341-48349.
9. Bechard, D., Scherpereel, A., Hammad, H., Gentina, T., Tsiropoulos, A., Aumercier, M., Pestel, J., Dessaint, J.P., Tonnel, A.B., Lassalle, P., Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*, 2001. **167**(6): p. 3099-3106.

## **ARTICLE VI**

### **Endocan, a new endothelial marker in human sepsis**

Arnaud Scherpereel, Florence Depontieu, Bogdan Grigoriu, Béatrice Cavestri, Anne Tsicopoulos, Thibaut Gentina, Mercé Jourdain, Jerome Pugin, Andre-Bernard Tonnel, Philippe Lassalle

Critical Care Medicine 2006, 4: 532-537

## Endocan, a new endothelial marker in human sepsis\*

Arnaud Scherpereel, MD, PhD; Florence Depontieu; Bogdan Grigoriu, MD; Béatrice Cavestri, MD; Anne Tscopoulos, MD, PhD; Thibaut Gentina, MD, PhD; Mercé Jourdain, MD, PhD; Jerome Pugin, MD, PhD; Andre-Bernard Tonnel, MD, PhD; Philippe Lassalle, MD, PhD

**Objectives:** a) To evaluate in septic patients the blood levels of endocan, a circulating proteoglycan, which regulates leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interactions *in vitro*; b) to determine whether endocan could be used as a diagnostic and prognostic marker in sepsis in the intensive care unit; and c) to study kinetics of endocan secretion by endothelial cells *in vitro* after stimulation by soluble mediators involved in sepsis.

**Design:** Prospective observational study.

**Setting:** Intensive care unit of the University Hospitals of Lille, France, and Geneva, Switzerland.

**Patients:** All patients admitted to the intensive care unit over a 6-month period with clinical evidence of severe sepsis or septic shock.

**Interventions:** None.

**Measurements and Main Results:** *In vitro*, we showed a sustained endocan secretion by endothelial cells after stimulation by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor- $\alpha$ . Circulating lev-

els of endocan measured in 63 patients admitted to the intensive care unit with sepsis were significantly elevated compared with 20 healthy donors and seven patients with systemic inflammatory response syndrome:  $2.71 \pm 4.88$  ng/mL vs.  $0.77 \pm 0.44$  ng/mL vs.  $0.68 \pm 1.03$  ng/mL (median  $\pm$  interquartile range,  $p < .001$ ). Endocan levels were higher in patients with septic shock ( $6.11 \pm 12.99$  ng/mL,  $n = 22$ ) than in patients with severe sepsis ( $1.97 \pm 7.8$  ng/mL,  $n = 12$ ) or sepsis ( $1.95 \pm 1.63$  ng/mL,  $n = 29$ ). Measurement of endocan at intensive care unit admission revealed higher levels in nonsurvivors ( $n = 12$ ) than in patients still alive 10 days later ( $n = 51$ ,  $6.98 \pm 13.8$  vs.  $2.45 \pm 4.09$ ,  $p < .01$ ).

**Conclusions:** These results suggest that in septic patients, endocan blood level is related to the severity of illness and the outcome of the patient and may represent a novel endothelial cell dysfunction marker. (Crit Care Med 2006; 34:532–537)

**KEY WORDS:** sepsis; endothelium; proteoglycan; marker; severity; prognosis

Sepsis remains a devastating problem in critically ill patients despite modern treatments (1). Endothelial cells play a key role in sepsis pathogenesis by

producing cytokines and chemotactic factors and expressing surface adhesion molecules that induce circulating leukocytes migration into tissues (2–5).

Endocan (endothelial cell specific molecule-1), a 50-kDa dermatan sulfate proteoglycan, is expressed by endothelial cells in lung and kidney (6) and can be detected in human blood (7, 8). *In vitro*, inflammatory cytokines (interleukin [IL]-1 $\beta$ , tumor necrosis factor [TNF]- $\alpha$ ) induce an up-regulation of endocan messenger RNA and a sustained release of the molecule by the endothelium (7). Endocan binds to human leukocytes via the integrin leukocyte function-associated antigen (LFA)-1 and inhibits the LFA-1/intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 interactions and, potentially, LFA-1-mediated leukocyte functions (9). The central role of leukocytes and endothelium dysfunction during sepsis (4, 5) led us to hypothesize that endocan might be involved in the pathogenesis of sepsis.

The aim of this work was to set up a pilot study to investigate whether circulating endocan at intensive care unit (ICU) admission is increased in septic pa-

tients. We compared endocan level with some markers usually used to evaluate septic patients and searched potential links between endocan and patient clinical status and prognosis. We also studied whether and how endocan secretion by endothelial cells is modulated *in vitro*.

### MATERIALS AND METHODS

This prospective study was conducted in the ICUs of the University Hospital of Geneva (Switzerland) and Lille (France). Patients were classified according to the Sepsis Consensus Conference in 1992 (10), and clinical data, diagnosis, treatment modalities, and blood samples were collected. Within 1 hr, samples were centrifuged at  $2000 \times g$  (5 mins), and sera and plasma were kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  until assayed. The study protocol was approved by the local ethical committee of both hospitals.

**HUVEC Cultures.** Human primary cultured endothelial cells (HUVECs) were derived from the vein of umbilical cords as previously described (11). Second passage HUVECs were cultured on fibronectin-coated 48-well culture plates (Becton Dickinson, Le Pont de Claix, France) in RPMI 1640 containing 20% fetal calf serum, endothelial cell growth supple-

\*See also p. 574.

From INSERM Unit 416, Institut Pasteur de Lille, France (AS, FD, BG, AT, TG, A-BT, PL); Pulmonary Department (AS, A-BT) and Intensive Care Unit (BC, M.J) of the University Hospital of Lille, France; Intensive Care Unit of the University Hospital of Geneva, Switzerland (JP); and Pulmonary and Critical Care Department, University of Medicine and Pharmacy "Gr. T. Popa," Iasi, Romania.

Supported, in part, by grant PHRC 2001-1914 from Programme Hospitalier de Recherche Clinique, France (AS), and Programme de Recherche en Sante PROGRES and IFR17 (PL). BG is recipient of a Long-Term Research Fellowship from the European Respiratory Society and from the Societe de Pathologie Thoracique du Nord.

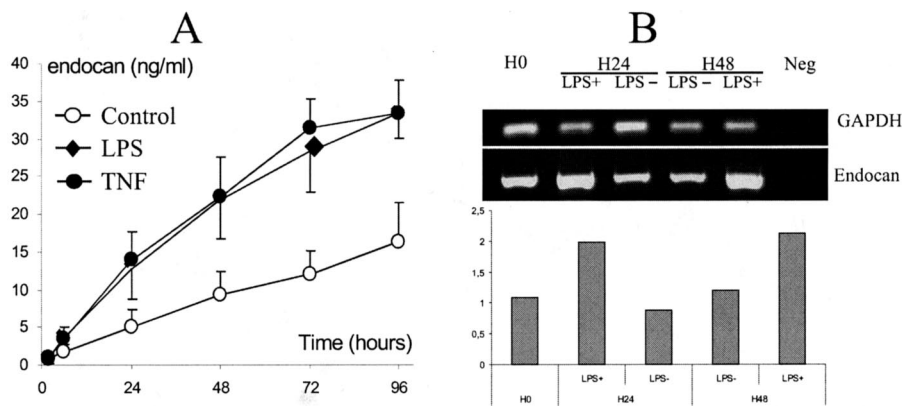
All authors have no financial interests to disclose, except Dr. Lassalle, who reports being consultant and stock ownership of Endotis Pharma.

Address requests for reprints to: Arnaud Scherpereel, MD, PhD, INSERM U416, Institut Pasteur de Lille, 1 rue du Professeur Calmette, B.P. 245, 59019 Lille cedex, France; E-mail: a-scherpereel@chru-lille.fr.

Copyright © 2006 by the Society of Critical Care Medicine and Lippincott Williams & Wilkins

DOI: 10.1097/01.CCM.0000198525.82124.74





**Figure 1.** Kinetics of endocan secretion induced by lipopolysaccharide (LPS) and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in human primary cultured endothelial cells (HUVECs). *A*, HUVECs were cultured in RPMI 1640 containing 2% fetal calf serum (open circles) with addition of 1  $\mu$ g/mL LPS (diamonds) or 500 IU/mL TNF- $\alpha$  (filled circles). The supernatants were collected and endocan was evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay. The results were mean  $\pm$  SD of seven separate experiments. An MTT test showed no difference in viability of HUVECs over time in all experimental conditions. *B*, Endocan messenger RNA kinetics in HUVECs after LPS stimulation. *Upper part*, gel electrophoresis polymerase chain reaction (PCR) products; *lower part*, semiquantitative analysis of PCR; units on graph represent relative intensities of endocan to reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

ment (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 5 IU/mL heparin (Sanofi-Synthelabo, Gentilly, France), and 2 mM L-glutamine (GIBCO BRL, Cergy Pontoise, France). At confluency, the cells were washed once and incubated in RPMI 1640 containing 2% fetal calf serum and 2 mM L-glutamine for 18 hrs and then washed once again with the same medium just before stimulation. Final concentrations of 1  $\mu$ g/mL and 5  $\mu$ g/mL of lipopolysaccharide (LPS from *E. coli* 055:B5, Sigma-Aldrich) and TNF- $\alpha$  at 500 IU/mL (R&D Systems, Abingdon, UK) were added in each well. The cell supernatants were centrifuged and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until endocan quantitation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**ELISA Assays.** Endocan assay was performed using a sandwich-type ELISA and expressed in ng/mL (7). Commercial assays were used for serum ICAM-1 and IL-10 (sICAM-1 and IL-10 Eli-pair both from Diaclone Research, Besancon, France), procalcitonin (LUMitest, Brahms-Diagnostica, Germany), C-reactive protein (CRP) (immuno-nephelometry), von Willebrand factor (Asserachrome vWF, Diagnostica Stago, Asnieres, France), and IL-6 (DuoSet R&D systems, Minneapolis, USA).

**Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction.** Total RNA was extracted by TRIzol reagent (Invitrogen<sup>®</sup>) according to manufacturer instructions. Two micrograms of total RNA was reverse transcribed with a dT12-18 oligonucleotide primer using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen<sup>®</sup>) as recommended by the manufacturer. The specific primers used for endocan were forward primer (5'GAGGCAGCTGGAAACATGAAG3') and reverse primer (5'CTGTGATTCTGAGAGAAGGC'3); these primers yield a specific DNA fragment of 600 base pairs. The human glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase primers were purchased from Clon-

tech<sup>®</sup>. For endocan PCR, amplification was performed using TaqMaster Polymerase (Eppendorf<sup>®</sup>) for 31 cycles with a "hot start" at  $92^{\circ}\text{C}$  for 2 mins followed by  $92^{\circ}\text{C}$  denaturation for 30 secs,  $60^{\circ}\text{C}$  hybridization for 1 min, and  $65^{\circ}\text{C}$  extension for 1 min 30 secs. Reverse transcription-polymerase chain reaction products were resolved in a 1.2% agarose gel in tris borate ethylene diamine buffer.

**Statistical Analysis.** Data are expressed as median, and the 25th-75th percentiles are supplied in brackets. Bland and Altman plots (12) were used to compare agreement between serum and plasma values. Comparisons of means were performed using a nonparametric one-way analysis of variance (13). *Post hoc* analyses were performed using a Bonferroni correction. Receiver operating characteristic (ROC) curves were computed and compared according the method described by Hanley and McNeil (14). Statistical analysis analyses were performed using the SPSS statistical package (version 12.0F, SPSS, Chicago, IL) and the SAS system (version 8.2, Cary, NC).

## RESULTS

**Endocan Measurements in Serum and Plasma.** We compared endocan levels in plasma and serum from healthy donors and in the first 36 patients of this study. Bland-Altman plots showed a strong agreement between the two values (mean difference = 0.03 ng/mL; SD = 0.5 ng/mL); all differences were between  $\pm 1$  SD in control patients and between  $\pm 1.62$  SD in study patients. Further testing showed no influence of temperature storage conditions (up to 4 days at  $4^{\circ}\text{C}$  or 1 month

freezing at  $-20^{\circ}\text{C}$  or  $-70^{\circ}\text{C}$ ) or up to four freeze-thaw cycles on endocan measured values. Thus, only serum endocan was quantified thereafter. Repeated assay of five specimens (between 0.5 ng/mL and 5 ng/mL) show an intra-assay coefficient of variation of 4.6% for the 0.5 ng/mL sample and up to 11.3% for the 5 ng/mL sample. Interassay coefficient of variation was between 6.7% (0.5 ng/mL) and 10.2% (5 ng/mL). Minimum ELISA sensitivity was 0.5 ng/mL.

**LPS or TNF- $\alpha$  Induces Sustained Release of Endocan by HUVECs.** LPS and TNF- $\alpha$  are mediators involved in the pathogenesis of sepsis and can stimulate endothelial cells. We wonder if they regulate endocan secretion in HUVECs cultured in growth factor-deficient medium that could stimulate cell proliferation and endocan secretion. In our conditions, 2% fetal calf serum was sufficient to maintain full viability for 96 hrs as judged by trypan blue exclusion and MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-z-yl]-2,5-diphenyltetrazolium) viability test. Stimulation of HUVECs with 1  $\mu$ g/mL LPS in cell medium resulted in an increase of endocan messenger RNA evaluated by reverse transcription-polymerase chain reaction and endocan secretion, which became significant after 24 hrs (Fig. 1). The release of endocan was sustained up to 96 hrs. HUVEC stimulation by TNF- $\alpha$  also induced an increase of endocan secretion (Fig. 1A) and endocan messenger RNA as previously reported (6). These results suggest that mediators involved in sepsis induce a sustained secretion of endocan by primary cultured human endothelial cells from the 24th to the 96th hour.

**Serum Endocan Is Increased in Septic Patients.** Median serum endocan values were 0.77 ng/mL (0.51-0.95) in 20 healthy volunteers and 0.72 ng/mL (0-1.03) in seven patients with systemic inflammatory response syndrome (demographic data in Table 1). Endocan was increased in patients with septic shock, 6.11 ng/mL (3.17-16.16, n = 22); severe sepsis, 1.97 ng/mL (1.25-9.05, n = 12); and sepsis, 1.95 ng/mL (1.34-2.97, n = 29, Fig. 2). Differences between groups were statistically significant except between sepsis and severe sepsis and between severe sepsis and septic shock patients.

Procalcitonin levels were higher in septic shock than severe sepsis ( $p = .05$ ) and sepsis patients ( $p < .001$ , Table 2). CRP values were higher in severe sepsis and septic shock patients compared with

Table 1. Demographic data of recruited patients

	SIRS (n = 7)	Sepsis (n = 29)	Severe Sepsis (n = 12)	Septic Shock (n = 22)	p
Male gender, n (%)	3 (42.8)	16 (55.1)	9 (75)	13 (59)	.53
Age, yrs, mean ± SD	45.4 ± 22.4	58.9 ± 14.9	57.7 ± 21.2	49.3 ± 18.7	.27
SAPS II median (25th–75th centiles)	45 (43–48)	38 (34–58)	45 (38–49)	47 (26–57)	.99
MacCabe, mean ± SD	1	1 ± 0.66	2 ± 0.7	1 ± 1.2	.19
Lung injury at admission					
ALI, n (%)	—	16 (57.1)	8 (66.7)	13 (59.1)	
ARDS, n (%)	—	—	—	3 (13.6)	
ARDS, in next 72 hrs	—	3 (10.7)	2 (16.7)	4 (18.2)	

SIRS, systemic inflammatory response syndrome; SAPS, Simplified Acute Physiology Score; ALI, acute lung injury; ARDS, acute respiratory distress syndrome.

other groups ( $p \leq .01$ ). sICAM-1 levels were similar between each group of septic patients. vWF protein, a proposed marker of endothelial activation in sepsis, was significantly increased in all septic patients, but no difference was seen be-

tween septic shock and severe sepsis groups. Elevated values were also found for IL-10 and IL-6 in all septic patients, but again no differences were found between severe sepsis and septic shock groups.

Significant correlations were searched between all markers (Table 3). Small but statistically significant correlations were found between endocan and both vWF and IL-10.

ROC curve analysis for endocan differentiating between septic patients (all categories,  $n = 63$ ) and those with systemic inflammatory response syndrome ( $n = 7$ ) gave an area under the curve (AUC) of 0.923 (95% confidence interval [CI] 0.851–0.995) compared with 0.860 for procalcitonin (95% CI 0.746–0.973), 0.869 for CRP (95% CI 0.682–1), 0.684 for ICAM-1 (95% CI 0.447–0.922), 0.761 for IL-10 (95% CI 0.620–0.903), 0.871 for IL-6 (95% CI 0.765–0.977), and 0.841 for vWF (95% CI 0.669–1). The AUC for endocan differentiating septic shock patients ( $n = 22$ ) and all other septic patients ( $n = 51$ ) was 0.777 (95% CI 0.644–0.910) compared with 0.786 (95% CI 0.665–0.906) for procalcitonin, 0.741 for CRP (95% CI 0.587–0.894), 0.573 for sICAM-1 (95% CI 0.424–0.721), 0.695 for IL-10 (95% CI 0.518–0.872), 0.736 for IL-6 (95% CI 0.572–0.902), and 0.584 for vWF (95% CI 0.405–0.762). Comparisons of

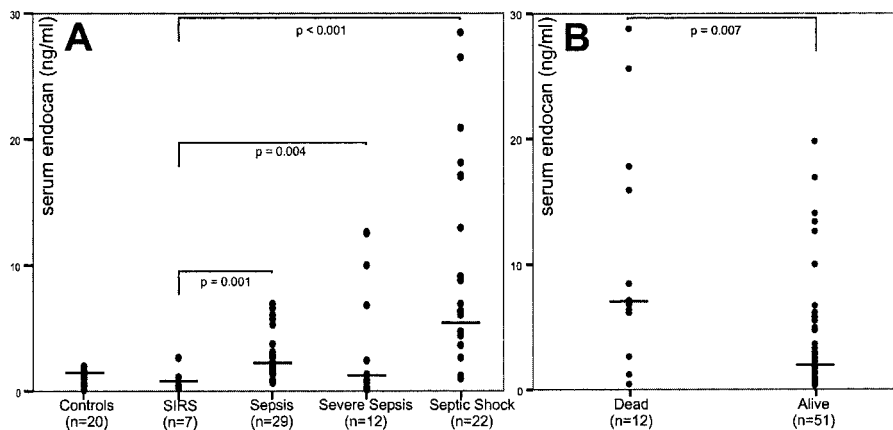


Figure 2. Serum endocan level is increased in septic patients. *A*, endocan was significantly elevated in all patient groups compared with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) patients and the control group. Graph shows the median (horizontal line), and circles represent individual patients. *B*, patients were grouped according to survival 10 days after admission. Serum endocan was higher (6.98 ng/mL, 3.5–17.32 ng/mL) in nonsurvivors compared with alive patients (2.45 ng/mL, 1.36–5.45 ng/mL,  $p = .007$ ).

Table 2. Soluble mediators in septic patients

	Control (n = 20)	SIRS (n = 7)	Sepsis (n = 29)	Severe Sepsis (n = 12)	Septic Shock (n = 22)
Endocan, ng/mL	0.77 (0.51–0.95)	0.72 (0–1.03)	1.9 <sup>a,b</sup> (1.34–2.97)	1.97 <sup>a</sup> (1.25–9.05)	6.11 <sup>a,b,c</sup> (3.17–16.16)
sICAM, ng/mL	—	761.5 (530–2645)	2130 <sup>a</sup> (1050–2640)	1957 <sup>a</sup> (1175–3365)	1997.5 <sup>a</sup> (1257.5–4122.5)
CRP, mg/L	<5	17.6 (7.5–151.5)	126 <sup>a</sup> (66.9–190.5)	222 <sup>a,c</sup> (127.5–469)	236 <sup>a,c</sup> (165.7–318)
PCT, ng/mL	<0.5	<0.5	0.2 (0–1.7)	6.7 <sup>a,c</sup> (1.87–49.3)	55.6 <sup>a,b,c</sup> (16.4–161.2)
IL-10, pg/mL	ND	0 (0–0)	0 (0–12.9)	11.6 <sup>a</sup> (3.51–48.1)	48.4 <sup>a,c</sup> (0–95.4)
IL-6, pg/mL	ND	0 (0–22.8)	40.4 <sup>a</sup> (16.1–145.9)	126.9 <sup>a</sup> (46.5–461.4)	379 <sup>a,c</sup> (63.8–684.8)
vWF	ND	146.5 (122.8–186.5)	328.4 <sup>a</sup> (199–386.4)	492 <sup>a,c</sup> (338–544.6)	339 <sup>a</sup> (302.2–472.5)

SIRS, systemic inflammatory response syndrome; sICAM, serum intercellular adhesion molecule; CRP, C reactive protein; PCT, procalcitonin; IL, interleukin; ND, vWF, von Willebrand factor protein.

<sup>a</sup> $p < .02$  for comparison with SIRS and control group (Mann-Whitney U test, two-tailed); <sup>b</sup> $p < .05$  for comparison with severe sepsis patients (Mann-Whitney U test, two-tailed); <sup>c</sup> $p < .02$  for comparison with sepsis patient group (Mann-Whitney U test, two-tailed). All results are expressed as median (25th–75th percentile) except for CRP and PCT in control group, where values represent reference values for normal subjects.

area under ROC curves show no significant differences between the different markers studied.

Among the 63 patients, 12 died within 10 days after admission (one with sepsis, two with severe sepsis, and nine with septic shock). Endocan level was significantly increased in nonsurvivors compared with survivors: 6.98 ng/mL (3.5–17.32) vs. 2.45 ng/mL (1.36–5.45,  $p = .007$ , Fig. 2B). When referring to outcome at day 28, endocan was again significantly increased in dead patients ( $n = 15$ ) compared with survivors: 6.82 ng/mL (4.12–14.98) vs. 1.82 ng/mL (0.88–3.27,  $p = .001$ ). No statistically significant differences between dead and surviving patients at day 10 were found for procalcitonin, CRP, sICAM-1, IL-10, IL-6, or vWF. Only vWF values showed a small difference between dead and surviving patients at day 28: 381.7% (315.9–480.6) vs. 310.9% (185.3–388.1,  $p = .039$ ). The AUC for endocan differentiating dead or surviving patients at day 10 was 0.752 (95% CI 0.572–0.933), the highest among all markers studied, which were all  $<0.704$  (for IL-6). The AUC for endocan, when referring to survival at day 28, was 0.810 (95% CI 0.682–0.937) compared with the highest value of 0.713 for vWF; however, no significant differences between AUC could be shown.

## DISCUSSION

Despite strong and invasive therapy, the mortality rate of septic shock remains high (1). Pathophysiologic markers have been sought that could relate to the diagnosis, severity, and/or prognosis of the disease (15). Various molecules such as CRP, procalcitonin, sICAM-1, IL-6, vWF, high-density lipoprotein cholesterol, and N-terminal pro-brain natriuretic peptide were found in blood of patients with septic shock and proposed as markers of sepsis severity, but none gained wide clinical acceptance because they generally reflect a single biological aspect of sepsis, a complex and heterogeneous process (15–18). Recently, triggering receptor expressed on myeloid cells-1 was shown to help to identify patients with infection and perhaps to have a predictive value for patients' outcome, but triggering receptor expressed on myeloid cells-1 was not correlated with the severity of sepsis (18, 19). In agreement with many previous reports, CRP, sICAM-1, procalcitonin, IL-6, and vWF were also found elevated in our septic patients but had

little value in assessment of patient outcome. In contrast, circulating endocan was increased in septic patients, and this elevation of endocan values was linked to

the level of illness severity. However, since the number of patients in the systemic inflammatory response syndrome group was limited, an increase of the

Table 3. Endocan is correlated with interleukin (IL)-10 and von Willebrand factor protein (vWF)

	Endocan	CRP	PCT	IL-10	IL-6
CRP					
$r^2$	.121				
$p$	.419				
PCT					
$r^2$	.254	.281			
$p$	.147	.140			
IL-10					
$r^2$	.355 <sup>a</sup>	.157	.096		
$p$	.011	.406	.704		
IL-6					
$r^2$	.180	.385 <sup>a</sup>	-.094	.445 <sup>b</sup>	
$p$	.220	.039	.729	.02	
vWF					
$r^2$	.359 <sup>a</sup>	.497 <sup>b</sup>	.331	.222	.171
$p$	.011	.06	.195	.125	.255

CRP, C reactive protein; PCT, procalcitonin;  $r^2$ , Pearson correlation coefficient.

<sup>a</sup> $p < .05$  (bilateral); <sup>b</sup> $p > .01$  (bilateral).

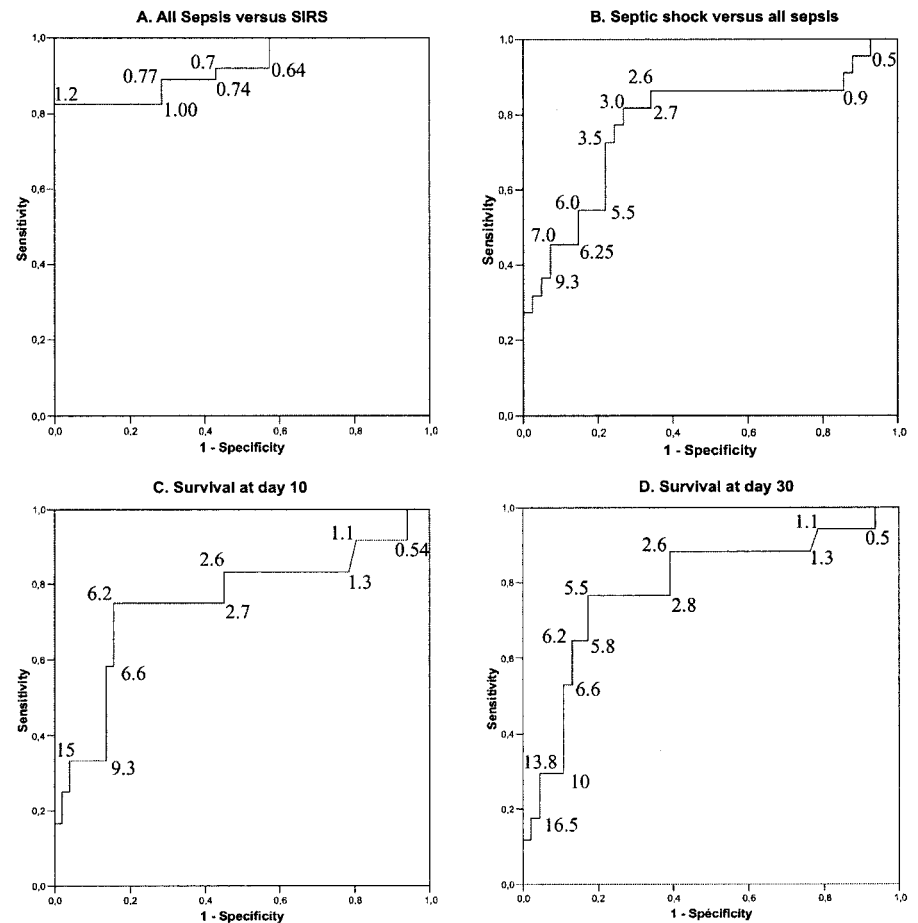


Figure 3. Receiver operating characteristics curves for endocan assay in differentiating (A) infected patients vs. those with systemic inflammatory response syndrome (SIRS), (B) septic shock patients vs. all other septic patients, (C) patients dead or alive at day 10 after admission, and (D) patients dead or alive at day 30 after admission. Numbers on the graphs represent cutoff values for serum endocan at the respective inflection points.

Table 4. Operational characteristics of endocan in sepsis patients

Groups	Cutoff, ng/mL	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	LR+	LR-
All sepsis vs. SIRS	1.2	0.825	1.000	1.000	0.389	—	0.17
Septic shock vs. all sepsis	3.0	0.818	0.732	0.621	0.882	3.05	0.24
Survival at day 10	6.2	0.750	0.843	0.529	0.935	4.78	0.29
Survival at day 30	5.5	0.765	0.826	0.579	0.918	4.39	0.28

PPV, positive predictive value; NPV, negative predictive value; LR, likelihood ratio; SIRS, systemic inflammatory distress syndrome.

variability of endocan values may be expected when studying a larger group of patients. A high level of circulating endocan at the early stage of the disease was also associated with a lower probability of survival 10 and 28 days later. However, we measured serum endocan only at admission; therefore, these data should be interpreted as preliminary before kinetic studies of endocan are available. Interestingly, we found a small but statistically significant correlation between endocan and vWF, a marker of endothelial cell activation and injury. Higher levels of vWF were associated with poorer survival and fewer organ-failure-free days in patients with acute lung injury regardless of the presence or absence of sepsis (20). In our series, endocan had a higher discriminant value for predicting septic shock and death than vWF and thus could represent a useful marker of the severity and outcome of sepsis. Functional characteristics of endocan assay in patient assessment are reported in Figure 3 (ROC curves) and Table 4.

The apparent discrepancy between studied markers could be explained by differences in their origin, their metabolism, and their significance in septic patients. Consistent with other reports, we found elevated values of some previously proposed markers of sepsis severity as IL-6, vWF, or IL-10, but their value in predicting severity and outcome was limited. Endocan expression is restricted to endothelial cells (6, 7). The elevated levels of endocan in septic patients are consistent with an induction of its secretion by endothelial cells because a) proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  induce the synthesis and the release of endocan by HUVECs (6, 7); b) bacteria endotoxin LPS increases endocan secretion by HUVECs; and c) the sustained hypersecretion of endocan induced by TNF- $\alpha$  and LPS may be consistent with the high level of serum endocan in patients with fatal outcome. However, the presence of endocan in a storage form

within the endothelial cells (7) may also suggest that endocan release could be partly due to endothelial cell injury.

Endocan not only could be a marker of severity but also could play a significant role in the pathogenesis of sepsis. In fact, it has been demonstrated that endocan interacts with LFA-1 on the surface of human leukocytes and directly inhibits LFA-1/ICAM-1 interactions (9). LFA-1/ICAM-1 interactions are involved in leukocyte firm adhesion to endothelial cells and subsequent migration into tissues during sepsis (3). Since serum endocan levels in patients can reach concentrations close to those used *in vitro* experiments, it can be speculated that *in vivo*, endocan may inhibit ICAM-1/LFA-1-dependent leukocyte recruitment in target organs and thus act as an anti-inflammatory molecule. Interestingly, a small correlation between endocan and IL-10, an anti-inflammatory cytokine, was observed in our study. Thus, the increase of circulating endocan in sepsis may not only reflect the intensity of endothelial activation and injury but also participate in the natural anti-inflammatory response of the body. High anti-inflammatory response overwhelming the initial inflammation induced by sepsis could result in more severe disease and lower survival, as previously demonstrated for IL-10 (21).

Consistently with previous reports associating gravity of sepsis to endothelial activation and injury (2, 4, 5), we found that circulating endocan, an endothelial proteoglycan, may represent a new marker in patients with sepsis, correlated with the severity and the outcome of the disease.

## REFERENCES

- Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, et al: Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001; 29:1303–1310
- Aird WC: The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003; 101:3765–3777
- Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: The multistep paradigm. *Cell* 1994; 76:301–314
- Vallet B: Bench-to bedside review: Endothelial cell dysfunction in severe sepsis: A role in organ dysfunction? *Crit Care* 2003; 7:130–138
- Hack CE, Zeerleder S: The endothelium in sepsis: Source of and a target for inflammation. *Crit Care Med* 2001; 29:S21–S27
- Lassalle P, Molet S, Janin A, et al: ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem* 1996; 271:20458–20464
- Bechard D, Meignin V, Scherpereel A, et al: Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J Vasc Res* 2000; 37:417–425
- Bechard D, Gentina T, Delehedde M, et al: Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J Biol Chem* 2001; 276:48341–48349
- Bechard D, Scherpereel A, Hammad H, et al: Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol* 2001; 167:3099–3106
- Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL: The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. *Chest* 1992; 101:1481–1483
- Lassalle P, Lagrou C, Delneste Y, et al: Human endothelial cells transfected by SV40 T antigens: Characterization and potential use as a source of normal endothelial factors. *Eur J Immunol* 1992; 22:425–431
- Bland JM, Altman DG: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* 1986; 1:307–310
- Conover WJ, Iman RL: Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *Am Stat* 1981; 35:124–133
- Hanley JA, McNeil BJ: A method of comparing the areas under receiver operating char-

**T**hese results suggest that in septic patients, endocan blood level is related to the severity of illness and the outcome of the patient and may represent a novel endothelial cell dysfunction marker.

- acteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 1983; 148:839–843
15. Marshall JC, Vincent JL, Fink MP, et al: Measures, markers, and mediators: Toward a staging system for clinical sepsis. A report of the Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25–26, 2000. *Crit Care Med* 2003; 31:1560–1567
  16. Chien JY, Jerng JS, Yu CJ, et al: Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33:1688–1693
  17. Roch A, Allardet-Servent J, Michelet P, et al: NH<sub>2</sub> terminal pro-brain natriuretic peptide plasma level as an early marker of prognosis and cardiac dysfunction in septic shock patients. *Crit Care Med* 2005; 33:1001–1007
  18. Gibot S, Cravoisy A, Kolopp-Sarda MN, et al: Time-course of sTREM (soluble triggering receptor expressed on myeloid cells)-1, procalcitonin, and C-reactive protein plasma concentrations during sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33:792–796
  19. Gibot S, Kolopp-Sarda MN, Bene MC, et al: Plasma level of a triggering receptor expressed on myeloid cells-1: Its diagnostic accuracy in patients with suspected sepsis. *Ann Intern Med* 2004; 141:9–15
  20. Ware LB, Eisner MD, Thompson BT, et al: Significance of von Willebrand factor in septic and nonseptic patients with acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 2004; 170:766–772
  21. van Dissel JT, van Langevelde P, Westendorp RG, et al: Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients. *Lancet* 1998; 351:950–953

# **ARTICLE VII**

## **Soluble Mesothelin–related Peptides in the Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma**

Arnaud Scherpereel\*, Bogdan Grigoriu\*, Massimo Conti, Thomas Gey, Marc Gregoire, Marie-Christine Copin, Patrick Devos, Bachar Chahine, Henri Porte, and Philippe Lassalle

\* Both authors contributed equally to this work

Am J Respir Crit Care Med, 2006, 173: 1155–1160

# Soluble Mesothelin–related Peptides in the Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma

Arnaud Scherpereel\*, Bogdan Grigoriu\*, Massimo Conti†, Thomas Gey, Marc Grégoire, Marie-Christine Copin, Patrick Devos, Bachar Chahine, Henri Porte‡, and Philippe Lassalle

INSERM Unit 774, Institut Pasteur de Lille; Departments of Pulmonary and Thoracic Oncology, Thoracic Surgery, and Pathology, University Hospital of Lille; Department of Biostatistics, Medical School of Lille, Lille; INSERM U601, Nantes, France; and University of Medicine, Iasi, Romania

**Background:** Diagnosis of malignant pleural mesothelioma is a challenging issue. Potential markers in mesothelioma diagnosis include soluble mesothelin–related peptides (SMRPs) and osteopontin, but no subsequent validation has been published yet.

**Methods:** We prospectively evaluated SMRPs in serum and pleural effusion from patients with mesothelioma ( $n = 74$ ), pleural metastasis of carcinomas ( $n = 35$ ), or benign pleural lesions associated with asbestos exposure ( $n = 28$ ), recruited when first suspected for mesothelioma.

**Findings:** Mean serum SMRP level was higher in patients with mesothelioma ( $2.05 \pm 2.57$  nM/L [median  $\pm$  interquartile range]) than in patients with metastasis ( $1.02 \pm 1.79$  nM/L) or benign lesions ( $0.55 \pm 0.59$  nM/L). The area under the receiver operating characteristic curve (AUC) for serum SMRP was 0.872 for differentiating mesothelioma and benign lesions, cut-off = 0.93 nM/L (sensitivity = 80%, specificity = 82.6%). The AUC for serum SMRP differentiating metastasis and mesothelioma was 0.693, cut-off = 1.85 nM/L (sensitivity = 58.3%, specificity = 73.3%). SMRP values in pleural fluid were higher than in serum in all groups (mesothelioma:  $46.1 \pm 83.2$  nM/L; benign lesions:  $6.4 \pm 11.1$  nM/L; metastasis:  $6.36 \pm 21.73$  nM/L). The AUC for pleural SMRP-differentiating benign lesions and mesothelioma was 0.831, cut-off = 10.4 nM/L (sensitivity = 76.7%, specificity = 76.2%). The AUC for pleural SMRP-differentiating metastasis and mesothelioma was 0.793.

**Interpretation:** We show that SMRPs may be a promising marker for mesothelioma diagnosis when measured either in serum or pleural fluid. The diagnostic value of SMRPs was similar in both types of samples, but pleural fluid SMRPs may better discriminate mesothelioma from pleural metastasis.

**Keywords:** diagnosis; marker; neoplasm; pleural disease

Malignant pleural mesothelioma (MPM) is a highly aggressive tumor with a poor survival rate that arises from the surface cells of the pleura. Previously considered as a rare tumor, MPM has become a very important public health issue, and its incidence is

expected to continue to increase for at least the next 10 yr (1). Asbestos exposure is the main factor involved in MPM pathogenesis (2). The screening and the diagnosis of MPM in subjects exposed to asbestos are difficult because of the following factors: (1) the disease may occur up to 30 to 40 yr after exposure and (2) the differential diagnosis on pleural biopsy between MPM and pleural benign disease, also frequently induced by asbestos exposure, or pleural metastasis of adenocarcinoma may be difficult in some cases, even with the use of immunohistochemistry (3). Management of patients with MPM remains difficult because they are often referred for evaluation late in the evolution of the disease. Moreover, MPM exhibits a high resistance to radiotherapy and chemotherapy; only a few patients are candidates for radical surgery in a multimodal treatment scheme. New therapeutic strategies, such as gene or cell therapy (4–6), and new drugs, such as histone deacetylase inhibitors (7), are still on clinical trial. Finally, there is no single current marker to help MPM diagnosis or to predict response to treatment or prognosis.

Mesothelin is a 40-kD cell surface glycosylated phosphatidylinositol (GPI)-anchored glycoprotein, which has putative functions in cell-to-cell adhesion (8). Mesothelin is expressed by normal mesothelial cells (9); however, it is highly overexpressed in cancers such as malignant mesothelioma (10, 11), pancreatic (12–14) or ovarian carcinoma (10, 15–18), sarcomas (13), and in some gastrointestinal (16, 19) or pulmonary carcinomas (3, 16, 18, 20). The mechanisms of release of mesothelin from the mesothelial cell surface are not yet established. The release of soluble mesothelin–related peptides (SMRPs) could be due to an abnormal splicing event resulting in a frameshift mutation of the protein, making it unable to stay attached at the cell surface. Another hypothesis is that SMRP is a proteolytically cleaved fragment of membrane-bound mesothelin (21). SMRPs can be detected in blood, and have been found highly increased in the blood of patients with mesothelioma (22) or ovarian (23) tumors. A first report of SMRPs as a marker of mesothelioma suggested excellent values for sensitivity (84%) and specificity (virtually 100%) (22). This retrospective study evaluated 44 mesotheliomas (of which 15 had a diagnosis based on cytology only) and a large panel of 160 patients with various diseases from only two referral hospitals. The pleural fluid SMRP level, which could eventually be more discriminant than blood SMRP level, was not assessed in this study (21).

Therefore, in a search of new tools for MPM screening and management, we studied SMRPs in serum and pleural fluid from a large panel of patients with benign pleural disease related to asbestos exposure, MPM, or pleural metastasis of carcinomas, in a prospective, multicentric study. Differences in SMRP values were also evaluated in the various pathologic subtypes of MPM.

## METHODS

### Patients

Starting May 2003, all consecutive patients suspected of, or recently diagnosed with, MPM were recruited in a prospective study in

(Received in original form November 22, 2005; accepted in final form January 27, 2006)

Supported by grants from La Ligue contre le Cancer, Comite de l'Aisne (2005), and from Pneumologie Developement (2004) (A.S.). B.G. is a recipient of a long-term research fellowship from the European Respiratory Society and from the Societe de Pathologie Thoracique du Nord. Mesomark ELISA kits were provided, free of charge, by CIS-Bio International (France) and Fujirebio Diagnostics.

CIS-Bio International and Fujirebio Diagnostics had no role in recruiting patients, performing assays, analyzing the data, or writing or approving the manuscript.

\* These authors contributed equally to this article.

† For the Chest Physicians of North of France Research Group (SPTN-APRN) (Annexe 1).

Correspondence and requests for reprints should be addressed to Arnaud Scherpereel, M.D., Ph.D., Clinique des Maladies Respiratoires, Hopital Calmette, CHRU of Lille, 59037 Lille Cedex, France. E-mail: a-scherpereel@chru-lille.fr

Am J Respir Crit Care Med Vol 173, pp 1155–1160, 2006

Originally Published in Press as DOI: 10.1164/rccm.200511-1789OC February 2, 2006  
Internet address: www.atsjournals.org

participating pulmonary or thoracic surgery departments in northern and western regions of France (from 20 different hospitals). Exclusion criteria were the presence or suspicion of any concomitant infectious disease, previous radical surgery, radiotherapy, or chemotherapy for the MPM, or patient refusal to participate in the study. Most of the patients had documented asbestos exposure history. Pathologic diagnosis by trained pathologists was done on pleural biopsies obtained by thoracoscopy or thoracotomy, or more rarely by tomodesitometry or ultrasound-guided biopsy. Final diagnosis divided the patients into three groups: confirmed MPM, benign pleural lesions associated with asbestos exposure (BPLAE group, diagnosis compliant with the 2004 American Thoracic Society recommendations [24]), and pleural metastasis of carcinomas (Mets group; Table 1). This last group of patients had a lower incidence of documented asbestos exposure, but was used as a comparison group for MPM subjects. Patients were included only if they had not received any prior antitumor treatment.

A standard operating procedure concerning patient sampling and data retrieval was set in place: at inclusion, blood and pleural fluid samples, if available, were collected from each patient and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  in aliquots until analyzed. Clinical data and outcome of the patients were also collected.

### SMRP Assay

Serum and pleural levels of SMRP levels were determined in a single laboratory (INSERM unit 774) using a newly available sandwich-type ELISA (Mesomark; CIS-Bio International, Gif/Yvette, France; Fujirebio Diagnostics, Inc., Malvern, PA) according to manufacturers' instructions, and results were expressed in nmol/L.

### Statistical Analysis

All data are reported as median and interquartile range. Comparisons between groups were performed using both Kruskal-Wallis test and a nonparametric analysis of variance (ANOVA) after rank transformation using the methodology suggested by Conover and Iman (25). The Bonferroni correction was applied for multiple comparisons in *post hoc*

tests. Area and standard errors of receiver operating curves (ROC) were calculated using standard techniques. The best statistical "cut-off" was calculated by minimizing the distance between the point with specificity = 1 and sensitivity = 1 and the points on the ROC curve. Areas under ROC curves (AUC) are reported with their 95% confidence intervals. Comparisons of AUC were done with the methodology suggested by Hanley and McNeil (26) using values available for both parameters. Unavailable data were coded as missing. Sensitivity and specificity for each cut-off were calculated using standard definitions. Correlations between serum and pleural SMRP values were calculated using Spearman's rank test. In an attempt to combine serum and pleural values to obtain a better classification of the patients, we built a score using discriminant analysis. Statistical calculations were performed with SPSS statistical package version 12.0F (SPSS, Inc., Chicago, IL) and the SAS system (version 8.2; Cary, NC).

### RESULTS

We recruited a total of 137 patients, of whom 74 had MPM, 35 had Mets, and 28 had BPLAE. Serum was available from 30 patients with Mets, 23 patients with BPLAE, and 60 patients with MPM, and pleural fluid from 28 Mets, 21 BPLAE, and 43 MPM cases. The characteristics of patients are reported in Table 1.

Serum SMRP levels were different between the three groups ( $p < 0.0001$ , Kruskal-Wallis test; Table 2, Figure 1); the median values measured in patients with MPM ( $2.05 \pm 2.57$  nmol/L) were significantly higher than in patients with either Mets ( $1.02 \pm 1.79$  nmol/L) or BPLAE ( $0.55 \pm 0.59$  nmol/L;  $p < 0.002$ , ANOVA after rank transformation). We also found a marginal difference between Mets and BPLAE groups ( $p = 0.05$ ). ROC analysis showed an AUC of 0.872 (0.798–0.946) for differentiating between BPLAE and MPM with a best statistical cut-off of 0.93

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF RECRUITED PATIENTS

	Mets (n = 35)	BPLAE (n = 28)	MPM (n = 74)
Age, yr (mean $\pm$ SD)	65.3 $\pm$ 10.8	61.4 $\pm$ 8.6	63.8 $\pm$ 10.6
Male sex, n (%)	16 (45.7)	24 (85.7)	53 (71.6)
Pleural fluid, median (QR25–QR75)			
Total protein, g/L	44.5 (32.5–48)	40 (34.5–45)	46 (40–48.5)
Glucose, g/L	0.93 (0.82–1.02)	1.39 (1.13–1.52)	0.84 (0.57–1.16)
LDH (IU/L)	676 (404–806)	654 (275–835)	542 (353–801)
Diagnosed by			
Blind pleural biopsy	—	—	1 (1.35%)
Thoracoscopy	24 (68.6%)	20 (71.4%)	49 (66.2%)
Surgery	7 (20%)	8 (28.6%)	23 (31.1%)
Guided biopsy (TDM or US)	4 (10.4%)	—	1 (1.35%)
Asbestos exposure, n (%)			
Yes	9 (25.8)	22 (78.6)	56 (75.7)
No	22 (74.2)	4 (14.3)	8 (10.8)
Likely (but not confirmed)	0 (0)	2 (7.1)	10 (13.5)
Histology			
Epithelioid	—	—	55 (74.3%)
Sarcomatoid	—	—	6 (8.1%)
Mixed type	—	—	13 (17.6%)
Survival: median (95% CI), mo*	7 (4–10)	—	16 (12–20)
Primary tumor, n (%)			
Lung adenocarcinoma	14 (40)	—	—
Breast adenocarcinoma	9 (25.7)	—	—
Ovarian adenocarcinoma	2 (5.7)	—	—
Digestive adenocarcinoma	3 (8.6)	—	—
Unknown origin	3 (8.6)	—	—
Other	4 (11.4)	—	—

Definition of abbreviations: BPLAE = benign pleural lesions associated with asbestos exposure; CI = confidence interval; LDH = lactate dehydrogenase; Mets = pleural metastasis of carcinoma; MPM = malignant pleural mesothelioma; QR25 = 25th centile; QR75 = 75th centile; TDM = tomodesitometry; US = ultrasound.

\* Median survival was not calculated for the BPLAE group as only two (7.7%) deaths (non-asbestos-related) were noted in this group.



**TABLE 2. VALUES OF SMRP MEASURED IN SERA AND PLEURAL FLUID**

	Mets (n = 30)	BPLAE (n = 23)	MPM (n = 60)
Serum SMRP (median), nM/L	1.02	0.55*	2.05†
QR25–QR75	0.34–2.13	0.3–0.89	1.03–3.61
Min–max	0–10.2	0–1.4	0–28.84
	(n = 28)	(n = 21)	(n = 43)
Pleural SMRP (median), nM/L	6.36	6.4	46.1†
QR25–QR75	0.53–22.26	0.55–11.7	11.5–94.7
Min–max	0–52.6	0–23.3	0–320

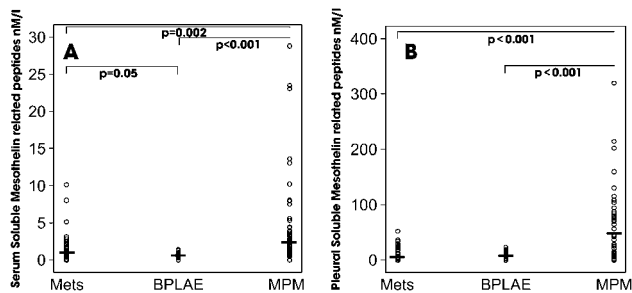
*Definition of abbreviations:* BPLAE = benign pleural lesions associated with asbestos exposure; Mets = pleural metastasis of carcinoma; MPM = malignant pleural mesothelioma; QR25 = 25th centile; QR75 = 75th centile; SMRP = soluble mesothelin-related peptide.

\* p = 0.05 versus Mets patients (nonparametric analysis of variance [ANOVA] with *post hoc* tests using Bonferroni correction).

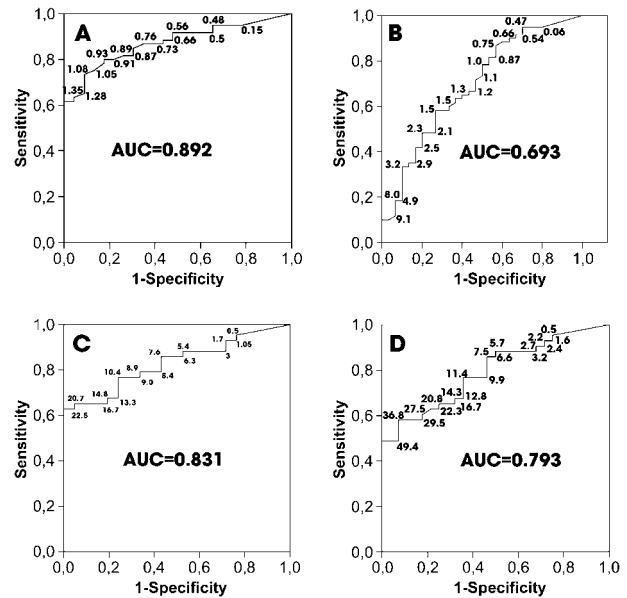
† p < 0.002 MPM versus BPLAE or Mets patients (nonparametric ANOVA with *post hoc* tests using Bonferroni correction).

nM/L (sensitivity = 80%, specificity = 82.6%; Figure 2A). The AUC for differentiating Mets and MPM was 0.693 (0.576–0.810) with a best cut-off of 1.85 nM/L (sensitivity = 58.3% and specificity = 73.3%; Figure 2B). The AUC for MPM versus all patients was 0.771 (0.683–0.858) with a cut-off greater than 1.1 nM/L (sensitivity = 71.7%, specificity = 69.8%).

As expected, in the three groups of subjects, SMRP values in pleural fluid were much higher than respective serum values (Table 2). Median pleural level was significantly higher in patients with MPM (46.1 ± 83.2 nM/L) compared with either patients with Mets (6.36 ± 21.73 nM/L) or patients with BPLAE (6.4 ± 11.1 nM/L; p < 0.001). Pleural values were low and not significantly different between patients with BPLAE and patients with Mets. When differentiating between BPLAE and MPM, ROC curve analysis showed an AUC of 0.831 (0.734–0.927) with a best statistical cut-off of 10.4 nM/L (sensitivity = 76.7%, specificity = 76.2%; Figure 2C). The AUC for pleural SMRP for differentiating Mets and MPM was 0.793 (0.691–0.894; Figure 2D). No single “best statistical cut-off” has been found in this case because SMRP values between 11.4 nM/L (sensitivity = 76%, specificity = 64%) and 36.8 nM/L (sensitivity = 58.1%, specificity = 93%) were all at about the same distance from the ideal classification point of sensitivity = 1 and specificity = 1. The AUC for MPM versus all patients was 0.809 (0.718–0.900) with two “best” cut-offs: 11.4 nm/L (sensitivity = 76.7%, specificity = 69.4%) or 20.8 nM/L (sensitivity = 65.1%, specificity = 83.7%).



**Figure 1.** Serum soluble mesothelin-related peptide values in serum (A) and pleural fluid (B). Horizontal lines are median values. BPLAE = benign pleural lesions associated with asbestos exposure; Mets = pleural metastasis of carcinoma; MPM = malignant pleural mesothelioma.



**Figure 2.** Receiver operating curves for SMRPs for diagnosing pleural mesothelioma. (A) Serum SMRPs in differentiating MPM and BPLAE. (B) Serum SMRPs in differentiating patients with MPM and carcinoma. (C) Pleural SMRPs in differentiating MPM and BPLAE. (D) Pleural SMRPs in differentiating patients with MPM and carcinoma. Numbers inside each graph represent cut-offs for SMRPs (nM/L) for each pair of sensitivity/specificity values determined by the breakpoints on the area under the receiver operating characteristic (AUC) curve.

Comparison between AUC of serum and pleural values showed similar diagnostic performance for differentiating BPLAE and MPM. Despite the fact that pleural SMRP had an AUC higher for differentiating MPM and Mets, this difference was not statistically significant when considering only the cases for which both values were available. We found a significant correlation between serum and pleural values of SMRP (Spearman’s rho = 0.666; p < 0.001). When running a discriminant analysis combining serum and pleural SMRP values to obtain a better classification of the patients, we found no statistically significant advantage over each variable taken separately. However, this analysis was done on only 73 patients from whom both serum and pleural samples were available.

We also found that the MPM epithelioid subtype had significantly higher values of serum SMRP (2.47 ± 2.63 nM/L; n = 42) than mixed subtype (0.892 ± 4.22 nM/L; n = 9; p = 0.026) or sarcomatoid subtype (1.05 ± 1.29 nM/L, p=0.06 due to the low number of patients in this group, n=5; Table 3, Figure 3). Pleural SMRP was also significantly higher in epithelioid mesothelioma compared with sarcomatoid type (p < 0.001) and mixed MPM subtype (p = 0.019). The differences between sarcomatoid MPM and mixed subtype were not statistically significant in either serum or pleural fluid (Table 3, Figure 3).

**DISCUSSION**

MPM is still a very challenging problem because its incidence is increasing all over the world, linked to a widespread exposure to asbestos. To date, there is no efficient or established curative treatment strategy of the tumor. To increase treatment effectiveness, an early and reliable diagnosis of MPM is needed. This has been difficult to achieve using only clinical and radiologic data. The management of MPM would be improved if guided

**TABLE 3. LEVEL OF SOLUBLE MESOTHELIN-RELATED PEPTIDE ACCORDING TO THE PATHOLOGIC SUBTYPE OF MALIGNANT PLEURAL MESOTHELIOMA**

	Epithelioid (n = 42)	Mixed type (n = 9)	Sarcomatoid (n = 5)
Serum SMRP, median	2.47*	0.892	1.05
QR25-QR75	1.21-3.84	0.5-4.72	0.42-1.97
Min-max	0.6-28.84	0-13.7	0-2.4
	(n = 31)	(n = 6)	(n = 4)
Pleural SMRP, median	72.7†	10.48	5.96
QR25-QR75	29.3-108.8	6-32.9	1.12-8.02
Min-max	0-320	1-94.7	0-8.2

Definition of abbreviations: QR25 = 25th centile; QR75 = 75th centile; SMRP = soluble mesothelin-related peptide.

\* p < 0.05 versus mixed-type group.

† p < 0.05 versus mixed type or sarcomatoid type.

by reliable markers (27). A few markers have been proposed in MPM, but none are used routinely (28). By evaluating new biological markers, such as SMRPs in both blood and pleural fluid in a large panel of patients, our goal was to address a crucial clinical question: Can we find new tools to easily differentiate patients with MPM from those with benign asbestos exposure-related lesions or pleural metastasis of carcinoma?

In agreement with other reports, we confirmed here that serum SMRP level is significantly higher in patients with MPM than in subjects exposed to asbestos with pleural benign disease, or in those with Mets. The median value of serum SMRPs in our series is similar for the BPLAE group to the one reported by Pass and colleagues (29) (1.166  $\mu\text{M/L}$ ; range, 0.004-2.821  $\mu\text{M/L}$ ), but is lower in the group of MPM (2.05 compared with 17.27 nM/L). However, the ROC curve analysis for differentiating MPM and BPLAE shows an AUC of 0.872, which is higher than reported by Pass and colleagues (29) (i.e., 0.793), especially if we take into account that these authors compared their MPM group versus a "normal volunteers" group and an "asbestos-exposed non-MPM" group together. The characteristics of these two last groups are not clearly described because the "normal volunteers" group presented pleural effusion, and it was not specified if patients of the "asbestos-exposed non-MPM" group had benign pleural disease. Because SMRP serum measures reported by Robinson and coworkers (22) were only expressed as optic absorbance values, we were unable to directly compare their results with our data. However, in our study, sensitivity and specificity of the SMRP test were much lower than those reported by Robinson and coworkers' study (22). When we tried in our study to optimize both sensitivity and specificity of the test, the best

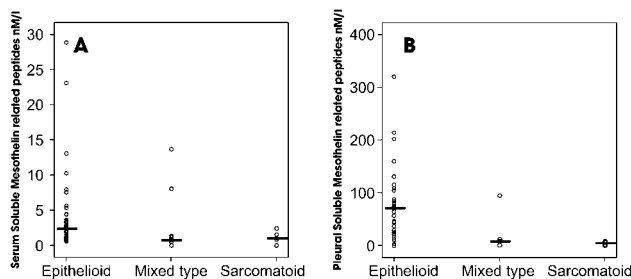
cut-off for serum SMRPs was 0.93  $\mu\text{M/L}$ , with sensitivity = 80% and specificity = 82.6%. To achieve similar specificity as reported by Robinson and colleagues (22) (i.e., higher than 95%), we had to set the cut-off at 1.3  $\mu\text{M/L}$ , which resulted in only 63.3% sensitivity.

Pleural values of SMRPs from non-MPM patients in our study were lower than those previously reported (29) (18.997 nM/L; range, 0.291-140.121), but similar in both studies for patients with MPM (65.573 nM/L; range, 0.421-255.166, compared with values in Table 2). Areas under ROC curves were slightly higher than reported by Pass and colleagues (29). Pleural SMRP assessment exhibited diagnostic power similar to serum SMRP. The AUC for pleural SMRPs was slightly higher than for serum SMRPs but the difference was not statistically significant. However, it is important to stress that both pleural fluid and serum were not available in all patients; therefore, pleural SMRPs were compared with serum SMRPs in a limited number of patients and thus the difference did not reach significance.

The ability to discriminate the MPM group vs. the secondary pleural carcinomas (Mets) group by serum SMRP was low. This is due, in part, to high serum levels of SMRP in some patients with Mets. When we tried to maximize both sensitivity and specificity of this marker, we obtained values of sensitivity = 58.3% and specificity = 73.3%, for a cut-off of 1.85 nM/L. Because specificity is the most desired feature in this goal, we would need to choose a cut-off of 3.2  $\mu\text{M/L}$  to obtain at least 90% specificity, which gives a sensitivity of only 33.3%. In addition to serum SMRP assessment, evaluation of pleural fluid SMRPs could be helpful to separate MPM and Mets groups, since a cut-off of 41 nM/L in pleural fluid resulted in a specificity of over 90% and a sensitivity of 53% (for 100% specificity, the cut-off is 55 nM/L, with 50% sensitivity). Thus, our data suggest that serum SMRPs could be a useful marker for diagnosis of pleural mesothelioma in patients with pleural abnormalities associated with asbestos exposure. However, negative results should be interpreted with caution.

As previously suggested from the observation of a few asbestos-exposed subjects, an initially high serum level of SMRPs in patients with BPLAE may predict development of mesothelioma in the subsequent years of follow-up (22). However, mesothelioma may develop slowly (30), and high levels of serum SMRPs in these three "healthy" patients could reflect the presence of small foci of mesothelioma that were not initially detected. In our opinion, association of pleural abnormalities and high SMRP levels in asbestos-exposed patients should be managed "aggressively" to exclude MPM or Mets diagnosis. Such strategy would need to be validated by a thorough prospective trial. On the basis of our study, the use of serum SMRP as an MPM screening marker may not reach sufficient sensitivity with adequate specificity; to reach a sensitivity of more than 90 to 95% (a cut-off between 0.5 and 0.6  $\mu\text{M/L}$ ), the specificity falls down to very low levels (between 30 and 50%). However, established tumor markers, such as prostate-specific antigen (PSA), exhibit similar or even lower test performances: PSA has a sensitivity for detecting cancer of approximately 75% but a specificity of only 40%, even if the identification of other molecular forms of PSA within serum has recently led to a new era in PSA markers (31).

Robinson and colleagues have already suggested that the operative characteristics of the test would likely be less favorable when investigating a larger number of patients in conditions similar to day-to-day practice (22). This prediction has been confirmed in our multicenter study where all patients were consecutively recruited over a short period of time in 20 different hospitals. This could result in minimizing potential recruiting bias compared with a selected retrospective study (29) or evaluation of patients only recruited in MPM-dedicated centers (22).



**Figure 3.** Serum (A) and pleural (B) SMRPs in different pathologic subtypes of MPM. Horizontal lines are median values.

Second, our series included about 50% more patients than both previous reports (22, 29) with more patients with Mets.

Previous reports have shown that mesothelin is significantly expressed at the mRNA and protein levels in a variety of tumoral localizations. Thus, our results were consistent with previous studies from McIntosh and colleagues (23), Scholler and colleagues (16), and Pass and colleagues (29) who reported high levels of SMRP in ovarian, breast, colon, and non-small cell lung carcinomas. However, it should be taken into account that mesothelin is a membrane-bound protein and the mechanism of release of its soluble form is still unknown. Therefore, every cancer expressing mesothelin on the surface of tumor cells would not automatically be associated with elevated levels of SMRPs.

Another finding is that a significantly elevated level of SMRPs was found only in epithelioid mesothelioma but not in sarcomatoid type, as already suggested by Robinson and colleagues (22). Interestingly, Ordonez has reported that only epithelioid mesothelioma cells are positive for mesothelin staining (32). Some patients with mixed-type MPM also had elevated values of serum SMRPs as probed by the high interquartile range. It can be speculated that the level of serum SMRPs is correlated to the percentage of the epithelioid component in the tumor.

Recently, Pass and coworkers suggested that serum osteopontin may be used as a screening marker for MPM in an asbestos-exposed population, with a sensitivity of 77.6% and a specificity of 85.5%, at a cut-off value of 48.3 ng/ml of osteopontin (33). However, serum osteopontin level is not specific to MPM as it has been found elevated in other cancers or nonmalignant diseases (34). Thus, the diagnostic value of serum osteopontin in MPM remains to be investigated in larger series of patients, including subjects with BPLAE and in patients with Mets (27).

In conclusion, we evaluated the performance of serum SMRPs as a diagnostic marker of patients with MPM using a newly available commercial kit. The operational characteristics of the kit were lower than previously obtained with the laboratory test. We showed that pleural fluid SMRP is a biological marker at least as interesting as serum SMRP, and potentially better able to differentiate MPM from pleural metastatic carcinomas. However, the pathologic study of pleural biopsies remains the gold standard in the diagnosis of MPM. Additional investigations in a larger panel of subjects will be necessary to demonstrate the usefulness of blood and pleural fluid SMRPs in the management of MPM treatment.

**Conflict of Interest Statement:** None of the authors have a financial relationship with a commercial entity that has an interest in the subject of this manuscript.

**Acknowledgment:** The following medical centers and investigators were involved in the study: University Hospital of Lille (J.-J. Lafitte, C.-H. Marquette, A.-B. Tonnel, P. Ramon, A. Scherpereel, S. Leroy, A. Wurtz, H. Porte, M. Conti, R. Akkad), University Hospital of Nantes (M. Gregoire), Clinique du Bois-Lille (J.-M. Faillon, S. Jaillard, Y. Rogeaux, C. Croxo), Clinique de la Louvière-Lille (T. Gentina, J.-C. Bout, B. Douay, E. Mensier, M. Debaert), Denain (J.-P. Grignet, L. Kedziora, P. Desmarest), Roubaix (N. Just, F. Steenhouwer), Valenciennes (B. Stach, A. Courbot, G. Demarcq, J.-P. Roux, F. Radenne), Armentieres (L. Boudoux, N. Boumaad), Lens (J.-Y. Tavernier, B. Chevalon, F. Desliers, H. Guenanen, I. Barrage), Dunkerque (E. Lelieur-Lepoivre, C. Deroubaix, L. Brillet, C. Rousselot, F. Dohen-Becue), Calais (V. Cliquennois, V. Tack), Saint-Omer (P. Richard, A. Boileau), Henin-Beaumont (R. Roboubi, E. Fournier), Lievin (D. Musielak), Bethune (J. Soots, C. Mordacque), Douai (M.-C. Florin, E. Maetz, S. Desurmont), Cambrai (F. Le Baron), Centre Oscar Lambret-Lille (E. Dansin), Saint-Philibert Hospital-Lomme (P. Mulliez), Tourcoing (X. Ficheroule), Maubeuge (M. Derollez). The authors also thank Dr. Steven M. Albelda from University of Pennsylvania (Philadelphia) for his helpful suggestions.

## References

- Robinson BW, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005;366:397-408.
- Pass HI, Vogelzang N, Hahn S, Carbone M. Malignant pleural mesothelioma. *Curr Probl Cancer* 2004;28:93-174.
- Ordonez NG. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1031-1051.
- Hegmans JPJ, Hemmes A, Aerts JG, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. Immunotherapy of murine malignant mesothelioma using tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:1168-1177.
- Ebstein F, Sapede C, Royer P-J, Marcq M, Ligeza-Poisson C, Barbieux I, Cellerin L, Dabouis G, Gregoire M. Cytotoxic T cell responses against mesothelioma by apoptotic cell-pulsed dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;169:1322-1330.
- Sterman DH, Recio A, Vachani A, Sun J, Cheung L, DeLong P, Amin KM, Litzky LA, Wilson JM, Kaiser LR, et al. Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clin Cancer Res* 2005;11:7444-7453.
- Cao XX, Mohiuddin I, Ece F, McConkey DJ, Smythe WR. Histone Deacetylase Inhibitor Downregulation of bcl-xl gene expression leads to apoptotic cell death in mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:562-568.
- Rump A, Morikawa Y, Tanaka M, Minami S, Umesaki N, Takeuchi M, Miyajima A. Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem* 2004;279:9190-9198.
- Chang K, Pai LH, Pass H, Pogrebniak HW, Tsao MS, Pastan I, Willingham MC. Monoclonal antibody K1 reacts with epithelial mesothelioma but not with lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 1992;16:259-268.
- Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:136-140.
- Ordonez NG. Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Mod Pathol* 2003;16:192-197.
- Hornick JL, Lauwers GY, Odze RD. Immunohistochemistry can help distinguish metastatic pancreatic adenocarcinomas from bile duct adenomas and hamartomas of the liver. *Am J Surg Pathol* 2005;29:381-389.
- Ordonez NG. Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1418-1428.
- Watanabe H, Okada G, Ohtsubo K, Yamaguchi Y, Mouri H, Motoo Y, Wakabayashi T, Sawabu N. Expression of mesothelin mRNA in pure pancreatic juice from patients with pancreatic carcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas, and chronic pancreatitis. *Pancreas* 2005;30:349-354.
- Gilks CB, Vanderhyden BC, Zhu S, van de Rijn M, Longacre TA. Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expression profiling. *Gynecol Oncol* 2005;96:684-694.
- Scholler N, Fu N, Yang Y, Ye Z, Goodman GE, Hellstrom KE, Hellstrom I. Soluble member(s) of the mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:11531-11536.
- Drapkin R, Crum CP, Hecht JL. Expression of candidate tumor markers in ovarian carcinoma and benign ovary: evidence for a link between epithelial phenotype and neoplasia. *Hum Pathol* 2004;35:1014-1021.
- Frierson HF Jr, Moskaluk CA, Powell SM, Zhang H, Cerilli LA, Stoler MH, Cathro H, Hampton GM. Large-scale molecular and tissue microarray analysis of mesothelin expression in common human carcinomas. *Hum Pathol* 2003;34:605-609.
- Liebig B, Brabletz T, Staeger MS, Wulfanger J, Riemann D, Burdach S, Ballhausen WG. Forced expression of deltaN-TCF-1B in colon cancer derived cell lines is accompanied by the induction of CEACAM5/6 and mesothelin. *Cancer Lett* 2005;223:159-167.
- Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:13790-13795.
- Hassan R, Bera T, Pastan I. Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res* 2004;10:3937-3942.
- Robinson BW, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N, Winzell P, Hellstrom KE, Hellstrom I. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 2003;362:1612-1616.
- McIntosh MW, Drescher C, Karlan B, Scholler N, Urban N, Hellstrom KE, Hellstrom I. Combining CA 125 and SMR serum markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol* 2004;95:9-15.
- American Thoracic Society. Diagnosis and initial management of nonmalignant diseases related to asbestos. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:691-715.

25. Conover WJ, Iman RL. Analysis of covariance using the rank transformation. *Biometrics* 1982;38:715-724.
26. Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 1983;148:839-843.
27. Cullen MR. Serum osteopontin levels: is it time to screen asbestos-exposed workers for pleural mesothelioma? *N Engl J Med* 2005;353:1617-1618.
28. Hillerdal G, Lindqvist U, Engstrom-Laurent A. Hyaluronan in pleural effusions and in serum. *Cancer* 1991;67:2410-2414.
29. Pass H, Wolaniuk D, Wali A, Thiel A, Hellstrom I, Hellstrom K, Sardesai N. Soluble mesothelin related peptides: a potential biomarker for malignant pleural mesothelioma [abstract]. *J Clin Oncol* 2005;23:9532.
30. Robinson BW, Robinson C, Lake RA. Localised spontaneous regression in mesothelioma: possible immunological mechanism. *Lung Cancer* 2001;32:197-201.
31. Jain S, Bhojwani AG, Mellon JK. Improving the utility of prostate specific antigen (PSA) in the diagnosis of prostate cancer: the use of PSA derivatives and novel markers. *Postgrad Med J* 2002;78:646-650.
32. Ordonez NG. The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between mesothelioma and renal cell carcinoma: a comparative study. *Hum Pathol* 2004;35:697-710.
33. Pass HI, Lott D, Lonardo F, Harbut M, Liu Z, Tang N, Carbone M, Webb C, Wali A. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med* 2005;353:1564-1573.
34. Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer* 2004;90:1877-1881.

## **ARTICLE VIII**

### **Osteopontin and soluble mesothelin-related peptides in pleural mesothelioma diagnosis and prognosis**

Bogdan-Dragos Grigoriu\*, Arnaud Scherpereel\*, Patrick Devos, Bachar Chahine, Marc Letourneux, Pierre Lebailly, Marc Grégoire, Henri Porte, Marie-Christine Copin, and Philippe Lassalle

Article en révision

\* Both authors contributed equally to this work

## **Osteopontin and soluble mesothelin-related peptides in pleural mesothelioma diagnosis and prognosis**

<sup>1,2</sup>Bogdan-Dragos Grigoriu\*, MD, <sup>1,3</sup>Arnaud Scherpereel\*, MD, PhD, <sup>4</sup>Patrick Devos, <sup>3</sup>Bachar Chahine, <sup>5</sup>Marc Letourneux, MD, <sup>6</sup>Pierre Lebailly, Ph.D, <sup>7</sup>Marc Grégoire, PhD, <sup>8</sup>Henri Porte, MD, PhD, <sup>9</sup>Marie-Christine Copin, MD, PhD, and <sup>1</sup>Philippe Lassalle, MD, PhD.

<sup>1</sup>INSERM Unit 774, Institut Pasteur de Lille, France

<sup>2</sup>Department of Pulmonary Diseases, University of Medicine and Pharmacy, Iasi, Romania

<sup>3</sup>Pulmonary and Thoracic Oncology Department, CHRU of Lille, France

<sup>4</sup>Statistics Department, Medical School of Lille, France

<sup>5</sup>Equipe ERI3 Inserm "Cancers et Populations", CHU of Caen, France

<sup>6</sup>Centre François Baclesse, GRECAN EA-1772, Université of Caen, France

<sup>7</sup>INSERM Unit 601 - IFR26, Nantes, France

<sup>8</sup>Department of Thoracic Surgery, CHRU of Lille, France

<sup>9</sup>Pathology Department, CHRU of Lille, France

\*Both authors contributed equally.

Corresponding author and reprint requests: Dr Arnaud Scherpereel, Clinique des Maladies Respiratoires, Hopital Calmette, CHRU of Lille, 59037 Lille cedex, France, Phone: 33 3 20 44 49 98, Fax number: 33 3 20 44 56 11; e-mail: a-scherpereel@chru-lille.fr

**Running title:** Osteopontin and SMRP in mesothelioma

**Text Word Count:** 3326 words

**Funding source:** Arnaud Scherpereel is supported by grants from La Ligue contre le Cancer, comite de l'Aisne (2005) and from Pneumologie Developpement (2004). Bogdan Grigoriu is a recipient of a research fellowship from the Societe de Pathologie Thoracique du Nord.

Healthy asbestos-exposed individuals surveillance program (ML) was founded by a grant from La Ligue contre le Cancer, comite du Calvados (2002)

Mesomark Elisa kit® were provided, free of charge, by CIS-Bio international (France). CIS-Bio international had no role in recruiting patients, performing assays, analyzing the data, writing or approving the manuscript.

**Descriptor:** 94 Pleural Disease

## **Abstract**

**Rationale:** mesothelioma is a highly aggressive tumour and is often diagnosed too late for a curative treatment. Serum osteopontin has been proposed as a screening marker for mesothelioma.

**Objectives:** to evaluate diagnostic value of osteopontin in 172 patients suspected of malignant pleural mesothelioma and a control group of asymptomatic asbestos-exposed individuals. We also compared osteopontin diagnostic capabilities with serum soluble mesothelin related peptides (SMRP).

**Methods:** both osteopontin and SMRP were assayed with commercial ELISA kits and results were correlated with patient's diagnosis and survival.

**Main results:** serum osteopontin was higher in MPM patients compared with asbestos exposed healthy subjects and had a good capability to distinguish these two populations. Osteopontin was unable to distinguish between MPM and pleural metastatic carcinoma or even benign pleural lesions associated with asbestos exposure (BPLAE). Neither plasma nor pleural fluid osteopontin were more powerful in diagnosing MPM though plasma osteopontin had some ability in separating neoplastic pleural involvement from patients with BPLAE or asbestos exposure. Serum mesothelin had a good ability in diagnosing MPM but is unable to identify patients with non-epithelial subtypes and has insufficient sensitivity for screening. Mesothelioma histological subtype along with serum osteopontin and serum SMRP were related to survival of mesothelioma patients and were independent prognostic factors.

**Conclusions:** Insufficient specificity limits osteopontin utility as diagnostic or screening marker. SMRP performed better for MPM diagnosis but will probably be of little value for screening. However, both markers have a potential utility as prognostic markers.

Abstract Word count: 242



## **Introduction**

The incidence of malignant pleural mesothelioma (MPM) has continuously raised in the last decades due to previous exposure to asbestos, which is the most important factor involved in MPM development(1). Mesothelioma is an extremely aggressive tumor, highly resistant to chemotherapy and to radiotherapy. Thus, significant advances in treatment of malignant mesothelioma will imply an early diagnosis in order to select candidates for therapy with curative intent(2). To date, there is no recognized marker for clinical diagnosis of mesothelioma or for screening of at-risk asbestos-exposed individuals. Recent reports have raised interest on soluble mesothelin-related peptides (SMRP) (3-5) and osteopontin (6) as possible markers for diagnosing mesothelioma. Osteopontin appears especially interesting as a potential early diagnostic marker since it has been shown to differentiate asbestos-exposed patients from stage I mesothelioma patients(6). However serious questions still remain concerning the effectiveness of this marker because its specificity and its sensitivity were not evaluated in other pleural malignancies and non malignant pleural diseases in this unique report. Moreover, osteopontin is expressed in various non pleural malignant diseases.(7-9) Osteopontin is an extracellular cell-adhesion protein involved in non-mineral bone matrix formation, but is also as a key cytokine in mediating type I immune responses(10), and was involved in regulation of metastatic spread of tumor cells(11). In fact, osteopontin was first described as being secreted by transformed malignant epithelial cells (12). High plasma osteopontin values have been found in patients with different tumors as ovarian (13) colon, breast, prostate or lung cancers (14).

Mesothelin is a physiologically expressed, membrane-bound peptide on the surface of normal mesothelial cells, and is found also expressed in various cancers including malignant mesothelioma (15), pancreatic (16) or ovarian carcinoma (15), sarcomas(16), and in some gastrointestinal (17) or pulmonary carcinomas(17-19). A soluble form derived from

membrane-bound mesothelin and termed soluble mesothelin-related peptides (SMRP) can be detected in sera from mesothelioma patients. The mechanism of release of mesothelin from the cell surface into the blood is unknown. Serum SMRP level is low in healthy subjects exposed to asbestos (3, 4).

The goal of our study was to evaluate the diagnostic value of osteopontin measured both in blood and in pleural fluid, and to compare it to SMRP, in a series of patients suspected of malignant pleural mesothelioma.

## **Material and methods**

### **Patients**

Starting May 2003, a first cohort was recruited by including all consecutive patients suspected of, or recently diagnosed with malignant pleural mesothelioma (MPM) from 20 different pulmonary or thoracic surgery departments from the North and West of France. All these patients had clinical symptoms consistent with a mesothelioma diagnostic. Exclusion criteria were any concomitant infectious disease and previous therapy against MPM. Patients were informed about inclusion in this descriptive study and none refused. Pathological diagnosis done on pleural biopsies was compliant with the recent guidelines (20).

Final diagnosis divided the patients into three groups: confirmed MPM, benign pleural lesions associated to asbestos exposure (BPLAE group), and pleural metastasis of carcinomas (Mets group). Therapy assigned to patients with MPM was decided after a multi-speciality staff which included surgeons, medical oncologists, radiotherapists and pneumologists. Irradiation of chest wall drainage points (with 21 Gray in 7 fractions) was done for all MPM patients including those under supportive care. A subset of the 172 recruited patients (119 cases, 63 with MPM, 31 with Mets and 25 with BPLAE) were already included in our previous report assessing the value of SMRP in MPM diagnosis (4).

We also recruited between December 2001 and June 2004 a cohort of 112 subjects who were occupationally exposed to asbestos. They were working in a single facility involved in textile and friction material processing. They were subsequently followed in the Occupational Medicine Department. These subjects had no clinical complaint, and none of them developed an asbestos-related mesothelioma, benign pleural effusion or pulmonary carcinoma during their follow-up.

A standard operating procedure concerning patients sampling and data retrieval was set in place at inclusion. Serum and ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)-anticoagulated

plasma samples, as well as pleural fluid samples (retrieved without anticoagulant) if available, were collected from each patient and stored at -80°C in aliquots until analyzed. Clinical data and outcome of the patients were also collected.

### **ELISA assays**

All assays were performed in a single laboratory (INSERM unit 774). Assays for osteopontin were performed in serum, plasma and pleural fluid using the human osteopontin kit from Immuno-Biological Laboratories (Hamburg, Germany). Serum and pleural levels of soluble mesothelin-related peptide were assayed with a commercial ELISA kit (MESOMARK™, CIS bio International, Gif/Yvette, France) according to manufacturer instructions and results were expressed in nM/l.

### **Statistical analysis**

All data are reported as median and interquartile range (IQR) as well as mean with standard deviation (SD) and standard error of the mean (SEM). Comparisons between groups were performed using both Kruskal Wallis test and a non parametric ANOVA after rank transformation as suggested by Conover (21). The Bonferoni correction was applied for multiple comparisons in *post hoc* tests. Areas under ROC curves (AUC) are reported with their 95% confidence intervals (CI) in parenthesis. Comparisons of AUC were done as suggested by Hanley using values available for both parameters (22). Unavailable data were coded as missing. A discriminant analysis was performed in order to seek combinations of different assays results which would result in a better classification of the patients)

A Cox proportional hazard model was used to examine associations between the various parameters and survival. Survival was defined as the number of weeks from the date of pathological diagnosis until the date of death if the patient died or until the date of last follow-up visit. Patients still alive at last follow-up were considered censored. The cut-off value for serum assays which best differentiate survivors and non survivors were determined by an

algorithm of maximization of hazard ratio (23, 24). The log-rank test statistic was used to compare differences in survival between groups. For all tests a two-sided p value of less than 0.05 was considered significant. Statistical calculations were performed with SPSS statistical package (version 12.0F, SPSS, Chicago, IL, USA) and the SAS system (V8.2, Cary, NC, USA).

*Role of the funding source*

The funding source had no role in the study design, data collection, data analysis and interpretation or writing or approving the manuscript. The corresponding author had full access to the data and had the final responsibility for submitting the paper.

## Results

### Diagnostic value of serum osteopontin

We recruited a total of 112 healthy subjects previously exposed to asbestos (AE group) and 172 patients with pleural abnormalities and a suspected diagnosis of MPM (of these 43 were patients with Mets, 33 patients with BPLAE and 96 patients with MPM) (details in Table I). Healthy asbestos-exposed subjects (AE) were subsequently followed in the occupational medicine department for a median time of 26 months (IQR 7 – 30 months). None of them developed a MPM or another malignant disease during the follow-up period. As expected, serum osteopontin values were low in this group with a median of 34.7 ng/ml (IQR 21.8- 43.5 ng/ml). Compared with asbestos exposed patients, higher serum osteopontin levels were found in patients with BPLAE (median 50.4 ng/ml; IQR 29.6 -118.8 ng/ml,  $p=0.006$ ), MPM (median 69.9 ng/ml, IQR 29.9 – 145.1 ng/ml,  $p=0.001$ ) and Mets (median 89.8 ng/ml, IQR 40.5 – 412.7 ng/ml,  $p=0.001$ ) (Figure 1A). Interestingly, we found no statistically significant difference for serum osteopontin between the three groups of patients (MPM, Mets and BPLAE) ( $p >0.38$  for all comparisons). Serum osteopontin has a good ability to distinguish between patients with MPM and asbestos-exposed healthy subjects (AE) with an area under the ROC curve (AUC) of 0.724 (95% CI 0.650 – 0.798) (Figure 1C). However, serum osteopontin could not distinguish between MPM patients and either BPLAE (AUC 0.567 95% CI 0.456 – 0.678) or Mets patients (AUC 0.421 95% CI 0.312 – 0.531). Serum osteopontin retained a significant ability to distinguish any pleural involvement (either MPM, Mets or BPLAE) and asbestos exposed individuals with no clinical complaints (AUC = 0.735 95% CI 0.677 – 0.793). In this respect, the best cut-off with a good sensitivity and a fair specificity was 68 ng/ml which offered a sensitivity of 94.6% and a specificity of 51.5% (figure 1D). Osteopontin is cleaved by thrombin after blood coagulation and serum values are much lower than corresponding plasma values. We therefore investigated if plasma values could be more

useful in this respect on a subset of 131 patients from which plasma was available. Serum and plasma osteopontin values were highly correlated (Pearson  $r^2 = 0.732$ ,  $p < 0.001$ ). Interestingly higher plasma osteopontin levels were found in the Mets group (Median 1176 ng/ml IQR 569.4 – 2719) compared to MPM patients (Median 682.6 IQR 423.7 – 1063) and to BPLAE patients (Median 420.5 ng/ml IQR 320 - 687)  $p < 0.02$  for all comparisons). ROC curve analysis showed similar values for area under ROC curve when differentiating MPM from Mets (AUC 0.689, 95% CI 0.579 – 0.798, with higher values for Mets group) or BPLAE (AUC of 0.677, 95% CI 0.562 – 0.792). Plasma osteopontin retained a significant ability to discriminate between neoplastic pleural lesions (MPM or Mets) and BPLAE (AUC of 0.729, 95% CI 0.631 – 0.827).

#### **Diagnostic value of serum SMRP.**

We also investigated serum level of SMRP in order to compare its diagnostic value to osteopontin. Low serum levels were found for SMRP in both AE and BPLAE groups (Figure 1B) and slightly higher values in Mets patients (Figure 1B). MPM patients had significant higher values for SMRP (median 1.94 nM/l, IQR 1.03- 4.07 nM/l,  $p < 0.001$  versus each Mets, BPLAE and AE group). Serum SMRP had a good capability to distinguish between MPM patients and AE subjects (AUC 0.866 95% CI 0.811 – 0.920) (Figure 1C), BPLAE (AUC 0.834 95% CI 0.755 – 0.912) or Mets patients (AUC 0.719 95% CI 0.624 – 0.814).

Comparisons between diagnostic ability of osteopontin and SMRP favour the later with a significant higher AUC in all comparisons ( $p < 0.001$ ). Whatever comparison group was chosen (AE, BPLAE or Mets), the serum SMRP cut-off value which offered about 95% sensitivity in detecting MPM was 0.4 nM/l. In all cases, the specificity ranged between 20% and 25%.

#### **Pleural Values of osteopontin and SMRP.**

Pleural osteopontin values were slightly higher in the MPM group than in patients with metastatic carcinoma (Mets) or benign pleural lesions (BPLAE) but differences did not reach statistical significance (Figure 2A). Consequently, pleural osteopontin had no value for differentiating those types of pleural lesions. Interestingly we found no correlation between pleural and serum or plasma values of osteopontin ( $r < 0.038$ ,  $p > 0.74$  for both tests). On the contrary, pleural SMRP value was significantly higher in patients with MPM than either BPLAE or Mets patients ( $p = 0.001$  for both comparisons). The area under the ROC curves for pleural SMRP differentiating MPM and BPLAE patients was 0.829 (95 CI 0.740 – 0.918), and was lower when differentiating MPM and Mets (AUC 0.758 95% CI 0.664 – 0.853). Pleural levels of SMRP had no better diagnostic value than serum levels since AUC for serum and pleural SMRP were similar irrespective of the comparison (MPM vs. Mets or MPM vs. BPLAE) contrary to the trend we previously reported (4).

### **Osteopontin and SMRP as prognostic factors**

We also investigated if SMRP and osteopontin could be related to survival in the subgroups of patients with MPM. Indeed, as SMRP is secreted by the tumor itself, it could reflect tumor burden. Follow-up data were not available from five patients, lost for follow-up after the initial inclusion visit. Thus only 91 patients were included in the analysis. Survival data from all the 43 patients with ADK and 33 patients with BPLAE was available (Table II). Median survival was lower in Mets than in MPM patients. In the subgroup of Mets patients, neither age, sex, primary tumor localisation, SMRP (serum or pleural) or osteopontin (serum, plasma or pleural) were predictors of the survival. In the MPM group, neither age, sex nor pleural values of SMRP and osteopontin were related to survival. Patients with sarcomatoid mesothelioma subtype had a significantly shorter survival (median 5 months 95% CI 3-7 months) than patients with epithelial (median 17 months 95% CI 11-23 months) or biphasic subtype (median 17 months 95% CI 6 - 28) ( $p = 0.002$  log rank test) (Table II and Figure 3A).



In MPM patients, a significant relationship with survival was found for serum SMRP, serum and plasma osteopontin. However serum osteopontin had a higher hazard ratio than plasma osteopontin, which was not subsequently introduced in the multivariate model.

Cut-off values of 3.5 nM/l for serum SMRP and 350 ng/ml for serum osteopontin were calculated in order establish groups with different outcomes. Patients with a high SMRP level (>3.5 nM/l) had a median survival of 7 months (95% CI 3 – 11 months) compared to 19 months (95% CI 13 – 25) for the low SMRP group (p=0.003 log rank test) (figure 3B).

Similarly, patients with a high serum osteopontin (i.e. > 350 ng/ml) had a significantly shorter survival (median 5 months 95% CI 2 – 8 months) than patients with low serum osteopontin level (median 15 months 95% CI 11 – 19 months)(Figure 3C).

Therefore the parameters introduced in the multivariate survival analysis were restricted to mesothelioma subtype and serum values of SMRP and osteopontin. Values for SMRP and osteopontin were introduced either as continuous values or as binary variables with the cut-off already determined. In both cases, all three parameters retained statistical significance (Table II).

## Discussion

Mesothelioma is a highly aggressive cancer which is often diagnosed up to 30 to 40 years after asbestos exposure. Since tumor growth is generally insidious and the clinical signs (dyspnoea, cough, chest pain) are unspecific, MPM diagnosis is generally obtained too late for a curative treatment. Modern combined chemotherapy has only a limited effect on disease progression even if it offers a small, but significant longer survival (25). Thus, disease markers have been searched in an attempt to help early diagnosis but none has been proven to be reliable in clinical practice yet. Recently, osteopontin has been proposed as an early marker for MPM diagnosis (6). In this first report, osteopontin serum level was related to duration of asbestos exposure and had a good ability to discriminate between asymptomatic asbestos-exposed individuals and early stage mesothelioma patients. However, this study did not include patients with diffuse pleural thickening and/or a benign pleural effusion related to asbestos neither patients with pleural metastasis of carcinoma, two common clinical situations from which MPM need to be differentiated. In addition, osteopontin expression and elevated circulating levels has been demonstrated in other pulmonary diseases (26) and a variety of tumoral localizations including lung cancer (27-29). Thus doubt has been raised about the potential utility of this marker (7). Our results are similar with those of Pass et al (6), who reported a mean osteopontin value of 30 ng/ml (standard error of the mean - SEM of 3 ng/ml) in exposed patients and 133 ng /ml (SEM 10 ng/ml) in patients with MPM. However, contrary to this previous report, we found a significant number of mesothelioma patients with very low serum osteopontin values (Figure 1A). Serum osteopontin has a good ability to discriminate between patients with MPM and asbestos-exposed healthy subjects. However, serum osteopontin has a lower AUC than serum SMRP and therefore is less accurate in classifying patients according to our results. Moreover, osteopontin was unable to discriminate patients with MPM from BPLAE or Mets patients. Osteopontin could be eventually used as a primary

marker in order to select patients for a more invasive evaluation (i.e. thoracoscopy). With an osteopontin cut-off of 68 ng/ml, sensitivity of the test would be 94.7% but with a specificity only of 51.5%. This means that roughly half of the patients without pleural involvement would have a positive test and therefore be false positive. High serum osteopontin levels may identify patients with any pleural involvement (and probably with other pulmonary and extra thoracic malignant tumors). With these limitations in mind, osteopontin seems superior to SMRP as a screening marker as SMRP would offer roughly only a specificity of 20 % for a sensitivity of at least 95%. However, the use of osteopontin as a screening marker is expected to be difficult since incidence of the disease is very low, even in the asbestos-exposed population, and consequently most patients with a positive test will be in fact false positive. Thus, performing a thoracoscopy with multiple pleural biopsies (the gold standard for MPM diagnosis) in all osteopontin positive patients seems inadvisable. At best, osteopontin could be used as a first step selection marker combined with a more specific assay in the subgroup of osteopontin positive patients. We also found elevated levels of osteopontin in patients with pleural diseases other than mesothelioma. Thus osteopontin assay was of little use as a diagnostic marker.

However it should be taken into account that osteopontin is a complex molecule and there are several distinct forms/proteolytic fragments of osteopontin (reviewed in (30)). Therefore quantification of other soluble isoforms/proteolytic fragments of osteopontin could possibly give better results. Serum soluble mesothelin related peptides (SMRP) did better than osteopontin as a MPM diagnostic marker in our series. However SMRP levels are low in non-epithelial MPM (4). Therefore sensitivity and specificity of SMRP alone are insufficient for use as a screening marker despite a good specificity. Combining both osteopontin a first step selection followed by assessment of serum SMRP did not result in a better classification of patients than using mesothelin alone. Using mesothelin alone would result in more false



produced, secreted and involved in mesothelioma tumor progression. Kinetic studies will also be important to assess the value of these markers in monitoring patient response to therapy. In conclusion, we confirm that malignant pleural mesothelioma patients have higher levels of serum osteopontin than asbestos-exposed individual but this finding is of little diagnostic value because it could not differentiate between MPM, pleural metastatic carcinoma or even benign pleural lesions associated with asbestos exposure.

## References

1. Robinson BW, Musk AW, Lake RA. Malignant mesothelioma. *Lancet* 2005;366:397-408.
2. Sugarbaker DJ, Flores RM, Jaklitsch MT, Richards WG, Strauss GM, Corson JM, DeCamp MM, Jr., Swanson SJ, Bueno R, et al. Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:54-63; discussion 63-55.
3. Robinson BW, Creaney J, Lake R, Nowak A, Musk AW, de Klerk N, Winzell P, Hellstrom KE, Hellstrom I. Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet* 2003;362:1612-1616.
4. Scherpereel A, Grigoriu BD, Conti M, Gey T, Gregoire M, Copin M-C, Devos P, Chahine B, Porte H, et al. Soluble Mesothelin-related Protein in the Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2006;173:1155-1160.
5. Hassan R, Remaley AT, Sampson ML, Zhang J, Cox DD, Pingpank J, Alexander R, Willingham M, Pastan I, et al. Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:447-453.
6. Pass HI, Lott D, Lonardo F, Harbut M, Liu Z, Tang N, Carbone M, Webb C, Wali A. Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med* 2005;353:1564-1573.
7. O'Regan AW, Serlin D, Berman JS. Asbestos exposure and serum osteopontin. *N Engl J Med* 2006;354:304-305.

8. Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B, Manseau EJ, Tognazzi K, Perruzzi CA, Dvorak HF, Senger DR. Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol* 1994;145:610-623.
9. Chambers AF, Wilson SM, Kerkvliet N, O'Malley FP, Harris JF, Casson AG. Osteopontin expression in lung cancer. *Lung Cancer* 1996;15:311-323.
10. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, et al. Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000;287:860-864.
11. Wai PY, Kuo PC. The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res* 2004;121:228-241.
12. Senger DR, Wirth DF, Hynes RO. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell* 1979;16:885-893.
13. Kim JH, Skates SJ, Uede T, Wong KK, Schorge JO, Feltmate CM, Berkowitz RS, Cramer DW, Mok SC. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA* 2002;287:1671-1679.
14. Fedarko NS, Jain A, Karadag A, Van Eman MR, Fisher LW. Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:4060-4066.
15. Chang K, Pastan I. Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:136-140.
16. Ordonez NG. Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1418-1428.

17. Scholler N, Fu N, Yang Y, Ye Z, Goodman GE, Hellstrom KE, Hellstrom I. Soluble member(s) of the mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:11531-11536.
18. Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, et al. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:13790-13795.
19. Ordonez NG. The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol* 2003;27:1031-1051.
20. Galateau-Sallé FE. 2006. Pathology of Malignant Mesothelioma, 1st edition ed. Springer-Verlag New York
21. Conover WJ, Iman RL. Analysis of covariance using the rank transformation. *Biometrics* 1982;38:715-724.
22. Hanley JA, McNeil BJ. A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. *Radiology* 1983;148:839-843.
23. Contal C, O'Quigley J. An application of changepoint methods in studying the effect of age on survival in breast cancer. *Computational Statistics & Data Analysis* 1999;30:253-270.
24. Mandrekar JN, Mandrekar SJ, Cha SS. 1999. Cutpoint Determination Methods in Survival Analysis using SAS®. SAS User Group 28, Seattle, Washington. Paper 261-228.
25. Vogelzang NJ, Rusthoven JJ, Symanowski J, Denham C, Kaukel E, Ruffie P, Gatzemeier U, Boyer M, Emri S, et al. Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 2003;21:2636-2644.



26. O'Regan A. The role of osteopontin in lung disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003;14:479-488.
27. Boldrini L, Donati V, Dell'Omodarme M, Prati MC, Faviana P, Camacci T, Lucchi M, Mussi A, Santoro M, et al. Prognostic significance of osteopontin expression in early-stage non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 2005;93:453-457.
28. Donati V, Boldrini L, Dell'Omodarme M, Prati MC, Faviana P, Camacci T, Lucchi M, Mussi A, Santoro M, et al. Osteopontin expression and prognostic significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:6459-6465.
29. Hu Z, Lin D, Yuan J, Xiao T, Zhang H, Sun W, Han N, Ma Y, Di X, et al. Overexpression of osteopontin is associated with more aggressive phenotypes in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:4646-4652.
30. O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol* 2000;81:373-390.
31. Rittling SR, Chambers AF. Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer* 2004;90:1877-1881.
32. de Silva Rudland S, Martin L, Roshanlall C, Winstanley J, Leinster S, Platt-Higgins A, Carroll J, West C, Barraclough R, et al. Association of S100A4 and Osteopontin with Specific Prognostic Factors and Survival of Patients with Minimally Invasive Breast Cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1192-1200.
33. Thalmann GN, Sikes RA, Devoll RE, Kiefer JA, Markwalder R, Klima I, Farach-Carson CM, Studer UE, Chung LW. Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 1999;5:2271-2277.
34. Agrawal D, Chen T, Irby R, Quackenbush J, Chambers AF, Szabo M, Cantor A, Coppola D, Yeatman TJ. Osteopontin identified as lead marker of colon cancer progression, using pooled sample expression profiling. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:513-521.

35. Kolb A, Kleeff J, Guweidhi A, Esposito I, Giese NA, Adwan H, Giese T, Buchler MW, Berger MR, et al. Osteopontin influences the invasiveness of pancreatic cancer cells and is increased in neoplastic and inflammatory conditions. *Cancer Biol Ther* 2005;4:740-746.
36. Shimada Y, Watanabe G, Kawamura J, Soma T, Okabe M, Ito T, Inoue H, Kondo M, Mori Y, et al. Clinical significance of osteopontin in esophageal squamous cell carcinoma: comparison with common tumor markers. *Oncology* 2005;68:285-292.
37. Bramwell VH, Tuck AB, Wilson SM, Stitt LW, Cherian AK, Rorke SC, Al-Katib W, Postenka CO, Chambers AF. Expression of Osteopontin and HGF/Met in Adult Soft Tissue Tumors. *Cancer Biol Ther* 2005;4:1336-1341.

**Table I. Demographic and clinical data of recruited patients**

	<b>Mets (n=43)</b>	<b>BPLAE (n=33)</b>	<b>MPM (n=96)</b>	<b>AE (n=112)</b>
<b>Age years (mean±SD)</b>	66•1 ± 11•2	62•2 ± 10•5	65 ± 9•7	63 ± 6•8
<b>Male gender n (%)</b>	24 (56 %)	32 (97 %)	78 (81 %)	95 (84 %)
<b>Diagnosed by</b>				
- Blind Pleural Biopsy	2 (4•7 %)	-	1 (1 %)	NA
- Thoracoscopy	29 (67•4 %)	22 (66•7 %)	60 (62•5 %)	
- Surgery (VATS or open surgery)	8 (18•6 %)	11 (33•3 %)	31 (32•3 %)	
- Guided biopsy (TDM or US)	4 (9•3 %)	-	4 (4•1 %)	
<b>Confirmed asbestos exposure n (%)</b>	15 (34•9 %)	28 (84•8 %)	82 (85•4 %)	112 (100 %)
<b>Histology</b>				
Epithelial	NA	NA	73 (76•1 %)	NA
Sarcomatoid			10 (10•4 %)	
Biphasic			13 (13•5 %)	
<b>Survival: Median (95% CI) months*</b>	9 (6 – 12)	-	14 (10 - 18)	NA
<b>Primary tumor n (%)</b>				
Bronchopulmonary adenocarcinoma	22 (51•1 %)	NA	NA	NA
Breast adenocarcionoma	10 (23•2 %)			
Ovarian adenocarcinoma	2 (4•7 %)			
Digestive adenocarcinomas	3 (7 %)			
Adenocarcinoma of unknown origin	3 (7 %)			
Other	3 (7 %)			
<b>Treatment received</b>				
- Cisplatin-pemetrexed chemotherapy		NA	70 (72•9 %)	NA
- Cisplatin gemcitabine chemotherapy			5 (5•2 %)	
- Other cisplatin-based chemotherapy			5 (5•2 %)	
- Best supportive care			16 (16•7%)	
- Surgery#			10 (10•4 %)	

\* median survival was not calculated for the BPLAE group; only three deaths (9•1 %) were noted in this group, one due to one bronchial adenocarcinoma and two non-neoplastic, non asbestos related deaths.

#Nine patients undergone an extra-pleural pneumonectomy and one patient pleural decortication;

all patients subjected to surgery received an multimodal therapy including cisplatin-pemetrexed chemotherapy and thoracic irradiation (xx Gray).

NA = not applicable, US = Ultrasound; Mets = pleural metastasis of carcinoma; BPLAE = benign pleural lesions associated with asbestos exposure; MPM = malignant pleural mesothelioma. CI = Confidence interval;

**Table II Survival analysis in malignant pleural mesothelioma (MPM) patients**

Parameters	Categories	Univariate analysis		Multivariate analysis	
		HR (95% CI)	P	HR (95% CI)	P
Histological subtype	Epithelial	-	-	-	-
	Biphasic	0•91 (0•37 - 2•24)	0•848	0•943 (0•350 - 2•539)	0•908
	Sarcomatoid	4•08 (1•72-9•66)	0•001	6•683 (2•525- 17•683)	0•001
Serum SMRP	Continuous	1•06 (1•02 - 1•10)	0•001	1•059 (1•012 - 1•109)	0•013
	> 3•5 nM/l	2•39 (1•247 - 4•583)	0•009	2•785 (1•384 - 5•607)	0•004
Pleural SMRP	Continuous	0•994 (0•988 - 1•001)	0•118	NA	NA
Serum osteopontin	Continuous	1•003 (1•001 - 1•004)	< 0•001	1•002 (1•001 - 1•003)	0•006
	> 350 ng/ml	5•263 (1•875 - 14•777)	0•002	3•459 (1•098 - 10•895)	0•034
Plasma osteopontin	Continuous	1•001 (1•000 - 1•001)	0•001	NA	NA
Pleural osteopontin	Continuous	1•000	0•259	NA	NA

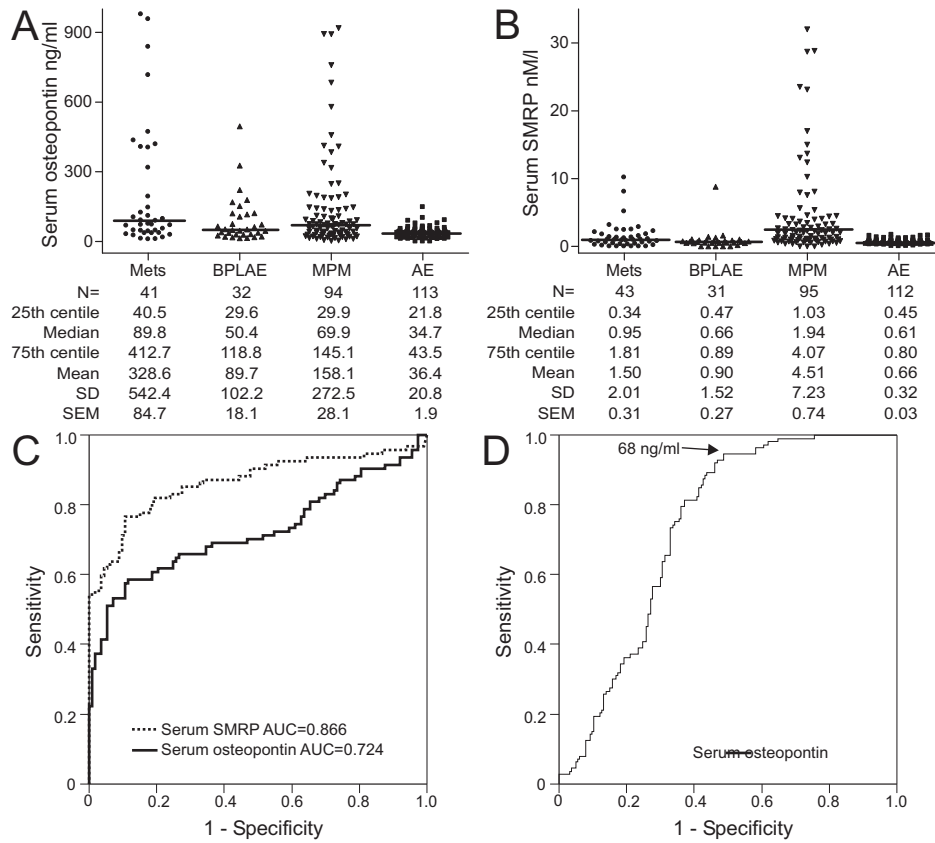


Figure 1. Diagnostic value of serum osteopontin and SMRP in patients with malignant pleural Mesothelioma. A. Serum osteopontin values in MPM patients compared with pleural metastasis (Mets), benign pleural lesions associated with asbestos exposure (BPLAE) and healthy asbestos exposed subjects (AE group). B. Serum SMRP in same patients. For both A and B: horizontal line denotes median values SD denotes standard deviation, SEM denotes standard error of the mean. C. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve for SMRP and mesothelin when differentiating between MPM and healthy asbestos exposed subjects (AE group). D. ROC curve for serum osteopontin differentiating patients with any pleural involvement (MPM, BPLAE or Mets) and healthy asbestos exposed patients. AUC denotes Area under ROC curve.

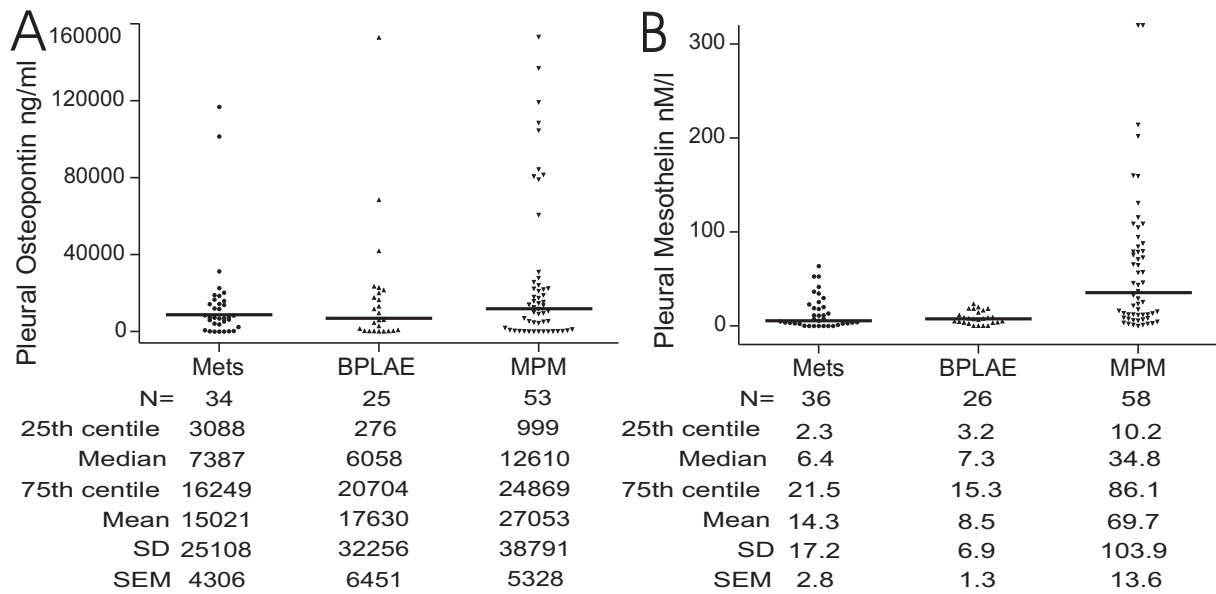


Figure 2 Pleural values of osteopontin (A) and SMRP (B) in patients with malignant pleural mesothelioma (MPM), Pleural metastasis of carcinoma (Mets) and Benign pleural lesions associated with asbestos exposure (BPLAE). Horizontal lines denote median values.

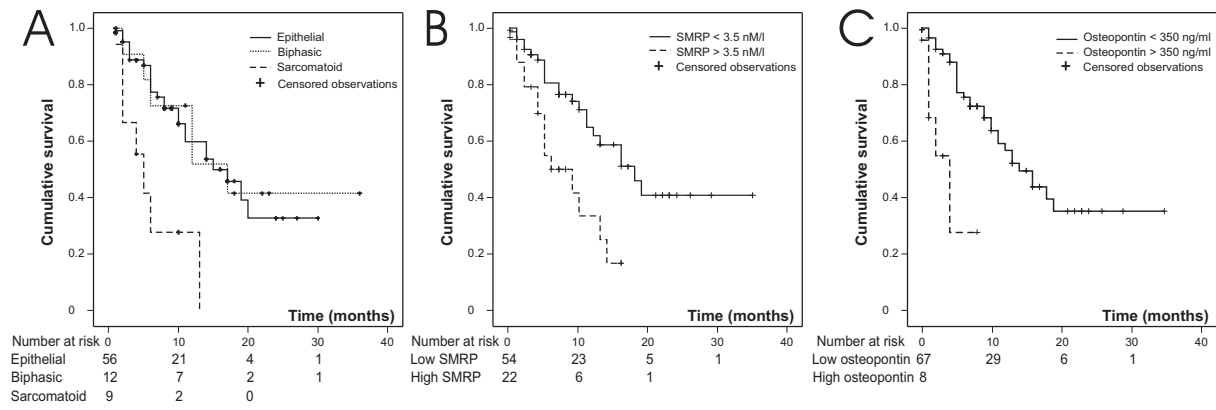


Figure 3 Kaplan Meyer Survival curves in the subgroup of patients with malignant pleural mesothelioma. A. Difference between different mesothelioma histological subtypes. B. Survival in patients with high (>3.5 nM/l) or low (<3.5 nM/l) serum SMRP C. Survival curves according to High (>350 ng/ml) and low (<350 ng/ml) serum osteopontin. Number under each graph represents mean numbers of individuals at risk for each period.



## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

Endocan est un protéoglycane endothélial cloné dans le laboratoire il y a une dizaine d'années [355]. Il est constitué d'un polypeptide monomérique de 20 kDa et d'une chaîne unique de dermatane sulfate attachée de manière covalente au niveau de la sérine 137 [365]. Endocan est une molécule spécifique de l'endothélium [352, 373] et elle n'est produite que par un nombre très réduit de cellules non endothéliales [329, 382]. Endocan est sécrété normalement dans le torrent circulatoire [356, 364] et des taux élevés d'endocan ont été retrouvés chez les patients septiques [364] ou ayant un cancer bronchopulmonaire évolué [317, 362]. La sécrétion d'endocan est augmentée par des médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 [355, 364] et par des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le FGF-2 [316, 373].

On ne connaît pas à ce jour la fonction physiologique d'endocan. Nous ne disposons pas encore de souris Knock-out *esm*<sup>-/-</sup> et nous ne savons pas si cet animal serait viable. Ce modèle permettrait d'étudier l'implication d'endocan dans diverses pathologies d'une manière plus élégante.

Les données dont nous disposons sur les fonctions d'endocan sont essentiellement le résultat d'expériences *in vitro*. On sait à ce jour qu'endocan peut interagir avec l'intégrine LFA-1 et que sa fixation à la surface des leucocytes est augmentée si ceux-ci sont stimulés (par le PMA par exemple) [383]. L'interaction d'endocan avec le LFA-1 a une importance fonctionnelle puisque endocan est capable d'inhiber la fixation de l'ICAM-1 sur LFA-1 *in vitro*.

Nous avons réussi à démontrer pendant la thèse qu'endocan est impliqué dans la croissance des tumeurs. En effet nous avons pu montrer que *in vivo*, dans un modèle de souris SCID, la surexpression d'endocan confère à des cellules épithéliales non tumorales un potentiel tumorigène ou augmente la vitesse de croissance de tumeurs résultant de cellules provenant de lignées tumorigènes. Cette action de promotion de la croissance tumorale par endocan est une action indirecte puisque endocan n'a pas d'action autocrine ni d'action angiogénique directe. En effet, endocan ne se fixe pas à la surface de la cellule endothéliale. Dans le modèle de prolifération des HUVECs induite par le FGF-2, l'addition d'endocan recombinant ou l'ajout d'anticorps anti-endocan neutralisant l'endocan endogène, ne modifie pas la prolifération des HUVECs [362]. La surexpression d'endocan ne modifie pas non plus la prolifération de différents clones cellulaires. Enfin, l'inhibition de l'expression d'endocan par des oligonucléotides antisens ne modifie pas la formation de vaisseaux sanguins *in vitro* induite par le VEGF et le FGF-2 [359].

L'action d'endocan passe donc par plusieurs voies paracrines. Endocan agit sur les cellules épithéliales en favorisant l'action mitogène du HGF/SF via son glycanes [365]. Il est également probable qu'endocan intervienne dans l'action de divers autres facteurs de croissance/cytokines par l'intermédiaire de son glycanes de type dermatane sulfate. En effet un nombre important de protéines basiques interagissent avec les dermatanes sulfates [489] et dans le laboratoire des travaux parallèles ont montré qu'endocan lie les chimiokines CCL5, CCL11, CCL17, CXCL10, ainsi que le FGF-2, de manière dépendante de sa partie glycanique. Des tests de chimiotaxie montrent une inhibition du recrutement par le CCL11, CCL17, CXCL10 et le CCL5 en présence d'endocan des basophiles de la lignée KU812 (Ralainirina N, données non publiées).

La présence du glycanes semble essentielle à son activité puisque l'absence de celui-ci lui fait perdre son action pro-tumorale sur la lignée HEK 293. Cette hypothèse est également soutenue par le fait que la forme endocan $\Delta$ 2 qui est un protéoglycane facultatif perd son action protumorale. Nous avons également démontré que l'endocan murin, qui est également un protéoglycane facultatif n'a pas de pouvoir protumoral.

Il est également intéressant de noter que la production d'endocan est corrélée avec une autre molécule soutenant la croissance tumorale, le VEGF. En effet, le VEGF, induit la sécrétion d'endocan *in vitro* et au niveau de l'ARNm il existe une corrélation significative entre endocan et VEGF.

Endocan est donc une molécule protumorale qui pourrait également refléter la stimulation angiogénique d'une tumeur. Se pose donc, de manière légitime, la question du

rôle d'endocan dans les tumeurs humaines. Des données antérieures liaient la surexpression du gène d'endocan à un pronostic défavorable des cancers pulmonaires, du sein ou de la prostate. Nous avons réussi à démontrer qu'endocan est surexprimé également au niveau protéique dans les cancers bronchiques non à petites cellules. L'intensité de cette expression traduite par les taux sériques élevés d'endocan, est corrélée avec le pronostic des patients. Il est intéressant de noter que les taux élevés d'endocan sont associés avec des métastases à distance plus fréquentes et possiblement par une invasion ganglionnaire plus avancée. Les données que nous avons obtenues sont néanmoins insuffisantes pour savoir si endocan est juste un reflet d'un stade avancé de la tumeur ou si l'expression d'endocan confère un pouvoir invasif plus important aux cellules néoplasiques. Il sera donc nécessaire de recourir à des modèles animaux plus sophistiqués pouvant modéliser, au moins en partie, le processus métastatique. L'utilisation des souris génétiquement modifiées et des modèles tumoraux orthotopiques devra être envisagée afin de pouvoir répondre à cette question. Il faudra néanmoins porter une attention toute particulière à l'interprétation des résultats obtenus par la « manipulation » de l'endocan murin puisque comme nous l'avons démontré, celui-ci a des caractéristiques biochimiques et fonctionnelles différentes de la forme humaine avec l'absence de l'épissage alternatif et une glycosylation facultative.

Un autre élément important apporté par notre travail sont les données concernant la régulation de la sécrétion d'endocan. En effet, nous avons pu démontrer qu'endocan est sécrété sous l'influence du VEGF et qu'endocan pourrait être le reflet de la stimulation angiogénique d'une tumeur. Des efforts importants ont été faits ces dernières années pour développer des thérapies ciblant l'angiogénèse tumorale. Actuellement, il existe un médicament déjà commercialisé, le bevacizumab, au moins une dizaine de candidats en test précliniques et cliniques et probablement beaucoup plus dans les cartons des chercheurs. Toutefois nous n'avons à ce jour aucun élément qui nous permet de juger de l'efficacité d'un traitement angiogénique et d'évaluer le moment où la tumeur échappe à ce type de thérapie [322]. L'évaluation de la réponse objective n'est pas adapté à ce type de traitement et les marqueurs existants sont soit difficiles à interpréter (taux circulants de VEGF par exemple) soit difficiles à mettre en œuvre (nombre de cellules endothéliales circulantes [490] ou l'imagerie vasculaire fine [491]). L'identification d'un tel marqueur de la réponse endothéliale pourrait être également intéressante pour évaluer précocement l'effet d'autres thérapies plus « classiques » comme la radiothérapie dont l'effet passe au moins en partie par une atteinte de l'endothélium [492]. Sur la base des données existantes nous pouvons spéculer qu'endocan pourrait représenter un tel marqueur. Cette hypothèse est soutenue pas les

résultats obtenus sur des patients septiques qui montrent qu'endocan est corrélé à d'autres marqueurs d'activation endothéliale et surtout à la gravité et à la survie des patients. Il serait donc très intéressant d'évaluer la relation entre les taux d'endocan (et surtout leur cinétique) sous traitement anti-angiogénique et l'évolution tumorale et la survie des patients.

Un deuxième volet concernant l'implication d'endocan dans la croissance tumorale comprend son utilité non pas comme marqueur mais comme cible antitumorale. Sur les modèles animaux nous avons pu montrer que les anticorps antiendocan diminuent la croissance tumorale et que cet effet est dépendant de la présence de leucocytes intra-tumoraux. Nous avons également montré que la surexpression de diverses formes mutées d'endocan qui entraînent un ralentissement de la croissance tumorale est associé à une augmentation de l'infiltration leucocytaire. Il est possible que ces formes mutées d'endocan ralentissent la croissance tumorale par recrutement de leucocytes intra tumoraux. En effet les données préliminaires indiquent que ces formes mutés gardent la possibilité de se fixer sur le LFA-1 (Lassalle P, données non publiées)

Endocan pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique qui aurait l'avantage d'avoir deux points d'impacts : de priver la tumeur de l'action de certains facteurs de croissance et d'augmenter le recrutement de cellules immunes dans la tumeur. Néanmoins les données dont nous disposons proviennent seulement de modèles animaux immunodéprimés et il est nécessaire de démontrer que les mêmes mécanismes sont efficaces chez des animaux immunocompétents.

Endocan pourrait également être impliqué dans d'autres pathologies non tumorales. Endocan intervient dans la croissance tumorale en modulant l'effet des facteurs de croissance mais aussi par sa capacité potentielle de diminuer le recrutement de cellules inflammatoires au niveau tumoral. En effet, endocan est capable d'interagir avec les leucocytes circulants en se fixant sur le LFA-1 et en inhibant l'interaction LFA-1/ICAM-1[383]. L'interaction ICAM-1 avec les intégrines beta2 est essentielle à l'adhésion des leucocytes à l'endothélium, une étape capitale dans la transmigration leucocytaire vers les tissus. De plus nous avons démontré *in vivo* sur des vaisseaux isolés de mésentère de rat que les anticorps anti-endocan augmentent le rolling mais surtout l'adhésion des leucocytes à l'endothélium.

Il est donc possible qu'endocan représente un point de contrôle endothélial qui tend à limiter l'infiltration leucocytaire tissulaire. Ce mécanisme pourrait être plus général et s'appliquer également à d'autres pathologies (notamment inflammatoires). Nous manquons toutefois d'arguments directs pour soutenir cette hypothèse et il sera nécessaire d'étudier de

manière plus précise l'effet d'endocan sur les différentes étapes qui interviennent dans la migration des leucocytes du torrent circulatoire vers les tissus.

Une partie importante de mon travail pendant la thèse a été dédiée à l'étude des marqueurs diagnostiques et pronostiques dans le mésothéliome pleural malin. Cette tumeur connaît actuellement une croissance constante de son incidence. Au plan mondial « l'épidémie » de mésothéliomes s'aggrave de manière constante car dans nombreux pays en voie de développement l'amiante est encore largement répandue. Aujourd'hui nous ne disposons pas de moyens diagnostiques précoces et le plus souvent nous sommes limités à proposer aux patients une thérapie palliative. Nous avons étudié une série de plus de 150 patients présentant soit un mésothéliome pleural malin soit des métastases pleurales d'un adénocarcinome soit une fibrose pleurale bénigne liée à l'exposition à l'amiante. Nous avons été surpris de constater que dans le sous-groupe de mésothéliomes pleuraux malins les taux d'endocan ne sont pas corrélés avec le pronostic des patients même si l'angiogénèse et la réponse immune jouent un rôle important dans l'évolution du mésothéliome [493]. Néanmoins nous avons pu montrer qu'endocan apporte une information pronostique dans le sous-groupe de patients ayant un carcinome pleural métastatique (données non présentées) confirmant ainsi nos données publiées.

Nous avons étudié sur cette population de mésothéliomes pleuraux l'utilité diagnostique et pronostique de deux nouveaux marqueurs l'ostéopontine et la SMRP. Nous avons pu montrer que la SMRP tant au niveau sérique que dans le liquide pleural est un bon marqueur diagnostique du mésothéliome pleural. Nos données ont montré que la SMRP pourrait être utilisée afin d'orienter le diagnostic des mésothéliomes pleuraux de type épithélioïde. Les résultats concernant l'ostéopontine sont plus nuancés. En effet les taux d'ostéopontine sont élevés chez les patients ayant un mésothéliome (comme l'avait suggéré Pass et coll [404]) mais ce marqueur est incapable de différencier un mésothéliome d'une atteinte pleurale métastatique d'un carcinome. La capacité de l'ostéopontine est également limitée pour différencier une atteinte pleurale néoplasique d'une pleurésie bénigne liée à l'amiante. Les deux marqueurs apportent une information pronostique indépendante.

La véritable question que soulève ces résultats est l'utilité pratique de ces marqueurs car à ce jour (et d'autant plus dans le futur) il nous semble inconcevable de poser le diagnostic d'une néoplasie quelconque sans avoir une confirmation anatomopathologique fiable. En dehors de l'utilisation comme marqueurs pronostiques, deux situations cliniques pourraient être envisagées. Premièrement il s'agit des patients qui ont une exposition à l'amiante prouvée et des signes cliniques et radiologiques francs d'atteinte pleurale (plaques ou surtout

pleurésie). Chez ce type de patient, en cas de valeur élevée de la SMRP, la probabilité d'avoir un mésothéliome est élevée. En cas de nécessité on pourrait aller jusqu'à proposer au patient de refaire une thoracoscopie (si les premières biopsies pleurales ne font pas le diagnostic) car cela influe fortement sur le pronostic du malade et a également des implications administratives lourdes (reconnaissance et indemnisation du patient).

Une deuxième situation concerne le dépistage des mésothéliome pleuraux malins chez les patients exposés à l'amiante. A ce jour il n'y a pas de consensus concernant le suivi de ces patients. La réalisation d'investigations radiologiques (scanners thoraciques principalement) répétées n'a pas encore démontré son efficacité dans l'amélioration du pronostic de ces malades. On pourrait dans ces conditions spéculer qu'un ou plusieurs marqueurs sériques comme la SMRP et/ou l'ostéopontine pourraient permettre d'identifier précocement les patients avec un mésothéliome pleural malin comme l'a déjà suggéré Robinson [400]. Même si cette approche semble prometteuse plusieurs écueils théoriques sont prévisibles.

En premier lieu il faudrait disposer d'un traitement efficace pour ces patients, ce qui revient à démontrer qu'une chirurgie précoce avec ou sans chimio-/radiothérapie associée offre un gain de survie significatif.

En deuxième lieu pour juger de l'utilité pratique d'un test il ne suffit pas de prendre en compte la sensibilité et la spécificité du test. En fait, il est plus utile de juger les valeurs prédictives positives et négatives, éléments qui sont calculés en prenant en compte l'incidence de la maladie dans la population étudiée. Dans le cas concret des patients fortement exposés à l'amiante qui ont plus de 55-60 ans le calcul théorique du nombre de cas de mésothéliome qui devraient apparaître par an serait d'environ 2 à 5 cas pour 1000 patients exposés à l'amiante. Avec un test ayant une sensibilité de 85-90% et une spécificité supérieure à 90% la majorité des patients positifs seraient en fait des faux positifs. Dans ces conditions l'utilité de ce test est discutable [487]. Les valeurs de sensibilité/spécificité prises en compte plus haut sont proches de celles retrouvées pour la mésothéline et l'ostéopontine. Cependant il est possible que la combinaison des deux marqueurs puisse apporter une information supplémentaire et il est également nécessaire de voir quels sont le type de faux positifs engendrés par ce test. Car si les « faux » positifs sont représentés par un spectre réduit d'autres pathologies graves (voir néoplasiques) le dépistage pourrait éventuellement apporter une amélioration de la prise en charge de ces patients. Il est donc nécessaire de réaliser rapidement des études de cohorte qui vont nous apporter les éléments nécessaires pour répondre à toutes ces questions.

## RÉFÉRENCES

1. Updated projections of global mortality and burden of disease, 2002-2030: data sources, methods and results. Geneva: WHO, 2005.
2. Jemal, A., Murray, T., Ward, E., Samuels, A., Tiwari, R.C., Ghafoor, A., Feuer, E.J., Thun, M.J., Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin*, 2005. **55**(1): p. 10-30.
3. Évolution de l'incidence et de la mortalité par cancer en France de 1978 à 2000 Saint Maurice: Institut de Veille Sanitaire, 2002.
4. OMS, *Rapport sur la santé en Europe 2002*, ed. Organisation Mondiale de la Santé, B.r.d.l.E. 2002, Copenhague.
5. Sugimura, H., Yang, P., Long-term Survivorship in Lung Cancer: A Review. *Chest*, 2006. **129**(4): p. 1088-1097.
6. Flehinger, B.J., Kimmel, M., Melamed, M.R., The effect of surgical treatment on survival from early lung cancer. Implications for screening. *Chest*, 1992. **101**(4): p. 1013-1018.
7. Hakama, M., Chamberlain, J., Day, N.E., Miller, A.B., Prorok, P.C., Evaluation of screening programmes for gynaecological cancer. *Br J Cancer*, 1985. **52**(4): p. 669-673.
8. Bach, P.B., Kelley, M.J., Tate, R.C., McCrory, D.C., Screening for Lung Cancer: A Review of the Current Literature. *Chest*, 2003. **123**(90010): p. 72S-82.
9. Mulshine, J.L., New Developments in Lung Cancer Screening. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(14): p. 3198-3202.
10. Sawyers, C., Targeted cancer therapy. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 294-297.
11. Robinson, B.W., Lake, R.A., Advances in malignant mesothelioma. *N Engl J Med*, 2005. **353**(15): p. 1591-1603.
12. Robinson, B.W., Musk, A.W., Lake, R.A., Malignant mesothelioma. *Lancet*, 2005. **366**(9483): p. 397-408.
13. Pass, H.I., Vogelzang, N., Hahn, S., Carbone, M., Malignant pleural mesothelioma. *Curr Probl Cancer*, 2004. **28**(3): p. 93-174.
14. Pass, H.I., Bocchetta, M., Carbone, M., Evidence of an important role for SV40 in mesothelioma. *Thorac Surg Clin*, 2004. **14**(4): p. 489-495.
15. Vogelzang, N.J., Rusthoven, J.J., Symanowski, J., Denham, C., Kaukel, E., Ruffie, P., Gatzemeier, U., Boyer, M., Emri, S., Manegold, C., Niyikiza, C., Paoletti, P., Phase III study of pemetrexed in combination with cisplatin versus cisplatin alone in patients with malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*, 2003. **21**(14): p. 2636-2644.
16. Sugarbaker, D.J., Flores, R.M., Jaklitsch, M.T., Richards, W.G., Strauss, G.M., Corson, J.M., DeCamp, M.M., Jr., Swanson, S.J., Bueno, R., Lukanich, J.M., Baldini, E.H., Mentzer, S.J., Resection margins, extrapleural nodal status, and cell type determine postoperative long-term survival in trimodality therapy of malignant pleural mesothelioma: results in 183 patients. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1999. **117**(1): p. 54-63; discussion 63-55.

17. Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 2004. **10**(8): p. 789-799.
18. Balmain, A., Cancer genetics: from Boveri and Mendel to microarrays. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(1): p. 77-82.
19. Nowell, P., Hungerford, D., A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Science*, 1960. **132**: p. 1488-1501.
20. Nordling, C.O., A new theory on cancer-inducing mechanism. *Br J Cancer*, 1953. **7**: p. 68-72
21. Knudson, A.G., Jr., Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. **68**(4): p. 820-823.
22. Cavenee, W.K., Dryja, T.P., Phillips, R.A., Benedict, W.F., Godbout, R., Gallie, B.L., Murphree, A.L., Strong, L.C., White, R.L., Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature*, 1983. **305**(5937): p. 779-784.
23. Lane, D.P., Crawford, L.V., T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*, 1979. **278**(5701): p. 261-263.
24. Linzer, D.I., Levine, A.J., Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 1979. **17**(1): p. 43-52.
25. Hanahan, D., Weinberg, R.A., The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000. **100**(1): p. 57-70.
26. Fedi, P., Tronick, S., Aarason, S., *Growth factors*, in *Cancer medicine*, Holland, J., Bast, R., Morton, D., Frei, E., Kufe, D. and Weichselbaum, R., Editors. 1997, Williams and Wilkins: Baltimore. p. 41-64.
27. Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., McGuire, W.L., Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*, 1987. **235**(4785): p. 177-182.
28. Reindl, C., Spiekermann, K., From kinases to cancer: leakiness, loss of autoinhibition and leukemia. *Cell Cycle*, 2006. **5**(6): p. 599-602.
29. Giancotti, F.G., Ruoslahti, E., Integrin signaling. *Science*, 1999. **285**(5430): p. 1028-1032.
30. Hunter, T., Oncoprotein networks. *Cell*, 1997. **88**(3): p. 333-346.
31. Weinberg, R.A., The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell*, 1995. **81**(3): p. 323-330.
32. Lowe, S.W., Cepero, E., Evan, G., Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 307-315.
33. DePinho, R.A., The age of cancer. *Nature*, 2000. **408**(6809): p. 248-254.
34. Hahn, W.C., Meyerson, M., Telomerase activation, cellular immortalization and cancer. *Ann Med*, 2001. **33**(2): p. 123-129.
35. Folkman, J., Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*, 1971. **285**(21): p. 1182-1186.
36. Folkman, J., What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst*, 1990. **82**(1): p. 4-6.
37. Folkman, J., Cole, P., Zimmerman, S., Tumor behavior in isolated perfused organs: in vitro growth and metastases of biopsy material in rabbit thyroid and canine intestinal segment. *Ann Surg*, 1966. **164**(3): p. 491-502.
38. Cruz, A., Rizzo, V., De Fouw, D.O., Microvessels of the chick chorioallantoic membrane uniformly restrict albumin extravasation during angiogenesis and endothelial cytodifferentiation. *Tissue Cell*, 1997. **29**(3): p. 277-281.
39. O'Reilly, M.S., *Antiangiogenesis: basic principles and preclinical models*, in *Principles and Practice of the Biologic Therapy of Cancer*, Rosenberg, S.A., Editor. 2000, Lippincott Williams & Wilkins Publishers. p. 827-843.
40. Radisky, D., Hagios, C., Bissell, M.J., Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin Cancer Biol*, 2001. **11**(2): p. 87-95.
41. Hahn, W.C., Weinberg, R.A., Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med*, 2002. **347**(20): p. 1593-1603.
42. Paget, S., The distribution of secondary growths in cancer of the breast. *The Lancet*, 1889. **133**(3421): p. 571-573.
43. Mintz, B., Illmensee, K., Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975. **72**(9): p. 3585-3589.
44. Duran-Reynals, F., Freire, P.M., The age of the tumor-bearing hosts as a factor conditioning the transmissibility of the Rous sarcoma by filtrates and cells. *Cancer Res*, 1953. **13**(4-5): p. 376-382.
45. Dolberg, D.S., Bissell, M.J., Inability of Rous sarcoma virus to cause sarcomas in the avian embryo. *Nature*, 1984. **309**(5968): p. 552-556.
46. Bissell, M.J., Weaver, V.M., Lelievre, S.A., Wang, F., Petersen, O.W., Schmeichel, K.L., Tissue structure, nuclear organization, and gene expression in normal and malignant breast. *Cancer Res*, 1999. **59**(7 Suppl): p. 1757-1763s; discussion 1763s-1764s.
47. Washington, C., Dalbague, F., Abreo, F., Taubenberger, J.K., Lichy, J.H., Loss of heterozygosity in fibrocystic change of the breast: genetic relationship between benign proliferative lesions and associated carcinomas. *Am J Pathol*, 2000. **157**(1): p. 323-329.



48. Deng, G., Lu, Y., Zlotnikov, G., Thor, A.D., Smith, H.S., Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. *Science*, 1996. **274**(5295): p. 2057-2059.
49. Sternlicht, M.D., Kedeshian, P., Shao, Z.M., Safarians, S., Barsky, S.H., The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(11): p. 1949-1958.
50. Ronnov-Jessen, L., Petersen, O.W., Bissell, M.J., Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev*, 1996. **76**(1): p. 69-125.
51. Sager, R., Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(3): p. 952-955.
52. Liotta, L.A., Kohn, E.C., The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*, 2001. **411**(6835): p. 375-379.
53. Brown, L.F., Guidi, A.J., Schnitt, S.J., Van De Water, L., Iruela-Arispe, M.L., Yeo, T.K., Tognazzi, K., Dvorak, H.F., Vascular stroma formation in carcinoma in situ, invasive carcinoma, and metastatic carcinoma of the breast. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(5): p. 1041-1056.
54. Tlsty, T.D., Hein, P.W., Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. *Curr Opin Genet Dev*, 2001. **11**(1): p. 54-59.
55. Park, C.C., Bissell, M.J., Barcellos-Hoff, M.H., The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today*, 2000. **6**(8): p. 324-329.
56. Ronnov-Jessen, L., Petersen, O.W., Koteliansky, V.E., Bissell, M.J., The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 1995. **95**(2): p. 859-873.
57. Weaver, V.M., Petersen, O.W., Wang, F., Larabell, C.A., Briand, P., Damsky, C., Bissell, M.J., Reversion of the malignant phenotype of human breast cells in three-dimensional culture and in vivo by integrin blocking antibodies. *J Cell Biol*, 1997. **137**(1): p. 231-245.
58. Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., Moses, H.L., Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 2004. **432**(7015): p. 332-337.
59. Folkman, J., Kalluri, R., Cancer without disease. *Nature*, 2004. **427**(6977): p. 787.
60. Cukierman, E., Tumour development due to stroma permissiveness. *J Biosci*, 2005. **30**(5): p. 551-552.
61. Maffini, M.V., Soto, A.M., Calabro, J.M., Ucci, A.A., Sonnenschein, C., The stroma as a crucial target in rat mammary gland carcinogenesis. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 8): p. 1495-1502.
62. Russo, J., Russo, I.H., DNA labeling index and structure of the rat mammary gland as determinants of its susceptibility to carcinogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 1978. **61**(6): p. 1451-1459.
63. Schedin, P., Pregnancy-associated breast cancer and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(4): p. 281-291.
64. Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., Weinberg, R.A., Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell*, 2005. **121**(3): p. 335-348.
65. Dvorak, H.F., Form, D.M., Manseau, E.J., Smith, B.D., Pathogenesis of desmoplasia. I. Immunofluorescence identification and localization of some structural proteins of line 1 and line 10 guinea pig tumors and of healing wounds. *J Natl Cancer Inst*, 1984. **73**(5): p. 1195-1205.
66. Dolberg, D.S., Hollingsworth, R., Hertle, M., Bissell, M.J., Wounding and its role in RSV-mediated tumor formation. *Science*, 1985. **230**(4726): p. 676-678.
67. Sieweke, M.H., Thompson, N.L., Sporn, M.B., Bissell, M.J., Mediation of wound-related Rous sarcoma virus tumorigenesis by TGF-beta. *Science*, 1990. **248**(4963): p. 1656-1660.
68. Bissell, M.J., Radisky, D., Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*, 2001. **1**(1): p. 46-54.
69. Ruitter, D., Bogenrieder, T., Elder, D., Herlyn, M., Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects. *Lancet Oncol*, 2002. **3**(1): p. 35-43.
70. Beacham, D.A., Cukierman, E., Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol*, 2005. **15**(5): p. 329-341.
71. Dvorak, H.F., Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*, 1986. **315**(26): p. 1650-1659.
72. Hochedlinger, K., Blelloch, R., Brennan, C., Yamada, Y., Kim, M., Chin, L., Jaenisch, R., Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes Dev*, 2004. **18**(15): p. 1875-1885.
73. Cunha, G.R., Matrisian, L.M., It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differentiation*, 2002. **70**(9-10): p. 469-472.
74. Welch, H.G., Black, W.C., Using Autopsy Series To Estimate the Disease "Reservoir" for Ductal Carcinoma in Situ of the Breast: How Much More Breast Cancer Can We Find? *Ann Intern Med*, 1997. **127**(11): p. 1023-1028.

75. Black, W.C., Welch, H.G., Advances in diagnostic imaging and overestimations of disease prevalence and the benefits of therapy. *N Engl J Med*, 1993. **328**(17): p. 1237-1243.
76. Kalluri, R., Zeisberg, M., Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(5): p. 392-401.
77. Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., O'Reilly, M.S., Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 1997. **390**(6658): p. 404-407.
78. Parangi, S., O'Reilly, M., Christofori, G., Holmgren, L., Grosfeld, J., Folkman, J., Hanahan, D., Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(5): p. 2002-2007.
79. Fidler, I.J., Modulation of the organ microenvironment for treatment of cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst*, 1995. **87**(21): p. 1588-1592.
80. Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C., Brown, R.A., Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(5): p. 349-363.
81. Parsonage, G., Filer, A.D., Haworth, O., Nash, G.B., Rainger, G.E., Salmon, M., Buckley, C.D., A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol*, 2005. **26**(3): p. 150-156.
82. Simian, M., Hirai, Y., Navre, M., Werb, Z., Lochter, A., Bissell, M.J., The interplay of matrix metalloproteinases, morphogens and growth factors is necessary for branching of mammary epithelial cells. *Development*, 2001. **128**(16): p. 3117-3131.
83. Egeblad, M., Werb, Z., New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(3): p. 161-174.
84. Overall, C.M., Kleinfeld, O., Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(3): p. 227-239.
85. De Wever, O., Mareel, M., Role of myofibroblasts at the invasion front. *Biol Chem*, 2002. **383**(1): p. 55-67.
86. Schor, S.L., Haggie, J.A., Durning, P., Howell, A., Smith, L., Sellwood, R.A., Crowther, D., Occurrence of a fetal fibroblast phenotype in familial breast cancer. *Int J Cancer*, 1986. **37**(6): p. 831-836.
87. Tsukada, T., McNutt, M.A., Ross, R., Gown, A.M., HHF35, a muscle actin-specific monoclonal antibody. II. Reactivity in normal, reactive, and neoplastic human tissues. *Am J Pathol*, 1987. **127**(2): p. 389-402.
88. Schor, S.L., Schor, A.M., Grey, A.M., Rushton, G., Foetal and cancer patient fibroblasts produce an autocrine migration-stimulating factor not made by normal adult cells. *J Cell Sci*, 1988. **90** (Pt 3): p. 391-399.
89. Durning, P., Schor, S.L., Sellwood, R.A., Fibroblasts from patients with breast cancer show abnormal migratory behaviour in vitro. *Lancet*, 1984. **2**(8408): p. 890-892.
90. Mareel, M., Leroy, A., Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev*, 2003. **83**(2): p. 337-376.
91. Kopelovich, L., Genetic predisposition to cancer in man: in vitro studies. *Int Rev Cytol*, 1982. **77**: p. 63-88.
92. Olumi, A.F., Grossfeld, G.D., Hayward, S.W., Carroll, P.R., Tlsty, T.D., Cunha, G.R., Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res*, 1999. **59**(19): p. 5002-5011.
93. Dimanche-Boitrel, M.T., Vakaet, L., Jr., Pujuguet, P., Chauffert, B., Martin, M.S., Hammann, A., Van Roy, F., Mareel, M., Martin, F., In vivo and in vitro invasiveness of a rat colon-cancer cell line maintaining E-cadherin expression: an enhancing role of tumor-associated myofibroblasts. *Int J Cancer*, 1994. **56**(4): p. 512-521.
94. Tuhkanen, H., Anttila, M., Kosma, V.M., Yla-Herttuala, S., Heinonen, S., Kuronen, A., Juhola, M., Tammi, R., Tammi, M., Mannermaa, A., Genetic alterations in the peritumoral stromal cells of malignant and borderline epithelial ovarian tumors as indicated by allelic imbalance on chromosome 3p. *Int J Cancer*, 2004. **109**(2): p. 247-252.
95. Ellsworth, D.L., Ellsworth, R.E., Love, B., Deyarmin, B., Lubert, S.M., Mittal, V., Shriver, C.D., Genomic patterns of allelic imbalance in disease free tissue adjacent to primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*, 2004. **88**(2): p. 131-139.
96. Kurose, K., Gilley, K., Matsumoto, S., Watson, P.H., Zhou, X.P., Eng, C., Frequent somatic mutations in PTEN and TP53 are mutually exclusive in the stroma of breast carcinomas. *Nat Genet*, 2002. **32**(3): p. 355-357.
97. Boudreau, N., Werb, Z., Bissell, M.J., Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(8): p. 3509-3513.
98. Boudreau, N., Bissell, M.J., *Extracellular Matrix: The Networking Solution*, in *The Cancer Handbook*, Alison, M., Editor. 2005, John Wiley & Sons, Inc. p. 209-224.
99. Dvorak, H.F., Senger, D.R., Dvorak, A.M., Fibrin as a component of the tumor stroma:

- origins and biological significance. *Cancer Metastasis Rev*, 1983. **2**(1): p. 41-73.
100. Mueller, M.M., Fusenig, N.E., Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(11): p. 839-849.
  101. Kalluri, R., Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 422-433.
  102. Roskelley, C.D., Srebrow, A., Bissell, M.J., A hierarchy of ECM-mediated signalling regulates tissue-specific gene expression. *Curr Opin Cell Biol*, 1995. **7**(5): p. 736-747.
  103. Radisky, D., Muschler, J., Bissell, M.J., Order and disorder: the role of extracellular matrix in epithelial cancer. *Cancer Invest*, 2002. **20**(1): p. 139-153.
  104. Folkman, J., D'Amore, P.A., Blood vessel formation: what is its molecular basis? *Cell*, 1996. **87**(7): p. 1153-1155.
  105. Ingber, D.E., Folkman, J., Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis in vitro: role of extracellular matrix. *J Cell Biol*, 1989. **109**(1): p. 317-330.
  106. Eliceiri, B.P., Cheresch, D.A., Adhesion events in angiogenesis. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. **13**(5): p. 563-568.
  107. O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., Folkman, J., Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997. **88**(2): p. 277-285.
  108. Maeshima, Y., Colorado, P.C., Torre, A., Holthaus, K.A., Grunkemeyer, J.A., Ericksen, M.B., Hopfer, H., Xiao, Y., Stillman, I.E., Kalluri, R., Distinct Antitumor Properties of a Type IV Collagen Domain Derived from Basement Membrane. *J. Biol. Chem.*, 2000. **275**(28): p. 21340-21348.
  109. van den Hooff, A., Stromal involvement in malignant growth. *Adv Cancer Res*, 1988. **50**: p. 159-196.
  110. Sappino, A.P., Schurch, W., Gabbiani, G., Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Lab Invest*, 1990. **63**(2): p. 144-161.
  111. Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., Zako, M., Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 729-777.
  112. Iozzo, R.V., Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu Rev Biochem*, 1998. **67**: p. 609-652.
  113. Kjellen, L., Lindahl, U., Proteoglycans: structures and interactions. *Annu Rev Biochem*, 1991. **60**: p. 443-475.
  114. Timar, J., Lapis, K., Dudas, J., Sebestyen, A., Kopper, L., Kovalszky, I., Proteoglycans and tumor progression: Janus-faced molecules with contradictory functions in cancer. *Semin Cancer Biol*, 2002. **12**(3): p. 173-186.
  115. Faassen, A.E., Schrage, J.A., Klein, D.J., Oegema, T.R., Couchman, J.R., McCarthy, J.B., A cell surface chondroitin sulfate proteoglycan, immunologically related to CD44, is involved in type I collagen-mediated melanoma cell motility and invasion. *J Cell Biol*, 1992. **116**(2): p. 521-531.
  116. Jung, Y.J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., Neckers, L., IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. *Faseb J*, 2003. **17**(14): p. 2115-2117.
  117. Delehedde, M., Deudon, E., Boilly, B., Hondermarck, H., Heparan sulfate proteoglycans play a dual role in regulating fibroblast growth factor-2 mitogenic activity in human breast cancer cells. *Exp Cell Res*, 1996. **229**(2): p. 398-406.
  118. Ohtani, H., Nakamura, S., Watanabe, Y., Mizoi, T., Saku, T., Nagura, H., Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor in carcinomas and inflammatory lesions of the human digestive tract. *Lab Invest*, 1993. **68**(5): p. 520-527.
  119. Tardieu, M., Gamby, C., Avramoglou, T., Jozefonvicz, J., Barritault, D., Derivatized dextrans mimic heparin as stabilizers, potentiators, and protectors of acidic or basic FGF. *J Cell Physiol*, 1992. **150**(1): p. 194-203.
  120. Delehedde, M., Lyon, M., Sergeant, N., Rahmoune, H., Fernig, D.G., Proteoglycans: pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001. **6**(3): p. 253-273.
  121. Nelson, R.M., Venot, A., Bevilacqua, M.P., Linhardt, R.J., Stamenkovic, I., Carbohydrate-protein interactions in vascular biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 1995. **11**: p. 601-631.
  122. Miyasaka, Y., Enomoto, N., Nagayama, K., Izumi, N., Marumo, F., Watanabe, M., Sato, C., Analysis of differentially expressed genes in human hepatocellular carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer*, 2001. **85**(2): p. 228-234.
  123. Leygue, E., Snell, L., Dotzlaw, H., Troup, S., Hiller-Hitchcock, T., Murphy, L.C., Roughley, P.J., Watson, P.H., Lumican and decorin are differentially expressed in human breast carcinoma. *J Pathol*, 2000. **192**(3): p. 313-320.
  124. Troup, S., Njue, C., Kliever, E.V., Parisien, M., Roskelley, C., Chakravarti, S., Roughley, P.J., Murphy, L.C., Watson, P.H., Reduced expression of the small leucine-rich

- proteoglycans, lumican, and decorin is associated with poor outcome in node-negative invasive breast cancer. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(1): p. 207-214.
125. Adany, R., Heimer, R., Caterson, B., Sorrell, J.M., Iozzo, R.V., Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels. *J Biol Chem*, 1990. **265**(19): p. 11389-11396.
  126. Blasco, F., Penuelas, S., Cascallo, M., Hernandez, J.L., Alemany, C., Masa, M., Calbo, J., Soler, M., Nicolas, M., Perez-Torras, S., Gomez, A., Tarrason, G., Noe, V., Mazo, A., Ciudad, C.J., Piulats, J., Expression profiles of a human pancreatic cancer cell line upon induction of apoptosis search for modulators in cancer therapy. *Oncology*, 2004. **67**(3-4): p. 277-290.
  127. Stander, M., Naumann, U., Wick, W., Weller, M., Transforming growth factor-beta and p-21: multiple molecular targets of decorin-mediated suppression of neoplastic growth. *Cell Tissue Res*, 1999. **296**(2): p. 221-227.
  128. Santra, M., Mann, D.M., Mercer, E.W., Skorski, T., Calabretta, B., Iozzo, R.V., Ectopic expression of decorin protein core causes a generalized growth suppression in neoplastic cells of various histogenetic origin and requires endogenous p21, an inhibitor of cyclin-dependent kinases. *J Clin Invest*, 1997. **100**(1): p. 149-157.
  129. Moscatello, D.K., Santra, M., Mann, D.M., McQuillan, D.J., Wong, A.J., Iozzo, R.V., Decorin suppresses tumor cell growth by activating the epidermal growth factor receptor. *J Clin Invest*, 1998. **101**(2): p. 406-412.
  130. Teicher, B.A., Maehara, Y., Kakeji, Y., Ara, G., Keyes, S.R., Wong, J., Herbst, R., Reversal of in vivo drug resistance by the transforming growth factor-beta inhibitor decorin. *Int J Cancer*, 1997. **71**(1): p. 49-58.
  131. Ladanyi, A., Gallai, M., Paku, S., Nagy, J.O., Dudas, J., Timar, J., Kovalszky, I., Expression of a decorin-like molecule in human melanoma. *Pathol Oncol Res*, 2001. **7**(4): p. 260-266.
  132. Iozzo, R.V., Moscatello, D.K., McQuillan, D.J., Eichstetter, I., Decorin is a biological ligand for the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem*, 1999. **274**(8): p. 4489-4492.
  133. Santra, M., Eichstetter, I., Iozzo, R.V., An anti-oncogenic role for decorin. Down-regulation of ErbB2 leads to growth suppression and cytodifferentiation of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2000. **275**(45): p. 35153-35161.
  134. Davies Cde, L., Melder, R.J., Munn, L.L., Mouta-Carreira, C., Jain, R.K., Boucher, Y., Decorin inhibits endothelial migration and tube-like structure formation: role of thrombospondin-1. *Microvasc Res*, 2001. **62**(1): p. 26-42.
  135. Reed, C.C., Waterhouse, A., Kirby, S., Kay, P., Owens, R.T., McQuillan, D.J., Iozzo, R.V., Decorin prevents metastatic spreading of breast cancer. *Oncogene*, 2005. **24**(6): p. 1104-1110.
  136. Grant, D.S., Yenisey, C., Rose, R.W., Tootell, M., Santra, M., Iozzo, R.V., Decorin suppresses tumor cell-mediated angiogenesis. *Oncogene*, 2002. **21**(31): p. 4765-4777.
  137. Segev, A., Nili, N., Strauss, B.H., The role of perlecan in arterial injury and angiogenesis. *Cardiovasc Res*, 2004. **63**(4): p. 603-610.
  138. Jiang, X., Couchman, J.R., Perlecan and tumor angiogenesis. *J Histochem Cytochem*, 2003. **51**(11): p. 1393-1410.
  139. Knox, S., Merry, C., Stringer, S., Melrose, J., Whitelock, J., Not all perlecans are created equal: interactions with fibroblast growth factor (FGF) 2 and FGF receptors. *J Biol Chem*, 2002. **277**(17): p. 14657-14665.
  140. Mohan, P.S., Spiro, R.G., Characterization of heparan sulfate proteoglycan from calf lens capsule and proteoglycans synthesized by cultured lens epithelial cells. Comparison with other basement membrane proteoglycans. *J Biol Chem*, 1991. **266**(13): p. 8567-8575.
  141. SundarRaj, N., Fite, D., Ledbetter, S., Chakravarti, S., Hassell, J.R., Perlecan is a component of cartilage matrix and promotes chondrocyte attachment. *J Cell Sci*, 1995. **108** (Pt 7): p. 2663-2672.
  142. Tapanadechopone, P., Tumova, S., Jiang, X., Couchman, J.R., Epidermal transformation leads to increased perlecan synthesis with heparin-binding-growth-factor affinity. *Biochem J*, 2001. **355**(Pt 2): p. 517-527.
  143. Tufvesson, E., Westergren-Thorsson, G., Alteration of proteoglycan synthesis in human lung fibroblasts induced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Cell Biochem*, 2000. **77**(2): p. 298-309.
  144. Weiser, M.C., Belknap, J.K., Grieshaber, S.S., Kinsella, M.G., Majack, R.A., Developmental regulation of perlecan gene expression in aortic smooth muscle cells. *Matrix Biol*, 1996. **15**(5): p. 331-340.
  145. Cohen, I.R., Murdoch, A.D., Naso, M.F., Marchetti, D., Berd, D., Iozzo, R.V., Abnormal expression of perlecan proteoglycan in metastatic melanomas. *Cancer Res*, 1994. **54**(22): p. 5771-5774.
  146. Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G., Yayon, A., Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell*, 1994. **79**(6): p. 1005-1013.

147. Timar, J., Jeney, A., Kovalszky, I.I., Kopper, L., Role of Proteoglycans in Tumor Progression. *Pathol Oncol Res*, 1995. **1**(1): p. 85-93.
148. Aviezer, D., Iozzo, R.V., Noonan, D.M., Yayon, A., Suppression of autocrine and paracrine functions of basic fibroblast growth factor by stable expression of perlecan antisense cDNA. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(4): p. 1938-1946.
149. Adatia, R., Albini, A., Carlone, S., Giunciuglio, D., Benelli, R., Santi, L., Noonan, D.M., Suppression of invasive behavior of melanoma cells by stable expression of antisense perlecan cDNA. *Ann Oncol*, 1997. **8**(12): p. 1257-1261.
150. Sharma, B., Handler, M., Eichstetter, I., Whitelock, J.M., Nugent, M.A., Iozzo, R.V., Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Clin Invest*, 1998. **102**(8): p. 1599-1608.
151. Knox, S., Fosang, A.J., Last, K., Melrose, J., Whitelock, J., Perlecan from human epithelial cells is a hybrid heparan/chondroitin/keratan sulfate proteoglycan. *FEBS Lett*, 2005. **579**(22): p. 5019-5023.
152. Vigny, M., Ollier-Hartmann, M.P., Lavigne, M., Fayein, N., Jeanny, J.C., Laurent, M., Courtois, Y., Specific binding of basic fibroblast growth factor to basement membrane-like structures and to purified heparan sulfate proteoglycan of the EHS tumor. *J Cell Physiol*, 1988. **137**(2): p. 321-328.
153. Handler, M., Yurchenco, P.D., Iozzo, R.V., Developmental expression of perlecan during murine embryogenesis. *Dev Dyn*, 1997. **210**(2): p. 130-145.
154. Iozzo, R.V., Cohen, I.R., Grassel, S., Murdoch, A.D., The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem J*, 1994. **302** ( Pt 3): p. 625-639.
155. Timar, J., Ladanyi, A., Lapis, K., Moczar, M., Differential expression of proteoglycans on the surface of human melanoma cells characterized by altered experimental metastatic potential. *Am J Pathol*, 1992. **141**(2): p. 467-474.
156. Filmus, J., Selleck, S.B., Glypicans: proteoglycans with a surprise. *J Clin Invest*, 2001. **108**(4): p. 497-501.
157. Matsuda, K., Maruyama, H., Guo, F., Kleeff, J., Itakura, J., Matsumoto, Y., Lander, A.D., Korc, M., Glypican-1 is overexpressed in human breast cancer and modulates the mitogenic effects of multiple heparin-binding growth factors in breast cancer cells. *Cancer Res*, 2001. **61**(14): p. 5562-5569.
158. Filmus, J., Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology*, 2001. **11**(3): p. 19R-23R.
159. Jalkanen, M., Elenius, K., Inki, P., Kirjavainen, J., Leppa, S., Syndecan, a regulator of cell behaviour, is lost in malignant transformation. *Biochem Soc Trans*, 1991. **19**(4): p. 1069-1072.
160. Essner, J.J., Chen, E., Ekker, S.C., Syndecan-2. *Int J Biochem Cell Biol*, 2006. **38**(2): p. 152-156.
161. Tkachenko, E., Rhodes, J.M., Simons, M., Syndecans: new kids on the signaling block. *Circ Res*, 2005. **96**(5): p. 488-500.
162. Beckhove, P., Helmke, B.M., Ziouta, Y., Bucur, M., Dorner, W., Mogler, C., Dyckhoff, G., Herold-Mende, C., Heparanase Expression at the Invasion Front of Human Head and Neck Cancers and Correlation with Poor Prognosis. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(8): p. 2899-2906.
163. Praillet, C., Lortat-Jacob, H., Grimaud, J.-A., Les protéoglycanes: molécules aux multiples fonctions ... futures molécules thérapeutiques. *Med Sci*, 1998. **14**: p. 412-420.
164. Nakanishi, H., Oguri, K., Yoshida, K., Itano, N., Takenaga, K., Kazama, T., Yoshida, A., Okayama, M., Structural differences between heparan sulphates of proteoglycan involved in the formation of basement membranes in vivo by Lewis-lung-carcinoma-derived cloned cells with different metastatic potentials. *Biochem J*, 1992. **288** ( Pt 1): p. 215-224.
165. Anttonen, A., Heikkila, P., Kajanti, M., Jalkanen, M., Joensuu, H., High syndecan-1 expression is associated with favourable outcome in squamous cell lung carcinoma treated with radical surgery. *Lung Cancer*, 2001. **32**(3): p. 297-305.
166. Wiksten, J.P., Lundin, J., Nordling, S., Lundin, M., Kokkola, A., von Boguslawski, K., Haglund, C., Epithelial and stromal syndecan-1 expression as predictor of outcome in patients with gastric cancer. *Int J Cancer*, 2001. **95**(1): p. 1-6.
167. Fujiya, M., Watari, J., Ashida, T., Honda, M., Tanabe, H., Fujiki, T., Saitoh, Y., Kohgo, Y., Reduced expression of syndecan-1 affects metastatic potential and clinical outcome in patients with colorectal cancer. *Jpn J Cancer Res*, 2001. **92**(10): p. 1074-1081.
168. Park, H., Kim, Y., Lim, Y., Han, I., Oh, E.S., Syndecan-2 mediates adhesion and proliferation of colon carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2002. **277**(33): p. 29730-29736.
169. Kim, Y., Park, H., Lim, Y., Han, I., Kwon, H.J., Woods, A., Oh, E.S., Decreased syndecan-2 expression correlates with trichostatin-A induced-morphological changes and reduced tumorigenic activity in colon

- carcinoma cells. *Oncogene*, 2003. **22**(6): p. 826-830.
170. Oh, E.S., Couchman, J.R., Syndecans-2 and -4; close cousins, but not identical twins. *Mol Cells*, 2004. **17**(2): p. 181-187.
  171. Fears, C.Y., Gladson, C.L., Woods, A., Syndecan-2 is expressed in the microvasculature of gliomas and regulates angiogenic processes in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 2006.
  172. Bernfield, M., Kokenyesi, R., Kato, M., Hinkes, M.T., Spring, J., Gallo, R.L., Lose, E.J., Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol*, 1992. **8**: p. 365-393.
  173. Gao, Y., Li, M., Chen, W., Simons, M., Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J Cell Physiol*, 2000. **184**(3): p. 373-379.
  174. Longley, R.L., Woods, A., Fleetwood, A., Cowling, G.J., Gallagher, J.T., Couchman, J.R., Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. *J Cell Sci*, 1999. **112** ( Pt 20): p. 3421-3431.
  175. Jayson, G.C., Vives, C., Paraskeva, C., Schofield, K., Coutts, J., Fleetwood, A., Gallagher, J.T., Coordinated modulation of the fibroblast growth factor dual receptor mechanism during transformation from human colon adenoma to carcinoma. *Int J Cancer*, 1999. **82**(2): p. 298-304.
  176. Morita, H., Takeuchi, T., Suzuki, S., Maeda, K., Yamada, K., Eguchi, G., Kimata, K., Aortic endothelial cells synthesize a large chondroitin sulphate proteoglycan capable of binding to hyaluronate. *Biochem J*, 1990. **265**(1): p. 61-68.
  177. Yao, L.Y., Moody, C., Schonherr, E., Wight, T.N., Sandell, L.J., Identification of the proteoglycan versican in aorta and smooth muscle cells by DNA sequence analysis, in situ hybridization and immunohistochemistry. *Matrix Biol*, 1994. **14**(3): p. 213-225.
  178. Cattaruzza, S., Schiappacassi, M., Ljungberg-Rose, A., Spessotto, P., Perissinotto, D., Morgelin, M., Mucignat, M.T., Colombatti, A., Perris, R., Distribution of PG-M/versican variants in human tissues and de novo expression of isoform V3 upon endothelial cell activation, migration, and neoangiogenesis in vitro. *J Biol Chem*, 2002. **277**(49): p. 47626-47635.
  179. Merrilees, M.J., Beaumont, B., Scott, L.J., Comparison of deposits of versican, biglycan and decorin in saphenous vein and internal thoracic, radial and coronary arteries: correlation to patency. *Coron Artery Dis*, 2001. **12**(1): p. 7-16.
  180. Theocharis, A.D., Tsolakis, I., Hjerpe, A., Karamanos, N.K., Human abdominal aortic aneurysm is characterized by decreased versican concentration and specific downregulation of versican isoform V(0). *Atherosclerosis*, 2001. **154**(2): p. 367-376.
  181. Zimmermann, D.R., Ruoslahti, E., Multiple domains of the large fibroblast proteoglycan, versican. *Embo J*, 1989. **8**(10): p. 2975-2981.
  182. Wight, T.N., Versican: a versatile extracellular matrix proteoglycan in cell biology. *Curr Opin Cell Biol*, 2002. **14**(5): p. 617-623.
  183. Dours-Zimmermann, M.T., Zimmermann, D.R., A novel glycosaminoglycan attachment domain identified in two alternative splice variants of human versican. *J Biol Chem*, 1994. **269**(52): p. 32992-32998.
  184. Zheng, P.S., Wen, J., Ang, L.C., Sheng, W., Vilorio-Petit, A., Wang, Y., Wu, Y., Kerbel, R.S., Yang, B.B., Versican/PDGF-M G3 domain promotes tumor growth and angiogenesis. *Faseb J*, 2004. **18**(6): p. 754-756.
  185. Paulus, W., Baur, I., Dours-Zimmermann, M.T., Zimmermann, D.R., Differential expression of versican isoforms in brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1996. **55**(5): p. 528-533.
  186. Nara, Y., Kato, Y., Torii, Y., Tsuji, Y., Nakagaki, S., Goto, S., Isobe, H., Nakashima, N., Takeuchi, J., Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human breast tumours with special reference to PG-M/versican. *Histochem J*, 1997. **29**(1): p. 21-30.
  187. Touab, M., Villena, J., Barranco, C., Arumi-Uria, M., Bassols, A., Versican is differentially expressed in human melanoma and may play a role in tumor development. *Am J Pathol*, 2002. **160**(2): p. 549-557.
  188. Ricciardelli, C., Mayne, K., Sykes, P.J., Raymond, W.A., McCaul, K., Marshall, V.R., Horsfall, D.J., Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 1998. **4**(4): p. 963-971.
  189. Pirinen, R., Leinonen, T., Bohm, J., Johansson, R., Ropponen, K., Kumpulainen, E., Kosma, V.M., Versican in nonsmall cell lung cancer: relation to hyaluronan, clinicopathologic factors, and prognosis. *Hum Pathol*, 2005. **36**(1): p. 44-50.
  190. Domenzain, C., Docampo, M.J., Serra, M., Miquel, L., Bassols, A., Differential expression of versican isoforms is a component of the human melanoma cell differentiation process. *Biochim Biophys Acta*, 2003. **1642**(1-2): p. 107-114.
  191. Griffioen, A.W., Coenen, M.J., Damen, C.A., Hellwig, S.M., van Weering, D.H., Vooys, W., Blijham, G.H., Groenewegen, G., CD44 is involved in tumor angiogenesis; an activation

- antigen on human endothelial cells. *Blood*, 1997. **90**(3): p. 1150-1159.
192. Ponta, H., Sherman, L., Herrlich, P.A., CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(1): p. 33-45.
  193. Zhang, Y., Weiler-Guettler, H., Chen, J., Wilhelm, O., Deng, Y., Qiu, F., Nakagawa, K., Klevesath, M., Wilhelm, S., Bohrer, H., Nakagawa, M., Graeff, H., Martin, E., Stern, D.M., Rosenberg, R.D., Ziegler, R., Nawroth, P.P., Thrombomodulin modulates growth of tumor cells independent of its anticoagulant activity. *J Clin Invest*, 1998. **101**(7): p. 1301-1309.
  194. Hanly, A.M., Hayanga, A., Winter, D.C., Bouchier-Hayes, D.J., Thrombomodulin: tumour biology and prognostic implications. *Eur J Surg Oncol*, 2005. **31**(3): p. 217-220.
  195. Iozzo, R.V., Proteoglycans and neoplasia. *Cancer Metastasis Rev*, 1988. **7**(1): p. 39-50.
  196. Sanderson, R.D., Heparan sulfate proteoglycans in invasion and metastasis. *Semin Cell Dev Biol*, 2001. **12**(2): p. 89-98.
  197. Jayson, G.C., Lyon, M., Paraskeva, C., Turnbull, J.E., Deakin, J.A., Gallagher, J.T., Heparan sulfate undergoes specific structural changes during the progression from human colon adenoma to carcinoma in vitro. *J Biol Chem*, 1998. **273**(1): p. 51-57.
  198. Adamia, S., Maxwell, C.A., Pilarski, L.M., Hyaluronan and hyaluronan synthases: potential therapeutic targets in cancer. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, 2005. **5**(1): p. 3-14.
  199. Iozzo, R.V., Murdoch, A.D., Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *Faseb J*, 1996. **10**(5): p. 598-614.
  200. Kleeff, J., Ishiwata, T., Kumbasar, A., Friess, H., Buchler, M.W., Lander, A.D., Korc, M., The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. *J Clin Invest*, 1998. **102**(9): p. 1662-1673.
  201. Lai, J., Chien, J., Staub, J., Avula, R., Greene, E.L., Matthews, T.A., Smith, D.I., Kaufmann, S.H., Roberts, L.R., Shridhar, V., Loss of HSulf-1 up-regulates heparin-binding growth factor signaling in cancer. *J Biol Chem*, 2003. **278**(25): p. 23107-23117.
  202. Fuster, M.M., Esko, J.D., The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer*, 2005. **5**(7): p. 526-542.
  203. van der Flier, A., Sonnenberg, A., Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 2001. **305**(3): p. 285-298.
  204. Hood, J.D., Cheresch, D.A., Role of integrins in cell invasion and migration. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(2): p. 91-100.
  205. Guadagno, T.M., Ohtsubo, M., Roberts, J.M., Assoian, R.K., A link between cyclin A expression and adhesion-dependent cell cycle progression. *Science*, 1993. **262**(5139): p. 1572-1575.
  206. Giannelli, G., Falk-Marzillier, J., Schiraldi, O., Stetler-Stevenson, W.G., Quaranta, V., Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science*, 1997. **277**(5323): p. 225-228.
  207. Huang, Y.-W., Baluna, R., Visetta, E., Adhesion molecules as targets for cancer therapy. *Histol. Histopathol.*, 1997. **12**: p. 467-477.
  208. Ruoslahti, E., Integrins as signaling molecules and targets for tumor therapy. *Kidney Int*, 1997. **51**(5): p. 1413-1417.
  209. Woodhouse, E.C., Chuaqui, R.F., Liotta, L.A., General mechanisms of metastasis. *Cancer*, 1997. **80**(8 Suppl): p. 1529-1537.
  210. Mizejewski, G.J., Role of integrins in cancer: survey of expression patterns. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1999. **222**(2): p. 124-138.
  211. Zutter, M.M., Sun, H., Santoro, S.A., Altered integrin expression and the malignant phenotype: the contribution of multiple integrated integrin receptors. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 1998. **3**(2): p. 191-200.
  212. Albelda, S.M., Mette, S.A., Elder, D.E., Stewart, R., Damjanovich, L., Herlyn, M., Buck, C.A., Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res*, 1990. **50**(20): p. 6757-6764.
  213. Hieken, T.J., Farolan, M., Ronan, S.G., Shilkaitis, A., Wild, L., Das Gupta, T.K., Beta3 integrin expression in melanoma predicts subsequent metastasis. *J Surg Res*, 1996. **63**(1): p. 169-173.
  214. Brooks, P.C., Clark, R.A., Cheresch, D.A., Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science*, 1994. **264**(5158): p. 569-571.
  215. Clarke, A.S., Lotz, M.M., Chao, C., Mercurio, A.M., Activation of the p21 pathway of growth arrest and apoptosis by the beta 4 integrin cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 1995. **270**(39): p. 22673-22676.
  216. Zutter, M.M., Santoro, S.A., Staatz, W.D., Tsung, Y.L., Re-expression of the alpha 2 beta 1 integrin abrogates the malignant phenotype of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(16): p. 7411-7415.
  217. Varner, J.A., Emerson, D.A., Juliano, R.L., Integrin alpha 5 beta 1 expression negatively regulates cell growth: reversal by attachment to

- fibronectin. *Mol Biol Cell*, 1995. **6**(6): p. 725-740.
218. Meredith, J.E., Jr., Fazeli, B., Schwartz, M.A., The extracellular matrix as a cell survival factor. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(9): p. 953-961.
219. Montgomery, A.M., Reisfeld, R.A., Cheresch, D.A., Integrin alpha v beta 3 rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. **91**(19): p. 8856-8860.
220. Brooks, P.C., Montgomery, A.M., Rosenfeld, M., Reisfeld, R.A., Hu, T., Klier, G., Cheresch, D.A., Integrin alpha v beta 3 antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels. *Cell*, 1994. **79**(7): p. 1157-1164.
221. Wu, C., Bauer, J.S., Juliano, R.L., McDonald, J.A., The alpha 5 beta 1 integrin fibronectin receptor, but not the alpha 5 cytoplasmic domain, functions in an early and essential step in fibronectin matrix assembly. *J Biol Chem*, 1993. **268**(29): p. 21883-21888.
222. Brown, E., Hogg, N., Where the outside meets the inside: integrins as activators and targets of signal transduction cascades. *Immunol Lett*, 1996. **54**(2-3): p. 189-193.
223. Kiosses, W.B., Shattil, S.J., Pampori, N., Schwartz, M.A., Rac recruits high-affinity integrin alphavbeta3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat Cell Biol*, 2001. **3**(3): p. 316-320.
224. Lin, E.Y., Pollard, J.W., Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer*, 2004. **90**(11): p. 2053-2058.
225. Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., Rubin, S.C., Coukos, G., Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*, 2003. **348**(3): p. 203-213.
226. Balkwill, F., Mantovani, A., Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*, 2001. **357**(9255): p. 539-545.
227. Coussens, L.M., Raymond, W.W., Bergers, G., Laig-Webster, M., Behrendtsen, O., Werb, Z., Coughley, G.H., Hanahan, D., Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis. *Genes Dev*, 1999. **13**(11): p. 1382-1397.
228. Rettig, M.B., Ma, H.J., Vescio, R.A., Pold, M., Schiller, G., Belson, D., Savage, A., Nishikubo, C., Wu, C., Fraser, J., Said, J.W., Berenson, J.R., Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science*, 1997. **276**(5320): p. 1851-1854.
229. Marincola, F.M., Jaffee, E.M., Hicklin, D.J., Ferrone, S., Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*, 2000. **74**: p. 181-273.
230. An international association between *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer. The EUROGAST Study Group. *Lancet*, 1993. **341**(8857): p. 1359-1362.
231. zur Hausen, H., Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nat Rev Cancer*, 2002. **2**(5): p. 342-350.
232. Balkwill, F., Charles, K.A., Mantovani, A., Smoldering and polarized inflammation in the initiation and promotion of malignant disease. *Cancer Cell*, 2005. **7**(3): p. 211-217.
233. Masmoudi, A., Chevalier, T.L., Sabatier, L., Soria, J.C., [Cyclooxygenase 2 inhibitors and cancer chemoprevention]. *Bull Cancer*, 2004. **91 Suppl 2**: p. S77-84.
234. Okada, F., Inflammation and free radicals in tumor development and progression. *Redox Rep*, 2002. **7**(6): p. 357-368.
235. Coussens, L.M., Werb, Z., Inflammation and cancer. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 860-867.
236. Esposito, I., Menicagli, M., Funel, N., Bergmann, F., Boggi, U., Mosca, F., Bevilacqua, G., Campani, D., Inflammatory cells contribute to the generation of an angiogenic phenotype in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J Clin Pathol*, 2004. **57**(6): p. 630-636.
237. Yano, H., Kinuta, M., Tateishi, H., Nakano, Y., Matsui, S., Monden, T., Okamura, J., Sakai, M., Okamoto, S., Mast cell infiltration around gastric cancer cells correlates with tumor angiogenesis and metastasis. *Gastric Cancer*, 1999. **2**(1): p. 26-32.
238. Hendrzak, J.A., Brunda, M.J., Antitumor and antimetastatic activity of interleukin-12. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1996. **213 ( Pt 3)**: p. 65-83.
239. Elgert, K.D., Alleva, D.G., Mullins, D.W., Tumor-induced immune dysfunction: the macrophage connection. *J Leukoc Biol*, 1998. **64**(3): p. 275-290.
240. Bingle, L., Brown, N.J., Lewis, C.E., The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol*, 2002. **196**(3): p. 254-265.
241. Lin, E.Y., Gouon-Evans, V., Nguyen, A.V., Pollard, J.W., The macrophage growth factor CSF-1 in mammary gland development and tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002. **7**(2): p. 147-162.
242. Welsh, T.J., Green, R.H., Richardson, D., Waller, D.A., O'Byrne, K.J., Bradding, P., Macrophage and mast-cell invasion of tumor cell islets confers a marked survival advantage in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(35): p. 8959-8967.
243. Condeelis, J., Pollard, J.W., Macrophages: obligate partners for tumor cell migration,



- invasion, and metastasis. *Cell*, 2006. **124**(2): p. 263-266.
244. Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G., Pollard, J. W., Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med*, 2001. **193**(6): p. 727-740.
245. Pollard, J. W., Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(1): p. 71-78.
246. Wang, W., Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Segall, J. E., Condeelis, J. S., Tumor cells caught in the act of invading: their strategy for enhanced cell motility. *Trends Cell Biol*, 2005. **15**(3): p. 138-145.
247. Yamaguchi, H., Pixley, F., Condeelis, J., Invadopodia and podosomes in tumor invasion. *Eur J Cell Biol*, 2006. **85**(3-4): p. 213-218.
248. Arenberg, D. A., Keane, M. P., DiGiovine, B., Kunkel, S. L., Strom, S. R., Burdick, M. D., Iannettoni, M. D., Strieter, R. M., Macrophage infiltration in human non-small-cell lung cancer: the role of CC chemokines. *Cancer Immunol Immunother*, 2000. **49**(2): p. 63-70.
249. Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E. Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E. R., Graf, T., Pollard, J. W., Segall, J., Condeelis, J., A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Res*, 2004. **64**(19): p. 7022-7029.
250. Condeelis, J., Segall, J. E., Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(12): p. 921-930.
251. Leek, R. D., Harris, A. L., Tumor-associated macrophages in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2002. **7**(2): p. 177-189.
252. Leek, R. D., Landers, R. J., Harris, A. L., Lewis, C. E., Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer*, 1999. **79**(5-6): p. 991-995.
253. Grimshaw, M. J., Wilson, J. L., Balkwill, F. R., Endothelin-2 is a macrophage chemoattractant: implications for macrophage distribution in tumors. *Eur J Immunol*, 2002. **32**(9): p. 2393-2400.
254. Foekens, J. A., Peters, H. A., Look, M. P., Portengen, H., Schmitt, M., Kramer, M. D., Brunner, N., Janicke, F., Meijer-van Gelder, M. E., Henzen-Logmans, S. C., van Putten, W. L., Klijn, J. G., The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients. *Cancer Res*, 2000. **60**(3): p. 636-643.
255. Bando, H., Toi, M., Tumor angiogenesis, macrophages, and cytokines. *Adv Exp Med Biol*, 2000. **476**: p. 267-284.
256. De Palma, M., Venneri, M. A., Galli, R., Sergi Sergi, L., Politi, L. S., Sampaolesi, M., Naldini, L., Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell*, 2005. **8**(3): p. 211-226.
257. Haqqani, A. S., Sandhu, J. K., Birnboim, H. C., Expression of interleukin-8 promotes neutrophil infiltration and genetic instability in mutatact tumors. *Neoplasia*, 2000. **2**(6): p. 561-568.
258. Bellocq, A., Antoine, M., Flahault, A., Philippe, C., Crestani, B., Bernaudin, J. F., Mayaud, C., Milleron, B., Baud, L., Cadranel, J., Neutrophil alveolitis in bronchioloalveolar carcinoma: induction by tumor-derived interleukin-8 and relation to clinical outcome. *Am J Pathol*, 1998. **152**(1): p. 83-92.
259. Caruso, R. A., Bellocco, R., Pagano, M., Bertoli, G., Rigoli, L., Inferrera, C., Prognostic value of intratumoral neutrophils in advanced gastric carcinoma in a high-risk area in northern Italy. *Mod Pathol*, 2002. **15**(8): p. 831-837.
260. Pekarek, L. A., Starr, B. A., Toledano, A. Y., Schreiber, H., Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J Exp Med*, 1995. **181**(1): p. 435-440.
261. Wislez, M., Fleury-Feith, J., Rabbe, N., Moreau, J., Cesari, D., Milleron, B., Mayaud, C., Antoine, M., Soler, P., Cadranel, J., Tumor-Derived Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Granulocyte Colony-Stimulating Factor Prolong the Survival of Neutrophils Infiltrating Bronchoalveolar Subtype Pulmonary Adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 2001. **159**(4): p. 1423-1433.
262. Wislez, M., Rabbe, N., Marchal, J., Milleron, B., Crestani, B., Mayaud, C., Antoine, M., Soler, P., Cadranel, J., Hepatocyte Growth Factor Production by Neutrophils Infiltrating Bronchioloalveolar Subtype Pulmonary Adenocarcinoma: Role in Tumor Progression and Death. *Cancer Res*, 2003. **63**(6): p. 1405-1412.
263. Schaidt, H., Oka, M., Bogenrieder, T., Nesbit, M., Satyamoorthy, K., Berking, C., Matsushima, K., Herlyn, M., Differential response of primary and metastatic melanomas to neutrophils attracted by IL-8. *Int J Cancer*, 2003. **103**(3): p. 335-343.
264. Shamamian, P., Schwartz, J. D., Pocock, B. J., Monea, S., Whiting, D., Marcus, S. G., Mignatti, P., Activation of progelatinase A (MMP-2) by neutrophil elastase, cathepsin G, and proteinase-3: a role for inflammatory cells in tumor invasion and angiogenesis. *J Cell Physiol*, 2001. **189**(2): p. 197-206.
265. Midorikawa, Y., Yamashita, T., Sendo, F., Modulation of the immune response to transplanted tumors in rats by selective

- depletion of neutrophils in vivo using a monoclonal antibody: abrogation of specific transplantation resistance to chemical carcinogen-induced syngeneic tumors by selective depletion of neutrophils in vivo. *Cancer Res*, 1990. **50**(19): p. 6243-6247.
266. Matsumoto, Y., Saiki, I., Murata, J., Okuyama, H., Tamura, M., Azuma, I., Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor inhibits the metastasis of hematogenous and non-hematogenous tumors in mice. *Int J Cancer*, 1991. **49**(3): p. 444-449.
267. Colombo, M.P., Ferrari, G., Stoppacciaro, A., Parenza, M., Rodolfo, M., Mavilio, F., Parmiani, G., Granulocyte colony-stimulating factor gene transfer suppresses tumorigenicity of a murine adenocarcinoma in vivo. *J Exp Med*, 1991. **173**(4): p. 889-897.
268. Di Carlo, E., Forni, G., Lollini, P., Colombo, M.P., Modesti, A., Musiani, P., The intriguing role of polymorphonuclear neutrophils in antitumor reactions. *Blood*, 2001. **97**(2): p. 339-345.
269. de Visser, K.E., Eichten, A., Coussens, L.M., Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(1): p. 24-37.
270. Sakaguchi, S., Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, 2000. **101**(5): p. 455-458.
271. Chouaib, S., Asselin-Paturel, C., Mami-Chouaib, F., Caignard, A., Blay, J.Y., The host-tumor immune conflict: from immunosuppression to resistance and destruction. *Immunol Today*, 1997. **18**(10): p. 493-497.
272. Burnet, F.M., The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*, 1970. **13**: p. 1-27.
273. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., Schreiber, R.D., IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*, 2001. **410**(6832): p. 1107-1111.
274. Kammertoens, T., Schuler, T., Blankenstein, T., Immunotherapy: target the stroma to hit the tumor. *Trends Mol Med*, 2005. **11**(5): p. 225-231.
275. Prall, F., Duhrkop, T., Weirich, V., Ostwald, C., Lenz, P., Nizze, H., Barten, M., Prognostic role of CD8 $^+$  tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Hum Pathol*, 2004. **35**(7): p. 808-816.
276. Kondratiev, S., Sabo, E., Yakirevich, E., Lavie, O., Resnick, M.B., Intratumoral CD8 $^+$  T lymphocytes as a prognostic factor of survival in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(13): p. 4450-4456.
277. Wakabayashi, O., Yamazaki, K., Oizumi, S., Hommura, F., Kinoshita, I., Ogura, S., Dosaka-Akita, H., Nishimura, M., CD4 $^+$  T cells in cancer stroma, not CD8 $^+$  T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human non-small cell lung cancers. *Cancer Sci*, 2003. **94**(11): p. 1003-1009.
278. Guidoboni, M., Gafa, R., Viel, A., Doglioni, C., Russo, A., Santini, A., Del Tin, L., Macri, E., Lanza, G., Boiocchi, M., Dolcetti, R., Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am J Pathol*, 2001. **159**(1): p. 297-304.
279. Schumacher, K., Haensch, W., Roefzaad, C., Schlag, P.M., Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res*, 2001. **61**(10): p. 3932-3936.
280. Eerola, A.K., Soini, Y., Paakko, P., A high number of tumor-infiltrating lymphocytes are associated with a small tumor size, low tumor stage, and a favorable prognosis in operated small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res*, 2000. **6**(5): p. 1875-1881.
281. Pardoll, D., Allison, J., Cancer immunotherapy: breaking the barriers to harvest the crop. *Nat Med*, 2004. **10**(9): p. 887-892.
282. O'Mahony, D., Kummar, S., Gutierrez, M.E., Non-small-cell lung cancer vaccine therapy: a concise review. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(35): p. 9022-9028.
283. Hlatky, L., Hahnfeldt, P., Folkman, J., Clinical Application of Antiangiogenic Therapy: Microvessel Density, What It Does and Doesn't Tell Us. *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**(12): p. 883-893.
284. Bergers, G., Benjamin, L.E., Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*, 2003. **3**(6): p. 401-410.
285. Folkman, J., Watson, K., Ingber, D., Hanahan, D., Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature*, 1989. **339**(6219): p. 58-61.
286. Gimbrone, M.A., Jr., Leapman, S.B., Cotran, R.S., Folkman, J., Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med*, 1972. **136**(2): p. 261-276.
287. Holmgren, L., O'Reilly, M.S., Folkman, J., Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*, 1995. **1**(2): p. 149-153.
288. Watnick, R.S., Cheng, Y.N., Rangarajan, A., Ince, T.A., Weinberg, R.A., Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell*, 2003. **3**(3): p. 219-231.

289. Carmeliet, P., Angiogenesis in health and disease. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 653-660.
290. Liekens, S., De Clercq, E., Neyts, J., Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*, 2001. **61**(3): p. 253-270.
291. Klagsbrun, M., Moses, M.A., Molecular angiogenesis. *Chem Biol*, 1999. **6**(8): p. R217-224.
292. Carmeliet, P., Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*, 2000. **6**(4): p. 389-395.
293. Papetti, M., Herman, I.M., Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2002. **282**(5): p. C947-970.
294. Auguste, P., Lemièrre, S., Larrièu-Lahargue, F., Bikfalvi, A., Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2005. **54**(1): p. 53-61.
295. Sullivan, D.C., Bicknell, R., New molecular pathways in angiogenesis. *Br J Cancer*, 2003. **89**(2): p. 228-231.
296. Shing, Y., Folkman, J., Sullivan, R., Butterfield, C., Murray, J., Klagsbrun, M., Heparin affinity: purification of a tumor-derived capillary endothelial cell growth factor. *Science*, 1984. **223**(4642): p. 1296-1299.
297. Presta, M., Moscatelli, D., Joseph-Silverstein, J., Rifkin, D.B., Purification from a human hepatoma cell line of a basic fibroblast growth factor-like molecule that stimulates capillary endothelial cell plasminogen activator production, DNA synthesis, and migration. *Mol Cell Biol*, 1986. **6**(11): p. 4060-4066.
298. Claffey, K.P., Abrams, K., Shih, S.C., Brown, L.F., Mullen, A., Keough, M., Fibroblast growth factor 2 activation of stromal cell vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis. *Lab Invest*, 2001. **81**(1): p. 61-75.
299. Cox, G., Jones, J.L., Walker, R.A., Steward, W.P., O'Byrne, K.J., Angiogenesis and non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2000. **27**(2): p. 81-100.
300. Risau, W., Mechanisms of angiogenesis. *Nature*, 1997. **386**(6626): p. 671-674.
301. Bredel, M., Pollack, I.F., Campbell, J.W., Hamilton, R.L., Basic fibroblast growth factor expression as a predictor of prognosis in pediatric high-grade gliomas. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(11): p. 2157-2164.
302. Dirix, L.Y., Vermeulen, P.B., Pawinski, A., Prove, A., Benoy, I., De Pooter, C., Martin, M., Van Oosterom, A.T., Elevated levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in sera of cancer patients. *Br J Cancer*, 1997. **76**(2): p. 238-243.
303. Nguyen, M., Angiogenic factors as tumor markers. *Invest New Drugs*, 1997. **15**(1): p. 29-37.
304. Takanami, I., Tanaka, F., Hashizume, T., Kikuchi, K., Yamamoto, Y., Yamamoto, T., Kodaira, S., The basic fibroblast growth factor and its receptor in pulmonary adenocarcinomas: an investigation of their expression as prognostic markers. *Eur J Cancer*, 1996. **32A**(9): p. 1504-1509.
305. Hicklin, D.J., Ellis, L.M., Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(5): p. 1011-1027.
306. Ferrara, N., Gerber, H.P., LeCouter, J., The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 669-676.
307. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W., Nagy, A., Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 1996. **380**(6573): p. 435-439.
308. Dvorak, H.F., Brown, L.F., Detmar, M., Dvorak, A.M., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, 1995. **146**(5): p. 1029-1039.
309. Enholm, B., Paavonen, K., Ristimäki, A., Kumar, V., Gunji, Y., Klefstrom, J., Kivinen, L., Laiho, M., Olofsson, B., Joukov, V., Eriksson, U., Alitalo, K., Comparison of VEGF, VEGF-B, VEGF-C and Ang-1 mRNA regulation by serum, growth factors, oncoproteins and hypoxia. *Oncogene*, 1997. **14**(20): p. 2475-2483.
310. Mukhopadhyay, D., Tsiokas, L., Zhou, X.M., Foster, D., Brugge, J.S., Sukhatme, V.P., Hypoxic induction of human vascular endothelial growth factor expression through c-Src activation. *Nature*, 1995. **375**(6532): p. 577-581.
311. Fontanini, G., Boldrini, L., Chine, S., Pisaturo, F., Basolo, F., Calcinai, A., Lucchi, M., Mussi, A., Angeletti, C.A., Bevilacqua, G., Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in non-small-cell lung carcinomas. *Br J Cancer*, 1999. **79**(2): p. 363-369.
312. Park, J.E., Keller, G.A., Ferrara, N., The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, 1993. **4**(12): p. 1317-1326.
313. Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y.,

- Bono, F., Devy, L., Beck, H., Scholz, D., Acker, T., DiPalma, T., Dewerchin, M., Noel, A., Stalmans, I., Barra, A., Blacher, S., Vandendriessche, T., Ponten, A., Eriksson, U., Plate, K.H., Foidart, J.M., Schaper, W., Charnock-Jones, D.S., Hicklin, D.J., Herbert, J.M., Collen, D., Persico, M.G., Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*, 2001. **7**(5): p. 575-583.
314. Veikkola, T., Alitalo, K., VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin Cancer Biol*, 1999. **9**(3): p. 211-220.
315. Dvorak, H.F., Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(21): p. 4368-4380.
316. Gerritsen, M.E., Tomlinson, J.E., Zlot, C., Ziman, M., Hwang, S., Using gene expression profiling to identify the molecular basis of the synergistic actions of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Br J Pharmacol*, 2003. **140**(4): p. 595-610.
317. Grigoriu, B., Depontieu, F., Scherpereel, A., Gourcerol, D., Devos, P., Ouatas, T., Lafitte, J., Copin, M., Tonnel, A., Lassalle, P., Endocan Expression and Relationship with Survival in Human Non Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 2006. **in press**.
318. Zachary, I., Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2001. **280**(6): p. C1375-1386.
319. Ferrara, N., Kerbel, R.S., Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*, 2005. **438**(7070): p. 967-974.
320. Hida, K., Hida, Y., Amin, D.N., Flint, A.F., Panigrahy, D., Morton, C.C., Klagsbrun, M., Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res*, 2004. **64**(22): p. 8249-8255.
321. Streubel, B., Chott, A., Huber, D., Exner, M., Jager, U., Wagner, O., Schwarzwinger, I., Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, 2004. **351**(3): p. 250-259.
322. Jubb, A.M., Oates, A.J., Holden, S., Koeppen, H., Predicting benefit from anti-angiogenic agents in malignancy. *Nat Rev Cancer*, 2006. **6**(8): p. 626-635.
323. Jubb, A.M., Hurwitz, H.I., Bai, W., Holmgren, E.B., Tobin, P., Guerrero, A.S., Kabbinnavar, F., Holden, S.N., Novotny, W.F., Frantz, G.D., Hillan, K.J., Koeppen, H., Impact of vascular endothelial growth factor-A expression, thrombospondin-2 expression, and microvessel density on the treatment effect of bevacizumab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2006. **24**(2): p. 217-227.
324. Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., Holash, J., Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 2000. **407**(6801): p. 242-248.
325. Falcone, D.J., McCaffrey, T.A., Haimovitz-Friedman, A., Garcia, M., Transforming growth factor-beta 1 stimulates macrophage urokinase expression and release of matrix-bound basic fibroblast growth factor. *J Cell Physiol*, 1993. **155**(3): p. 595-605.
326. Giraudo, E., Primo, L., Audero, E., Gerber, H.P., Koolwijk, P., Soker, S., Klagsbrun, M., Ferrara, N., Bussolino, F., Tumor necrosis factor-alpha regulates expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 and of its co-receptor neuropilin-1 in human vascular endothelial cells. *J Biol Chem*, 1998. **273**(34): p. 22128-22135.
327. Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H., Kuwano, M., Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(7): p. 4015-4023.
328. Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Sefter, E.A., Gardner, L.M., Pe'er, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., Hendrix, M.J., Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*, 1999. **155**(3): p. 739-752.
329. Sefter, E.A., Meltzer, P.S., Schattman, G.C., Gruman, L.M., Hess, A.R., Kirschmann, D.A., Sefter, R.E., Hendrix, M.J., Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2002. **44**(1): p. 17-27.
330. Bittner, M., Meltzer, P., Chen, Y., Jiang, Y., Sefter, E., Hendrix, M., Radmacher, M., Simon, R., Yakhini, Z., Ben-Dor, A., Sampas, N., Dougherty, E., Wang, E., Marincola, F., Gooden, C., Lueders, J., Glatfelter, A., Pollock, P., Carpten, J., Gillanders, E., Leja, D., Dietrich, K., Beaudry, C., Berens, M., Alberts, D., Sondak, V., Molecular classification of cutaneous malignant melanoma by gene expression profiling. *Nature*, 2000. **406**(6795): p. 536-540.
331. Konerding, M.A., Fait, E., Dimitropoulou, C., Malkusch, W., Ferri, C., Giavazzi, R., Coltrini, D., Presta, M., Impact of fibroblast growth factor-2 on tumor microvascular architecture. A tridimensional morphometric study. *Am J Pathol*, 1998. **152**(6): p. 1607-1616.

332. Nasu, R., Kimura, H., Akagi, K., Murata, T., Tanaka, Y., Blood flow influences vascular growth during tumour angiogenesis. *Br J Cancer*, 1999. **79**(5-6): p. 780-786.
333. Folberg, R., Hendrix, M.J., Maniatis, A.J., Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am J Pathol*, 2000. **156**(2): p. 361-381.
334. Chang, Y.S., di Tomaso, E., McDonald, D.M., Jones, R., Jain, R.K., Munn, L.L., Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(26): p. 14608-14613.
335. Bissell, M.J., Tumor Plasticity Allows Vasculogenic Mimicry, a Novel Form of Angiogenic Switch : A Rose by Any Other Name? *Am J Pathol*, 1999. **155**(3): p. 675-679.
336. McDonald, D.M., Munn, L., Jain, R.K., Vasculogenic mimicry: how convincing, how novel, and how significant? *Am J Pathol*, 2000. **156**(2): p. 383-388.
337. Nanda, A., St Croix, B., Tumor endothelial markers: new targets for cancer therapy. *Curr Opin Oncol*, 2004. **16**(1): p. 44-49.
338. McCarthy, M., Antiangiogenesis drug promising for metastatic colorectal cancer. *Lancet*, 2003. **361**(9373): p. 1959.
339. Yang, J.C., Haworth, L., Sherry, R.M., Hwu, P., Schwartzentruber, D.J., Topalian, S.L., Steinberg, S.M., Chen, H.X., Rosenberg, S.A., A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med*, 2003. **349**(5): p. 427-434.
340. Garber, K., Angiogenesis inhibitors suffer new setback. *Nat Biotechnol*, 2002. **20**(11): p. 1067-1068.
341. Huang, J., Frischer, J.S., Serur, A., Kadenhe, A., Yokoi, A., McCrudden, K.W., New, T., O'Toole, K., Zabski, S., Rudge, J.S., Holash, J., Yancopoulos, G.D., Yamashiro, D.J., Kandel, J.J., Regression of established tumors and metastases by potent vascular endothelial growth factor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(13): p. 7785-7790.
342. Ghitescu, L.D., Crine, P., Jacobson, B.S., Antibodies specific to the plasma membrane of rat lung microvascular endothelium. *Exp Cell Res*, 1997. **232**(1): p. 47-55.
343. Auerbach, R., Alby, L., Morrissey, L.W., Tu, M., Joseph, J., Expression of organ-specific antigens on capillary endothelial cells. *Microvasc Res*, 1985. **29**(3): p. 401-411.
344. Ruoslahti, E., Rajotte, D., An address system in the vasculature of normal tissues and tumors. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 813-827.
345. Rajotte, D., Arap, W., Hagedorn, M., Koivunen, E., Pasqualini, R., Ruoslahti, E., Molecular heterogeneity of the vascular endothelium revealed by in vivo phage display. *J Clin Invest*, 1998. **102**(2): p. 430-437.
346. Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*, 2003. **9**(6): p. 677-684.
347. St Croix, B., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K.E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G.J., Lengauer, C., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., Genes expressed in human tumor endothelium. *Science*, 2000. **289**(5482): p. 1197-1202.
348. Spinella, D.G., Bernardino, A.K., Redding, A.C., Koutz, P., Wei, Y., Pratt, E.K., Myers, K.K., Chappell, G., Gerken, S., McConnell, S.J., Tandem arrayed ligation of expressed sequence tags (TALEST): a new method for generating global gene expression profiles. *Nucleic Acids Res*, 1999. **27**(18): p. e22.
349. Davies, G., Cunnick, G.H., Mansel, R.E., Mason, M.D., Jiang, W.G., Levels of expression of endothelial markers specific to tumour-associated endothelial cells and their correlation with prognosis in patients with breast cancer. *Clin Exp Metastasis*, 2004. **21**(1): p. 31-37.
350. Rmali, K.A., Puntis, M.C., Jiang, W.G., Prognostic values of tumor endothelial markers in patients with colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 2005. **11**(9): p. 1283-1286.
351. Carson-Walter, E.B., Watkins, D.N., Nanda, A., Vogelstein, B., Kinzler, K.W., St Croix, B., Cell surface tumor endothelial markers are conserved in mice and humans. *Cancer Res*, 2001. **61**(18): p. 6649-6655.
352. Ho, M., Yang, E., Matcuk, G., Deng, D., Sampas, N., Tsalenko, A., Tabibiazar, R., Zhang, Y., Chen, M., Talbi, S., Ho, Y.D., Wang, J., Tsao, P.S., Ben-Dor, A., Yakhini, Z., Bruhn, L., Quertermous, T., Identification of endothelial cell genes by combined database mining and microarray analysis. *Physiol Genomics*, 2003. **13**(3): p. 249-262.
353. Ross, D.T., Scherf, U., Eisen, M.B., Perou, C.M., Rees, C., Spellman, P., Iyer, V., Jeffrey, S.S., Van de Rijn, M., Waltham, M., Pergamenschikov, A., Lee, J.C., Lashkari, D., Shalon, D., Myers, T.G., Weinstein, J.N., Botstein, D., Brown, P.O., Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nat Genet*, 2000. **24**(3): p. 227-235.
354. Sarrazin, S., Adam, E., Lyon, M., Depontieu, F., Motte, V., Landolfi, C., Lortat-Jacob, H., Bechard, D., Lassalle, P., Delehedde, M., Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): A potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta*, 2006. **1765**(1): p. 25-37.
355. Lassalle, P., Molet, S., Janin, A., Heyden, J.V., Tavernier, J., Fiers, W., Devos, R., Tonnel,

- A.B., ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem*, 1996. **271**(34): p. 20458-20464.
356. Tsai, J.C., Zhang, J., Minami, T., Volland, C., Zhao, S., Yi, X., Lassalle, P., Oettgen, P., Aird, W.C., Cloning and characterization of the human lung endothelial-cell-specific molecule-1 promoter. *J Vasc Res*, 2002. **39**(2): p. 148-159.
357. Kirwan, R.P., Leonard, M.O., Murphy, M., Clark, A.F., O'Brien, C.J., Transforming growth factor-beta-regulated gene transcription and protein expression in human GFAP-negative lamina cribrosa cells. *Glia*, 2005. **52**(4): p. 309-324.
358. Tschernatsch, M.M., Mlecnik, B., Trajanoski, Z., Zechner, R., Zimmerman, R., LPL-mediated lipolysis of VLDL induces an upregulation of AU-rich mRNAs and an activation of HuR in endothelial cells. *Atherosclerosis*, 2006.
359. Aitkenhead, M., Wang, S.J., Nakatsu, M.N., Mestas, J., Heard, C., Hughes, C.C., Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. *Microvasc Res*, 2002. **63**(2): p. 159-171.
360. Wang, X., Brownstein, M.J., Young, W.S., PG25, a pineal-specific cDNA, cloned by differential display PCR (DDPCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). *J Neurosci Methods*, 1997. **73**(2): p. 187-191.
361. Cong, R., Jiang, X., Wilson, C.M., Hunter, M.P., Vasavada, H., Bogue, C.W., Hhex is a direct repressor of endothelial cell-specific molecule 1 (ESM-1). *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **346**(2): p. 535-545.
362. Scherpereel, A., Gentina, T., Grigoriu, B., Senechal, S., Janin, A., Tsicopoulos, A., Plenat, F., Bechard, D., Tonnel, A.B., Lassalle, P., Overexpression of endocan induces tumor formation. *Cancer Res*, 2003. **63**(18): p. 6084-6089.
363. Hwa, V., Oh, Y., Rosenfeld, R.G., The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev*, 1999. **20**(6): p. 761-787.
364. Bechard, D., Meignin, V., Scherpereel, A., Oudin, S., Kervoaze, G., Bertheau, P., Janin, A., Tonnel, A., Lassalle, P., Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J Vasc Res*, 2000. **37**(5): p. 417-425.
365. Bechard, D., Gentina, T., Delehedde, M., Scherpereel, A., Lyon, M., Aumercier, M., Vazeux, R., Richet, C., Degand, P., Jude, B., Janin, A., Fernig, D.G., Tonnel, A.B., Lassalle, P., Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J Biol Chem*, 2001. **276**(51): p. 48341-48349.
366. Wellner, M., Herse, F., Janke, J., Gorzelniak, K., Engeli, S., Bechart, D., Lasalle, P., Luft, F.C., Sharma, A.M., Endothelial cell specific molecule-1 - a newly identified protein in adipocytes. *Horm Metab Res*, 2003. **35**(4): p. 217-221.
367. Janke, J., Engeli, S., Gorzelniak, K., Feldpausch, M., Heintze, U., Bohnke, J., Wellner, M., Herse, F., Lassalle, P., Luft, F.C., Sharma, A.M., Adipose tissue and circulating endothelial cell specific molecule-1 in human obesity. *Horm Metab Res*, 2006. **38**(1): p. 28-33.
368. Zhao, X., Ramsey, K.E., Stephan, D.A., Russell, P., Gene and protein expression changes in human trabecular meshwork cells treated with transforming growth factor-beta. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2004. **45**(11): p. 4023-4034.
369. Frevel, M.A., Bakheet, T., Silva, A.M., Hissong, J.G., Khabar, K.S., Williams, B.R., p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Mol Cell Biol*, 2003. **23**(2): p. 425-436.
370. O. Tschernatsch, M.M., Mlecnik, B., Trajanoski, Z., Zechner, R., Zimmermann, R., LPL-mediated lipolysis of VLDL induces an upregulation of AU-rich mRNAs and an activation of HuR in endothelial cells. *Atherosclerosis*. **In Press, Corrected Proof**.
371. De Caterina, R., Liao, J.K., Libby, P., Fatty acid modulation of endothelial activation. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(1 Suppl): p. 213S-223S.
372. Brooks, A.R., Lelkes, P.I., Rubanyi, G.M., Gene expression profiling of human aortic endothelial cells exposed to disturbed flow and steady laminar flow. *Physiol Genomics*, 2002. **9**(1): p. 27-41.
373. Schoenfeld, J., Lessan, K., Johnson, N.A., Charnock-Jones, D.S., Evans, A., Vourvouhaki, E., Scott, L., Stephens, R., Freeman, T.C., Saidi, S.A., Tom, B., Weston, G.C., Rogers, P., Smith, S.K., Print, C.G., Bioinformatic analysis of primary endothelial cell gene array data illustrated by the analysis of transcriptome changes in endothelial cells exposed to VEGF-A and PlGF. *Angiogenesis*, 2004. **7**(2): p. 143-156.
374. Rennel, E., *Molecular Mechanisms in Endothelial Cell Differentiation*, in *Department of Genetics and Pathology, Rudebeck laboratory*. 2004, Uppsala University: Uppsala.
375. Yi, X., Tsai, J.C., Aird, W.C., Endocan is Preferentially Expressed in Tumor Endothelium by a Vascular Endothelial Growth

- Factor-Dependent Mechanism. Personal communication.
376. Lenburg, M.E., Liou, L.S., Gerry, N.P., Frampton, G.M., Cohen, H.T., Christman, M.F., Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer*, 2003. **3**(1): p. 31.
  377. Amatschek, S., Koenig, U., Auer, H., Steinlein, P., Pacher, M., Gruenfelder, A., Dekan, G., Vogl, S., Kubista, E., Heider, K.H., Stratowa, C., Schreiber, M., Sommergruber, W., Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res*, 2004. **64**(3): p. 844-856.
  378. Weinschenk, T., Gouttefangeas, C., Schirle, M., Obermayr, F., Walter, S., Schoor, O., Kurek, R., Loeser, W., Bichler, K.H., Wernet, D., Stevanovic, S., Rammensee, H.G., Integrated functional genomics approach for the design of patient-individual antitumor vaccines. *Cancer Res*, 2002. **62**(20): p. 5818-5827.
  379. Borczuk, A.C., Shah, L., Pearson, G.D., Walter, K.L., Wang, L., Austin, J.H., Friedman, R.A., Powell, C.A., Molecular signatures in biopsy specimens of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **170**(2): p. 167-174.
  380. van 't Veer, L.J., Dai, H., van de Vijver, M.J., He, Y.D., Hart, A.A., Mao, M., Peterse, H.L., van der Kooy, K., Marton, M.J., Witteveen, A.T., Schreiber, G.J., Kerkhoven, R.M., Roberts, C., Linsley, P.S., Bernards, R., Friend, S.H., Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*, 2002. **415**(6871): p. 530-536.
  381. Glinskii, A., Hoffman, R., Gerald, W., Glinsky, G., Kimmel, S. *GeneChip analysis reveals multiple clinically relevant genetic signatures of metastatic prostate cancer.* in *2003 AACR Annual Meeting*. 2003. Washington American Association for Cancer Research.
  382. Hendrix, M.J., Seftor, E.A., Hess, A.R., Seftor, R.E., Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene*, 2003. **22**(20): p. 3070-3075.
  383. Bechard, D., Scherpereel, A., Hammad, H., Gentina, T., Tsiropoulos, A., Aumercier, M., Pestel, J., Dessaint, J.P., Tonnel, A.B., Lassalle, P., Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol*, 2001. **167**(6): p. 3099-3106.
  384. Stewart, D.J., Edwards, J.G., Smythe, W.R., Waller, D.A., O'Byrne, K.J., Malignant pleural mesothelioma--an update. *Int J Occup Environ Health*, 2004. **10**(1): p. 26-39.
  385. Hughes, R.S., Malignant pleural mesothelioma. *Am J Med Sci*, 2005. **329**(1): p. 29-44.
  386. Pistolesi, M., Rusthoven, J., Malignant pleural mesothelioma: update, current management, and newer therapeutic strategies. *Chest*, 2004. **126**(4): p. 1318-1329.
  387. Recommandations de la Société de Pneumologie de Langue Française sur le mésothéliome pleural. *Rev Mal Respir*, 2006. **23 Suppl 3**: p. 80-92.
  388. Rusch, V.W., Indications for pneumonectomy. *Extrapleural pneumonectomy.* *Chest Surg Clin N Am*, 1999. **9**(2): p. 327-338, x.
  389. Hegmans, J.P.J.J., Hemmes, A., Aerts, J.G., Hoogsteden, H.C., Lambrecht, B.N., Immunotherapy of Murine Malignant Mesothelioma Using Tumor Lysate-pulsed Dendritic Cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 2005. **171**(10): p. 1168-1177.
  390. Ebstein, F., Sapede, C., Royer, P.-J., Marcq, M., Ligeza-Poisson, C., Barbieux, I., Cellerin, L., Dabouis, G., Gregoire, M., Cytotoxic T Cell Responses against Mesothelioma by Apoptotic Cell-pulsed Dendritic Cells. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004. **169**(12): p. 1322-1330.
  391. Serman, D.H., Recio, A., Vachani, A., Sun, J., Cheung, L., DeLong, P., Amin, K.M., Litzky, L.A., Wilson, J.M., Kaiser, L.R., Albelda, S.M., Long-term follow-up of patients with malignant pleural mesothelioma receiving high-dose adenovirus herpes simplex thymidine kinase/ganciclovir suicide gene therapy. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(20): p. 7444-7453.
  392. Cao, X.X., Mohuiddin, I., Ece, F., McConkey, D.J., Smythe, W.R., Histone Deacetylase Inhibitor Downregulation of bcl-xl Gene Expression Leads to Apoptotic Cell Death in Mesothelioma. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2001. **25**(5): p. 562-568.
  393. Grondin, S.C., Sugarbaker, D.J., Pleuropneumonectomy in the treatment of malignant pleural mesothelioma. *Chest*, 1999. **116**(6 Suppl): p. 450S-454S.
  394. Ordonez, N.G., The immunohistochemical diagnosis of mesothelioma: a comparative study of epithelioid mesothelioma and lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 2003. **27**(8): p. 1031-1051.
  395. Conférence de consensus : élaboration d'une stratégie de surveillance médicale clinique des personnes exposées à l'amiante. *Rev Mal Respir*, 1999. **16**(6 Pt 2): p. 1187-1362.
  396. Statement on malignant mesothelioma in the United Kingdom. *Thorax*, 2001. **56**(4): p. 250-265.
  397. Onda, M., Nagata, S., Ho, M., Bera, T.K., Hassan, R., Alexander, R.H., Pastan, I., Megakaryocyte potentiation factor cleaved from mesothelin precursor is a useful tumor

- marker in the serum of patients with mesothelioma. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(14): p. 4225-4231.
398. Pass, H., Wolaniuk, D., Wali, A., Thiel, A., Hellstrom, I., Hellstrom, K., Sardesai, N., Soluble mesothelin related peptides: A potential biomarker for malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol* 2005. **23**: p. 9532.
399. Pass, H., Bones, J., Hellstrom, I., Hellstrom, K.E., Piccoli, S.P., Somers, E., Sardesai, N., O'Shannessy, D.J. *A Sensitive Serum Test for Monitoring of Malignant Pleural Mesothelioma*. in *ISOBM 2003*. 2003. Edinburgh.
400. Robinson, B.W., Creaney, J., Lake, R., Nowak, A., Musk, A.W., de Klerk, N., Winzell, P., Hellstrom, K.E., Hellstrom, I., Mesothelin-family proteins and diagnosis of mesothelioma. *Lancet*, 2003. **362**(9396): p. 1612-1616.
401. Scherpereel, A., Grigoriu, B.D., Conti, M., Gey, T., Gregoire, M., Copin, M.-C., Devos, P., Chahine, B., Porte, H., Lassalle, P., Soluble Mesothelin-related Protein in the Diagnosis of Malignant Pleural Mesothelioma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006. **173**: p. 1155-1160.
402. Hassan, R., Remaley, A.T., Sampson, M.L., Zhang, J., Cox, D.D., Pingpank, J., Alexander, R., Willingham, M., Pastan, I., Onda, M., Detection and quantitation of serum mesothelin, a tumor marker for patients with mesothelioma and ovarian cancer. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(2): p. 447-453.
403. Creaney, J., Christiansen, H., Lake, R., Musk, B., de Klerk, N., Robinson, B.W., Soluble Mesothelin Related Protein in Mesothelioma. *Journal of Thoracic Oncology* 2006. **1**(2): p. 172-174.
404. Pass, H.I., Lott, D., Lonardo, F., Harbut, M., Liu, Z., Tang, N., Carbone, M., Webb, C., Wali, A., Asbestos exposure, pleural mesothelioma, and serum osteopontin levels. *N Engl J Med*, 2005. **353**(15): p. 1564-1573.
405. Hammarstrom, S., The carcinoembryonic antigen (CEA) family: structures, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. *Semin Cancer Biol*, 1999. **9**(2): p. 67-81.
406. Romero, S., Fernandez, C., Arriero, J.M., Espasa, A., Candela, A., Martin, C., Sanchez-Paya, J., CEA, CA 15-3 and CYFRA 21-1 in serum and pleural fluid of patients with pleural effusions. *Eur Respir J*, 1996. **9**(1): p. 17-23.
407. Fuhrman, C., Duche, J.C., Chouaid, C., Abd Alsamad, I., Atassi, K., Monnet, I., Tillement, J.P., Housset, B., Use of tumor markers for differential diagnosis of mesothelioma and secondary pleural malignancies. *Clin Biochem*, 2000. **33**(5): p. 405-410.
408. Paganuzzi, M., Onetto, M., Marroni, P., Filiberti, R., Tassara, E., Parodi, S., Felletti, R., Diagnostic value of CYFRA 21-1 tumor marker and CEA in pleural effusion due to mesothelioma. *Chest*, 2001. **119**(4): p. 1138-1142.
409. Porcel, J.M., Vives, M., Esquerda, A., Salud, A., Perez, B., Rodriguez-Panadero, F., Use of a panel of tumor markers (carcinoembryonic antigen, cancer antigen 125, carbohydrate antigen 15-3, and cytokeratin 19 fragments) in pleural fluid for the differential diagnosis of benign and malignant effusions. *Chest*, 2004. **126**(6): p. 1757-1763.
410. Barak, V., Goike, H., Panaretakis, K.W., Einarsson, R., Clinical utility of cytokeratins as tumor markers. *Clinical Biochemistry*, 2004. **37**(7): p. 529-540.
411. Hedman, M., Arnberg, H., Wernlund, J., Riska, H., Brodin, O., Tissue polypeptide antigen (TPA), hyaluronan and CA 125 as serum markers in malignant mesothelioma. *Anticancer Res*, 2003. **23**(1B): p. 531-536.
412. Roboz, J., Greaves, J., Silides, D., Chahinian, A.P., Holland, J.F., Hyaluronic acid content of effusions as a diagnostic aid for malignant mesothelioma. *Cancer Res*, 1985. **45**(4): p. 1850-1854.
413. Pettersson, T., Froseth, B., Riska, H., Klockars, M., Concentration of hyaluronic acid in pleural fluid as a diagnostic aid for malignant mesothelioma. *Chest*, 1988. **94**(5): p. 1037-1039.
414. Nurminen, M., Dejmek, A., Martensson, G., Thylen, A., Hjerpe, A., Clinical utility of liquid-chromatographic analysis of effusions for hyaluronate content. *Clin Chem*, 1994. **40**(5): p. 777-780.
415. Soderblom, T., Pettersson, T., Nyberg, P., Teppo, A.M., Linko, L., Riska, H., High pleural fluid hyaluronan concentrations in rheumatoid arthritis. *Eur Respir J*, 1999. **13**(3): p. 519-522.
416. Laurent, T.C., Laurent, U.B., Fraser, J.R., Serum hyaluronan as a disease marker. *Ann Med*, 1996. **28**(3): p. 241-253.
417. Boersma, A., Degand, P., Biserte, G., Hyaluronic acid analysis and the diagnosis of pleural mesothelioma. *Bull Eur Physiopathol Respir*, 1980. **16**(1): p. 41-45.
418. Chiu, B., Churg, A., Tengblad, A., Pearce, R., McCaughey, W.T., Analysis of hyaluronic acid in the diagnosis of malignant mesothelioma. *Cancer*, 1984. **54**(10): p. 2195-2199.
419. Frebourg, T., Lerebours, G., Delpech, B., Benhamou, D., Bertrand, P., Maingonnat, C., Boutin, C., Nouvet, G., Serum hyaluronate in malignant pleural mesothelioma. *Cancer*, 1987. **59**(12): p. 2104-2107.



420. Martensson, G., Thylen, A., Lindquist, U., Hjerpe, A., The sensitivity of hyaluronan analysis of pleural fluid from patients with malignant mesothelioma and a comparison of different methods. *Cancer*, 1994. **73**(5): p. 1406-1410.
421. Atagi, S., Ogawara, M., Kawahara, M., Sakatani, M., Furuse, K., Ueda, E., Yamamoto, S., Utility of hyaluronic acid in pleural fluid for differential diagnosis of pleural effusions: likelihood ratios for malignant mesothelioma. *Jpn J Clin Oncol*, 1997. **27**(5): p. 293-297.
422. Thylen, A., Hjerpe, A., Martensson, G., Hyaluronan content in pleural fluid as a prognostic factor in patients with malignant pleural mesothelioma. *Cancer*, 2001. **92**(5): p. 1224-1230.
423. Li, Y., Heldin, P., Hyaluronan production increases the malignant properties of mesothelioma cells. *Br J Cancer*, 2001. **85**(4): p. 600-607.
424. Chang, K., Pai, L.H., Pass, H., Pogrebniak, H.W., Tsao, M.S., Pastan, I., Willingham, M.C., Monoclonal antibody K1 reacts with epithelial mesothelioma but not with lung adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*, 1992. **16**(3): p. 259-268.
425. Chang, K., Pastan, I., Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(1): p. 136-140.
426. Chang, K., Pastan, I., Willingham, M.C., Frequent expression of the tumor antigen CAK1 in squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer*, 1992. **51**(4): p. 548-554.
427. Chang, K., Pastan, I., Willingham, M.C., Isolation and characterization of a monoclonal antibody, K1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium. *Int J Cancer*, 1992. **50**(3): p. 373-381.
428. Chang, K., Pai, L.H., Batra, J.K., Pastan, I., Willingham, M.C., Characterization of the antigen (CAK1) recognized by monoclonal antibody K1 present on ovarian cancers and normal mesothelium. *Cancer Res*, 1992. **52**(1): p. 181-186.
429. Chang, K., Pastan, I., Molecular cloning and expression of a cDNA encoding a protein detected by the K1 antibody from an ovarian carcinoma (OVCAR-3) cell line. *Int J Cancer*, 1994. **57**(1): p. 90-97.
430. Brinkmann, U., Webber, K., Di Carlo, A., Beers, R., Chowdhury, P., Chang, K., Chaudhary, V., Gallo, M., Pastan, I., Cloning and expression of the recombinant FAb fragment of monoclonal antibody K1 that reacts with mesothelin present on mesotheliomas and ovarian cancers. *Int J Cancer*, 1997. **71**(4): p. 638-644.
431. Chowdhury, P.S., Chang, K., Pastan, I., Isolation of anti-mesothelin antibodies from a phage display library. *Mol Immunol*, 1997. **34**(1): p. 9-20.
432. Ordonez, N.G., Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Mod Pathol*, 2003. **16**(3): p. 192-197.
433. Watanabe, H., Okada, G., Ohtsubo, K., Yamaguchi, Y., Mouri, H., Motoo, Y., Wakabayashi, T., Sawabu, N., Expression of mesothelin mRNA in pure pancreatic juice from patients with pancreatic carcinoma, intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas, and chronic pancreatitis. *Pancreas*, 2005. **30**(4): p. 349-354.
434. Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C., Ryu, B., Rosty, C., Goggins, M., Wilentz, R.E., Murugesan, S.R., Leach, S.D., Jaffee, E., Yeo, C.J., Cameron, J.L., Kern, S.E., Hruban, R.H., Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(12): p. 3862-3868.
435. Ordonez, N.G., Application of mesothelin immunostaining in tumor diagnosis. *Am J Surg Pathol*, 2003. **27**(11): p. 1418-1428.
436. Hornick, J.L., Lauwers, G.Y., Odze, R.D., Immunohistochemistry can help distinguish metastatic pancreatic adenocarcinomas from bile duct adenomas and hamartomas of the liver. *Am J Surg Pathol*, 2005. **29**(3): p. 381-389.
437. Gilks, C.B., Vanderhyden, B.C., Zhu, S., van de Rijn, M., Longacre, T.A., Distinction between serous tumors of low malignant potential and serous carcinomas based on global mRNA expression profiling. *Gynecol Oncol*, 2005. **96**(3): p. 684-694.
438. Scholler, N., Fu, N., Yang, Y., Ye, Z., Goodman, G.E., Hellstrom, K.E., Hellstrom, I., Soluble member(s) of the mesothelin/megakaryocyte potentiating factor family are detectable in sera from patients with ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(20): p. 11531-11536.
439. Drapkin, R., Crum, C.P., Hecht, J.L., Expression of candidate tumor markers in ovarian carcinoma and benign ovary: evidence for a link between epithelial phenotype and neoplasia. *Hum Pathol*, 2004. **35**(8): p. 1014-1021.
440. Frierson, H.F., Jr., Moskaluk, C.A., Powell, S.M., Zhang, H., Cerilli, L.A., Stoler, M.H., Cathro, H., Hampton, G.M., Large-scale molecular and tissue microarray analysis of mesothelin expression in common human

- carcinomas. *Hum Pathol*, 2003. **34**(6): p. 605-609.
441. Liebig, B., Brabletz, T., Staeger, M.S., Wulfanger, J., Riemann, D., Burdach, S., Ballhausen, W.G., Forced expression of deltaN-TCF-1B in colon cancer derived cell lines is accompanied by the induction of CEACAM5/6 and mesothelin. *Cancer Lett*, 2005. **223**(1): p. 159-167.
442. Bhattacharjee, A., Richards, W.G., Staunton, J., Li, C., Monti, S., Vasa, P., Ladd, C., Beheshti, J., Bueno, R., Gillette, M., Loda, M., Weber, G., Mark, E.J., Lander, E.S., Wong, W., Johnson, B.E., Golub, T.R., Sugarbaker, D.J., Meyerson, M., Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(24): p. 13790-13795.
443. Muminova, Z.E., Strong, T.V., Shaw, D.R., Characterization of human mesothelin transcripts in ovarian and pancreatic cancer. *BMC Cancer*, 2004. **4**: p. 19.
444. Shaw, D.R., Muminova, Z.E., Strong, T.V., Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(24): p. 8751; author reply 8752.
445. Hassan, R., Bera, T., Pastan, I., Mesothelin: a new target for immunotherapy. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(12 Pt 1): p. 3937-3942.
446. Kojima, T., Oh-eda, M., Hattori, K., Taniguchi, Y., Tamura, M., Ochi, N., Yamaguchi, N., Molecular cloning and expression of megakaryocyte potentiating factor cDNA. *J Biol Chem*, 1995. **270**(37): p. 21984-21990.
447. Yamaguchi, N., Hattori, K., Oh-eda, M., Kojima, T., Imai, N., Ochi, N., A novel cytokine exhibiting megakaryocyte potentiating activity from a human pancreatic tumor cell line HPC-Y5. *J Biol Chem*, 1994. **269**(2): p. 805-808.
448. Bera, T.K., Pastan, I., Mesothelin is not required for normal mouse development or reproduction. *Mol Cell Biol*, 2000. **20**(8): p. 2902-2906.
449. Rump, A., Morikawa, Y., Tanaka, M., Minami, S., Umesaki, N., Takeuchi, M., Miyajima, A., Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. *J Biol Chem*, 2004. **279**(10): p. 9190-9198.
450. Yamashita, Y., Yokoyama, M., Kobayashi, E., Takai, S., Hino, O., Mapping and determination of the cDNA sequence of the Erc gene preferentially expressed in renal cell carcinoma in the Tsc2 gene mutant (Eker) rat model. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **275**(1): p. 134-140.
451. Prieve, M.G., Moon, R.T., Stromelysin-1 and mesothelin are differentially regulated by Wnt-5a and Wnt-1 in C57mg mouse mammary epithelial cells. *BMC Dev Biol*, 2003. **3**: p. 2.
452. McCarthy, D.M., Maitra, A., Argani, P., Rader, A.E., Faigel, D.O., Van Heek, N.T., Hruban, R.H., Wilentz, R.E., Novel markers of pancreatic adenocarcinoma in fine-needle aspiration: mesothelin and prostate stem cell antigen labeling increases accuracy in cytologically borderline cases. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2003. **11**(3): p. 238-243.
453. Ordonez, N.G., The diagnostic utility of immunohistochemistry in distinguishing between mesothelioma and renal cell carcinoma: a comparative study. *Hum Pathol*, 2004. **35**(6): p. 697-710.
454. Ho, M., Hassan, R., Zhang, J., Wang, Q.C., Onda, M., Bera, T., Pastan, I., Humoral immune response to mesothelin in mesothelioma and ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(10): p. 3814-3820.
455. Hassan, R., Lerner, M.R., Benbrook, D., Lightfoot, S.A., Brackett, D.J., Wang, Q.C., Pastan, I., Antitumor activity of SS(dsFv)PE38 and SS1(dsFv)PE38, recombinant antimesothelin immunotoxins against human gynecologic cancers grown in organotypic culture in vitro. *Clin Cancer Res*, 2002. **8**(11): p. 3520-3526.
456. Hassan, R., Bullock, S., Kreitman, R.J., Kindler, H.L., Pastan, I. *Targeted therapy of mesothelin expressing mesotheliomas (MM), ovarian cancer (OC) and pancreatic cancer (PC): Results of phase I study of SS1(dsFv)PE38 (SSIP)*. in *Journal of Clinical Oncology*. 2004.
457. Breidenbach, M., Rein, D.T., Everts, M., Glasgow, J.N., Wang, M., Passineau, M.J., Alvarez, R.D., Korokhov, N., Curiel, D.T., Mesothelin-mediated targeting of adenoviral vectors for ovarian cancer gene therapy. *Gene Ther*, 2005. **12**(2): p. 187-193.
458. McIntosh, M.W., Drescher, C., Karlan, B., Scholler, N., Urban, N., Hellstrom, K.E., Hellstrom, I., Combining CA 125 and SMR serum markers for diagnosis and early detection of ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, 2004. **95**(1): p. 9-15.
459. Robinson, B.W., Creaney, J., Lake, R., Nowak, A., Musk, A.W., de Klerk, N., Winzell, P., Hellstrom, K.E., Hellstrom, I., Soluble mesothelin-related protein--a blood test for mesothelioma. *Lung Cancer*, 2005. **49 Suppl 1**: p. S109-111.
460. Chabas, D., L'osteopontine, une molecule aux multiples facettes. *Med Sci (Paris)*, 2005. **21**(10): p. 832-838.
461. Denhardt, D.T., Guo, X., Osteopontin: a protein with diverse functions. *Faseb J*, 1993. **7**(15): p. 1475-1482.

462. O'Regan, A., The role of osteopontin in lung disease. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003. **14**(6): p. 479-488.
463. Wai, P.Y., Kuo, P.C., The role of Osteopontin in tumor metastasis. *J Surg Res*, 2004. **121**(2): p. 228-241.
464. Rangaswami, H., Bulbule, A., Kundu, G.C., Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *Trends Cell Biol*, 2006. **16**(2): p. 79-87.
465. Denhardt, D.T., Noda, M., O'Regan, A.W., Pavlin, D., Berman, J.S., Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest*, 2001. **107**(9): p. 1055-1061.
466. Furger, K.A., Menon, R.K., Tuck, A.B., Bramwell, V.H., Chambers, A.F., The functional and clinical roles of osteopontin in cancer and metastasis. *Curr Mol Med*, 2001. **1**(5): p. 621-632.
467. Thalmann, G.N., Sikes, R.A., Devoll, R.E., Kiefer, J.A., Markwalder, R., Klima, I., Farach-Carson, C.M., Studer, U.E., Chung, L.W., Osteopontin: possible role in prostate cancer progression. *Clin Cancer Res*, 1999. **5**(8): p. 2271-2277.
468. Rittling, S.R., Chambers, A.F., Role of osteopontin in tumour progression. *Br J Cancer*, 2004. **90**(10): p. 1877-1881.
469. Jono, S., Peinado, C., Giachelli, C.M., Phosphorylation of osteopontin is required for inhibition of vascular smooth muscle cell calcification. *J Biol Chem*, 2000. **275**(26): p. 20197-20203.
470. Ashkar, S., Weber, G.F., Panoutsakopoulou, V., Sanchirico, M.E., Jansson, M., Zawaideh, S., Rittling, S.R., Denhardt, D.T., Glimcher, M.J., Cantor, H., Eta-1 (osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*, 2000. **287**(5454): p. 860-864.
471. Senger, D.R., Wirth, D.F., Hynes, R.O., Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. *Cell*, 1979. **16**(4): p. 885-893.
472. O'Regan, A.W., Serlin, D., Berman, J.S., Asbestos exposure and serum osteopontin. *N Engl J Med*, 2006. **354**(3): p. 304-305; author reply 304-305.
473. Coppola, D., Szabo, M., Boulware, D., Muraca, P., Alsarraj, M., Chambers, A.F., Yeatman, T.J., Correlation of osteopontin protein expression and pathological stage across a wide variety of tumor histologies. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(Pt 1): p. 184-190.
474. Brown, L.F., Papadopoulos-Sergiou, A., Berse, B., Manseau, E.J., Tognazzi, K., Perruzzi, C.A., Dvorak, H.F., Senger, D.R., Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol*, 1994. **145**(3): p. 610-623.
475. Chambers, A.F., Wilson, S.M., Kerkvliet, N., O'Malley, F.P., Harris, J.F., Casson, A.G., Osteopontin expression in lung cancer. *Lung Cancer*, 1996. **15**(3): p. 311-323.
476. Koopmann, J., Fedarko, N.S., Jain, A., Maitra, A., Iacobuzio-Donahue, C., Rahman, A., Hruban, R.H., Yeo, C.J., Goggins, M., Evaluation of osteopontin as biomarker for pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2004. **13**(3): p. 487-491.
477. Yeatman, T.J., Chambers, A.F., Osteopontin and colon cancer progression. *Clin Exp Metastasis*, 2003. **20**(1): p. 85-90.
478. Kim, J.H., Skates, S.J., Uede, T., Wong, K.K., Schorge, J.O., Feltmate, C.M., Berkowitz, R.S., Cramer, D.W., Mok, S.C., Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA*, 2002. **287**(13): p. 1671-1679.
479. Hu, Z., Lin, D., Yuan, J., Xiao, T., Zhang, H., Sun, W., Han, N., Ma, Y., Di, X., Gao, M., Ma, J., Zhang, J., Cheng, S., Gao, Y., Overexpression of osteopontin is associated with more aggressive phenotypes in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(13): p. 4646-4652.
480. Donati, V., Boldrini, L., Dell'Omodarme, M., Prati, M.C., Faviana, P., Camacci, T., Lucchi, M., Mussi, A., Santoro, M., Basolo, F., Fontanini, G., Osteopontin expression and prognostic significance in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(18): p. 6459-6465.
481. Fedarko, N.S., Jain, A., Karadag, A., Van Eman, M.R., Fisher, L.W., Elevated serum bone sialoprotein and osteopontin in colon, breast, prostate, and lung cancer. *Clin Cancer Res*, 2001. **7**(12): p. 4060-4066.
482. Nemoto, H., Rittling, S.R., Yoshitake, H., Furuya, K., Amagasa, T., Tsuji, K., Nifuji, A., Denhardt, D.T., Noda, M., Osteopontin deficiency reduces experimental tumor cell metastasis to bone and soft tissues. *J Bone Miner Res*, 2001. **16**(4): p. 652-659.
483. Wu, Y., Denhardt, D.T., Rittling, S.R., Osteopontin is required for full expression of the transformed phenotype by the ras oncogene. *Br J Cancer*, 2000. **83**(2): p. 156-163.
484. Ophascharoensuk, V., Giachelli, C.M., Gordon, K., Hughes, J., Pichler, R., Brown, P., Liaw, L., Schmidt, R., Shankland, S.J., Alpers, C.E., Couser, W.G., Johnson, R.J., Obstructive uropathy in the mouse: role of osteopontin in interstitial fibrosis and apoptosis. *Kidney Int*, 1999. **56**(2): p. 571-580.
485. Fedarko, N.S., Fohr, B., Robey, P.G., Young, M.F., Fisher, L.W., Factor H binding to bone sialoprotein and osteopontin enables tumor cell

- evasion of complement-mediated attack. *J Biol Chem*, 2000. **275**(22): p. 16666-16672.
486. Fisher, L.W., Torchia, D.A., Fohr, B., Young, M.F., Fedarko, N.S., Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **280**(2): p. 460-465.
487. Cullen, M.R., Serum osteopontin levels--is it time to screen asbestos-exposed workers for pleural mesothelioma? *N Engl J Med*, 2005. **353**(15): p. 1617-1618.
488. Hiraki, A., Aoe, K., Ueoka, H., Asbestos exposure and serum osteopontin. *N Engl J Med*, 2006. **354**(3): p. 304-305; author reply 304-305.
489. Trowbridge, J.M., Gallo, R.L., Dermatan sulfate: new functions from an old glycosaminoglycan. *Glycobiology*, 2002. **12**(9): p. 117R-125R.
490. Mancuso, P., Colleoni, M., Calleri, A., Orlando, L., Maisonneuve, P., Pruneri, G., Agliano, A., Goldhirsch, A., Shaked, Y., Kerbel, R.S., Bertolini, F., Circulating endothelial-cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy. *Blood*, 2006. **108**(2): p. 452-459.
491. Miller, J.C., Pien, H.H., Sahani, D., Sorensen, A.G., Thrall, J.H., Imaging angiogenesis: applications and potential for drug development. *J Natl Cancer Inst*, 2005. **97**(3): p. 172-187.
492. Garcia-Barros, M., Paris, F., Cordon-Cardo, C., Lyden, D., Rafii, S., Haimovitz-Friedman, A., Fuks, Z., Kolesnick, R., Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*, 2003. **300**(5622): p. 1155-1159.
493. Dowell, J.E., Kindler, H.L., Antiangiogenic therapies for mesothelioma. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2005. **19**(6): p. 1137-1145, viii.