



ÉTUDE DES EFFETS DE L'EXTRAIT DE CARTILAGE DE REQUIN ET DU TLN-4601 SUR LE GLIOBLASTOME CHEZ LA SOURIS GRÂCE AUX TECHNOLOGIES TRANSCRIPTOMIQUES ET PROTEOMIQUES

Bryan Simard

► To cite this version:

Bryan Simard. ÉTUDE DES EFFETS DE L'EXTRAIT DE CARTILAGE DE REQUIN ET DU TLN-4601 SUR LE GLIOBLASTOME CHEZ LA SOURIS GRÂCE AUX TECHNOLOGIES TRANSCRIPTOMIQUES ET PROTEOMIQUES. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2010. Français. NNT: . tel-00540852

HAL Id: tel-00540852

<https://theses.hal.science/tel-00540852>

Submitted on 29 Nov 2010

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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

ECOLE DOCTORALE CHIMIE ET SCIENCES DU VIVANT

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité: Neurosciences et neurobiologie

Présentée et soutenue par

Bryan SIMARD

Le 24 novembre 2010

ÉTUDE DES EFFETS DE L'EXTRAIT DE CARTILAGE DE REQUIN ET
DU TLN-4601 SUR LE GLIOBLASTOME CHEZ LA SOURIS GRÂCE
AUX TECHNOLOGIES TRANSCRIPTOMIQUES ET PROTEOMIQUES

Directeur de thèse : Pr. François BERGER

Composition du Jury :

Dr. Thomas Bachelot, rapporteur
Dr. Pierre Falardeau, rapporteur
Dr. Gilles Pernod, président

Thèse préparée dans le laboratoire de Neurosciences précliniques,
INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences

À Daniel Dubuc et Richard Roussel, tous deux décédés du cancer cet été ...

REMERCIEMENTS

J'aimerais d'abord remercier mes parents, qui ont su développer ma curiosité et qui m'ont toujours encouragé à me surpasser.

Je remercie François Berger de m'avoir accueilli si chaleureusement dans son unité et pour toutes les discussions qui m'ont toujours très inspiré.

Je remercie Isabelle Dupré, Michèle El Atifi, Béatrice Rostaing-Puissant et Virginie Pautre pour tout le travail d'optimisation de la technologie du transcriptôme et leur aide qui m'ont permis d'obtenir si rapidement des résultats d'aussi bonnes qualités.

Je remercie Ali Bouamrani de m'avoir donné un fier coup de main pour le travail énorme qui a été réalisé in vivo.

Je remercie également David Ratel et Annick Michoud pour leur aide sur la détection des cytokines et les zymographies.

Enfin, j'aimerais souligner tout le plaisir que j'ai eu à connaître les membres de l'unité 836, pour leur convivialité, leur générosité et leur inégalable sens de l'humour !

RÉSUMÉ

Le glioblastome représente le grade le plus élevé des tumeurs cérébrales. Sa croissance est favorisée par une forte néovascularisation de même que par l'activation de la voie du récepteur à l'EGFR-Ras.

La première partie montre l'effet antiangiogénique et antitumoral de l'extrait de cartilage dans plusieurs modèles de glioblastome chez la souris. L'étude du transcriptôme des cellules endothéliales a permis de proposer des mécanismes d'actions. Il a été proposé que l'extrait de cartilage induise la sécrétion de cytokines, qui entraînent la génération de dérivés réactifs de l'oxygène. Ceux-ci entraîneraient l'activation du NFκB qui induirait l'expression d'un premier réseau de gènes impliqués dans l'inflammation de l'endothélium en croissance. La co-administration de corticoïdes pour réduire l'œdème tumoral a d'ailleurs entraîné une perte de l'efficacité in vivo et serait donc à proscrire en clinique. L'extrait de cartilage a également surexprimés un second réseau de gènes impliqués dans la protéolyse de la matrice, nécessaire à la stabilisation du tube vasculaire. Le rôle essentiel joué par l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) a été démontré par une étude fonctionnelle complète du système fibrinolytique in vivo. Enfin, la formation d'œdème tumoral, causé par ce système, a pu être contrôlée grâce à un co-traitement au N-actéylcystéine, ce qui a augmenté significativement la survie dans le modèle de glioblastome intracérébral chez la souris. Ce co-traitement serait recommandé pour des essais cliniques.

La seconde partie montre que l'effet du TLN-4601 dépend d'une exposition chronique, ce qui a permis d'orienter le régime thérapeutique lors des essais cliniques. Il a été montré que ce dibenzodiazépines farnésylé, pouvait agir sur le récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) et les messagers farnésylés tel que Ras, Raf et Rho, dans la voie de l'EGFR. L'accumulation du composé dans les tumeurs, les effets sur la stéroïdogénèse et la dépolarisation de la mitochondrie, seraient attribuables au PBR. L'induction de tout un réseau de gènes responsables du catabolisme du glycérol et de la beta oxydation des acides gras, enlèverait les substrats nécessaires à la synthèse des phospholipides membranaires et la croissance des cellules tumorales. Ce changement métabolique, pourrait découler de l'inhibition d'Akt en aval de Ras. C'est pourquoi, les patients présentant les mutations de MDM2, p53 et PTEN, fréquemment rencontrées dans les GBM, ne seraient en théorie pas de bons candidats, car elles sont capables d'activer la voie de RAS en aval de l'effet du TLN. En revanche, la surexpression du PBR serait tout à fait souhaitable.

STUDY OF THE EFFECT OF CARTILAGE EXTRACT AND TLN-4601 ON EXPERIMENTAL MICE GLIOMA, USING TRANSCRIPTOMIC AND PROTEOMIC TECHNOLOGIES

Glioblastoma represents the highest grade of brain tumors. Its growth is promoted by a strong neovascularization and by the activation of the EGFR-Ras pathway.

The first part shows the antiangiogenic and antitumoral effect of cartilage extract in several models of glioblastoma in mice. The study of the transcriptome of endothelial cells has permitted to propose some mechanisms of action. It was postulated that the cartilage extract could induce secretion of cytokines, which would cause the generation of reactive oxygen species. These would lead to the activation of NFkB, which would induce the expression of a first network of genes involved in inflammation of endothelial growth. Co-administration of corticosteroids, to reduce tumor edema, has resulted in a loss of efficacy in vivo and should be avoided in clinical practice. The cartilage extract also overexpressed a second network of genes involved in proteolysis of the matrix, required for vascular tube stabilization. The essential role played by tissue plasminogen activator (tPA) has been demonstrated by a complete functional study of the fibrinolytic system in vivo. Finally, the formation of tumor edema, caused by that system could be controlled by co-treatment with N-acetylcysteine, which significantly increased survival in the intracerebral model of mice glioblastoma. This co-treatment would be recommended for clinical trials.

The second part demonstrates that the effect of TLN-4601 relies on a chronic exposure, which guided the design of the therapeutic regimen in clinical trials. It was shown that this farnesylated dibenzodiazepine, could act on the peripheral benzodiazepine receptor (PBR) and farnesylated messengers such as Ras, Raf and Rho involved in the EGFR pathway. The accumulation of the compound in tumors, the effects on steroidogenesis and the mitochondrial depolarization could be attributed to the PBR. The induction of a network of genes responsible for catabolism of glycerol and beta oxidation of fatty acids, would remove the substrates required for synthesis of membrane phospholipids and growth of tumor cells. This metabolic change could result from the inhibition of Akt downstream of Ras. Therefore, patients with mutations of MDM2, p53 and PTEN, frequently found in GBM, would in theory not be good candidates, since they are able to activate the RAS pathway downstream of the effect of TLN. In contrast, overexpression of PBR would be an excellent criterion.

TABLE DES MATIÈRES

Contexte général	11
INTRODUCTION	12
Glioblastome	13
Incidence	13
Classification.....	13
Thérapies.....	14
Radiothérapie	14
Chimiothérapie.....	15
Principaux mécanismes de l'oncogénèse	16
Problématique.....	17
Particularité du glioblastome	17
Objectifs.....	18
1^{ERE} PARTIE	
INHIBITION DE L'ANGIOGÉNÈSE PAR LE CARTILAGE DE REQUIN.....	19
INTRODUCTION	20
Angiogenèse	20
Thérapies antiangiogéniques	23
Cartilage	27
1^{ER} ARTICLE	
ÉTUDE DU TRANSCRIPTÔME DES CELLULES ENDOTHÉLIALES	32
PREINTRODUCTION	33
Étude du transcriptôme à l'aide de puces à ADN	33
Mécanismes d'action de l'extrait de cartilage de requin	34
Analyse des données transcriptomiques.....	34
Pathway Assist	34
TITLE: Shark cartilage extract induces cytokines expression and secretion in ECs and induces E-selectin, plasminogen and t-PA genes expression through an antioxidant-sensitive mechanism	37
ABSTRACT.....	38
INTRODUCTION	39
MATERIAL AND METHODS.....	41
Oligonucleotide microarray analysis.....	41
Pathway analysis	43
Measurement of cytokine release using antibody arrays.....	43
Real-time quantitative PCR.....	44

RESULTATS (traduit en français)	45
DISCUSSION (traduite en français)	47
1) protéolyse excessive de la matrice et détachement des cellules endothéliales ...	47
2) attraction et adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales	51
AKNOWLEDGMENTS	54
TABLES AND FIGURES.....	55

2^E ARTICLE

Rôle du système fibrinolytique dans l'effet antiangiogénique ... du cartilage de requin	62
CONTEXTE	63
INTRODUCTION	63
Système fibrinolytique	63
TITLE: Induction of plasminogen system by cartilage extract is essential to its antiangiogenic effect in mouse glioma	67
ABSTRACT.....	68
INTRODUCTION	69
METHODS.....	71
Lentiviral vector production	73
<i>In vitro</i> transduction of GL-26 cells	74
Cartilage extract preparation and storage	75
Histology	76
Detection of t-PA by immunohistochemistry	77
Zymography analysis	78
<i>In vitro</i> tissue type plasminogen activator (t-PA) assay	79
STATISTICAL ANALYSIS.....	79
RESULTS	76
Effect of cartilage extract on vessel morphology and counting	80
Effect of cartilage extract on survival.....	81
Effect of cartilage extract on t-PA activity	82
Treatment with cartilage extract results in Angiostatin formation	82
Functional analysis of the fibrinolytic pathway.....	83
Inhibition of plasminogen/plasmin with EACA	83
Reduction of plasmin with NAC.....	83
Inhibition of t-PA by PAI-1	84
Overexpression of PAI-1 by lentivector-transduced GL-26 glioma cells	84
FIGURES AND LEGENDS	85

DISCUSSION	95
Acknowledgements.....	102
3^E ARTICLE	
Méthode pour optimiser le Néovastat.....	103
Analyse transcriptomique par microarray à haute densité	104
Corrélation avec l'efficacité obtenue in vivo	105
Passage de la haute densité vers le haut débit	106
TITLE: High Density Microarray on Nylon Membrane and Oligo Sorbent Array: Two comparable and complementary methods for analysis of gene expression...	107
ABSTRACT.....	108
INTRODUCTION	109
MATERIAL AND METHODS.....	110
HUVEC treatment and RNA preparation	111
High Density Microarray on Nylon Membrane (HDM).....	111
Low Density Microarray on 96-well microtiter plate (OLISA™ technology)	113
Quantitative PCR	115
STATISTICAL ANALYSIS.....	115
RESULTS	116
DISCUSSION	122
ACKNOWLEDGMENTS.....	124
CONCLUSION DE LA 1^{ère} PARTIE	124
2^E PARTIE	
CONTEXTE	130
INTRODUCTION	132
Récepteurs des benzodiazépines	132
TSPO.....	132
TLN-4601.....	134
Voie de signalisation de Ras	136
MATÉRIEL & MÉTHODES	138
RESULTATS.....	141
Étude d'efficacité antitumorale	141
Étude transcriptomiques par microarray.....	143
DISCUSSION	146
Efficacité in vivo	146
Transcriptôme des tumeurs traitées	148

TSPO.....	148
Entrée du cholestérol et stéroïdogénèse.....	149
Voies de signalisation de Ras	150
Effets sur le métabolisme.....	153
F ₁ F ₀ ATP synthase	153
Hexokinase	156
PFK-1	157
Métabolismes des acides gras	157
Apoptose	161
CONCLUSION DE LA 2^e PARTIE	163
CONCLUSION GENERALE	165
RÉFÉRENCES	168

TABLES ET FIGURES

Tableau 1 : Fréquence des altérations dans les gliomes	16
Tableau 2 : Facteurs angiogéniques	23
Tableau 3 : Principaux inhibiteurs de l'angiogenèse testés in vivo	25
Tableau 4 : Essais cliniques antiangiogéniques dans les gliomes malins	26
Tableau 5: Premières expériences sur les effets antiangiogéniques du cartilage de requin	27
Tableau 6 : Molécules extraites du cartilage.....	28
Tableau 7 : Effets antiangiogénique du cartilage de requin per os	29
Tableau 8 : Effets du Néovastat dans différents modèles expérimentaux	30
Tableau 9: Essais cliniques impliquant le Néovastat.....	30
Table 10: Differential gene expression in HUVECs in response to SCE.....	55
Table 11: Cytokine detected in the medium of HUVEC treated with SCE	56
Table 12: Gene expression profiles of HUVECs treated with SCE or TNF- α	57
Table 13: Primers used for real-time quantitative PCR.....	58
Figure 1: Validation of gene expression by quantitative RT-PCR	59
Figure 2: Effect of corticoid and SCE cotreatment on survival of i.c. glioma bearing mice... ..	60
Figure 3: Biological association network (BAN) for the data gene list	61
Table 14: Effect of cartilage extract on tumor vessel density	85
Figure 4: Effect of cartilage extract on tumor vessels	86
Figure 5: Morphological aspect of tumor tissue	87
Table 15: Effect of cartilage extract on mice median survival.....	88
Figure 6: Effect of SCE treatment on survival of mice implanted i.c. with C6 glioma	88
Figure 7: Immunostaining of tPA in subcutaneous glioma of cartilage extract-treated mice	89
Figure 8: Formation of angiostatin in subcutaneous glioma of SCE-treated mice	89

Figure 9: Localization of t-PA and angiostatin by immunofluorescence in orthotopically inoculated glioma of cartilage extract-treated mice.....	90
Figure 10: Effect of EACA and NAC on survival of cartilage extract-treated mice.....	91
Figure 11: Effect of EACA and NAC on cartilage extract induced tumor oedema	91
Figure 12: In vitro stimulation of t-PA activity by cartilage extract and its inhibition by PAI-1...	92
Figure 13: Increased t-PA activity within subcutaneous tumors treated with SCE.....	93
Figure 14: Effect of plasminogen activator inhibitor-1 on SCE antiangiogenic effect	94
Figure 15: Modulation of the fibrinolytic pathway by PAI-1, EACA and NAC	95
Figure 16 : Clustering du transcriptôme des HUVEC traitées avec différents extraits de cartilage de requin	104
Figure 17 : Effet des différents lots de Néovastat sur la survie des souris.....	105
Figure 18 : Marqueurs différenciant l'efficacité des lots.....	106
Figure 19: Schematic representation of the OLISA technology and protocol	114
Figure 20: Typical image of a nylon membrane spotted with long oligonucleotides and using radioactive detection for large scaled analysis of gene expression.....	116
Table 16: Quantitative data of 6 classifiers obtained from High Density Microarray on Nylon Membrane (HDM).....	117
Figure 21: Images of OLISA™ for the 6 RNA samples.....	118
Table 17: Quantitative data obtained from OLISA	118
Table 18: Quantitative RT-PCR data.....	119
Table 19: Spearman's rank-order correlation coefficients for the 3 technologies.....	120
Figure 22 : Comparison of the rescaled data of the 3 technologies	121
Table 20: Pearson's product moment correlation coeff. for the 3 technologies	121
Figure 23 : Structures de deux ligands typiques du TSPO: Ro5-4864 et PK11195.....	133
Figure 24 : Structure chimique du TLN-4601	134
Tableau 21 : Cytotoxicité du TLN-4601 dans les lignées cérébrales	135
Figure 25 : Liaison compétitive du PK-11195 et du ECO-4601 sur le TSPO.....	136
Figure 26 : Effet de la voie d'administration sur l'efficacité antitumorale du TLN-4601 dans le modèle de glioblastome C6 chez la souris	142
Figure 27 : Effet antitumoral du TLN-4601 dans le modèle U87MG chez la souris	143
Tableau 22 : Gènes différentiellement exprimés par le TLN-4601 dans les tumeurs C6	144
Figure 28 : Rôle du MPTP dans la stéroïdogénèse	149
Figure 29 : Effets du TLN-4601 sur les voies de signalisation de Ras.....	151
Figure 30 : Effets possibles du TLN-4601 sur la mitochondrie	153
Figure 31 : Effet du TLN-4601 sur le métabolisme énergétique	158

Contexte général

Les glioblastomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes et les plus graves de l'adulte. Malgré le développement des techniques chirurgicales, de la radiothérapie et des chimiothérapies, le pronostic des patients porteurs d'un glioblastome demeure sombre avec une médiane de survie estimée à 12 mois. Leur échec s'explique par le caractère très infiltrant de ces tumeurs, excluant toute exérèse totale, et une relative résistance à la radiothérapie et aux chimiothérapies actuelles. La faible efficacité des thérapeutiques conventionnelles a justifié le développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblées sur les caractéristiques biologiques et moléculaires de ces tumeurs. L'importance du phénomène angiogénique au sein des glioblastomes ainsi que la forte expression du récepteur périphérique des benzodiazépines et du récepteur à l'EGF en font des cibles thérapeutiques privilégiées. Les premières thérapies visant une cible moléculaire ont souvent montré de bons résultats lors des essais cliniques de phase II, mais la grande majorité ne se sont pas qualifiées pour la phase III ou n'ont pas atteint leurs objectifs ou eu d'impact significatif sur la pratique clinique courante. La prochaine génération de thérapies tentera de viser plusieurs cibles moléculaires à l'aide d'une drogue à cibles multiples ou bien à l'aide d'une combinaison de plusieurs drogues. Cette thèse portera sur l'étude de deux thérapies issues de sources naturelles : 1) L'extrait de cartilage de requin, qui contiendrait plusieurs molécules ayant des propriétés antiangiogéniques et 2) Le TLN-4601, un dibenzodiazépinone farnésylé produit par des actinomycètes et pouvant se lier au récepteur périphérique des benzodiazépines ou interférer avec l'activation du RAS farnésylé dans la signalisation de l'EGFR. Elle décrira comment les différentes technologies transcriptomiques et protéomiques ont été mis en œuvre dans l'étude des mécanismes d'actions de ces deux thérapies.

INTRODUCTION

Glioblastome

Incidence

Les tumeurs primitives du système nerveux central (SNC) représentent approximativement 1 % des tumeurs de l'adulte (incidence évaluée à 7,2/100 000 par an) et plus de 2 % des décès par cancer de l'adulte peuvent leur être attribués [1]. Parmi ces tumeurs, les gliomes (tumeurs dérivées des cellules gliales ou de leurs précurseurs) sont les plus fréquentes [1, 2].

Classification

Le diagnostic et la classification histologique des gliomes reposent sur la classification OMS 2000 qui les différencie en fonction du type cellulaire (astrocytome, oligodendrogliome ou oligoastrocytome) et de quatre degré de malignité croissante [3]. Les astrocytome de grade IV ou glioblastomes (GBM) représentent la forme la plus agressive avec une médiane de survie des patients non traités estimée à 4 mois [4]. C'est aussi le type histologique le plus fréquemment rencontré chez l'adulte. Leur incidence a été évaluée à 3,3/100 000 par an pour les hommes et à 2,2/100 000 par an pour les femmes, dans une étude récente menée par l'IARC (International Agency for Research on Cancer) sur la population suisse [5]. L'âge médian au diagnostic est de 61 ans [5, 6] (80 % des patients ont plus de 50 ans et 30 % plus de 70 ans au diagnostic). L'allongement de l'espérance de vie dans les pays développés a pour effet d'augmenter l'incidence des glioblastomes dans cette population [7].

Thérapies

Sur le plan thérapeutique, les glioblastomes semblent cumuler les handicaps et représentent un véritable défi pour les neuro-oncologues. Ainsi, leur caractère diffus et infiltrant rend illusoire leur résection complète. Certes, la qualité du geste chirurgical influence la survie mais la récurrence postopératoire reste la règle [8, 9]. Ces tumeurs sont par ailleurs caractérisées par leur chimiorésistance et leur radiorésistance, expliquant le faible impact du traitement sur la survie.

Radiothérapie

Le bénéfice de la radiothérapie a été prouvé à la fin des années 1970 quand plusieurs études de phase III ont démontré que la radiothérapie focalisée réalisée en postopératoire permettait d'augmenter la médiane de survie [4, 10], faisant de cette approche un standard thérapeutique. Suite à ces résultats, de nombreuses équipes ont tenté d'augmenter l'efficacité de l'irradiation en modifiant les modalités d'administration (radiothérapie hypo ou hyperfractionnée, irradiation accélérée...). Aucune stratégie ne s'est cependant révélée supérieure au protocole standard: irradiation focalisée de 60 grays (Gy) en 5 fractions de 2 Gy par semaine. La problématique est que le glioblastome est une tumeur particulièrement radiorésistante qui siège au sein d'un organe radiosensible. Pour augmenter l'efficacité de la radiothérapie, l'irradiation fractionnée devrait passer à 75 ou 80 Gy [11]. Toutefois une pareille dose ne serait pas sans toxicité tardive sur le parenchyme cérébral.

Cette faible radiosensibilité des glioblastomes est probablement multifactorielle, impliquant notamment les mécanismes de réparation de l'ADN et les altérations de la voie de l'apoptose. Par ailleurs, la radiosensibilité dépend

également du cycle cellulaire, les cellules en phase G2/M étant les plus sensibles aux radiations [12].

Chimiothérapie

La chimioradiothérapie concomitante est une méthode qui doit permettre d'améliorer l'efficacité de la radiothérapie. L'objectif de ces associations thérapeutiques est d'obtenir une coopération spatiale au niveau cellulaire entre les radiations ionisantes et les agents cytotoxiques. Différents modes d'action peuvent s'exercer selon les agents: Il peut s'agir de produire davantage de lésions à l'ADN, diminuer les mécanismes de réparation des lésions de l'ADN ou bloquer les cellules dans une phase du cycle où elles sont davantage radiosensibles. Les agents cytotoxiques les plus étudiés sont les sels de platine tel que le cisplatine [13] et les agents alkylants comprenant les nitroso-urées, tel que le BCNU et le fotémustine [14, 15] et, de façon plus récente, les témozolomides [16, 17]. Les épipodophyllotoxines comme l'étoposide [18] ou le topotécan [19] sont des inhibiteurs de topoisomérases étudiés dans le but d'augmenter l'efficacité des agents cytotoxiques.

Le traitement standard actuel pour les patients de moins de 70 ans atteints d'un gliome de grade IV, consiste en une chirurgie maximale suivi d'une radiothérapie et d'une chimiothérapie concomitante et adjuvante de témozolomide. Ce plan thérapeutique permet un taux de survie de 61.1% et 26.5% à 1 an et 2 ans, respectivement [20]. Lors de la récurrence, il n'y a pas de consensus sur le prochain traitement et le pronostic est faible. Lorsque possible, une deuxième résection tumorale est recommandée, avec l'implantation d'une éponge interstitielle de BCNU

(Gliadel®; MGI Pharma, Inc., Bloomington, MN) [21]. Dans le cas contraire, les patients reçoivent alors une chimiothérapie de seconde ligne.

Principaux mécanismes de l'oncogenèse

De multiples altérations chromosomiques ont été décrites dans les glioblastomes, notamment les pertes d'hétérozygotie sur les chromosomes 1p, 9p, 10q, 17p 19q et 22q ou le gain du chromosome 7. Certaines de ces pertes chromosomiques impliquent des gènes suppresseurs de tumeurs. En effet, comme le montre le tableau 1, les glioblastomes présentent fréquemment une mutation du gène p53 [22], une mutation du gène PTEN [23], une surexpression du gène du MDM2 [24] et du gène de l'EGFR ou une délétion du gène p16/CDKN2 [25].

Gènes	Siège	Fonction	Principale altération	Incidence astro (%)	Incidence oligo (%)
TP53	17p	Cycle, apoptose, réparation	Mutation	40	10
P16/CDKN2A	9p	Cycle	Délétion	50	20
P14ARF	9p	Cycle	Méthylation	20	20
RB	13q	Cycle	Mutation	20	-
PTEN	10q	Transduction, invasion	Mutation	20	-
EGFR	7q	Transduction	Amplification/mutation	40	0- 20
MDM2	12q	Cycle	Amplification	10	-
CDK4	12q	Cycle	Amplification	5 - 10	-
PDGFRA	4q	Transduction	Amplification	5 - 10	5 - 10
?	1p	?	LOH	10	50 - 80
?	19q	?	LOH	40	50 - 80
?	10q	?	LOH	80	30
?	22q	?	LOH	25	25

Tableau 1 : Fréquence des altérations dans les gliomes

Problématique

La radiothérapie et la chimiothérapie actuelle ont pour cible directe l'ADN qui contient le bagage génétique de toutes les cellules. Ces traitements manquent de sélectivité et sont limités par la toxicité en plus de faire face à des mécanismes de réparations tel que la topoisomérase et la O6-méthylguanine DNA méthyltransférase (MGMT).

Stratégie

La connaissance plus approfondie des caractéristiques biologiques et moléculaires du glioblastome nous permet à présent de proposer des thérapies plus spécifiques et moins toxiques pour l'organisme.

Particularité du glioblastome

Le glioblastome est caractérisé par une forte néovascularisation, un métabolisme élevé et une résistance à l'apoptose.

Le phénomène, d'angiogenèse, permet à la tumeur d'augmenter son afflux de nutriments et d'oxygène et d'évacuer les déchets afin de croître plus rapidement. Les glioblastome sont parmi les tumeurs les plus vascularisées et leur croissance en dépend. Pour cette raison, nous nous sommes intéressés à l'effet antiangiogénique et antitumoral du cartilage de requin.

Le glioblastome bénéficie également d'un rendement accru de la glycolyse qui lui serait conféré par un pore trans-mitochondrial (MPTP) reliant l'hexokinase à l'ATP synthétase [26, 27]. Le récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR), est le principal constituant de ce pore et s'avère fortement surexprimé dans les

glioblastomes. En addition, ces derniers s'avèrent particulièrement résistants à l'apoptose et par conséquent à la radiothérapie. L'amplification du gène de l'EGFR serait en partie responsable de cette résistance [28]. Il entraîne une activation de Ras [29], qui active ensuite la PI3K et au final la voie antiapoptotique d'Akt. P53 est un activateur de PTEN [30] qui contre normalement l'effet de la PI3K [31]. Leur mutation favorise également l'activation de la voie d'Akt [32]. Comme l'amplification de l'EGFR et la mutation de p53 et de PTEN sont fréquente dans les glioblastomes, Ras et son effecteur Akt se retrouvent activés dans 30% et 70 % des gliomes respectivement [33]. Ras active également la voie de Raf qui mène à l'activation de ERK. Ce dernier s'avère surexprimé et activé dans le glioblastome multiforme [34] et jouerait aussi un rôle important dans la survie des gliomes [35]. Enfin, la farnésylation de Ras est une modification essentielle pour sa localisation à la membrane et pour son pouvoir de transformation [36].

Les actinomycètes sont capables de produire un dibenzodiazépine farnésylé pouvant, de par sa structure, potentiellement se lier au PBR sur la mitochondrie et/ou interférer avec la signalisation de messagers farnésylés tel que Ras, Raf ou RhoB. Pour cette raison, nous nous sommes également intéressés aux effets de ce nouveau composé sur le glioblastome.

Objectifs

Au-delà de l'efficacité antitumorale de ces différentes thérapies issues toutes deux d'organismes biologiques, nous verrons comment les technologies transcriptomiques et protéomiques ont été mis en œuvre afin d'investiguer leur mécanisme d'action.

1^{ERE} PARTIE :

INHIBITION DE L'ANGIOGENÈSE PAR LE CARTILAGE DE REQUIN

INTRODUCTION

Angiogenèse

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir des vaisseaux préexistants. Ce processus joue un rôle dans le développement de l'embryon à un stade tardif [37]. Chez l'adulte, la grande majorité du réseau vasculaire est quiescent et seulement 0.01 % des cellules endothéliales (CE) est en division. L'angiogenèse physiologique est un phénomène étroitement contrôlé. Chez l'adulte, elle est observée exclusivement au cours de la réparation tissulaire et dans le système de reproduction féminin. Elle joue également un rôle important dans des conditions pathologiques tel que l'inflammation, le psoriasis, la rétinopathie diabétique et la croissance tumorale.

L'angiogenèse tumorale débute 1) par la vasodilatation puis la perméabilisation des vaisseaux primitifs qui permettent l'extravasation des protéines plasmatiques, formant ainsi un environnement favorable à la migration des cellules endothéliales. Ensuite, 2) elle nécessite l'activation des cellules endothéliales et leur prolifération, 3) la dégradation de la membrane basale grâce à des enzymes protéolytiques dont les métalloprotéases matricielles (MMPs) et les protéases du système du plasminogène, 4) la migration des cellules endothéliales vers le stimulus angiogénique, impliquant notamment des molécules d'adhérence cellulaire (CAMs) tel que les intégrines, 5) l'adhérence des cellules endothéliales entre elles pour constituer l'architecture des nouveaux vaisseaux, 6) la formation de la lumière vasculaire, 7) l'élaboration d'une nouvelle membrane basale, 8) le recrutement des péricytes et enfin, 9) la maturation fonctionnelle des néovaisseaux. L'angiogenèse est donc une suite d'événements complexes qui requiert des activités mitotiques,

protéolytiques et chimiotactiques des cellules endothéliales. De nombreuses molécules sont susceptibles d'induire une action pro-angiogénique ou antiangiogénique et participent à l'établissement d'un équilibre assurant le maintien de l'état basal. Un déséquilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et antiangiogéniques à la suite d'altérations environnementales (hypoxie, inflammation) et/ou génétiques (mutations des cellules tumorales) peut alors déclencher le processus angiogénique: c'est la conversion ou "switch" angiogénique [38]. Les cellules tumorales favorisent la rupture de l'équilibre en faveur de l'angiogenèse, en synthétisant leurs propres facteurs angiogéniques et en activant les macrophages infiltrés dans la tumeur, qui synthétisent des protéases spécifiques, capables de libérer des facteurs angiogéniques stockés dans la matrice extracellulaire.

Les principaux facteurs impliqués dans l'angiogenèse des glioblastomes sont les protéines de la famille du "vascular endothelial growth factor" (VEGF) et leurs récepteurs VEGFR1 (flt1), VEGFR2 (flk1/KDR) et VEGFR3 (flt4), les angiopoïétines 1 et 2 et leur récepteur Tie2 (tyrosine kinase with immunoglobulin and epidermal growth factor homology domains), le "basic fibroblast growth factor" (bFGF), les métalloprotéases matricielles (MMPs), le système des activateurs du plasminogène et certaines molécules d'adhésion cellulaire (CAMs) [39]. Le tableau 2 décrit sommairement les facteurs angiogéniques les plus connus.

Facteurs angiogéniques	Mécanismes d'action
Facteurs de croissance	
VEGF	↑ la perméabilité vasculaire, ↑ la prolifération des CE
PIGF	↑ l'angiogenèse pathologique
bFGF	↑ la prolifération et la migration des CE
Pléiotrophine	↑ la prolifération et la différenciation des CE
PDGF	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
HGF/SF	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
EGF/TGFα	↑ la synthèse de facteurs pro-angiogénique
Système des angiopoïétines	
Ang1 et Tie2	↑ la stabilisation des néovaisseaux, ↓ la perméabilité vasculaire
Ang2 en présence de VEGF	Déstabilise les vaisseaux pour permettre la modification du réseau vasculaire
Médiateurs de l'inflammation et cytokines	
TNFα	↑ la différenciation des CE
IL8	↑ la prolifération des CE
IL3	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
Prostaglandines E1, E2	↑ la différenciation des CE
IL4	↑ la migration et la différenciation des CE
TGFα	↑ la production de molécules de la MEC, du VEGF, de l'IL8 et du PDGF
IGF1	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
Molécules de la MEC, molécules d'adhérence cellulaire, protéases matricielles et inhibiteurs	
Gangliosides, laminine, ténectine, collagène IV	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
uPA et tPA	↑ le remodelage de la MEC, libère et active de nombreux facteurs de croissance
PAI	↑ la stabilisation des néovaisseaux en empêchant la dissolution de la MEC
MMP	↑ le remodelage de la MEC, libère et active de nombreux facteurs de croissance
TIMP	↑ la stabilisation des néovaisseaux en empêchant la dissolution de la MEC
PECAM	Molécules d'adhésion des CE nécessaires à leur survie
E-sélectine	Molécules exprimées dans les néovaisseaux associés aux tumeurs, mécanismes inconnus
ICAM3	Molécules exprimées dans les néovaisseaux associés aux tumeurs, mécanismes inconnus
Intégrine αvβ3 et αvβ5	Interaction avec la MEC et les protéases, importante pour la migration des CE ; liaison avec le VEGF
Oncogènes tumoraux	
ras	↑ la synthèse du VEGF et des TGFα et β, ↓ la synthèse de la TSP1
p53	↑ la synthèse du VEGF, ↓ la synthèse de la TSP1
Von Hippel Lindau	↑ la synthèse du HIF-1 et du VEGF

Autres	
COX2	↑ la vasodilatation
Angiogénine	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
Adrénomedulline	↑ la vasodilatation, la prolifération et la migration des CE
Œstrogènes	↑ la prolifération, la migration et la différenciation des CE
Proliférine	↑ la migration des CE

Tableau 2 : Facteurs angiogéniques

Thérapies antiangiogéniques

L'hétérogénéité et l'inaccessibilité des glioblastomes en raison de la barrière hématoencéphalique, leur confère une grande résistance aux traitements chimiothérapeutiques actuels. Comme la croissance des glioblastomes dépend fortement de l'angiogenèse et que les cellules endothéliales sont beaucoup plus stables génétiquement en plus d'être directement accessibles depuis la circulation, beaucoup d'espoir a été placé dans les thérapies antiangiogéniques. De plus, comme l'angiogenèse physiologique est plutôt rare chez l'adulte, peu d'effets secondaires sont à craindre théoriquement.

La connaissance des mécanismes moléculaires de l'angiogenèse a conduit au développement de nombreuses molécules susceptibles de bloquer une ou plusieurs phases du processus. Ainsi ont été créés des anticorps bloquant les facteurs pro-angiogéniques ou leurs récepteurs, ainsi que des molécules pouvant inhiber les médiateurs de la signalisation intracellulaire, les protéines d'adhésion ou même les protéases matricielles. Certains inhibiteurs endogènes ont également été reproduits et testés (Tableau 3)

Stratégies et traitements	Modèle de GBM	Résultats	[Réf]
Inhibiteurs des facteurs angiogéniques, de leurs récepteurs et/ou des voies de signalisation			
Anticorps monoclonal A.4.6.1 du VEGF	U87MG IC souris nude	↓ de la densité vasculaire	[40]
DC101, anticorps polyclonal spécifique du VEGFR2	9L IC rats nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire, ↑ de l'apoptose, ↑ de l'invasion des 9L	[41]
SU5416, inhibiteur du VEGFR2	C6 SC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire	[42]
D54MG transduite par le gène codant pour forme soluble du VEGFR1	D54MG IC souris SCID	↑ de la survie des souris	[43]
SU11248 inhibiteur des RTK du VEGF et du PDGF	U87MG IC souris nude	↓ de la densité vasculaire, ↑ de l'apoptose ↑ de la survie	[44]
SU6668 inhibiteur des RTK du VEGF, bFGF et du PDGF	C6 SC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire	[45]
Suramine	E106 SC souris nude	↓ du volume tumoral	[46]
Anticorps polyclonal spécifique du bFGF	U87MG IC rats nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire	[47]
Squalamine	9L SC rats Fischer	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire	[48]
Ibuprofène	C6 IC rats Sprague-Dawley	↓ du poids tumoral	[49]
Inhibiteurs des cellules endothéliales activées			
Angiostatine	U87MG, C6, 9L SC IC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire, ↑ de l'apoptose	[50]
Fragment du plasminogène, kringles 1-3	U87MG IC souris nude	↓ du volume tumoral, ↑ de l'apoptose	[51]
Endostatine	SHG44 SC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire	[52]
ES	BT4C SC rats BD-IX	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire	[53]
Injection d'ES (SC) + SU5416 (IP)	U87MG SC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire	[54]
TNP470	9L SC IC rats Fischer	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire	[55]
Injection de la doxorubicine encapsulée dans des liposomes	9L IC rats Fischer	↑ de l'apoptose et de la nécrose, hémorragie	[56]
Injection systémique d'IFNβ	U87MG IC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire, ↑ de l'apoptose	[57]
Inhibiteurs des molécules d'adhérence cellulaire et du remodelage de la MEC			
Cilengitide (inhibiteur de l'intégrine αVβ3)	U87MG IC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire	[58]
Injection systémique de	U87MG SC IC	↓ du volume tumoral et de la densité	[59]

Stratégies et traitements	Modèle de GBM	Résultats	[Réf]
l'EMD121974	souris nude	vasculaire, ↑ de la survie	
Injection systémique de PEX	U87MG, U373MG, U118MG SC IC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire, ↑ de l'apoptose	[60]
Injection intratumorale d'antisens uPAR-uPA	U87MG SC souris nude	↓ du volume tumoral	[61]
Injection intratumorale d'antisens uPAR-MMP9	U87MG SC souris nude	↓ du volume tumoral	[62]
Injection d'un fragment octamérique de l'uPA (A6)	U87MG SC IC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire, ↑ de la survie des souris	[63]
Injection systémique d'un kringle recombinant (UK1) de l'uPA	U87MG IC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire	[64]
Combinaison du traitement antiangiogénique avec la chimio ou la radiothérapie			
Thalidomide + Cisplatine	9L IC SC rat F344	Altération de la vasculature, ↑ de la capture du cisplatine par 10x, ↓ du volume tumoral	[65]
TNP470 + témozolomide	C6 SC rat Sprague-Dawley	↓ de 25% de la capture du témozolomide par la tumeur	[66]
PEX + carboplatine + étoposide	U87MG IC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire, ↑ de l'apoptose	[67]
Minocycline + BCNU	9L IC rat Fischer	↓ du volume tumoral	[68]
Inhibiteur de PKC + BCNU	T98G SC IC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire, ↑ de la survie, l'inhibiteur de PKC potentialise l'effet du BCNU	[69]
Thalidomide + BCNU	C6 SC rat Wistar	↓ du volume tumoral, pas d'effet antiangiogénique, effet antiprolifératif	[70]
A6 + cisplatine	U87MG SC IC souri nudes	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire, ↑ de la survie des souris	[63]
Angiostatine + irradiation	D54 SC souris nude	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire	[71]
TNP470 + irradiation	U87MG SC IC souris nude	Le TNP-470 potentialise l'effet de la radiothérapie	[72]
SU5416 + VEGFR2 + irradiation	GL261 SC souris C57Bl6	↓ de la radiorésistance des cellules tumorales	[73]
SU11248 + irradiation	GL261 SC souris C57Bl6	↓ du volume tumoral et de la densité vasculaire, SU11248 potentialise l'effet de la radiothérapie	[74]]
Celecoxib + irradiation	U87MG IC souris nude	Celecoxib potentialise l'effet de la radiothérapie, ↓ de la densité vasculaire, ↑ de la nécrose	[75]
DC101 + irradiation	U87MG SC souris nude	Le traitement par DC101 potentialise l'effet de la radiothérapie	[76]

Tableau 3 : Principaux inhibiteurs de l'angiogenèse testés in vivo

Ces résultats expérimentaux prometteurs ont encouragés l'investigation clinique de plusieurs molécules antiangiogéniques (tableau 4).

Molécules	Phase	Mécanismes	Promoteur
PTK787	I	Bloquant du VEGFR-2	Novartis
SU5416	I-II	Bloquant du VEGFR-2	Sugen ; NCI
SU101	III	Inhibiteur du récepteur du PDGF	Sugen
STI571	I-II	Inhibiteur du récepteur du PDGF	Novartis
Suramine	II	Bloquant des récepteurs à activité tyrosine	NCI ; NABTT
Thalidomide	I-II	Mécanismes inconnus	Celgene
TNP470	II	Inhibiteur des CE dérivé de la fumagilline	TAP Pharma.
EMD121974	I-II	Antagoniste des intégrines présentes sur les CE	Merck KGaA
CCI779	I-II	Analogue de la rapacynine inhibitrice de m-TOR	NCI
PEG-IFN α 2b	II	Effets multiples	NCI
BG00001-IFN β	I	Effets multiples	Biogen
ZD1839- Iressa [®] -Gefitinib	II	Inhibiteur du récepteur de l'EGFR	NCI
Prinomastat [®]	III	Inhibiteur des MMP	Pfizer
Marimastat [®]	III	Inhibiteur des MMP	British Biotech
COL3	I-II	Inhibiteur synthétique de MMP	Collagenex ; NCI
Avastin [®]	III	Anticorps anti-VEGF	Genentech

Tableau 4 : Essais cliniques antiangiogéniques dans les gliomes malins

À ce jour, les rares molécules ayant atteint la phase III n'ont pas permis de conclure à un effet bénéfique des stratégies antiangiogéniques sur la survie ou la qualité de vie des patients atteints de glioblastome. Toutefois, les résultats récents obtenus dans les cancers du rein et du côlon avec un anticorps bloquant le VEGF [77], et l'approbation de l'avastin par la FDA en mai 2009, comme thérapie de deuxième ligne pour le traitement des glioblastomes, démontrent bien que le traitement antiangiogénique n'est plus une utopie et qu'il a sa place dans le traitement du cancer. La difficulté vient du fait que l'angiogenèse est un phénomène

complexe qui fait intervenir de nombreux partenaires ayant parfois des actions compensatoires. Par conséquent, les thérapies antiangiogéniques devront viser plus d'une cible moléculaire pour être enfin efficaces.

Cartilage

Le cartilage fut le premier tissu à être perçu comme une source potentielle d'inhibiteurs de l'angiogenèse, car ce tissu est normalement avasculaire et que le chondrosarcome, une tumeur du cartilage, est la moins vascularisée de toutes les tumeurs [78]. Initialement, un extrait de cartilage de veau avait servi à démontrer l'effet antiangiogénique du cartilage. Le requin a par la suite été choisi comme source de cartilage, car son endosquelette en est entièrement constitué, ce qui représente jusqu'à 8% de sa masse corporelle, alors que les mammifères n'en contiennent que 0,6% [79]. L'effet antiangiogénique et antitumoral du cartilage de requin a par la suite été démontré dans de nombreux modèles, comme le montre le tableau 5.

Préparation	Méthode	Activité inhibitrice	Réf.
Fraction de cartilage de requin	Test de cornée de lapin	Angiogenèse tumorale	[79]
Fractions de cartilage de requin	Test de cornée de lapin, CAM	Angiogenèse tumorale	[80]
Extrait de cartilage de requin	Culture de CE	Prolifération des CE	[81]
Fraction purifiée de cartilage de requin (U-995)	CAM	Angiogenèse	[82]
	Culture de CE	Prolifération et migration des CE	
	Zymographie	Activité collagénolytique	

Tableau 5: Premières expériences sur les effets antiangiogéniques du cartilage de requin. (CAM : chick chorioallantoic membrane)

L'efficacité antiangiogénique du cartilage lui viendrait de la coopération entre de nombreuses molécules inhibitrices endogènes. Le tableau 6 décrit les différentes molécules qui ont été purifiées et identifiées à partir du cartilage.

Masse moléculaire (kDa)	Description	Réf.
10	SCF2	[83]
10 & 14	U-995	[82]
13.7	SCP-1	[84]
14 & 15	-	[85]
16	-	[86]
18	SCAIF-1	[87]
19	Inhibiteur de collagénase	[88]
20	Endostatine / fragment du collagène XVIII	[89]
21	Troponine-1 (TnI)	[90]
23	TIMP-3 glycosylée	[91]
24	TIMP-2 glycosylée	[92]
25	Chondromoduline-1 (ChM-I)	[93]
28	Inhibiteur de collagénase	[94]
35.5	Chondrocyte derived inhibitor (ChDI)	[95]
38	Métastatine	[96]
40	Chondromodulin-1 like glycoprotein (ChM1L)	[97]
45	ChM1L glycosylée	[97]
58 & 62	Enzymes fibrinolytique	[98]
80	Shark cartilage-derived angiogenesis inhibitory factor (SCAIF)	[99]
103-104	Fraction	[80]
450	Thrombospondine (glycosylée)	[100]

Tableau 6 : Molécules extraites du cartilage

Des doutes ont été soulevés quant à la possibilité que des protéines puissent être absorbées par le tube digestif et conserver leur activité antiangiogénique. En effet, la biodisponibilité orale des protéines est limitée, d'une part, par leur faible stabilité face aux enzymes digestives telles que la chymotrypsine, l'élastase et la trypsine. Ensuite, le passage des protéines à travers la muqueuse intestinale peut

se faire via le transport paracellulaire ou bien le transport transcellulaire. Les protéines hydrophylques sont généralement limitées au transport paracellulaire qui s'effectue à travers des pores aqueux formés par les jonctions intercellulaires. Leur biodisponibilité par cette voie est d'environ 1-2% [101]. En revanche, les protéines hydrophobiques peuvent traverser la muqueuse par diffusion passive via le transport transcellulaire et profiter d'une biodisponibilité accrue [102]. En somme, bien qu'il soit possible qu'une quantité suffisante de molécules actives soient absorbées intactes, il est probable que les molécules actives soient en fait des produits de dégradation. Par exemple, différents fragments du collagène XIII, de la prolactine et du plasminogène possèdent une activité antiangiogénique [103-106]. Quoiqu'il en soit, l'efficacité antiangiogénique des extraits de cartilage administrés par la voie orale a bel et bien été démontrée dans de multiples études (tableau 7).

Préparation	Méthode	Activité Inhibitrice	Réf.
En poudre	Lit mésentérique de rat	Angiogenèse	[107]
Extrait liquide	Implant de PVA sous cutané chez l'humain	Prolifération endothéliale	[108]
Suspension	Gliosarcome 9L	Croissance tumorale	[109]
En poudre	Test de cornée de lapin	Angiogenèse induite par le bFGF	[110]
Fraction hydrosoluble	Culture de CE	Prolifération endothéliale	

Tableau 7 : Effets antiangiogénique du cartilage de requin per os

En revanche, certains extraits se sont avérés inefficaces [111, 112]. La source de cartilage, la qualité des préparations ou bien leur lyophilisation pourraient être en cause. Les Laboratoires Aeterna ont donc entrepris de standardiser la préparation du cartilage de requin et d'en contrôler la qualité afin de promouvoir son

utilisation en clinique [113]. Le Néovastat (AE-941) est l'agent actif issu de l'homogénéisation et de l'ultra filtration du cartilage. Le procédé permet de se débarrasser d'environ 95% du cartilage brut et de ne conserver que les molécules actives comprises entre 0-500kDa. Ce produit s'est montré actif dans de nombreux modèles (Table 8).

Modèle	Espèce	Activité inhibitrice	Réf.
Irritation cutanée	Humain	Inflammation	[114]
Extravasation plasmatique	Souris	Perméabilité vasculaire induite par le VEGF	[115]
Matrigel	Souris	Angiogenèse induite par le b-FGF	[116]
Métastase des os	Souris	Propagation et croissance des cellules de cancer du sein	[117]
Hypersensibilité de contact	Souris	Inflammation	[118]
Asthme	Souris	Infiltration leucocytaire bronchoalvéolaire	[119]
Asthme	Souris	Expression du VEGF et de HIF-2 dans les poumons	[120]

Tableau 8 : Effets du Néovastat dans différents modèles expérimentaux

Le Néovastat a également été le sujet de quatre études cliniques portant sur différents types de cancers et d'une étude clinique sur le psoriasis (table 9).

Pathologie	Année	Type d'essai	Réf.
Sarcome de Kaposi	2001	1 patient	[121]
Cancer du rein	2002	Phase II	[122]
Psoriasis	2002	Phase I / II	[123]
Cancer du poumon	2003	Phase I / II	[124]
Cancer du rein	2007	Phase III	[125]

Tableau 9: Essais cliniques impliquant le Néovastat

Compte tenu des caractéristiques des gliomes malins et de la nature multi mécanistique de l'extrait de cartilage, le Néovastat est apparu comme un bon candidat pour de prochains essais cliniques portant sur le glioblastome. Dans le

cadre du développement préclinique du Néovastat, le travail de cette thèse s'est d'abord intéressé aux mécanismes d'action de son effet antiangiogénique en analysant le transcriptôme de cellules endothéliales traitées, à l'aide du logiciel PathwayAssist de Stratagène. Parmi les mécanismes proposés, un intérêt tout particulier pour le système fibrinolytique est né du fait que les gènes du plasminogène (PLG) et de son activateur tissulaire (PLAT) se sont avérés fortement induits et que de fortes doses administrées in vivo ont eu pour effet de rendre les tumeurs hémorragiques. Une étude fonctionnelle in vivo du système fibrinolytique est par la suite venue éclaircir le rôle joué par ces deux gènes dans l'effet antiangiogénique de l'extrait de cartilage de requin sur le glioblastome. Enfin, nous présenterons une nouvelle technologie, appelée OLISA, permettant le transfert du microarray à haute densité vers un essai à haut débit n'impliquant que quelques gènes sélectionnés, dans le but de valider les résultats transcriptomiques et d'étudier quelques marqueurs sur un grand nombre d'échantillons dans l'industrie pharmaceutique ou la clinique.

1^{ER} ARTICLE :

ÉTUDE DU TRANSCRIPTÔME DES CELLULES ENDOTHÉLIALES
TRAITÉES À L'EXTRAIT DE CARTILAGE DE REQUIN

INTRODUCTION

Étude du transcriptôme à l'aide de puces à ADN

Les puces à ADN permettent de quantifier les ARN messagers spécifiques d'un grand nombre de gènes de façon simultanée dans un tissu donné. Le principe repose sur l'hybridation ADN-ADN, à savoir, l'appariement par complémentarité des bases de deux séquences de nucléotides formant un duplex ADN (double brin). Des séquences spécifiques de 50-70 nucléotides, sont sélectionnées pour chaque gène d'intérêt. Ces oligonucléotides constituent les sondes. Grâce à une station robotisée (microarrayer), des milliers de sondes peuvent être déposées sur un support solide de manière régulière, ordonnée et parfaitement identique d'une puce à l'autre. L'utilisation de membranes de nylon assure un bon ancrage des sondes permettant une grande stabilité dans le temps et même la déshybridation des cibles et la réutilisation des membranes. La bonne capacité d'absorption du nylon, permet également de déposer un grand nombre de gouttes au même endroit sans altérer la résolution du dépôt, ce qui permet d'augmenter la quantité d'ADN déposée lorsque les solutions sont faiblement concentrées.

Pour sa part, la cible est constituée des ADNc radiomarqués obtenus en soumettant la totalité des ARN messagers du tissu étudié à une réaction de transcription inverse, durant laquelle sont incorporés des nucléotides radioactifs (α ^{33}P dCTP). L'utilisation de la radioactivité pour le marquage des cibles permet d'obtenir une grande sensibilité. Le choix du P^{33} donnera des signaux mieux résolus grâce à un rayonnement β de faible énergie. Après l'hybridation de la cible avec les sondes contenues sur la puce, le signal est mesuré à l'aide d'un scanner à haute résolution. L'intensité est proportionnelle à la quantité de cible fixée sur les sondes, et donc au taux d'expression du gène concerné. Les signaux d'hybridation sont

ensuite quantifiés à l'aide d'un logiciel et à chaque signal est assigné le nom du gène. Une normalisation est effectuée entre les différentes puces grâce à un standard interne. L'intensité moyenne des signaux de chaque puce peut également servir de référence pour la normalisation. Les gènes ayant un ratio d'expression différentielle de 2 ou plus et ayant une valeur p inférieure à 0.05, peuvent servir à établir des réseaux afin de proposer des mécanismes d'actions. Ces gènes peuvent également servir à établir une signature transcriptionnelle permettant de faire de la classification. Par exemple, les gènes peuvent former des profils d'expression caractéristiques pouvant discriminer avec une grande fiabilité des tumeurs invasives ou non invasives, résistantes ou sensibles.

Mécanismes d'action de l'extrait de cartilage de requin

Dans le premier article, la puce à ADN a été utilisée pour étudier le transcriptôme de cellules endothéliales traitées afin de proposer des mécanismes par lequel l'extrait de cartilage de requin inhiberait l'angiogenèse tumorale.

Analyse des données transcriptomiques

Les méthodologies générant un haut débit de données telles que l'étude transcriptomique par microarray, requièrent de nouvelles approches pour collecter de l'information pertinente pour permettre leur analyse.

Pathway Assist

Pathway Assist de Adriadne Genomic est un logiciel qui utilise les données extraites de la littérature pour établir des liens entre les gènes qui sont

différentiellement exprimés ou entre leurs protéines et ainsi proposer des mécanismes.

Dans un premier temps, la liste des gènes d'intérêts est importée dans le logiciel. Ce dernier n'a aucun problème à les reconnaître puisqu'il contient une liste complète des alias connus.

Le logiciel peut alors interroger une base de données déjà établie qui renferme 1 million de faits. Ces faits décrivent des interactions telles que les liaisons protéiques, le transport, la synthèse, le métabolisme, l'expression, la traduction et les modifications post-traductionnelles.

En addition, cette base de données peut être enrichie et spécialisée grâce à la fonction Medscan. En effet, l'une des forces du logiciel Pathway Assist, c'est qu'il offre la possibilité de faire une recherche par mots clefs sur Pubmed et de scanner le texte de tous les résumés du sujet d'intérêt à la recherche d'interactions possibles. La collecte de faits peut par exemple se limiter à un type cellulaire ou bien une maladie en particulier. Le logiciel dresse alors une liste incluant toute les relations trouvées, les molécules impliquées et la référence précisant jusqu'à la ligne du texte afin que l'information puisse facilement être vérifiée et validée.

Une fois les relations validées et sélectionnées, le logiciel bâtit alors graphiquement un réseau et positionne de façon optimale les objets et les connecteurs décrivant les relations qui les unissent. Plusieurs options flexibles s'offrent alors. Entre autre, il est possible de filtrer seulement les interactions directes, la voie la plus courte, les régulateurs communs ou les cibles communes.

Dans l'étude des mécanismes antiangiogéniques du cartilage de requin par exemple, les 200 gènes sur ou sous exprimés d'un facteur supérieur à 2 ont été importés dans Pathway Assist à l'aide de leur Unigene ID. Afin de lancer la fonction

Medscan et d'orienter au maximum la recherche, la liste des 200 gènes, chacun séparé par le terme "OR" et l'ensemble mis entre parenthèses, a été combinée grâce au terme "AND" avec les mots clefs "Angiogenesis" OR "Endothel*" entre parenthèses. Afin d'épargner du temps, pour générer la liste textuelle des 200 gènes, la fonction concaténer du logiciel microsoft excel a été utilisée sur la colonne contenant les symboles des 200 gènes. Environ 10 000 faits, se rapportant à l'un de nos 200 gènes et à l'angiogénèse, l'endothélium ou les cellules endothéliales, ont été trouvés dans Pubmed et intégrés dans la base de données grâce à la fonction Medscan. De ces 10 000 faits, en utilisant la fonction "Find only direct interactions", quelques centaines de relations entre les gènes d'intérêts ont été trouvées.

Il est alors conseillé de vérifier une à une les références afin de les valider. La stratégie adoptée fut plutôt d'utiliser encore une fois excel pour simplifier le processus. Les énoncés ont été copiés dans excel, puis en utilisant la fonction "rechercher", avec des mots clefs tels que "angiogenesis" ou "endothelial cell" ou "proliferation", il a été possible de trouver rapidement les phrases énonçant explicitement le processus ou le type cellulaire souhaité. Un bon exemple explicite serait: VEGF binds to KDR and stimulates endothelial cells proliferation during angiogenesis. Dans ce travail de thèse, nous avons limité la recherche de Pathway Assist à l'aide de la fonction "Find only direct interactions" ce qui a permis de ne faire ressortir que les relations les plus probables.

En somme, le logiciel a rendu possible une analyse croisée et complète de résultats transcriptomiques issus de la technologie microarray et orienté l'élaboration d'hypothèses sur les mécanismes d'action possibles de nos deux thérapies.

Shark cartilage extract induces cytokines expression and secretion in endothelial cells and induces E-selectin, plasminogen and t-PA genes expression through an antioxidant-sensitive mechanism.

Bryan Simard*, David Ratel, Isabelle Dupré, Virginie Pautre and François Berger

INSERM U836, Institut des neurosciences de Grenoble (GIN) et Université Joseph Fourier.

*Corresponding author: Bryan Simard

INSERM U836, Institut des neurosciences de Grenoble.

Tel: 001 819 575 4409

Fax: (011 33) 4 56 52 06 39

E-mail: simardbryan@yahoo.com

Running title: Transcriptomic analysis of endothelial cells treated with cartilage extract

Key words: Shark cartilage Extract, microarray, cytokines, NAC, ROS, SELE, PLAT, PLG, IL8, CSF2

Abbreviations: ROS : reactive oxygen species, t-PA : Tissue-plasminogene activator, PLG: plasminogene, NAC: N-acetylcystein, SELE: E-selectin

Word count :

Scientific heading :

ABSTRACT

Neovastat[®] is a standardized extract of marine cartilage, an avascular tissue, which contains many biologically active molecules and has multiple antiangiogenic properties. In addition to VEGFR2 and MMPs inhibition, it has recently been shown to induce PLAT expression in bovine endothelial cells in a TNF like manner, by inducing the typical mediators NF- κ B and JNK. We used microarray genes expression analysis on human umbilical vein endothelial cells (EC), to investigate further the mechanisms of genes induction in EC and angiogenesis inhibition by shark cartilage extract (SCE). Results showed that SCE induced expression of several cytokines. A protein array confirmed that HUVEC actually secrete TNF- α in addition to many others cytokines in response to SCE treatment. Their impact may be important, given the great similitude found when comparing the expression profiles of SCE and TNF- α treated cells. There is now compelling evidences that cytokine activates the NF- κ B and JNK pathways by inducing the generation of reactive oxygen species (ROS). Among the genes commonly induced by these pathways, we confirmed the overexpression of SELE, IL-8, PLAT, PLG, EFNA1, PRDX2 by q-PCR to validate our microarray results. Interestingly, overexpression of most of these genes has been inhibited by a pretreatment with the antioxidant N-Acetylcystein (NAC), suggesting a role of ROS. To explain how it could lead to angiogenesis inhibition, we proposed that IL-8 and SELE could cooperate to attract and attach immune cells to proliferating endothelial cells (EC). Still inspired by the literature, we also suggested that induction of the PLG/PLAT system could lead to degradation of the extracellular matrix and cause EC detachment, also interfering with angiogenesis.

INTRODUCTION

Angiogenesis, the formation of new vessels from pre-existing ones, is essential for normal physiological processes such as reproduction, development and repair. This process is a cascade of events, which under normal conditions, is a tightly regulated balance between endogenous anti and proangiogenic factors [126]. Angiogenesis is involved in multiple disease processes including inflammation, rheumatoid arthritis, arteriosclerosis, diabetic retinopathies, and cancer [127]. The formation of new blood vessels is a crucial step in the growth and metastasis of cancers and increased tumor angiogenesis has been associated with an increased incidence of distant metastasis [128]. Tumor unable to induce angiogenesis remain dormant at a microscopic in situ size [129]. Tumor angiogenesis is an extremely complex process in which the exposure of endothelial cells (ECs) to proangiogenic factors lead to subsequent angiogenic processes including invasion, migration and proliferation of endothelial cells [130]. The high proliferating rate of endothelial cells in new blood vessels formation confers them more sensitivity to a wide variety of drugs than normal endothelium. Moreover the direct accessibility from the circulation, and the potential low rate of drug resistance related to the genetic stability of ECs presents certain advantages on conventional therapies. Therefore, inhibiting tumor angiogenesis is a promising strategy for treating cancer. Various inhibitors of angiogenesis have been developed to target vascular endothelium and block tumor angiogenesis. In this way, it has been hypothesized that avascular tissues, like cartilage, may contain angiogenesis inhibitors and many studies have shown an inhibition effect of cartilage on tumor angiogenesis [86, 131]. Neovastat[®] is a naturally occurring inhibitor of angiogenesis derived from marine cartilage [132].

There is now strong evidence that the clinical benefits obtained with SCE rely on the presence of several angiogenesis inhibitors in this cartilage extract interfering with the complex and interrelated steps of angiogenesis. Previous studies have reported that SCE inhibits VEGF-mediated biological effects, like endothelial cell proliferation, migration, tubulogenesis and permeabilization by antagonizing its binding to the receptor Flk (VEGFR2) and the subsequent tyrosine kinase phosphorylation [115]. SCE also induces endothelial cell apoptosis via induction of caspase 3, 8 and 9 [133] and inhibits the matrix metalloproteinase activities of MMP 2, 9 and 12 [134]. Recently, it was reported that SCE specifically stimulates tPA-dependent-plasmin generation through an increase in the affinity of the enzyme towards plasminogen [135]. It has also been shown to induce PLAT expression in bovine endothelial cells in a TNF like manner, by inducing the typical mediators NF-kB and JNK [136]. However, the mechanism of action of this antiangiogenic agent has not yet been completely elucidated and many other signalling pathways and targets remain to discover.

In this work, we set out to further investigate the early responses of endothelial cells to SCE using DNA microarrays. Guided by PathwayAssist we compared the effects of SCE with those of TNF- α on EC and the response to a cotreatment with the antioxidant NAC to investigate the possible role of cytokines and ROS in genes induction by cartilage extract. The possible role of IL8, SELE, PLG and PLAT expression, in angiogenesis inhibition, will also be discussed.

MATERIAL AND METHODS

Cell cultures

Human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) were obtained from Cambrex (Paris, France). Early passages (p4-5) were grown in a humidified atmosphere (37°C, 5 % CO₂) to 70 % or 100 % confluence in EGM-2 (supplemented EBM-2). Three independent sets of experiments were performed. Each experiment consisted of HUVECs incubated in ½ of M199 supplemented with 10 % FCS, 10 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 10 µg/ml ECGS and ½ of EGM2 for 24 h and then subjected to either SCE 0, 35, 100 and 350 µg/ml or/and TNF-α 10 ng/ml and NAC 30 µM. Cells were washed twice in PBS and used either for mRNA analysis or for biological assays.

Reagents

Fetal calf serum (FCS), medium E-199, endothelial cell growth serum (ECGS), trypsin-EDTA, TNF-α, NAC were obtained from Sigma Chemicals (St-Louis, MO). Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2) and supplements were from Cambrex Bio Science (Paris, France). Penicillin and streptomycin were from Laboratoires Diamant (Puteaux, France). Shark cartilage extract (SCE, AE-941) was obtained from Aeterna Laboratories (Québec City, QC, Canada) [114].

Oligonucleotide microarray analysis

Array features: The microarray analyses were performed using long oligonucleotide nylon filters with 500-µm spot spacing. The 70-mer oligonucleotides of 230 genes were obtained from Operon Company GmbH (Cologne, Germany). Of them, 187

were related to cancer and angiogenesis. The DNA probes were printed in duplicate onto the membrane and probes for the standard RNA (*Oryza sativa* gene) were printed in 48 locations onto the filter. An anti-sense DNA probe for the RNA standard was used as negative signal to control the hybridization specificity. The quality of the filters and the quantities of printed DNA were determined using the polynucleotide kinase labelling method [137].

Samples, hybridization and expression measurements: Total RNAs were extracted from cells using the RNAgents® Total RNA Isolation System (Promega, Madison, WI, USA). The quantity and the quality of the extracted RNAs were checked using RNA LabChip and BioAnalyser 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). RNA samples were stored at -80°C until analysis. For transcriptomic analysis, 3 μg of total RNA sample and 0.2 ng of standard mRNA sample were reverse transcribed using polydT priming and $\alpha\text{-}^{33}\text{P}\text{-dCTP}$. The efficiency of the reverse transcription was verified by measuring the radioactivity level of the purified cDNA. Hybridizations on the filters were carried out for 72 hours under the conditions described previously [138]. After exposure on a phosphor screen high-resolution plate for 3 days, the image was scanned using a BAS 5000 phosphorimager and the spot intensities were acquired using the Array Gauge software (Fuji-Film; Raytest, Paris la Défense, France). Any raw data with intensity lower than the background plus three standard deviations were excluded. The normalization factors inter-assays were calculated with the global normalization method using the linear regression of all intensity data of the arrays, including the RNA standard intensities. For each arrayed gene, the resulting expression values, reported in arbitrary units, were compared to the expression value from the control cells. The relative changes in gene expression were analyzed using the Student's t-test ($p < 0.05$). Results were expressed as ratio

of the mean level of gene expression between the treated and the control groups. One unity has been added to the numerator and to the denominator to avoid problem of ratio calculation when genes were not detected in control (intensity 0) but were detected in treated cells. For example: Level of SELE expression was 79 in treated cells and undetected in control. $\text{Ratio}_{\text{SELE}} = (79 + 1) / (0 + 1) = 80$.

Pathway analysis

Biological association networks (BANs) were constructed using Pathways Assist (Stratgene). This program uses Med-Scan, which is a three tier information extraction system based on a full sentence parsing approach. It consists of a preprocessor which identifies and tags biomedical domain-specific concepts and a natural language processor engine that constructs a set of alternative semantic sentence structures and finally, an information extraction module acting as a domain specific filter for these structures. In addition, the Pathways Assist software contains ResNet, a database containing over 140,000 biological facts extracted from PubMed and other biological data bases. The sources of the canonical pathways include KEGG and LIGAND for 9 metabolic pathways, and PubMed references (both review and regular research articles) for signaling pathways.

Measurement of cytokine release using antibody arrays

Human cytokine array (Novagen, Darmstadt, Germany) consisted of 12 different cytokine antibodies spotted on the slide with four “spots” for each of the 12 cytokines plus additional spots for positive and negative controls. The wells were washed two times and 100 µl sample or standard solution were added in separate wells and incubated one hour at room temperature with gentle agitation. Following the wash,

80 µl of a biotin-conjugated antibodies solution were incubated for one hour at room temperature. After washing, the slide was exposed to a streptavidin-conjugated fluorophore for one and half hour in the dark before washing and imaging. The slide was scanned (excitation: 635 nm, emission: 660 nm, resolution: 10 µm). For each spot, the net density gray level was determined by subtracting the background gray levels from the total raw density gray levels. The standard curve for each analyte was determined with a plot of signal versus cytokine concentration and fitted with linear regression. The slope of the curve was used to calculate the analyte concentrations for the cell culture samples. The fold increase in cytokine amount was determined in reference to the amount present on the control culture wells on the basis of the following: average treated culture cytokine spot gray levels/average control culture cytokine spot gray levels.

Real-time quantitative PCR

All cDNAs were prepared by reverse transcription of 2 µg of DNase treated total RNA in a 25 µl final volume as described above but without radiolabeled dCTP. Oligonucleotide primers were synthesized at Invitrogen (Invitrogen Life Technologies, Cergy-Pontoise, France). Primer design regarding to primer dimer, self-priming formation and primer melting temperature was done with MacVector software (Accelrys, San Diego, USA). Specificities of the PCR amplification were documented with LightCycler melting curve analysis. The PCR was carried out with the LC Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) using 100 pg of cDNA, 2 mM MgCl₂ and 0.5 µM of each primer (final concentration). Quantitative PCR was performed using a Lightcycler (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Relative mRNA values were calculated with

RealQuant software (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Normalization was performed by geometric averaging of an internal control gene, i.e. β -actin, using RealQuant software (Roche Applied Science, Mannheim, Germany).

RESULTATS (traduit en français)

Des cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) ont été traitées à l'extrait de cartilage de requin (350 μ g/ml) pendant 15 min, 1, 4, 8 et 24 heures afin de déterminer la cinétique des changements d'expression des gènes. Pour chaque traitement, l'ARN total a été extrait et soumis à une réaction de transcription inverse afin de produire des ADN complémentaires radiomarqués au ^{33}P . Les ADNc produits à partir des cellules traitées et non traitées ont ensuite été hybridés sur une puce à oligonucléotides humains. Un filtrage a ensuite été effectué afin de sélectionner que les gènes ayant été sous ou sur exprimés significativement ($p < 0,01$) par un ratio supérieur ou égal à 2 (≤ 0.5 ou > 2) pour au moins un des temps de traitements. L'analyse statistique a révélé que l'expression de 50 gènes correspondait à ces critères. De plus, les résultats ont indiqués que la majorité des changements d'expression survenait de façon maximale après 4 à 8 h de traitement (table 10).

L'extrait de cartilage de requin a induit l'expression de différentes molécules d'adhésion telles que ICAM-1 et E-sélectine. A cela s'ajoute également des gènes de chimiotactisme, tel que IL-8 et CSF2, ainsi qu'une dizaine de gènes proinflammatoires. L'extrait de cartilage a également induit l'expression des gènes SOD2, PRDX2, HMOX1 et TNFAIP3, impliqués dans la réponse au stress oxydatif. Enfin, les gènes PLAT, PLG et F3 impliqués dans coagulation et la thrombolyse se

sont avérés surexprimés dans les cellules endothéliales traitées à l'extrait de cartilage de requin.

Étant donné le nombre de gènes proinflammatoires surexprimés, une trousse de détection des cytokines a été utilisée pour mesurer les concentrations sécrétées dans le milieu des cellules endothéliales 6h après le traitement à l'ECR et ainsi confirmer une partie des résultats transcriptomiques. Une plus forte production d'interleukines, de GM-CSF, de TNF- α et d'IFN- γ a été détectée dans le milieu des cellules endothéliales traitées à l'ECR par rapport aux cellules contrôles (table 11).

Afin de voir l'importance des cytokines sur la transcription, nous avons comparé l'effet de l'ECR avec celui du TNF- α . Une similitude frappante a été observée (table 12).

Il est important de noter qu'un des lots d'extrait de cartilage de requin, qui n'avait pas eu d'effet antiangiogénique in vivo, n'a pas montré cette similarité sur l'expression génique. Par ailleurs, aucun niveau significatif d'endotoxines n'a été détecté dans les différents lots, éliminant ainsi leur participation possible dans l'induction des gènes.

Une PCR quantitative en temps réel a ensuite été réalisée pour les gènes PLG, SELE, IL8, PRDX2, PLAT et EFNA1, à partir des mêmes échantillons d'ARN utilisés précédemment, afin de valider les résultats transcriptomiques obtenus par la méthode de microarray. La table 13 montre les différentes amorces utilisées. Comme le montre la figure 1, le profil d'expression de ces 6 gènes c'est avéré très similaire que celui obtenu précédemment par la méthode de microarray.

Puisque la génération de DROs est une voie majeure par laquelle les cytokines induisent la voie de NF κ B et l'expression des gènes dans les cellules endothéliales, nous avons investigué leur rôle au moyen d'un antioxydant et avons

constaté qu'un prétraitement à la N-Acétylcystéine (NAC) inhibait l'induction d'un grand nombre de gènes par l'extrait de cartilage (table 12).

L'importance du système inflammatoire dans l'efficacité de l'extrait de cartilage, a été soulignée par le fait qu'un co-traitement aux corticoïdes a fait perdre le bénéfice obtenu sur la survie dans le modèle de glioblastome GL26 implanté en intracérébral (figure 2).

DISCUSSION (traduite en français)

Le potentiel très prometteur du cartilage de requin a été publié dans les années 70 par J Folkmann [131]. Néanmoins, la rationalité de son bénéfice thérapeutique est toujours débattue. Le Néovastat un est extrait de cartilage de requin purifié ayant démontré de multiples propriétés antiangiogéniques. Il a d'ailleurs fait l'objet de plusieurs études cliniques dont une phase III dans le cancer du rein et une autre dans le cancer du poumon. L'angiogenèse est un processus complexe régulé par une multitude de molécules pro et anti angiogéniques. Le but de notre étude était d'éclaircir les mécanismes par lesquels l'extrait de cartilage de requin inhibe l'angiogenèse. Nous avons donc utilisé le microarray qui est un outil puissant pour déterminer simultanément le niveau d'expression de milliers de gènes. La technologie utilisée est celle du filtre d'oligonucléotides proposée par Jordan [139], mais nous avons préféré limiter notre étude à un nombre restreint de gènes présélectionnés pour leur lien avec le cancer et l'angiogenèse. Cela permet d'espérer des résultats plus pertinents et d'éviter les problèmes de reproductibilité observé avec les puces pangénomiques [140]. La sélection de seulement 230 gènes permet en effet un meilleur design de chaque oligonucléotides, l'introduction de dupliquas et la vérification de la qualité de chaque signal. Cette stratégie pourrait

expliquer le fait que 100% des 6 gènes, soumis à une validation par PCR quantitative, ait été confirmé. Notre microarray semble également bénéficier d'une bonne sélectivité, puisque plusieurs gènes d'origine endothéliale, tel que SELE, EDG1, NOS3, PECAM et TEK n'ont pas été détecté dans la lignée de glioblastome HGD (non montré). En somme, l'utilisation d'un filtre bien orienté sur le sujet, permet d'obtenir autant de résultats qu'en utilisant un filtre pangénomique. Parmi les gènes exprimés différemment, 50 ont été sélectionnés pour leur bon ratio (> 2), leur bonne significativité ($p < 0,01$) et leur bonne relation avec le temps et la dose. Le logiciel PathwayAssist a grandement facilité l'analyse des données et permis de proposer des mécanismes innovateurs pouvant expliquer comment l'extrait de cartilage de requin induit l'expression des gènes endothéliaux et comment ces gènes pourraient interagir pour inhiber l'angiogenèse. En se basant sur les données extraites de la littérature, le logiciel propose que les changements d'expression des gènes, observés dans les cellules endothéliales traitées au cartilage de requin, puissent résulter de la production de cytokines, qui entraînerait la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (DROs), qui activeraient alors la voie de NF-kB ou de JNK.

L'ECR a en effet induit l'expression de plusieurs cytokines par les cellules endothéliales. La sécrétion de TNF- α et d'autres cytokines a ensuite été confirmée dans le milieu de culture au moyen d'une trousse de détection. Leur impact doit être important étant donné que le TNF- α à lui seul est capable d'induire un profil d'expression très similaire à celui de l'ECR. Bien que l'angiogenèse tumorale s'accompagne normalement d'une diminution de la réponse inflammatoire dans l'endothélium vasculaire tumoral [141], l'inhibition de l'angiogenèse rétablirait cette réponse aux cytokines inflammatoire [142].

La littérature rapporte que plusieurs des cytokines induites par l'ECR entraînent la génération de DROs dans les cellules endothéliales, activant alors la voie de NFkB et de JNK [143-151].

Des collaborateurs ont démontré que l'extrait de cartilage de requin induisait l'activation de NF-kB, dans les cellules endothéliales d'aorte bovine, en induisant la phosphorylation de sa sous-unité inhibitrice I kappa B [136]. Or, les DROs semblent servir de messagers médiant directement ou indirectement la dissociation de NF-kB et de I-kB [152]. Les mêmes collaborateurs ont également rapportés que l'ECR induisait la JNK ainsi que les caspases dans les cellules endothéliales d'aorte bovine [133, 136]. Or, il a été démontré que la hausse de DROs pouvait aussi activer les kinases de c-Jun et les caspases [153]. Enfin, il a été démontré que l'antioxydant N-acétylcystéine pouvait bloquer l'activation de NF-kB, en stabilisant le complexe NF-kB / I-kB, en neutralisant les DROs [152]. Dans la présente étude, le prétraitement à la NAC a inhibé l'induction d'un grand nombre de gènes par l'ECR, renforçant le rôle possible des DROs dans l'induction des gènes par les cytokines produites en réponse à l'ECR.

En addition, il est possible que l'impact des DROs soit favorisé par le fait que le Néovastat est un inhibiteur du VEGFR2 [115]. En effet, lorsque le VEGFR2 n'est pas inhibé, celui-ci peut induire l'expression ainsi que l'activité de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) [154, 155]. Lorsqu'elle n'est pas inhibée, la eNOS peut neutraliser les DROs ou inhiber leur production [156, 157], stabiliser l'I-kB [158] et inhiber le NF-kB [158-160].

En somme, l'expression de nombreux gènes pourrait avoir été causée par les cytokines et les DROs. Nous avons ensuite utilisé le logiciel PathwayAssist pour tenter d'expliquer comment ces gènes pourraient interagir pour inhiber

l'angiogenèse. Outre la sous-expression de plusieurs facteurs de croissance et la surexpression de plusieurs gènes apoptotiques, notre attention a été particulièrement retenue par les gènes PLG et PLAT ainsi que les gènes IL-8 et SELE, dont la surexpression a été validée par q-PCR.

1) protéolyse excessive de la matrice et détachement des cellules endothéliales

Les résultats de microarray et de PCR ont montré que le cartilage induisait l'expression du gène du plasminogène (PLG) et de son activateur tissulaire (PLAT) dans les HUVEC. D'autres auteurs ont rapportés que le cartilage induisait l'expression du t-PA dans les cellules d'aorte bovine [136], mais aussi qu'il augmentait son activité in vitro [135].

L'expression du gène PLAT pourrait être induite par la cytokine IL4 [161], le TNF- α et le NF-kB [136] et le t-PA pourrait être relâché en conséquence de la baisse de NO découlant de la sous-expression de la eNOS [162].

Plusieurs observations suggèrent qu'un niveau élevé de t-PA corrèlerait avec un bon pronostic dans de nombreux cancers [163, 164], alors qu'un faible niveau de tPA serait associé à des tumeurs plus malignes [165].

Le t-PA a pour effet de convertir le plasminogène en plasmine. L'augmentation de la production de plasmine par le cartilage de requin peut être bénéfique en provoquant la dégradation de la matrice de fibrine essentielle au développement des nouveaux vaisseaux [166]. La plasmine est également capable de dégrader d'autres protéines d'adhésion de la matrice extracellulaire (MEC) telle que la laminine [167, 168] la fibronectine (FN), le facteur de von Willebrand [169] et la vitronectine [170, 171]. Il s'ensuit alors un détachement des cellules endothéliales

[166, 172] pouvant causer une élévation dramatique des niveaux intracellulaires de DROs, menant à la mort cellulaire [153].

La surexpression des gènes du système PLG/PLAT pourrait également induire l'apoptose de plusieurs autres façons. Il a été rapporté que le t-PA potentialisait l'apoptose dans l'endothélium du cerveau humain en faisant progresser la voie de l'apoptose de la caspase-9 à la caspase-8 qui activerait ensuite directement la caspase-3 [173]. Or, il avait justement été démontré que l'ECR induisait les caspases 3, 8 et 9 dans les cellules endothéliales [133]. Le t-PA serait aussi un réducteur des niveaux d'eNOS [174], et la baisse de NO un inducteur de la relâche de t-PA emmagasiné dans les corpuscules de Weibel-Palade [162] ce qui pourrait accentuer l'activation des caspases par le t-PA.

La plasmine peut également être réduite en angiostatine (AS) ou en d'autres fragments possédant une activité antiangiogénique [175]. L'AS est capable d'inhiber l'expression de la eNOS [176], augmenter l'expression du gène SELE [177] et induire l'apoptose [178].

Une étude subséquente a par la suite montré que l'activation du plasminogène par l'extrait de cartilage, était essentielle à son efficacité antiangiogénique dans un modèle de gliome chez la souris (soumis pour publication).

2) attraction et adhésion des leucocytes aux cellules endothéliales

Les résultats ont montré que l'expression de l'IFN-gamma, l'IL-1alpha, du TNF-alpha et de la GBP-1, était induite par le traitement au cartilage de requin. Il a été rapporté que les cytokines inflammatoires, en collaboration avec la GBP-1,

inhibaient la prolifération des cellules endothéliales et induisaient l'adhésion des leucocytes [179].

Les résultats ont également montré une augmentation de l'expression des gènes des chémokines IL8 et GM-CSF et des molécules d'adhésion leucocytaires E-Sélectine et ICAM1. L'expression de ces gènes pourrait découler de l'activation de NF- κ B. L'expression du gène SELE peut également être induite par l'angiostatine [177]. En addition l'expression de SELE, ICAM1, IL6 et IL8 pourrait être induite par une diminution de NO [180]. Le mécanisme proposé serait que le recrutement des cellules immunitaires par les chémokines et leur adhésion aux molécules endothéliales pourraient endommager les cellules endothéliales et interférer avec l'angiogenèse [181, 182]. Il a d'ailleurs été intéressant de constater que la paroi des vaisseaux des tumeurs traitées étaient inflammées et que plusieurs gènes d'origine leucocytaires avaient été détecté dans les gliomes de souris traitées au cartilage de requin (non montré). En somme, les cytokines joueraient un rôle à la fois dans l'induction de la transcription des gènes, mais également dans la réponse inflammatoire qui s'ensuivrait. Leur importance a été soulignée par le fait qu'un traitement aux corticoïdes a fait perdre le bénéfice de l'extrait du cartilage obtenu sur la survie dans le modèle de glioblastome GL26 en intracérébral.

Particularité de l'endothélium en croissance

Les résultats ont montrés que l'extrait de cartilage exerçait un plus grand effet sur les cellules endothéliales en prolifération que sur les cellules à confluence. Le même phénomène a également été observés avec plusieurs autres traitements antiangiogéniques [183, 184]. Il semblerait donc que pour différentes raison l'endothélium croissant soit plus sensible que l'endothélium quiescent [185]. Il a été

rapporté que la nature non-différenciée des cellules endothéliales en prolifération les rendrait plus vulnérables à l'oxydation [186]. Par ailleurs, les cellules endothéliales sont dans un état dynamique durant l'angiogenèse et ne sont pas fermement attachées les unes aux autres. Or, le contact et l'adhésion cellulaire sont des facteurs importants dans le contrôle de la survie et de l'apoptose [187, 188].

Mécanisme de défense

Les résultats ont montrés que l'expression des gènes, induite par l'extrait de cartilage de requin, était transitoire, suggérant qu'un mécanisme soit mis en place pour atténuer ou terminer l'activation des cellules endothéliales. En effet, certains gènes tel que HO-1, SOD2 et PRDX2 peuvent avoir un effet antioxydant [189, 190] et limiter l'inflammation endothéliale [191], associées à l'activation du NF- κ B [189].

En terminant, cette étude introduit un rôle possible des cytokines et des DROs dans l'activation des cellules endothéliales par l'extrait de cartilage de requin, entraînant par la suite l'expression de plusieurs gènes pouvant avoir des effets antiangiogéniques. L'induction du plasminogène (PLG) et de son activateur (PLAT), pourrait entraîner la dégradation de la matrice essentielle à l'angiogenèse ou la génération d'angiostatine. En addition, la sécrétion de chémokines et l'expression de molécules d'adhésion pourraient quant à elles recruter et attacher les cellules immunitaires à l'endothélium en croissance. La nature complémentaire de ses deux processus pourrait résulter en une action synergique des gènes induit par l'extrait de cartilage. Il a également été intéressant de constater que l'effet du cartilage de requin était plus important sur les cellules endothéliales en prolifération que sur les cellules confluentes. Cette sélectivité pourrait expliquer comment l'extrait de

cartilage de requin inhibe l'angiogenèse sans avoir toutefois d'effet apparent sur l'endothélium quiescent.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Michelle El Atifi, Dr. Béatrice Rostaing for years of work in improving the microarray reliability. Mouse pangenomic cDNA filter were a gift of Catherine Nguyen.

TABLES AND FIGURES

Table 10

Symbol	Gene name	Time course					Dose-response		
		15mi	1h	4h	8h	24h	35	100	350
<u>Adhesion</u>									
SELE	Selectin E (endothelial adhesion molecule 1)	2,5	5,0	80,0	72,0	19,3	1,5	8,4	80,0
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54)	2,1	2,9	10,5	15,7	10,5	1,4	1,3	10,5
PTK2	Protein tyrosine kinase 2 (Focal adhesion kinase, FAK)	2,0	4,1	9,5	9,2	9,6	0,9	1,0	9,5
ITGB3BP	Integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)	1,2	1,0	3,5	4,9	3,5	2,0	2,1	3,5
<u>Chemotaxis</u>									
IL8	Interleukin 8	1,5	4,3	67,7	68,2	37,7	8,3	18,4	67,7
SCYB5	granulocyte chemotactic prt-2; small inducible cytokine B5	1,4	2,2	2,8	3,3	1,5	0,7	0,7	2,8
<u>Inflammation</u>									
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	0,6	0,9	6,2	6,1	4,9	0,9	1,5	6,2
IL3RA	Interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	1,3	1,0	3,2	4,0	3,7	1,2	1,8	3,2
IFNGR2	Interferon gamma receptor 2	1,1	1,3	2,6	3,7	2,1	2,4	3,0	2,6
GBP1	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	0,5	0,5	1,7	3,4	1,2	0,8	1,0	1,6
G1P3	Interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16)	1,4	1,4	1,7	2,8	11,7	1,2	0,7	1,7
IFNA2	Interferon, alpha 2	1,2	0,8	2,1	2,2	1,6	1,7	1,7	2,1
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	1,3	1,5	1,6	2,2	2,1	1,4	1,1	1,6
CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	1,7	1,2	3,3	1,4	3,4	0,6	1,2	3,3
CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	0,9	0,9	4,5	1,3	1,7	1,0	1,2	4,5
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor	1,0	1,0	3,0	1,1	1,0	1,1	1,3	3,0
<u>Coagulation/thrombolysis</u>									
PLAT	Plasminogen activator, tissue	2,2	1,4	8,8	12,9	4,9	1,3	1,6	8,8
PLG	Plasminogen	1,4	2,0	8,8	11,3	7,7	2,8	5,3	8,8
F3	Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	0,7	1,0	6,3	1,9	0,9	1,0	1,1	6,3
<u>Antioxidant</u>									
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	1,0	0,8	3,0	8,8	6,9	1,0	1,0	3,0
PRDX2	Peroxiredoxin 2	2,0	1,8	4,9	4,9	4,0	1,3	1,6	4,9
HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	0,9	0,7	3,2	2,4	5,6	1,6	3,1	3,2
TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	1,4	1,1	4,2	2,2	1,9	0,9	1,1	4,2
<u>Cell survival</u>									
SAT	Spermidine/spermine N1-acetyltransferase	0,7	0,8	4,3	4,4	2,0	1,6	2,2	4,3
GSN	Gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	0,77	0,58	0,50	0,51	0,81	0,58	0,69	0,50
EFNA1	Ephrin-A1 (TNFAIP4)	0,8	1,7	5,4	2,4	1,9	1,4	3,6	5,4
<u>Transcription</u>									
JUNB	Jun B proto-oncogene	1,2	3,3	2,9	3,0	2,3	1,3	1,6	2,9
CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	0,8	1,4	10,3	2,9	4,8	1,3	3,6	10,3
ATF3	Activating transcription factor 3	1,3	0,7	2,6	2,0	1,4	1,1	1,6	2,6
FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	1,2	1,4	2,0	1,2	1,6	1,5	1,4	2,0
NR2F2	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	0,87	0,58	0,50	0,58	0,52	0,67	0,68	0,50
HOXA9	Homeo box A9	0,82	0,81	0,50	0,58	0,66	0,95	0,69	0,50
<u>Growth factor and receptors</u>									
HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	1,02	1,25	0,50	1,10	1,13	0,88	0,78	0,50
PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	1,1	1,1	1,8	2,4	2,1	0,9	0,6	1,8
EDG1	Endoth. Diff. sphingolipid G-prt-coupled receptor 1	1,2	1,7	3,3	2,3	1,7	1,1	1,9	3,3
DTR	Diphtheria toxin receptor (hb-EGF-like GF)	0,6	1,4	3,0	1,5	0,8	0,7	1,1	3,0
<u>Signal transduction</u>									
PRKCG	Protein kinase C, gamma	2,2	2,7	3,7	4,5	4,0	1,2	1,1	3,7
SPHK2	Sphingosine kinase 2	1,06	0,82	0,58	0,40	0,69	0,74	0,56	0,58
EPHA4	EPH receptor A4	1,06	0,73	0,51	0,85	0,64	0,61	0,71	0,51
NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	0,88	0,82	0,68	0,23	0,23	1,06	1,15	0,68
<u>Cell cycle</u>									
CDC20	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	0,75	0,74	0,54	0,34	0,42	1,42	1,00	0,54
<u>Others</u>									
STC2	Stanniocalcin 2	1,1	1,4	1,6	3,5	2,2	1,3	0,9	1,6
PPP4C	Protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit	1,1	1,2	1,5	2,8	1,7	0,8	1,1	1,5
AVPR1B	Arginine vasopressin receptor 1B	1,6	0,9	2,8	2,0	1,0	0,9	1,3	2,8
ITK	IL2-inducible T-cell kinase	1,1	1,1	1,7	1,9	2,0	0,8	1,3	1,7
KPNA4	Karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)	1,6	1,6	2,1	1,7	1,4	1,2	1,9	2,1
KLK11	Kallikrein 11	1,3	0,9	2,2	1,5	1,2	1,4	1,4	2,2
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	1,4	1,6	2,1	1,4	1,2	1,7	1,8	2,1
TGM2	Transglutaminase 2	1,01	0,83	0,58	0,31	0,71	0,69	0,31	0,58
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	0,61	0,36	0,27	0,06	0,16	0,83	0,56	0,27

Table 10. Differential gene expression in HUVECs in response to SCE. A) Gene expression profiles of HUVECs treated with 350 µg/ml SCE over the time course of 15 min, 1, 4, 8 and 24h. The table shows a list of genes that are up- or down-regulated by twofold for at least one time point. The majority of gene expression changes appeared to occur within 4 and 8 h of treatment. B) Gene expression profiles of HUVECs treated with 35, 100 and 350 µg/ml SCE for 4h. Gene expression changes appeared maximal with 350 µg/ml SCE.

Table 11

Culture treatment	Control	SCE	Fold increase
Cytokine	Concentration (pg/ml)	Concentration (pg/ml)	
IL-1 α	1.3 $\pm$ 0.6	3.6 $\pm$ 0.3	2.7
IL-1 β	-	-	ND
IL-2	0.2 $\pm$ 0.3	1.2 $\pm$ 0.5	5.1
IL-4	1.05 $\pm$ 0.06	22.0 $\pm$ 1.1	20.9
IL-6	102 $\pm$ 18	1090 $\pm$ 140	10.7
IL-7	-	-	ND
IL-8	791 $\pm$ 134	1162.0 $\pm$ 0.3	1.5
IL-10	-	0.73 $\pm$ 0.18	ND
IL-12	-	4.4 $\pm$ 1.4	ND
GM-CSF	5 $\pm$ 7	174 $\pm$ 5	32.7
TNF- α	1.2 $\pm$ 0.6	7 $\pm$ 3	5.4
IFN- γ	-	62 $\pm$ 75	ND

Cytokine detected in the medium of HUVEC treated with SCE (350µg/ml) for 6 hours. The protein assay has been used to validate the overexpression of cytokines reported by the cDNA microarray.

Table 12

Symbol	Gene name	SCE	TNF	SCE + NAC
<u>Adhesion</u>				
SELE	Selectin E (endothelial adhesion molecule 1)	80,0	34,4	12,9
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1 (CD54)	10,5	26,5	4,1
PTK2	Protein tyrosine kinase 2 (Focal adhesion kinase, FAK)	9,5	2,3	4,9
ITGB3BP	Integrin beta 3 binding protein (beta3-endonexin)	3,5	6,1	3,7
<u>Chemotaxis</u>				
IL8	Interleukin 8	67,7	24,4	21,5
SCYB5	granulocyte chemotactic prt-2; small inducible cytokine B5	2,8	1,3	1,4
<u>Inflammation</u>				
CSF2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	6,2	4,2	4,7
IL3RA	Interleukin 3 receptor, alpha (low affinity)	3,2	3,1	3,1
IFNGR2	Interferon gamma receptor 2	2,6	2,7	1,9
GBP1	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	1,7	1,6	0,8
G1P3	Interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16)	1,7	1,5	2,8
IFNA2	Interferon, alpha 2	2,1	1,5	1,8
PRC1	Protein regulator of cytokinesis 1	1,6	1,8	1,1
CSF1	Colony stimulating factor 1 (macrophage)	3,3	1,6	2,0
CSF3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	4,5	1,1	1,3
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor	3,0	2,0	2,5
<u>Coagulation/thrombolysis</u>				
PLAT	Plasminogen activator, tissue	8,8	16,6	3,3
PLG	Plasminogen	8,8	8,5	2,3
F3	Coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	6,3	1,5	3,1
<u>Antioxidant</u>				
SOD2	Superoxide dismutase 2, mitochondrial	3,0	1,4	0,7
PRDX2	Peroxiredoxin 2	4,9	5,4	2,5
HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	3,2	1,5	6,6
TNFAIP3	Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	4,2	6,0	2,7
<u>Cell survival</u>				
SAT	Spermidine/spermine N1-acetyltransferase	4,3	1,6	4,4
GSN	Gelsolin (amyloidosis, Finnish type)	0,50	0,68	0,74
EFNA1	Ephrin-A1 (TNFAIP4)	5,4	6,7	2,7
<u>Transcription</u>				
JUNB	Jun B proto-oncogene	2,9	3,4	5,4
CEBPD	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	10,3	2,7	6,3
ATF3	Activating transcription factor 3	2,6	0,6	13,0
FOS	V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	2,0	3,5	7,6
NR2F2	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 2	0,50	0,28	0,97
HOXA9	Homeo box A9	0,50	0,64	1,01
<u>Growth factor and receptors</u>				
HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	0,50	1,80	1,34
PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha polypeptide	1,8	2,0	1,4
EDG1	Endoth. Diff. sphingolipid G-prt-coupled receptor 1	3,3	2,0	1,7
DTR	Diphtheria toxin receptor (hb-EGF-like GF)	3,0	1,5	4,5
<u>Signal transduction</u>				
PRKCG	Protein kinase C, gamma	3,7	1,6	0,9
SPHK2	Sphingosine kinase 2	0,58	0,29	0,53
EPHA4	EPH receptor A4	0,51	0,59	0,52
NOS3	Nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)	0,68	0,19	1,64
<u>Cell cycle</u>				
CDC20	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	0,54	0,54	1,21
<u>Others</u>				
STC2	Stanniocalcin 2	1,6	1,5	1,8
PPP4C	Protein phosphatase 4 (formerly X), catalytic subunit	1,5	0,8	0,8
AVPR1B	Arginine vasopressin receptor 1B	2,8	2,1	3,4
ITK	IL2-inducible T-cell kinase	1,7	3,3	2,5
KPNA4	Karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)	2,1	8,2	1,5
KLK11	Kallikrein 11	2,2	2,7	4,7
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	2,1	0,4	1,6
TGM2	Transglutaminase 2	0,58	0,09	0,63
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	0,27	0,17	0,21

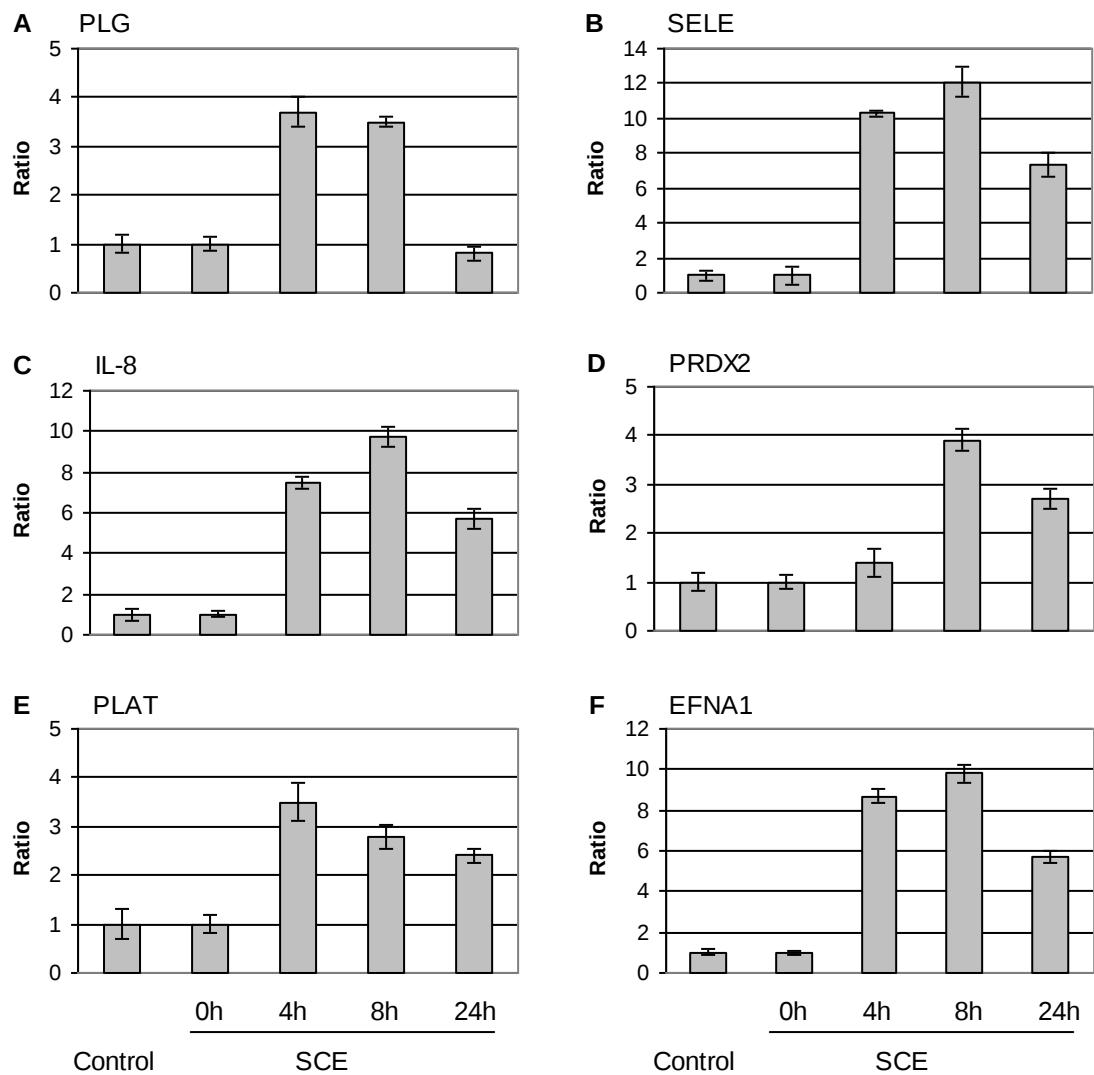
Table 12: Gene expression profiles of HUVECs treated with SCE (350µg/ml) or TNF-α (10 ng/ml) for 4 hours. The table shows a list of genes that are up- or down-regulated by twofold for at least one time point (extracted from the time course study). Effect of NAC on SCE-induced changes in gene expression. HUVECs were treated with SCE (350 µg/ml for 4 hours) either in the presence or in the absence of NAC. Genes for which NAC inhibited more than 50% of the effect of SCE are highlighted in grey, suggesting an important role of ROS in their induction by SCE.

Table 13

Gene name	5'-3' forward primer	3'-5' reverse primer	Amplicon (bp)
PLG	CAA ATT ATG TGG TCG CTG AC	AGA GTT CGG TGG ATT GGA	168
SELE	CAA TAC AAG TGT GGT AGG GAC	TCA TGC CTT GCT AGG G	167
IL8	GCC AAG AGA ATA TCC GAA CT	TAG GGT TGC CAG ATT TAA CAG	159
PRDX2	CTT CGC CAG ATC ACT GTT AAT	TCC ACG TTC GGC TTA ATC	152
PLAT	CCA CCC TGT TTT CAG CTA AAG	TGC TGG GCT CTT GTG ACT A	172
EFNA1	GCC AAG AGA ATA TCC GAA CT	TAG GGT TGC CAG ATT TAA CAG	159

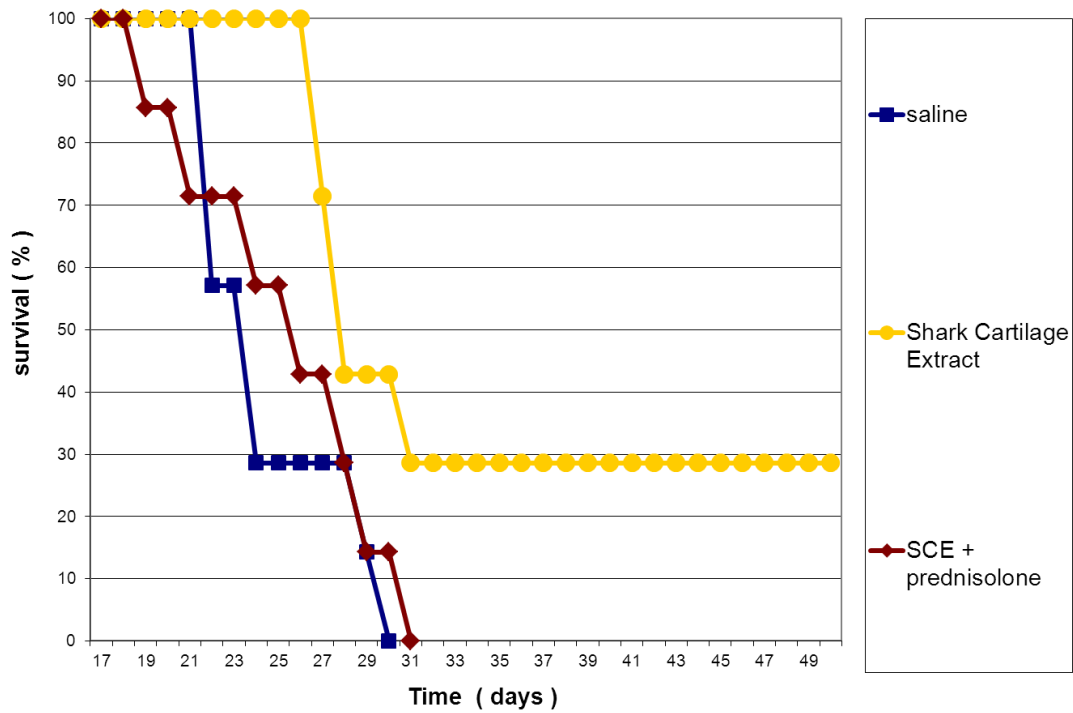
Primers used for real-time quantitative PCR.

Figure 1



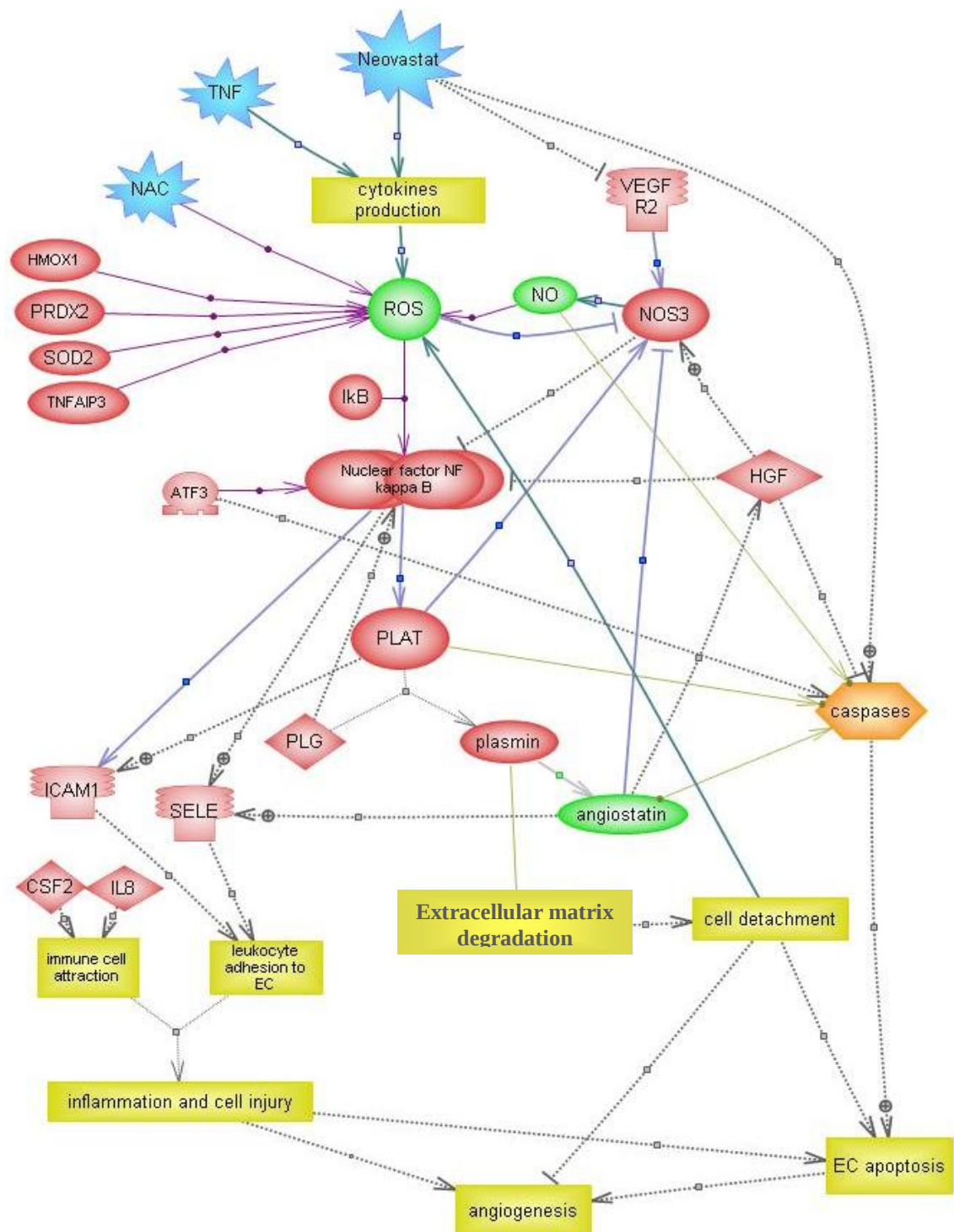
Validation of gene expression by quantitative RT-PCR. The expression of PLG (A), SELE (B), IL-8 (C), PRDX2 (D), PLAT (E) and EFNA1 (F) were determined by real time quantitative PCR. Analysis of each gene was conducted in triplicates and normalized against their expression in HUVECs using β -actin as internal control. The histograms showed the ratio between untreated and SCE-treated samples.

Figure 2



Effect of corticoid and cartilage extract cotreatment on survival of orthotopic glioma bearing mice. Saline (500 ul), cartilage extract (10 mg/kg), or cartilage extract + prednisolone (100 mg/kg) were administrated orally in C57 mice implanted intracerebraly with the syngeneic GL26 glioma cell line.

Figure 3



Biological association network (BAN) for the data gene list. Genes differentially expressed by SCE treatment were linked by the PathwayAssist software of Ariadne Genomic, using a database enriched with Pubmed abstracts focussed on endothelial cells or angiogenesis.

2^E ARTICLE :

RÔLE DU SYSTÈME FIBRINOLYTIQUE DANS L'EFFET
ANTIANGIOGÉNIQUE DU CARTILAGE DE REQUIN

CONTEXTE

Un intérêt tout particulier pour le système fibrinolytique est né du fait que les gènes du plasminogène (PLG) et de son activateur tissulaire (PLAT) sont fortement induits dans les cellules endothéliales traitées à l'extrait de cartilage de requin et que de fortes doses administrées à des souris ont pour effet de rendre leur tumeur hémorragique.

INTRODUCTION

Système fibrinolytique

La plasmine est une protéase polyvalente ayant une spécificité tryptique qui active directement ou indirectement, certaines pro-MMPs, et hydrolyse plusieurs protéines extracellulaires, telle que la fibrine. L'uPA et le tPA, les principaux activateurs du plasminogène, sont le produit de différents gènes régulés séparément par une variété de facteurs tels que des hormones et des cytokines. Comme la plasmine, l'uPA et le tPA sont des protéases à sérine ayant une activité tryptique, mais qui en revanche, ont une grande spécificité envers leur substrat, le plasminogène. L'uPA (ou plus précisément, son précurseur le pro-uPA) est sécrété comme une protéine soluble et se lie à un récepteur cellulaire de surface (uPAR), accroché par un complexe GPI et présent sur plusieurs variété de cellules, incluant les cellules endothéliales.

Le plasminogène et la plasmine s'associent aussi avec les membranes plasmatiques, et la co-localisation de l'uPA et du plasminogène à la surface de la cellule augmente l'efficacité de l'activation du plasminogène et la subséquente protéolyse induite par la plasmine. L'existence de multiples inhibiteurs spécifiques

de la plasmine (α_2 -antiplasmine) et des activateurs du plasminogène (PAI - 1 et 2), procure des moyens additionnels de régulation de cette cascade protéolytique. La spécificité, l'activité et la localisation des inhibiteurs de protéases à sérine peuvent être régulé par la MEC et certaines glycoprotéines [192, 193].

En ce qui attrait aux études de localisation, l'idée générale est que l'uPA, l'uPAR et le PAI-1 ne sont pas exprimés par l'endothélium quiescent. Le tPA, en revanche, a été détecté dans l'endothélium quiescent d'un petit pourcentage d'artérioles, veinules et vasa vasorum de tissus normaux humains. À l'opposé, l'uPA, l'uPAR et le PAI-1 sont tous exprimés au cours de l'angiogenèse in vivo dans plusieurs contextes. L'uPA et l'uPAR semblent être exprimés par les cellules endothéliales, et dépendamment de la situation, le PAI-1 est exprimé par les cellules endothéliales, stromales et épithéliales, où il jouerait un rôle dans la préservation de l'intégrité de la matrice [194, 195]. En revanche, il y a peu de données sur l'expression du tPA au cours de l'angiogenèse.

Ces observations faites in vivo sont amplement supportées par les résultats obtenus in vitro. Les cellules endothéliales en culture, qui sont plutôt activées que quiescentes, produisent de l'uPA, de l'uPAR, du tPA et du PAI-1 et leur régulation par le bFGF et le VEGF a été décrite [195, 196]. Toutefois, il est à noter, que les cellules endothéliales d'origine humaine répondent moins bien que les cellules d'origine bovine à l'effet des activateurs du plasminogène, du bFGF et du VEGF. La raison de cette réponse atténuée pourrait être reliée à la stimulation chronique de ces cellules par les composantes du supplément de croissance endothélial (les FGFs et possiblement le VEGF) utilisé en culture cellulaire. La réponse au VEGF semble également dépendre du lit vasculaire à partir duquel les cellules ont été

isolées. Par exemple, le VEGF induit l'uPA et le tPA dans les cellules endothéliales dérivées de la microvasculature mais pas dans les cellules issues de l'aorte [197, 198]. Cette distinction peut avoir d'importantes implications dans la régulation de l'angiogenèse, que l'on croit s'amorcer à partir de vaisseaux préexistant de la microvasculature. L'hypoxie, un stimuli majeur pour l'angiogenèse, augmente l'expression de l'uPAR [199] et du PAI-1 [200] dans les cellules endothéliales. Il a été précédemment démontré que l'uPA, l'uPAR et le PAI-1 étaient augmentés dans les cellules endothéliales, dans un modèle de migration en deux-dimensions induit par une coupure, et que la migration et l'induction des protéase et de leurs inhibiteurs dépendent toutes du bFGF endogène [201-203]. Dans un système de co-culture de cellules endothéliales et de fibroblastes, l'activité du promoteur de PAI-1 et l'expression de l'ARNm sont induits seulement dans les fibroblastes apposés à l'endothélium en bourgeonnement et non en présence d'un endothélium en quiescence [204]. Les auteurs ont interprété que cette induction devait avoir de l'importance pendant le bourgeonnement étant donné que c'est la seule période pendant laquelle les cellules endothéliales sont en contact direct avec les fibroblastes. Ils proposèrent que l'induction paracrine de PAI-1 procure un mécanisme pour arrêter la protéolyse péricellulaire.

Le t-PA est une enzyme clef de la fibrinolyse par son habilité à catalyser significativement la conversion du plasminogène en plasmine, résultant en la dégradation de la fibrine [205]. Le rôle de cette fibrinolyse catalysée par le t-PA dans l'angiogenèse demeure inconnu [206], mais néanmoins considérable, étant donné l'importance cruciale de la matrice fibrillaire pour la formation de néovaisseaux [207]. À l'inverse de l'u-PA, plusieurs observations suggèrent qu'un

niveau élevé de t-PA corrèle avec un bon pronostic [163] alors qu'un faible niveau de t-PA serait associé à la malignité des tumeurs et à un mauvais pronostic dans le cancer du cerveau ou autres cancers [165, 208-210].

Une étude fonctionnelle a donc été réalisée in vivo afin de comprendre l'importance de ce système dans l'effet antiangiogénique de l'extrait de cartilage de requin.

Pour ce faire, nous avons modulé l'activité des différents éléments du système fibrinolytique en utilisant: 1) l'acide ϵ -aminocaproïque (EACA), un inhibiteur bloquant les sites de liaison de haute affinité pour la lysine situé sur le plasminogène et la plasmine [211], 2) le N-acétylcystéine (NAC), un donneur sulfhydryle réduisant la plasmine en angiostatine [212] ou en d'autres fragments antiangiogéniques [213], et 3) l'implantation de cellules tumorales surexprimant le PAI-1, une protéine qui inhibe avec une grande affinité l'activité du t-PA.

Cette étude a montré que parmi les différents mécanismes proposés de l'inhibition de l'angiogenèse par l'extrait de cartilage de requin, l'induction du t-PA semble être cruciale, puisque sa modulation dans le gliome expérimental a augmenté ou a empêché les bénéfices du traitement sur l'angiogenèse des tumeurs et la survie des souris.

Induction of plasminogen system by cartilage extract is essential to its antiangiogenic effect in mouse glioma

Bryan Simard¹, Ali Bouamrani¹, Peggy Jourdes¹, Gilles Pernod², Violetta Dimitriadou³, Alim-Louis Benabid¹ and François Berger¹

¹ Grenoble Institut des Neurosciences, INSERM U 836, équipe 7, BP 170, F38042, Grenoble Cedex 9, France

²Unité d'hémostase, CHU de Grenoble, BP 217, F38043, Grenoble Cedex 9, France

³ ITR Laboratories Canada Inc., 19601 Clark Graham, Baie d'Urfé, Qc, H9X3T1, Canada

Corresponding author: Bryan Simard

Telephone: 1 514 515 7899

Fax: 011 33 4 76 76 56 19

e-mail: simardbryan@yahoo.com

cc: f.berger@ujf-grenoble.fr

Key words: Cartilage extract, angiogenesis, t-PA, PAI-1, glioma, plasminogen, plasmin, fibrinolysis, angiostatin, NAC, EACA.

Abstract

Both the antiangiogenic and antitumoral activity of shark cartilage extracts (SCE) have been demonstrated in animal models and clinical trials. Studies reported that SCE induces the expression of tissue plasminogen activator gene (PLAT) in endothelial cells and increases the activity of the protein (t-PA) *in vitro*. The aim of this study was to demonstrate the crucial role of t-PA induction in the antiangiogenic and antitumor activity of SCE in experimental glioma. This study showed antiangiogenic and antitumoral effects of SCE in three mice glioma models (C6, HGD and GL26). Histological examination suggested perivascular proteolysis and oedema as well as important intratumoral necrosis, which artefactually increased the tumor volume at high doses. Thus, the antiangiogenic effect of SCE correlated with the presence of t-PA and angiostatin in degenerating vessels. Functional *in vivo* experiments were conducted to modulate the plasminogen pathway. No antiangiogenic effect was observed on tumors overexpressing the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1). Moreover, therapeutical effects were neutralized in mice that were co-treated with ϵ -aminocaproic acid (EACA, 120 mg/kg p.o.), an inhibitor that blocks the high-affinity lysine binding sites of both plasminogen and plasmin. In contrast, co-treatment with N-acetylcysteine (NAC, 7,5 mg/kg i.p.), a sulfhydryl donor that reduces plasmin into angiostatin or other antiangiogenic fragments, increased the benefit of SCE on mice survival. In subcutaneous models, NAC prevented the increase in tumor volume caused by high doses of cartilage extract. In conclusion, this study indicates that induction of t-PA by shark cartilage extract plays an essential role in its antiangiogenic activity, but that control of excessive proteolysis

by a plasmin reductor could prevent oedema and uncover the full benefit of shark cartilage extract in the treatment of intracranial tumors.

Key words: Cartilage extract, angiogenesis, t-PA, PAI-1, glioma, plasminogen, plasmin, fibrinolysis, angiostatin, NAC.

Introduction

The past decades in research have brought only minor improvements in the prognosis for patients with glioblastoma. Because glioblastomas as well as virtually all other tumors require angiogenesis to sustain growth [1, 2], and because high vessel density correlates with the malignancy of glioma and is linked to a poor prognosis [3, 4], inhibition of angiogenesis is a promising treatment strategy. Reinforcing this therapeutical strategy, the therapeutical effect of the antibodies targeting VEGF was recently demonstrated in glioblastoma [5, 6]. However, limitations are also emerging, such as the induction of a more invasive phenotype [7], thus encouraging the development of multimodal strategies [8].

In the 70's, it was shown that avascular tissues, like cartilage, overexpress angiogenesis inhibitors [9] and inhibit tumor growth [10]. Since then, the antiangiogenic effect of cartilage extract has been demonstrated in several *in vivo* models, like the chorioallantoic membrane of the chicken embryo [11-14], the rabbit cornea [11, 15, 16], the rat mesenteric window [17] and the skin irritation model [14]. Subsequently, the oral efficacy of SCE has been demonstrated in animal [16-18] and human models [19] and in cancer clinical trials [20-22]. Many antiangiogenic molecules like proteins of 14-15 kDa [23], 16 kDa [9], 103-104 kDa [11], 19 kDa collagenase inhibitor [24] cartilage derived inhibitor (CDI) [12], 35.5 kDa chondrocyte

derived inhibitor (ChDI) [25], 10-14 kDa U-995 [13], 10 kDa SCF2 [26], 18 kDa SCAF-1, 38 kDa metastatin [27], 40-45 kDa chondromodulin-1 like glycoproteins (ChM1L) [28], have been partially purified from cartilage extracts. Examples of antiangiogenic molecules that have been identified in cartilage tissue are 25 kDa chondromodulin-1 (ChM-I) [29], 20 kDa endostatin / fragment of collagen XVIII [30], 450 kDa glycosylated thrombospondin [31], 21 kDa troponin-1 (Tnl) [32] and TIMP-2 [33] and TIMP-3 [34], which both have M.W. of 21.5 kDa when unglycosylated, and 24 or 23 kDa when glycosylated. Aeterna Laboratories produced a standardized water-soluble extract derived from shark cartilage, containing less than 5% of crude cartilage. The final product, called Neovastat (AE-941), interferes with many steps in the development of angiogenesis by inhibiting VEGF [35] and MMP [36] activity and by inducing apoptosis in EC [37]. More recently, it has been shown to increase the expression of PLAT in BAEC [38] and both PLAT / PLG expression in HUVEC (article in preparation) and to stimulate t-PA activity *in vitro* [39]. The main interest in cartilage extract, besides the therapeutical interest which might be difficult to manage because of its animal origin and polymorphic composition, is to provide a window to find new compounds and new pathways to manipulate angiogenesis.

Tissue-PA is a key enzyme in fibrinolysis due to its ability to significantly increase the cleavage of plasminogen into plasmin, leading to fibrin degradation, [40]. The role of this t-PA-mediated fibrinolytic activity in angiogenesis remains largely unknown [41] but is likely to be important given the crucial importance of the provisional fibrin matrix for neovessel formation [42]. In contrast to u-PA, several observations suggest that high t-PA levels correlate with good prognosis [43] whereas lower t-PA levels have been associated with malignant tumors and a poor prognosis in brain and others cancers [44-47].

Besides demonstrating the antitumoral effect of cartilage extract in glioma models, we also wanted to understand the role of t-PA in the inhibition of angiogenesis and tumor growth. Therefore, we performed *in vivo* functional analysis of the fibrinolytic pathway by modulation of its component's activity using: 1) ϵ -aminocaproic acid (EACA), an inhibitor that blocks the high-affinity lysine binding sites of plasminogen and plasmin [48], 2) N-acetylcysteine (NAC), a sulfhydryl donor which reduces part of the plasmin in angiostatin [49] and other antiangiogenic fragments [50], and 3) implantation of tumor cells overexpressing PAI-1, the endogenous inhibitor of t-PA activity.

This study showed that among all the proposed mechanisms of angiogenesis inhibition by SCE, the induction of t-PA appears to be crucial, since its modulation in experimental glioma increased or inhibited the benefit of SCE on tumor angiogenesis and mice survival.

Methods

Reagents

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal calf serum (FCS), medium E-199, endothelial cell growth serum (ECGS), Trypsin-EDTA, ketamine, xylazine, anti-mouse IgG-FITC conjugates, anti-rabbit IgG-biotin conjugates and ExtrAvidine-TRITC conjugates were obtained from Sigma Chemicals (St-Louis, MO). Penicillin and streptomycin were from Laboratoires Diamant (Puteaux, France). Biuret assay, plasminogen and plasmin chromogenic substrate (Chromozym-PL) were supplied by Roche Diagnostics (Meylan, France). All electrophoresis supplies were from BioRad Laboratories (Richmond, CA). Enhanced chemoluminescence (ECL) kit was obtained from Amersham France SA (Les Ulis, France). The rabbit polyclonal anti-

human Von Willebrand factor (vWF), anti-human plasminogen and anti-human PAI-1 antibodies, the peroxidase labeled anti-rabbit antibody and the DAB immunodetection kit were supplied by Dako (Trappes, France). Mouse monoclonal antibody against t-PA was supplied by Santa Cruz Laboratories (Santa Cruz, CA). The peroxidase-conjugated AffiniPure goat anti-mouse IgG was purchased from Jackson ImmunoResearch Laboratories (Baltimore, PA). Angiostatin polyclonal antibody was from Euromedex (Mundolsheim, France). Recombinant t-PA, u-PA and PAI-1 were from Calbiochem (San Diego, CA). Plasminogen and the plasmin chromogenic substrate, Chromozym-PL were supplied by Roche Diagnostics (Meylan, France). Cartilage extract was supplied by Æterna Laboratories (Québec, QC, Canada).

Cell Lines

The mouse glioblastoma GL-26 line was kindly provided by Dr. Albright [95]. The cellular line C6 comes from rat glioblastoma purchased at the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD). Cellular line HGD was obtained in our laboratory starting from a human astrocytome. Its statute was confirmed by CGH (polysomy of chromosome 7, monosomy of chromosome 10) and immunohistochemistry.

Early passage (p50) GL26 (tested mycoplasma and virus-free) were grown in a humidified atmosphere to 60% confluence in DMEM supplemented with 10% FCS, 10 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin (37 °C, 5% CO₂). Cells were harvested using trypsin-EDTA solution and were resuspended at a dilution of 5×10^6 / ml. Cell viability was determined by trypan blue staining. Only those with > 95% viability were used.

Lentiviral vector production

Two lentiviral vectors were used: a GFP encoding control vector named *EW-ires-GFP*, and a PAI-1 encoding vector named *EW-ires-PAI-1*. Both directed expression of the transgenes from the elongation factor 1 α promoter (EW) and contained an internal ribosomal entry site (ires).

PAI-1 cDNA was amplified by PCR to introduce BamHI and XhoI restriction sites at the 5' and 3' ends respectively. The PCR product was inserted into the *pGEM* Teasy plasmid (Promega, Madison, WI USA), verified by DNA sequencing, excised and sub-cloned into the BamHI and XhoI sites of the *pLox-EW-ires-GFP* plasmid (gift from Dr P Salmon, University Medical Center, Geneva). *pLox-EW-ires-GFP* and *pLox-EW-ires-PAI-1* then served as gene transfer plasmids to produce the viral vectors.

Lentiviral vectors, pseudotyped with the vesicular stomatitis virus (VSV)-G envelope protein, were produced by co-transfection of human embryonic kidney 293T cells with four plasmids, using the calcium-phosphate precipitation method [96]. *pCMVR8.91* encodes the necessary HIV structural genes. *pMD.G* bears the VSV-G envelope cDNA. Both plasmids were a gift from Dr. D. Trono (University of Geneva, www.tronolab.unige.ch). *pAdVantage* (Promega, Madison, WI USA) encodes VAI RNA, an inhibitor of the interferon-inducible protein kinase (PKR) [97]. Lastly, *pLox-EW-ires-GFP* and *pLox-EW-ires-PAI-1* are the transfer plasmids carrying the gene of interest. Five million 293T cells were plated the day prior to transfection in 10 cm round culture dishes containing 10 ml of DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). The medium was changed two hours before transfection. For each dish, 15 μ g of *pCMVR8.91*, 5 μ g of *pMD.G*, 10 μ g of *pAdVantage*, and 20 μ g of *pLox-EW-gene* plasmids were mixed. The DNA was diluted to a final volume of 250 μ l with 2.5

mM HEPES (pH 7.0), and supplemented with 250 μ l of 0.5 M CaCl_2 . The DNA- CaCl_2 solution was added dropwise to 500 μ l of 0.28 M NaCl, 0.05 M HEPES (pH 7.0) and 1.5 mM Na_2HPO_4 under bubbling air. The mixture was incubated 20 minutes at room temperature, and then added dropwise to the 293T cells. After 16 hours of incubation at 37 °C and 5% CO_2 , the medium was aspirated and 15 ml of fresh medium added for a further 24-hour incubation. At the end of the second incubation, the supernatant was collected and passed through a 0.45 μ m sterile filter. Lentivectors were concentrated 500x by three rounds of ultracentrifugation and stored at -80 °C.

Lentivector titers were determined by transduction of HeLa cells followed by flow cytometry analysis (FACSCalibur, Becton Dickinson). $5 \cdot 10^4$ HeLa cells were plated in six-well plates in RPMI-10% FCS. Serial dilutions of lentivector preparations were added. The plates were centrifuged for one hour at 2500 rpm and incubated for 72 hours in a regular CO_2 incubator. Cells were trypsinized, washed twice in PBS-0.5% bovine serum albumin (BSA), and fixed in 2% paraformaldehyde before flow cytometry analysis. Vector titer was calculated ($10^5 \times \% \text{ transduced cells} / \text{volume } \mu\text{L}$) using transduced cell populations for which the percentage of positive cells was lower than 15. Virus titers were expressed as transduction units per milliliter (TU/ml).

***In vitro* transduction of GL-26 cells**

10^5 GL-26 cells were plated in a 24-well plate for 24 hours. Before transduction, the culture medium was replaced by 500 μ l of fresh serum-free medium. The lentiviral vectors were added at a multiplicity of infection (MOI) of five in the presence of polybrene (8 $\mu\text{g/mL}$), the plate was centrifuged at 1200 g for one hour at 37°C, and then incubated for 16 hours at 37°C before replacing the medium.

Transgene expression analysis

Expression of the GFP transgene was evaluated by flow cytometry. Presence of PAI-1 antigen in supernatants was verified by Western blot analysis. Equal amounts of proteins in all samples, as determined by Biuret assay, were loaded and separated by SDS-PAGE on a 10% polyacrylamide gel, followed by protein transfer on a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated overnight with a rabbit polyclonal anti-human PAI-1 primary antibody at a 1:100 dilution. After washing with TTBS, a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was added at 1:5000 dilution for one hour. The protein bands were detected by chemiluminescence.

Cartilage extract preparation and storage

Cartilage extract was prepared according to Dupont E [98] and stored in vials kept at -80°C . Vials were thawed out each day one hour before administration.

***In vivo* experimental design**

Eight week-old mice (IFFA Credo) weighing 18-22 g were housed five per cage and kept under a light/dark 12h cycle. Standard certified commercial rodent chow (UAR ref.A04) and autoclaved tap water were provided *ad libitum*. Mice were randomized before assignment to groups and treatments. The study was approved by the local animal ethics committee.

Different models of glioma (HGD, C6 and GL26), subcutaneously or orthotopically implanted, were used to compare tumor histology, vessel density and mice survival.

In intracerebral models, C6 or HGD glioma cells (5×10^4 cells in 5 μl of PBS) were stereotactically implanted into the right caudate nucleus (2.0 mm to the right of

bregma at a depth of 2.5 mm) of anesthetized immunodeficient nude mice (ketamine/ xylazine, 75 mg/kg each, i.p.). Syngeneic mice (C57BL/6) were used for the orthotopic implantation of GL26 cells. Starting three days before tumor implantation, mice were treated by daily gavage with 500 µl of saline or 0.1X cartilage extract (1 mg of total protein / kg) using a plastic feeding tube, until spontaneous death or euthanasia. In addition, mice orthotopically implanted with the GL26 syngeneic cell line were also cotreated with NAC (7,5 mg/kg i.p.), EACA (120 mg/kg p.o.) or saline (100 µl i.p.). Median survival was determined by Kaplan-Meier analysis.

The three glioma cell lines (5×10^5 cells in 100 µl) were also subcutaneously inoculated in the posterior limb of conscious immunodeficient nude mice. GL26 cells overexpressing GFP or PAI-1 were also used. Starting three days before implantation, mice were treated by daily gavage with 500 µl of saline or 1X cartilage extract (10 mg /kg) until sacrificed when average tumor volume reached 3000 mm³. Tumor were collected and frozen for immunohistological analysis and vessel count. Tumor extract was prepared to determine t-PA and PAI-1 activity by zymography analysis and angiostatin production by Western blot.

Histology

Cryostat sections (15 µm in thickness) were stained with hematoxylin, eosin and saffranin (HES) to visualize tumor morphology.

Quantitation of blood vessels by von Willebrand factor immunohistochemistry

Serial cryostat sections of 15 µm were fixed in cold 4% paraformaldehyde for 10 min and stored at -30 °C until use. Blood vessels were visualized by immunostaining

with a rabbit polyclonal anti-vWF antibody (1/500 dilution) incubated for three hours at room temperature. Anti-rabbit peroxidase labeled antibody was incubated for one hour. Immunoreactivity was revealed using DAB. Controls without primary antibody were performed to eliminate the background of non-specific staining of secondary antibodies. The average number of vessels per field in each tumor was determined by counting blood vessels in five highly vascularized areas, at 10X magnification, on each section. The angiogenic index corresponds to the average number of vessels per field counted from each of six animals per group.

Detection of t-PA by immunohistochemistry

Tissue-PA immunolocalization was performed using anti-tPA monoclonal antibodies, diluted at 1/250 and incubated for 16 hours. Slides were then incubated with peroxidase conjugated antibodies anti-mouse IgG for one hour. DAB were incubated for 10 min. Slides were washed, deshydrated and mounted in glycerol. Controls without primary antibody were performed to discriminate the non-specific staining of secondary antibodies.

Detection of AS in tumor extract

Western blot analysis for angiostatin was carried out according to Gately [49]. Briefly, tumor samples were fractionated on a 12.5 % acrylamide/bisacrylamide gel by electrophoresis and electrotransferred to a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (0.45 μ m pore size) using a Milliblot graphite electroblotter I (90 min, 1 mA/sq. cm). Hydrophobic or non-specific binding sites were blocked overnight at 4 °C with 5 % non- fat dry milk in Tris-buffered (20 mM Tris, 150 mM NaCl) containing 0.3 % Tween 20 (TBST). Membranes were washed three times in TBST and

incubated with an anti-angiostatin monoclonal antibody (1:1000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin (BSA). This was followed by incubation for one hour at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG (1:1000 dilution) in TBST containing 5 % non- fat dry milk. PVDF membranes were washed three times in TBST and the presence of antigens was detected using ECL reagents.

Zymography analysis

Tissue extracts were prepared using an acetate buffer according to Padro [99], and SDS-PAGE zymography was carried out as previously described [53]. After electrophoresis, the 10% polyacrylamide gel was washed in 2.5% Triton X-100 for one hour followed by distilled water. Fibrinolytic activity was revealed by placing the gel on a plasminogen fibrin agarose underlay, according to Granelli-Piperno and Reich [54], and incubated at 37°C for 16 hours. For photographic purposes, the underlays were washed, dried and stained with Coomassie blue. Molecular weight calibration was performed using known molecular weight standards run under the same conditions, together with standard t-PA and urokinase-type plasminogen activator (u-PA).

Localization of t-PA and angiostatin by immunofluorescence

Tissue-PA and angiostatin immunolocalization were performed using anti-tPA monoclonal antibodies and anti-angiostatin polyclonal antibodies. The anti-angiostatin antibody did not recognize plasminogen [100]. Slides were incubated with their respective primary antibody (1/500 dilution) for 16 hours. Slides were then incubated with fluorescein isothiocyanate labeled antibodies anti-mouse IgG and

biotinylated anti-rabbit IgG for one hour. ExtrAvidin-tetramethylrhodamine isothiocyanate conjugates were incubated for one hour. The slides were washed three times and mounted in glycerol. Controls without primary antibody were performed to eliminate the non-specific staining of secondary antibodies as well as lipofuscin autofluorescence.

***In vitro* tissue type plasminogen activator (t-PA) assay**

Plasminogen (5 µg/ml) and the plasmin chromogenic substrate, Chromozym-PL (130 mg/ml) were pre-incubated one hour at 37°C in reaction buffer (50 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM CaCl₂ and 0.2 mM NaN₃), with various concentrations of cartilage extract. Afterwards, 35 U/ml of t-PA were added to the reaction mixture and incubated for one additional hour with gentle agitation at room temperature in a plate reader. Tissue-PA activity was monitored every three minutes by the change in absorbance at 405 nm corresponding to the rate of 4-nitroaniline release from Chromozym-PL. Tissue-PA activities was compared in presence or absence of cartilage extract and expressed as fold induction. The same experiments were also conducted in the presence of a t-PA inhibitor (PAI-1) at final concentration of 3 µg/ml.

Statistical Analysis

Numerical data obtained during the study were subjected to calculation of group mean values and standard deviations. Data were analyzed using the Student's Two-Tailed T test or one way analysis of variance (Dunnett's and Bonferroni's tests). Differences were considered to be statistically significant when $P < 0.05$. Kaplan-Meier analysis was used to determine the significance of the mice median survival.

Results

Effect of cartilage extract on vessel morphology and counting

Von Willebrand factor immunostaining indicates that oral administration of cartilage extract significantly decreases the number of vessels within HGD and GL-26 tumors by > 55% (Table 14). In addition, while tumors from saline-treated animals contained numerous regularly shaped vessels (Figure 4 A and B), blood vessels in tumors from cartilage extract-treated mice were rare (Figure 4C) and appeared degenerated or dystrophic as they presented an abnormal morphology characterized by a thick intima (Figure 4 D) which often masked the lumen (Figure 4 E). Moreover, they showed a “half-moon” halo suggesting perivascular oedema and/or disruption of the extracellular matrix (Figure 4 D and F). Similar results were observed in all intracerebrally or subcutaneously implanted cell lines.

Effect of cartilage extract on tumor morphology

Histological examination of brain parenchyma from control mice (HGD, C6 and GL-26 models) revealed an extensive infiltration of densely packed glioma cells (Figure 5A). This observation was in contrast to the presence of only small tumor formations in the brain parenchyma and the presence of residual disseminated tumor cells within the ventricles and the meningeal space of cartilage extract-treated mice (Figure 5B). No major histological differences were observed between the three intracerebral models.

In addition, mice that were subcutaneously implanted with glioma cells (HGD, C6 and GL-26 models) showed profound morphological alterations within the tumor tissue (Figure 5 D) when treated with cartilage extract (Figure 5 C). The tumor areas

of treated mice appeared more diffuse and softer than the controls and histological examination revealed that tumor cell density was decreased as tumor cells underwent apoptosis or advanced necrosis extending from the center of the tumor to the periphery. Moreover, the tumors from animals treated with high doses of SCE were filled with interstitial liquid which artefactually increased tumor volume (Figure 11), thus limiting the dosage and the benefits on survival in the intracranial model. Therefore, the effect of cartilage extract on tumor volume was not an end-point, but needed to be addressed in intracranial models.

Effect of cartilage extract on survival

The effect of lower doses of cartilage extract on the survival of nude mice bearing intracerebral gliomas derived from HGD and C6 was assessed. The effect of cartilage extract on the survival of C57BL/6 mice bearing intracerebral gliomas derived from the syngeneic GL-26 cell line was also assessed. Cartilage extract administration significantly prolonged median survival in the three models tested. In this comparative study, all the mice from the control groups lived no longer than 20 days following glioblastoma cell inoculation, whereas the median survival of the cartilage extract-treated group was increased by two days in the HGD model ($p = 0.023$), by six days in the syngeneic GL26 model ($p = 0.0048$) and by 10.5 days in the C6 model ($p < 0.0001$) (Table 15, Figure 6). At the end of the study (day 40), four mice out of a group of 10 cartilage extract-treated mice were still alive (observed for each model) whereas there were no survivors from the control groups. Remarkably, histological analysis of the brains of surviving mice indicated no signs of tumor within the parenchyma and only disseminated cells within the inter-meningeal space (data not shown).

Effect of cartilage extract on t-PA activity

Given that the morphological changes in the tumor tissue and vascular network observed in cartilage extract-treated mice suggested an alteration of the extracellular matrix (Figure 4 D and F) and since a previous microarray study (article in preparation) indicated that PLG and PLAT were among the genes mostly overexpressed in HUVEC in response to treatment with cartilage extract, we investigated the potential role of the fibrinolytic system in its antiangiogenic and antitumor effect observed in mouse glioma.

Labeling of tumor cryostat sections with t-PA specific antibody showed increased t-PA antigens in treated tumors, which were detected mostly around the vessels (Figure 7). Apparently, no labeling of t-PA was observed outside the tumor areas (data not shown). SDS-PAGE zymography also indicated an increased t-PA activity in tumor lysates from cartilage extract-treated mice (Figure 13).

Treatment with cartilage extract results in Angiostatin formation

Under suitable conditions, plasmin, the proteolytic fragment of plasminogen generated by t-PA can be reduced into angiostatin. Since components of cartilage extract possess some reducing activity, we investigated the generation of endogenous levels of angiostatin. Lysates from C6 subcutaneous-treated tumors were subjected to Western blot analysis. Cartilage extract was found to increase plasmin formation and to induce the appearance of endogenous angiostatin in treated animals (Figure 8). It should be noted that previous experiments have demonstrated that cartilage extract does not contain angiostatin (data not shown). Immunolocalisation of t-PA and angiostatin revealed the presence of angiostatin within large and small vessels of intracerebral tumor from cartilage extract-treated

animals Double-labeling with antibodies directed against t-PA and angiostatin revealed the co-localization of both proteins within blood vessels of treated intracerebral tumors (Figure 9).

Functional analysis of the fibrinolytic pathway

Even if the presence of t-PA correlates with a reduced number of vessels and altered morphology, more precisions were needed to come to a conclusion on its importance in the antiangiogenic effect of cartilage extract.

Inhibition of plasminogen/plasmin with EACA

The importance of plasmin was investigated by using EACA, an inhibitor that binds on the lysine residue of plasminogen or plasmin. Figure 10 shows that cotreatment of orthotopic glioma-implanted mice with EACA (120 mg/kg, oral) inhibited the benefit of oral treatment with cartilage extract on mice survival.

Reduction of plasmin with NAC

The reducing effect of NAC on plasmin was also investigated. Cotreatment with the sulfhydryl donor NAC (7,5 mg/kg i.p.) resulted in increased survival in mice treated with cartilage extract (Figure 10).

Effect of EACA and NAC on cartilage extract induced tumor oedema. The increased subcutaneous tumor volume induced by high doses of cartilage extract (11 mg/kg/day, p.o.) was inhibited by EACA or NAC cotreatment (Figure 11).

Inhibition of t-PA by PAI-1

The stimulation of t-PA by cartilage extract was further supported by the increase of plasmin generation in an *in vitro* assay (Figure 12). Plasmin formation was cartilage extract dose-dependent and was significantly inhibited in the presence of the plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1).

Overexpression of PAI-1 by lentivector-transduced GL-26 glioma cells

After transduction of GL-26 glioma cells by the control vector *CW-ires-GFP* and by the PAI-1 encoding vector *CW-ires-PAI-1*, expression of the reporter gene GFP was assessed by flow cytometry. On average, 80% of the transduced cells expressed GFP over more than six months (not shown), which suggested a high transduction stability.

Expression of the PAI-1 transgene was quantified by Western blot. PAI-1 was secreted only by *CW-ires-PAI-1* transduced cells (not shown). We ensured that the presence of the transgenes did not impair cell viability and confirmed that the proliferation rates of GFP and PAI-1 transduced cells were actually the same *in vitro* as the non-transduced cells (data not shown).

The importance of t-PA was investigated by implanting these transduced glioma cells subcutaneously in nude mice. SDS-PAGE-zymography showed that oral administration of cartilage extract increased t-PA activity in tumors derived from GFP-expressing glioma cells, but not in those derived from cells overexpressing PAI-1 (Figure 13). Finally, vWF immunostaining of tumor section showed that cartilage extract reduced vessel density in tumors overexpressing GFP but not in those overexpressing PAI-1 (Figure 14).

FIGURES AND LEGENDS

Model	HGD		GL26 (syngeneic)
Inoculation	S.C.	i.c.	i.c.
Treatment	Angiogenic index		
Saline	9.8 ± 2.8	7.2 ± 1.7	9.2 ± 1.2
Cartilage extract	2.3 ± 0.8 (p < 0.001)	3.5 ± 1.4 (p = 0.002)	4.0 ± 1.0 (p < 0.001)

Table 14: Effect of cartilage extract on tumor vessel density

Mice implanted with glioma were treated orally with saline or cartilage extract (1 mg of protein/kg/day in i.c. models and 10 mg/kg/day in s.c. models), until sacrificed on day 21. VWF immunostaining was performed and the average number of vessels per field in each tumor was determined by counting blood vessels in five highly vascularized areas, at 10X magnification, in each section. The angiogenic index corresponds to the average number of vWF positive vessels per field counted from each of six animals per group.

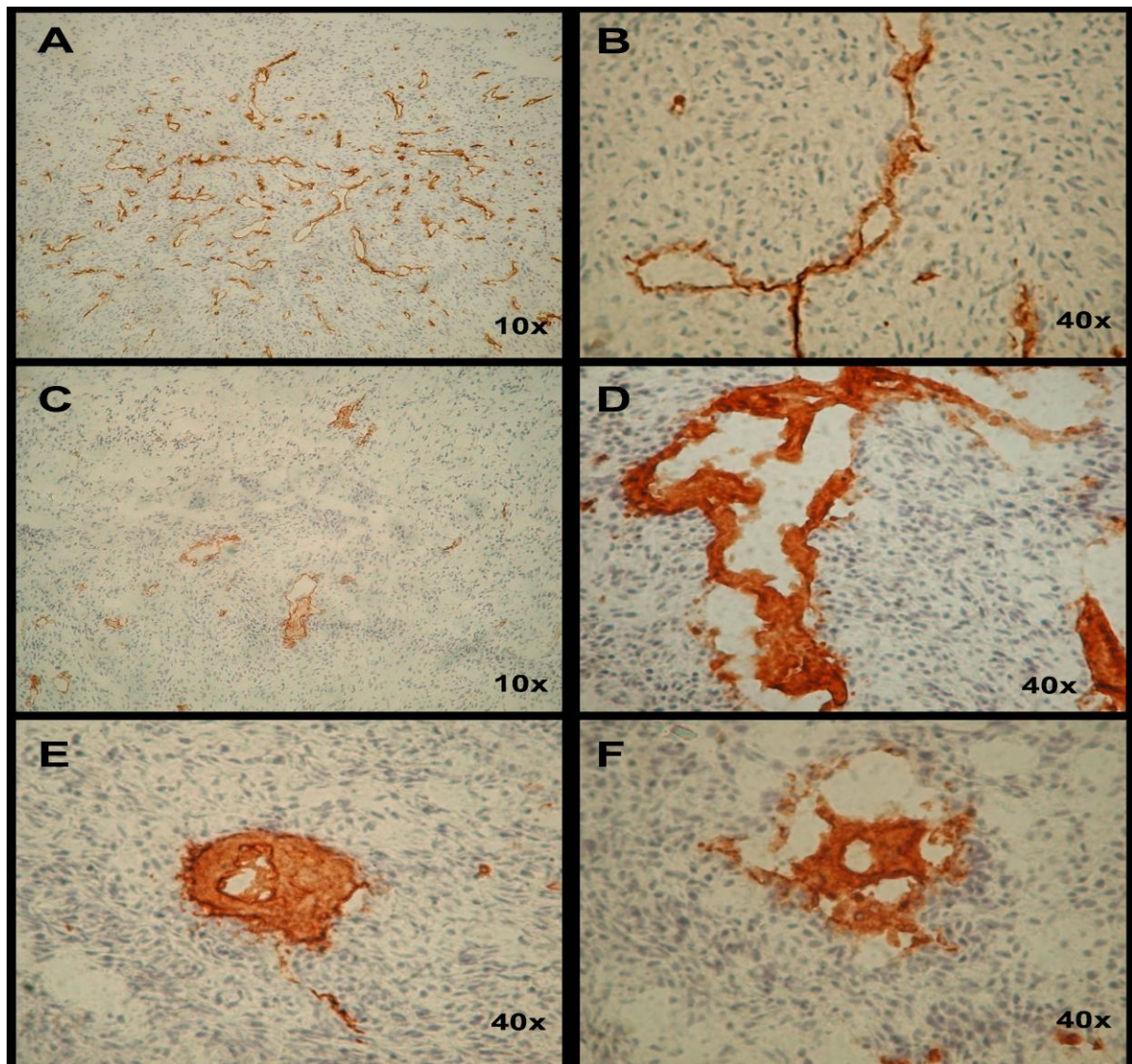


Figure 4: Effect of cartilage extract on tumor vessels

VWF immunostaining of GL26 subcutaneous mice glioma showed that a high number of regularly shaped vessels are present in tumors from saline-treated animals (A, B), while a low number of blood vessels are present in tumors from cartilage extract-treated mice (C). The rare vessels appear to be degenerated or dystrophic as they presented an abnormal morphology characterized by a thick intima (D) which often masked the lumen (E). Moreover, presence of a “half-moon” halo suggests perivascular oedema and/or degradation of the extracellular matrix (D and F).

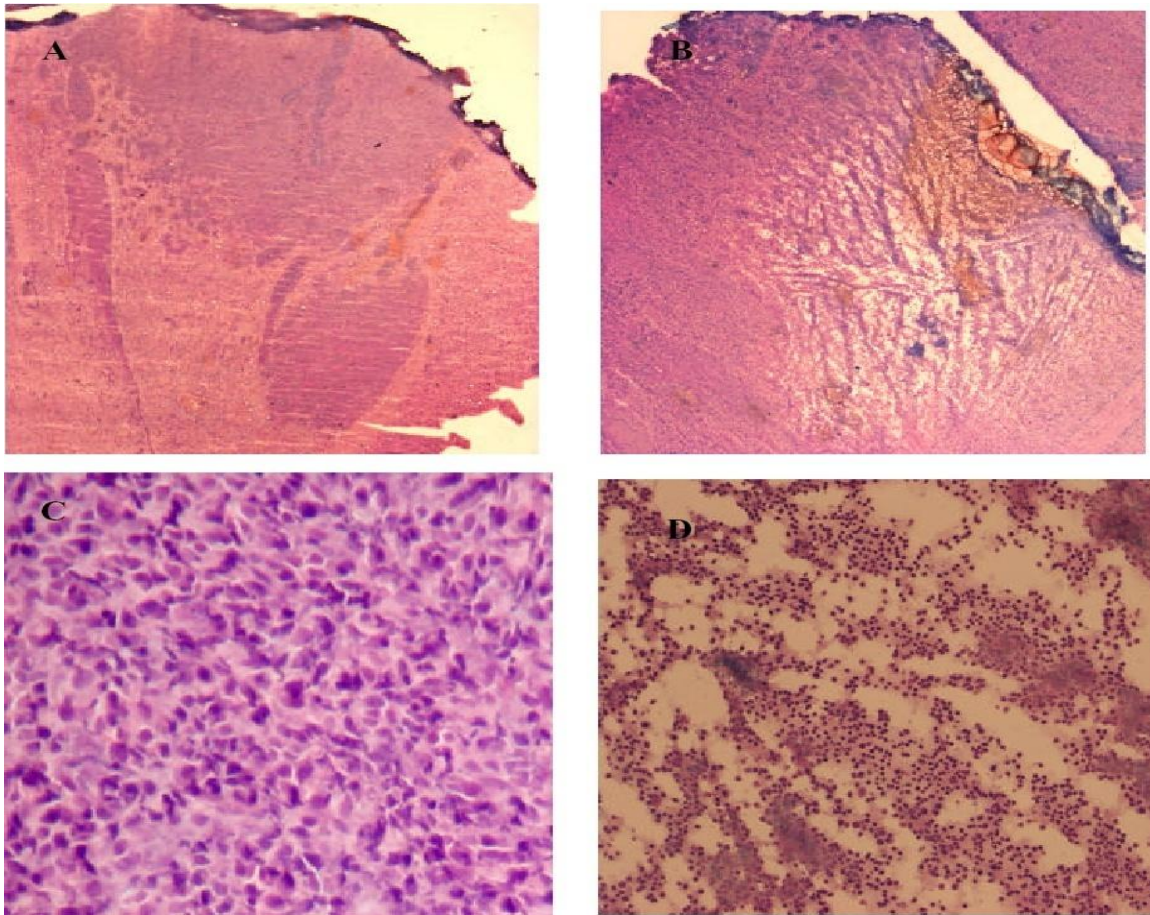


Figure 5: Morphological aspect of tumor tissue (i.c and s.c inoculation)

Cryostat sections of GL26 glioma (15 μ m in thickness) were stained with hematoxylin, eosin and saffranin (HES) and tumor morphology of intracerebral (up, 2X magnification) and subcutaneous tumors (down, 10X magnification) from control (A,C) and cartilage extract-treated animals (B,D) was visualized by light microscopy.

	HGD model	C6 model	Syngeneic model (GL26)
Saline	17.5	18.0	19.0
Cartilage extract	19.5 ($p = 0.020$)	28.5 ($p < 0.001$)	25.0 ($p = 0.005$)

Table 15: Effect of cartilage extract on mice median survival.

Mice bearing intracerebral glioma (n = 10 per group) were treated orally with saline or cartilage extract (1 mg of total protein/kg/day). Median survival was determined by Kaplan-Meier analysis.

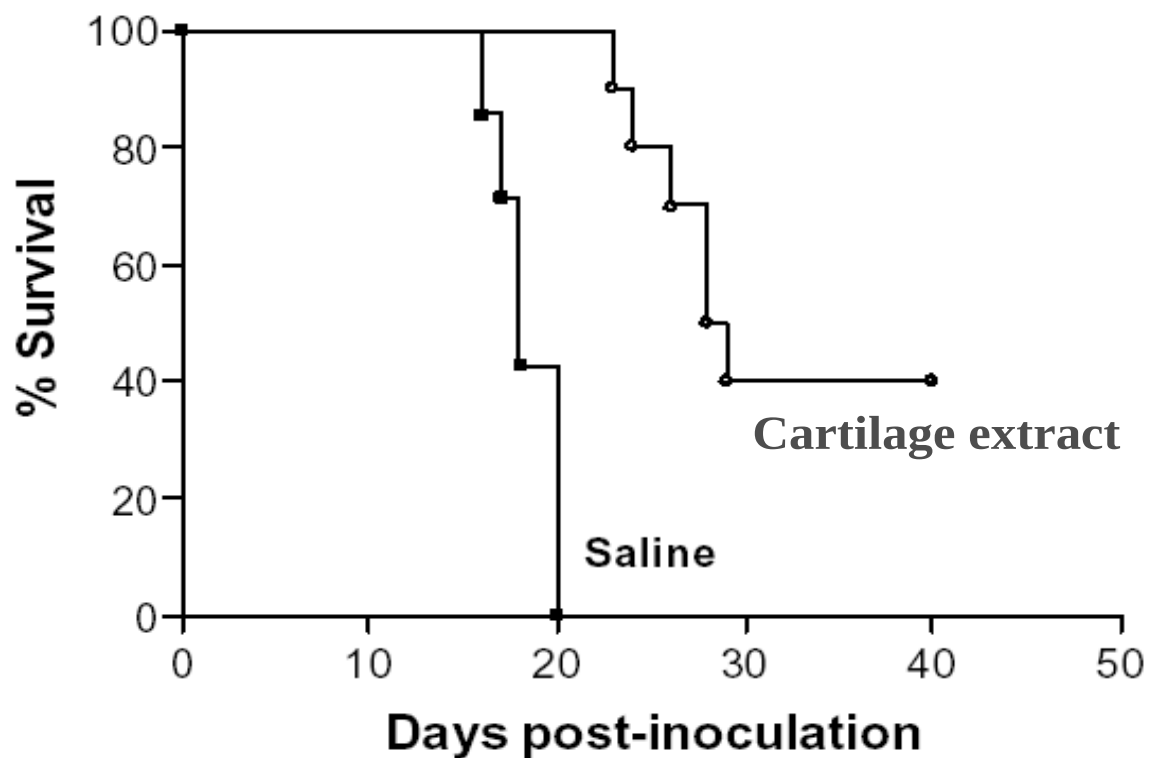


Figure 6: Effect of cartilage extract treatment on survival of mice implanted intracerebrally with C6 glioma.

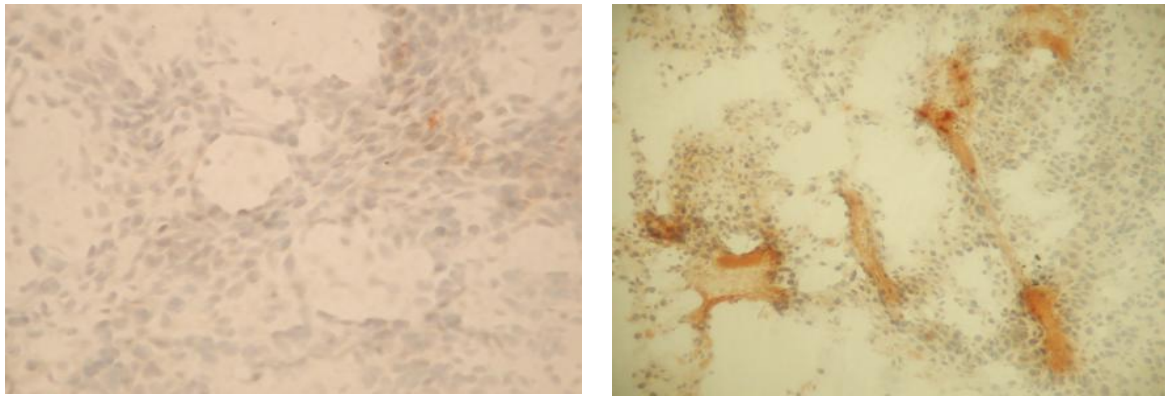


Figure 7: Immunostaining of tPA in subcutaneous glioma of cartilage extract-treated mice. Treatment with cartilage extract resulted in increased levels of tPA antigen around GL26 tumor vessels (B) compared to tumors from saline-treated mice (A). Controls without primary antibody showed no staining of secondary antibodies.

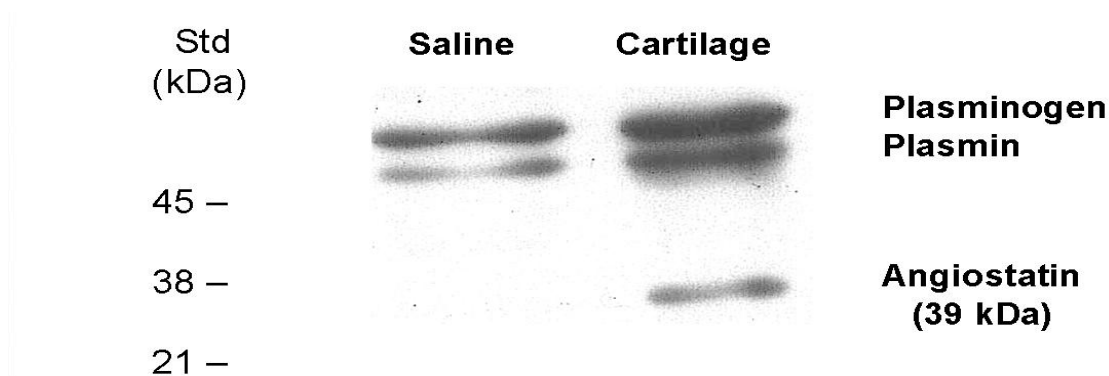


Figure 8: Formation of angiotensinogen in subcutaneous glioma of cartilage extract-treated mice. Western blot was performed by separating 60 μ g of protein from C6 tumor extracts in a 10% SDS-PAGE, followed by protein transfer on a nitrocellulose membrane. The membrane was incubated overnight with a rabbit polyclonal anti-human plasminogen primary antibody at a 1:100 dilution. Horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody was added at 1:5000 dilution for one hour. The protein bands were detected by enhanced chemiluminescence.

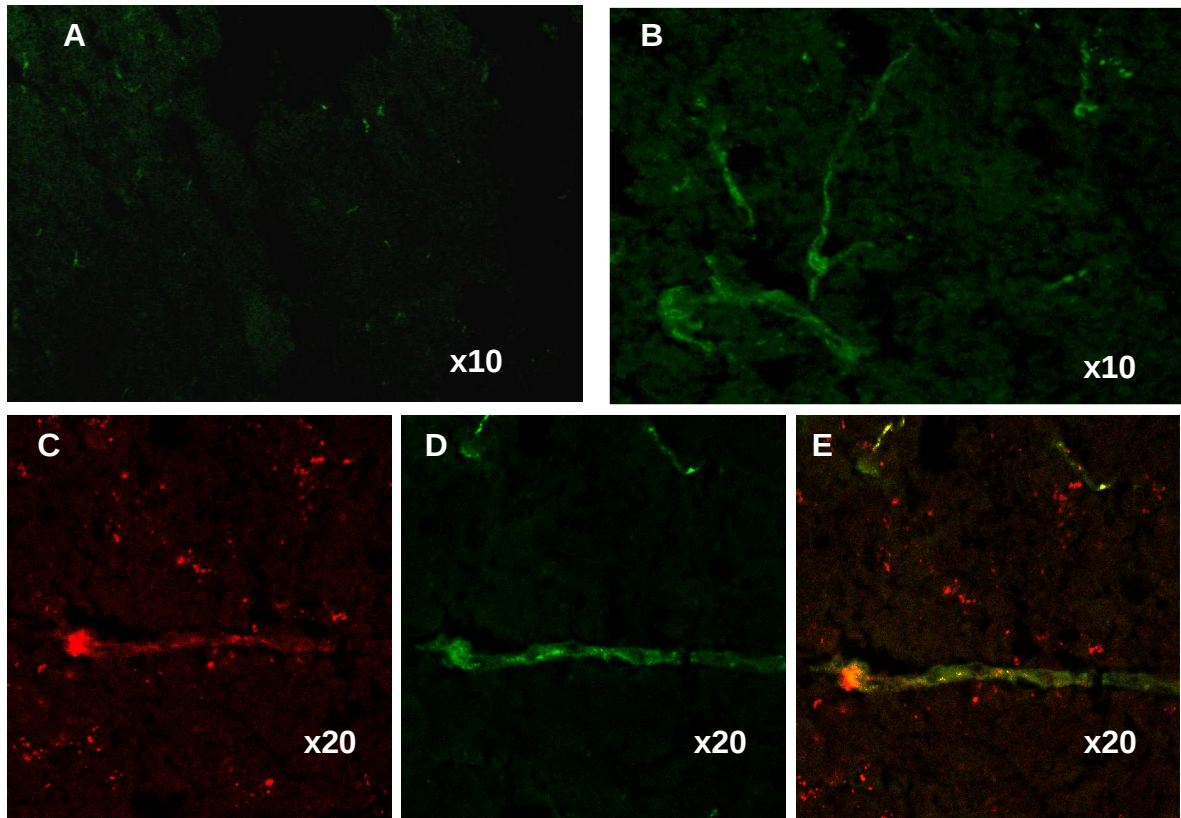


Figure 9: Localization of t-PA and angiostatin by immunofluorescence in orthotopically inoculated glioma of cartilage extract-treated mice.

Tissue-PA and angiostatin immunolocalization in C6 tumors were performed using anti-tPA monoclonal antibodies and anti-angiostatin polyclonal antibodies. The anti-angiostatin antibody did not recognize plasminogen [100]. Slides were then incubated with fluorescein isothiocyanate labeled antibodies anti-mouse IgG and biotinylated anti-rabbit IgG and finally incubated with an ExtrAvidin-tetramethylrhodamine isothiocyanate conjugate. Controls without primary antibody were performed to eliminate the non-specific staining of secondary antibodies as well as lipofuscin autofluorescence. Labeling of t-PA in tumor of mice treated with saline (A) or cartilage extract (B and D) are shown. Labeling of angiostatin in tumor of cartilage extract-treated mice is shown in C. Both labelling of AS and t-PA (C and D) are superposed to show their colocalization (E).

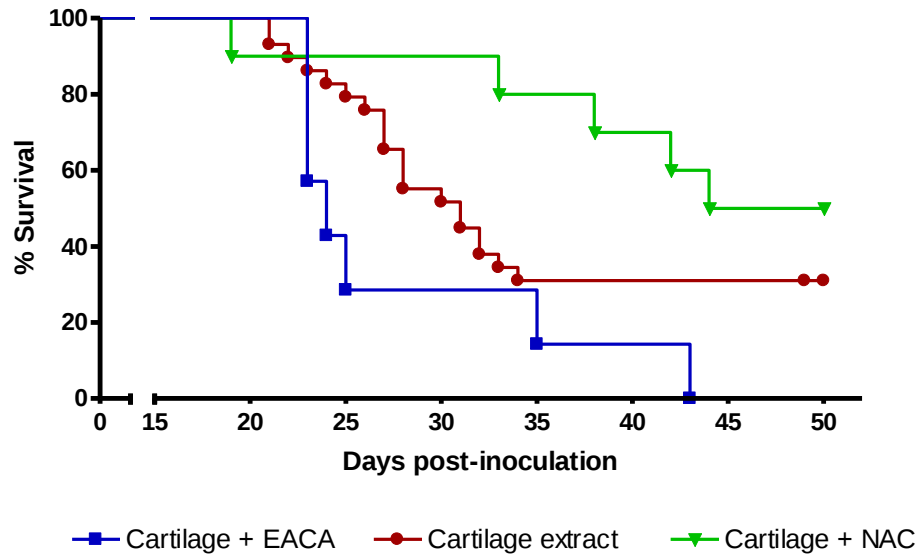


Figure 10: Effect of EACA and NAC on survival of cartilage extract-treated mice. C57BL/6 mice orthotopically inoculated with 5×10^4 GL26 cells were treated daily with cartilage extract (1 mg/kg p.o.) (red circle) or cartilage extract + EACA (120 mg/kg, p.o.) (blue square) or cartilage extract + NAC (7,5 mg/kg, i.p.) (green triangle).

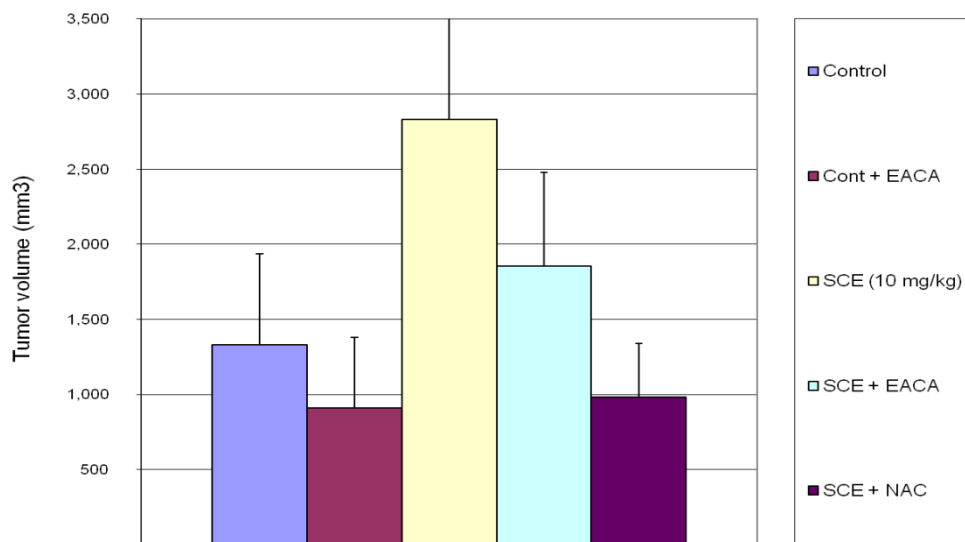


Figure 11: Effect of EACA and NAC on cartilage extract induced tumor oedema. Nude mice subcutaneously inoculated with 5×10^5 GL26 cells were treated

daily with saline or cartilage extract (10 mg/kg p.o.) or cartilage extract + EACA (120 mg/kg, p.o.) or cartilage extract + NAC (7,5 mg/kg, i.p.).

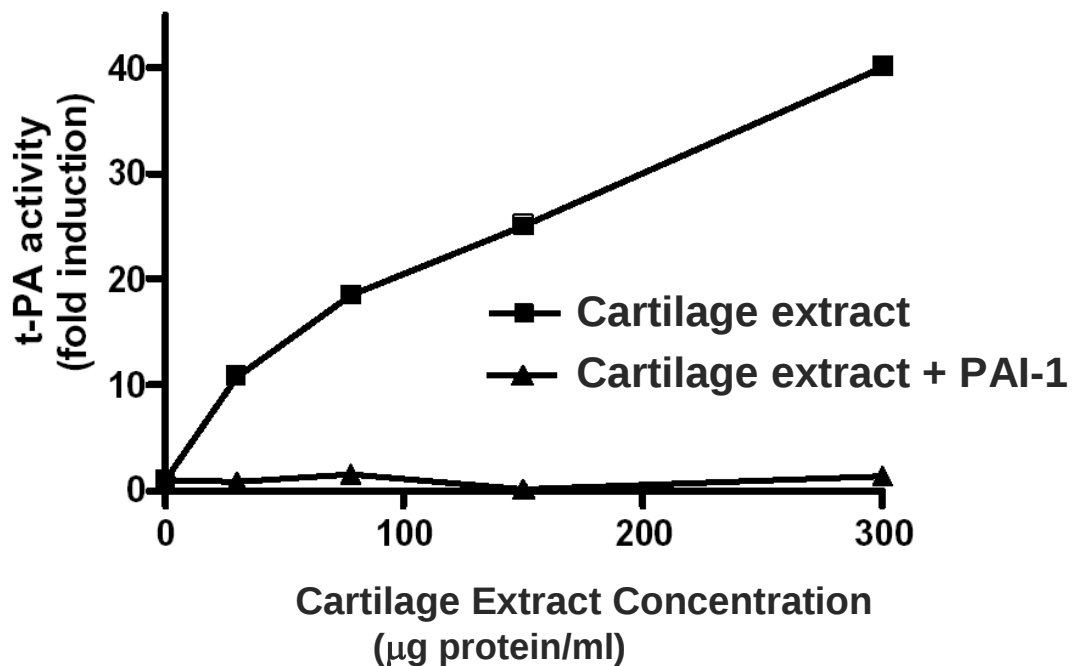


Figure 12: *In vitro* stimulation of t-PA activity by cartilage extract and its inhibition by PAI-1. Plasminogen (5 µg/ml) and the plasmin chromogenic substrate, Chromozym-PL (130 mg/ml) were pre-incubated with saline or various concentrations of cartilage extract in the absence or in the presence of 3 µg/ml of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI 1). Tissue-PA (35 U/ml) was added and its activity was monitored every three minutes by the change in absorbance at 405 nm corresponding to the rate of 4-nitroaniline release from Chromozym-PL. Tissue-PA activities were expressed as fold induction when compared to basal t-PA activity (without addition of increasing concentrations of cartilage extract).

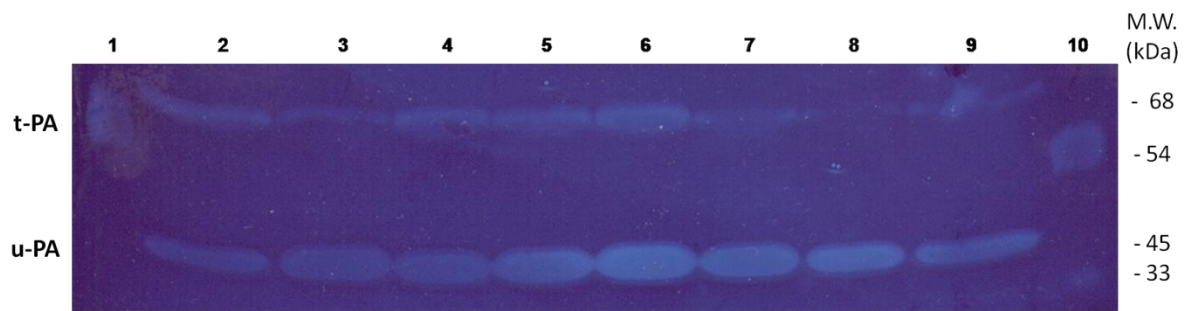


Figure 13: Increased t-PA activity within subcutaneous tumors treated with cartilage extract. Zymography was performed by separating 250 μ g of protein from GL26 tumor extracts on a SDS-polyacrylamide gel 10%. Recombinant human tissue plasminogen activator (t-PA) and urokinase-type plasminogen activator (single and double chain u-PA) were used as controls (line 1 and 10). Low t-PA activity detected in tumors from saline-treated mice can be visualized in the upper bands of lines 2 and 3, and compared to the high t-PA activity found in tumors from cartilage extract-treated mice (line 4, 5 and 6). Low t-PA activity was found in cartilage extract-treated tumors overexpressing PAI-1 (line 7, 8 and 9). The low molecular band which seems to be constant between all samples of both groups corresponds to murine u-PA.

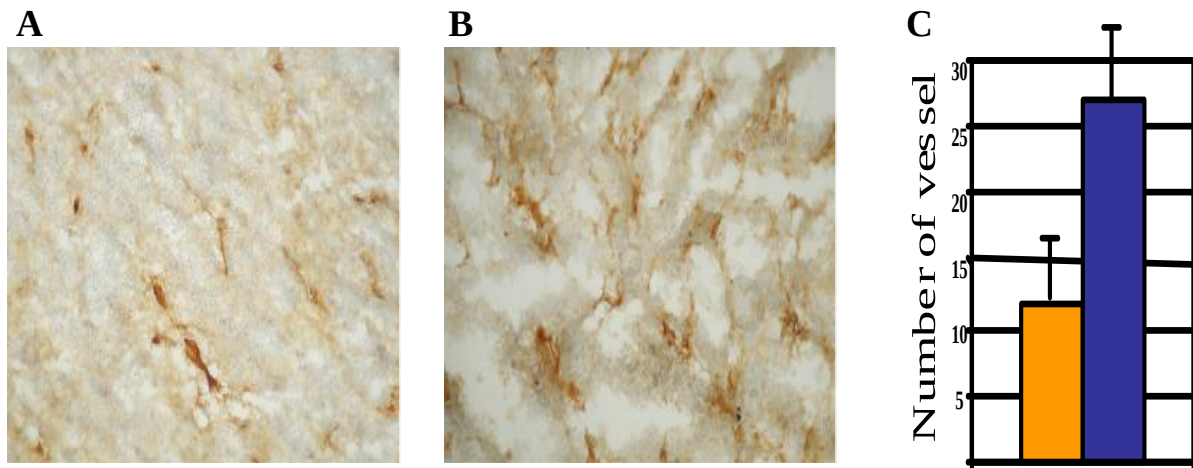


Figure 14: Effect of plasminogen activator inhibitor-1 on cartilage extract antiangiogenic effect.

Nude mice implanted subcutaneously with 5×10^5 GL26 cells overexpressing GFP or PAI-1 were treated daily per os with saline or cartilage extract, until sacrificed 28 days later. Tumor vessels were stained with anti-vWF, as shown previously in Figure 4. Tumors derived from GFP- or PAI-1-transfected GL26 cells are shown in A and B, respectively. Vessel density is represented in the histogram (light orange for GFP overexpressing tumors and dark blue for PAI-1 overexpressing tumors).

Discussion

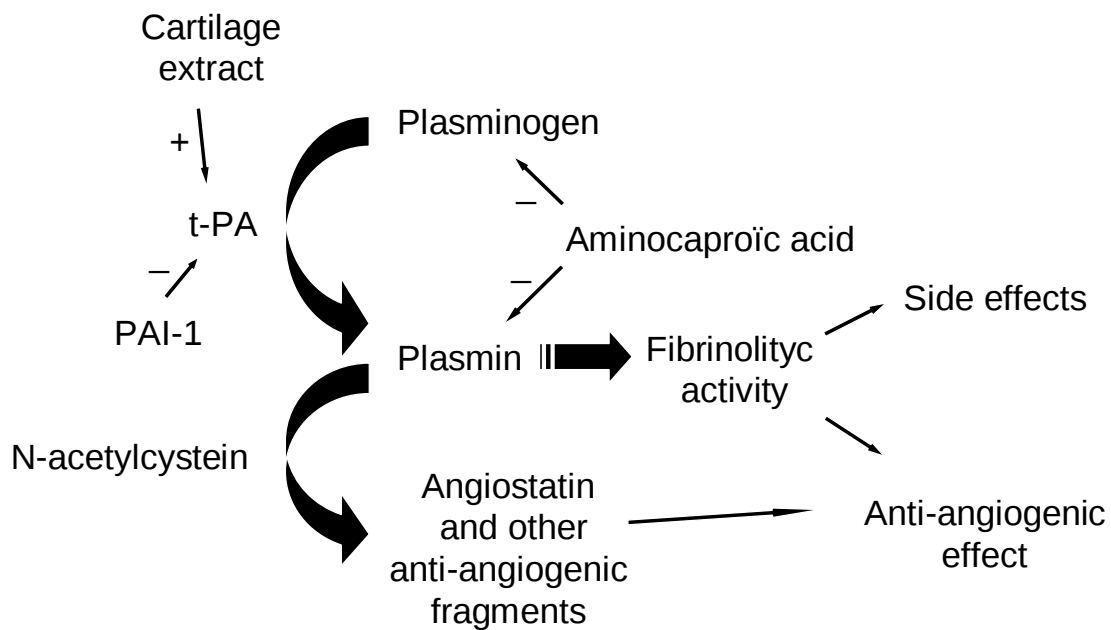


Figure 15: Modulation of the fibrinolytic pathway by PAI-1, EACA and NAC

The present study reveals that the antitumor and antiangiogenic properties of cartilage extract in experimental glioblastomas are accompanied by modulation of the plasminogen system through the stimulation of t-PA activity resulting in the formation of plasmin and endogenous angiostatin. Several functional *in vivo* experiments modulating the plasminogen system clearly demonstrate that this pathway is a direct player in the therapeutical effects of cartilage extract.

The antitumoral effect of cartilage extract is confirmed by its efficacy on several experimental glioblastoma models including immunosuppressed and syngeneic animals grafted with both orthotopic and subcutaneous tumors. These findings are supported by substantial morphological reorganization of the tumor cytoarchitecture observed in cartilage extract-treated animals. A significant reduction in vWF

expression, a marker for the presence of endothelial cells, was observed, which is the hallmark of an antiangiogenic effect. Histological analysis of the brains of control mice from all the intracerebral models showed extensive infiltration by glioblastoma cells contrasting with the small tumor formations observed in the brain parenchyma of cartilage extract-treated mice. Such data indicate that the use of antiangiogenic agents such as cartilage extract for the treatment of intracerebral tumors is not affected by the blood-brain barrier. This is probably because angiogenic events can be controlled by targeting the vascular endothelial cells directly from the circulation, independently of any intracerebral diffusion toward the tumor. In addition, the integrity of the blood-brain barrier is often compromised in brain tumors [51, 52]. Moreover, cartilage extract activity does not seem to require an intact immune system since strong antitumor activity was shown in athymic mice. The clinical benefits of cartilage extract have been demonstrated in a Phase II study involving patients with renal cell carcinoma refractory to immunotherapy and in a Phase II study involving patients with non-small cell lung carcinoma (NSCLC).

Besides its preclinical interest supporting the potential application of shark cartilage extract in glioblastoma therapy, this work also individualizes a new pathway involved in the effect of cartilage extract, and provides an interesting preclinical setting to find new targets in the field of angiogenesis and to clarify the role of t-PA in angiogenesis, tumor progression and therapy.

The morphological changes observed in cartilage extract-treated animals, such as the presence of degenerated or dystrophic vessels characterized by a thick intima and perivascular spacing were similar to those obtained in response to an activation of fibrinolysis [49, 53-55]. This is supported by the demonstration that cartilage extract increases PLAT expression in ECs [38] and stimulates t-PA-dependent

plasmin formation *in vitro* [39]. Tissue-PA is a proteolytic enzyme that is responsible for the activation of fibrinolysis through the transformation of plasminogen in plasmin which then degrades components of the extracellular matrix like fibrin laminin [56] and fibronectin [57]. The presence of t-PA within the vascular walls of normal and pathologic vessels [58-60], including those from brain tumors [61, 62], has been demonstrated in several reports. Moreover, t-PA stored in small vesicles within the endothelium can be rapidly released into the vessel lumen to activate fibrinolysis [63-65]. In the present study, we have shown that the increase in t-PA expression in glioblastomas following treatment with cartilage extract, resulted in the formation of plasmin and angiostatin within the tumor vasculature. Vessels outside the tumor or other cell types did not express detectable levels of t-PA or angiostatin. Moreover, *in vitro* studies showed that the formation of plasmin requires the presence of plasminogen, thus suggesting that cartilage extract contains a catalytic element, which significantly improves the affinity of t-PA for plasminogen, since it decreases the K_m of t-PA for plasminogen and increases the K_{cat} of the enzyme [39].

The role of t-PA in angiogenesis and tumor formation as well as therapy remains controversial.

Increasing experimental and clinical evidence supports the activation of t-PA and fibrinolysis as a mechanism of inhibiting diapidesis of tumor cells and formation of metastases [66, 67]. In fact, it has been experimentally demonstrated that circulating tumor cells favor coagulation to create a physical link with platelets and fibrin as a means of migrating through the tumor vessel wall [68, 69]. It therefore appears that modulation of fibrinolysis could improve tumor clearance and inhibit the invasion of healthy distant tissues [70]. Similarly, the formation of vascular tube by endothelial cells during tumor angiogenesis is supported by fibrin deposition [71]. In accordance

with these concepts, higher levels of t-PA have been reported in benign versus malignant glioblastoma and a good prognostic correlation and increased survival have been associated with high t-PA levels [44, 47, 72]. Similarly, beneficial effects of cartilage extract observed in clinical trials [73] could be linked to the stimulation of t-PA and consequent perivascular fibrinolysis. Indeed, intracerebral and subcutaneous tumors in cartilage extract-treated animals displayed a dramatic reduction in the number of blood vessels as well as substantial morphological reorganization of the vessel and tumor cyto-architecture, suggesting an alteration of extracellular matrix properties.

Antiangiogenic effects of drugs targeting VEGF such as Avastin have been recently associated with an increase in tumor invasiveness, which is not the case with cartilage extract. Modulation of the plasminogen pathway could be one of the targets to neutralize the pro-invasive effect of Avastin, providing a new modality to neutralize Avastin resistance. Localisation of t-PA antigene around degenerating vessels and increased t-PA activity in the tumor lysate of cartilage extract-treated animals, suggest that t-PA stimulation could be involved in the antiangiogenic effect of cartilage extract, but more experimental data were needed to rigorously conclude. To support this hypothesis, we designed *in vivo* experimental modulation of the the t-PA pathway to investigate the direct role of t-PA in the therapeutical effect of cartilage extract. We demonstrated that inhibition of t-PA by PAI-1 neutralized its antiangiogenic effect. We also demonstrated that plasminogen and plasmin neutralization with EACA inhibited survival benefit. In contrast, reducing the generated plasmin into angiostatin or other fragments of plasmin by cotreatment with NAC extended mice survival. It remains unclear if this beneficial effect could be related to enhanced angiostatin generation or reduced side effects of intracerebral

oedema caused by excessive tumor fibrinolysis. On one hand, t-PA could be considered to be antiangiogenic through plasmin cleavage and the consequent generation of angiostatin, one of the best characterized antiangiogenic molecules [74-76]. Although the absence of angiostatin in cartilage extract has been demonstrated by Western blot analysis (data not shown), the formation of endogenous angiostatin within cartilage extract-treated tumors suggests the presence of a “plasmin reductase like” element within cartilage extract similar to the disulphide reductase identified in tumors by Lay and coll. [77]. Moreover, angiostatin and t-PA were colocalized in the brain tumor vasculature of animals treated with cartilage extract. Despite these observations, it is unlikely that the global effect of cartilage extract can be explained only by the generation of endogeneous angiostatin. In fact, as described in different reports, the phenotype of brain tumors from angiostatin-treated animals is clearly different from that of cartilage extract-treated animals [78-80]. There is a lack of peritumoral intercellular spaces, no reduction in the number and diameter of dystrophic blood vessels and absence of the accompanying morphological changes observed in brain tumors from angiostatin-treated animals [78-80]. Thus, even if cartilage extract is able to induce intratumoral angiostatin level, their mechanisms of action appear to be quite different and the contribution of endogenous angiostatin to the global effect of cartilage extract is probably not predominant. As an example, although a Phase I study showed that increased plasma levels of angiostatin following co-treatment with t-PA and a free sulfhydryl donor resulted in the decreased presence of tumor markers, it did not result in any clinical objective responses [81]. This is in accordance with findings showing that angiostatin generation is not a critical event [82-84]. These findings also suggest that other molecule(s), in addition to angiostatin, could be

involved in the antiangiogenic activity of cartilage extract. For example, Merchan et al. [50] have recently advanced the hypothesis that plasmin reduction in the presence of captopril resulted in the formation of an unidentified protein that is significantly more potent than angiostatin. On the other hand, the mechanisms by which t-PA stimulation results in angiogenesis blockade, could also be explained by the increased plasmin activity although its benefit is controversial. Recent studies have shown that depending upon its microenvironmental location, plasmin exhibits either pro or antiangiogenic properties [85, 86]. In addition, increasing proteolysis in intracerebral glioma may involve some risks for the brain since the delimited intracranial space gives no margin for tumoral oedema and hemorrhagia that accompany high-dose treatment with inducers of t-PA, like SCE. Besides its anti-VEGF binding and pro-apoptotic activities [35, 37], cartilage extract is also characterized by its capacity to significantly inhibit MMP activity *in vitro* [36]. This latter property appears crucial to the global effect of cartilage extract, as on one hand it blocks peritumoral matrix destabilization and, on the other hand it could limit the pro-hemorrhagic phenomena linked to excessive proteolysis, as it has been reported for the combined treatment of t-PA and MMP synthetic blockers in the treatment of acute ischemic events [87]. Despite the presence of endogenous inhibitors of MMPs in SCE, the concomitant use of a plasmin reductor is still hoped for, since artefactual increase in tumor volume limits the dosage and benefits of SCE on survival in intracerebral models. In this study, the concomitant use of NAC decreased tumor oedema and increased survival. Interestingly, t-PA can also be induced by retinoic acid (RA) in endothelial cells [88] and glioma [53]. Similar problems of increased tumor volume or intratumoral haemorrhagia were encountered with RA treatment and resolved by co-treatment with NAC, which uncovered a great benefit on survival

(unpublished). In spite of all the potential of t-PA activation, the interest in cartilage extract remains in its multitarget activity that distinguish it from other more conventional drugs. Clinical benefits of cartilage extract have been evaluated in a Phase II clinical trial for non-small cell lung carcinoma (NSCLC). Interestingly, abnormalities of the fibrinolytic system are described in this cancer [89, 90] but there are also correlations with MMPs and VEGF activity [41, 91-94]. Therefore, it is difficult and premature to predict which among the different mechanisms of action related to cartilage extract (anti-MMP, anti- VEGF, pro-apoptotic or pro-t-PA activities) could be responsible, or more important, for such efficacy. Recent approval of the VEGF inhibitor Avastin as 2nd line treatment of recurrent glioblastoma, indicates a place for antiangiogenic therapy for this incurable cancer. However, tumor angiogenesis and metastasis involve complex pathways and recurrence is unavoidable without validation of multitargeted therapies.

Conclusions

Cartilage extract is a unique natural antiangiogenic product showing multiple mechanisms of action. Our data demonstrates the importance of the t-PA pathway in the antiangiogenic effect of cartilage extract on glioblastomas *in vivo*. The synergistic actions of NAC with cartilage extract suggest that it may also be an effective treatment for human glioblastomas which are notoriously resistant to current chemotherapies and tend to swell under antiangiogenic treatment. It also illustrates how a better understanding of the mechanism of action can uncover the full benefits of promising therapies with minimal but appropriate management.

Competing interests

The authors hereby declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

FB, VD and GP conceived the studies, oversaw the experimental work and helped draft the manuscript. BS, AB and PJ performed the experimental work and participated in data analysis. FB and VD counted the number of vessels. BS and FB completed and corrected the manuscript.

Acknowledgements

The authors wish to thank Ms. Anik Michoud and Ms. Anik Simon for their excellent technical assistance. This work was sponsored by Æterna-Zentaris Laboratories.

Méthode pour optimiser le Néovastat

Dans un premier temps, l'efficacité de plusieurs sources de cartilage de requin devaient être comparées afin d'optimiser la qualité du produit. Les méthodes les plus simples telles que la prolifération des cellules endothéliales, la formation de tubes vasculaires dans le matrigel ainsi que la vascularisation de la membrane chorioallantoïde de l'embryon de poulet se sont avérées peu discriminantes. L'effet antiangiogénique a donc été comparé dans des modèles de glioblastome chez la souris. Bien que cette méthode ce soit avérée efficace, elle ne pouvait demeurer viable lorsque les besoins augmenteraient. Elle requiert en effet plusieurs passages avant d'obtenir suffisamment de cellules tumorales pour l'implantation des souris. Ensuite, les nombreux groupes de souris doivent être gavés quotidiennement avec les différents lots du produit pendant 2 semaines pour un modèle de tumeur sous-cutanée et 4 semaines pour un modèle orthotopique. Finalement, l'efficacité antiangiogénique des lots de cartilage doit être révélée par une immunohistochimie, impliquant la sélection de plusieurs coupes au cryotôme pour chaque tumeur, le marquage des vaisseaux avec des anticorps et enfin, leur comptage au microscope, effectué sur plusieurs zones représentatives de l'ensemble de la tumeur. Plus tard, lors de l'augmentation du volume de la production, plusieurs lots issus de différentes méthodes de purification devaient également être comparés. Il devenait de plus en plus impératif de trouver une méthode plus reproductible, plus rapide et moins coûteuse. La stratégie élaborée, fut d'identifier des marqueurs endothéliaux qui corrôlaient avec les différentes efficacités antiangiogéniques observées in vivo.

Analyse transcriptomique par microarray à haute densité

Une étude transcriptomique similaire à celle décrite dans le premier article, a permis de comparer la signature transcriptionnelle de cellules endothéliales traitées avec différents lots d'extrait de cartilage de requin. Comme le montre le logiciel Tree View à la figure 16, l'effet de deux lots sur les cellules endothéliales, présentait une signature transcriptionnelle plus similaire que celle d'un troisième lot.

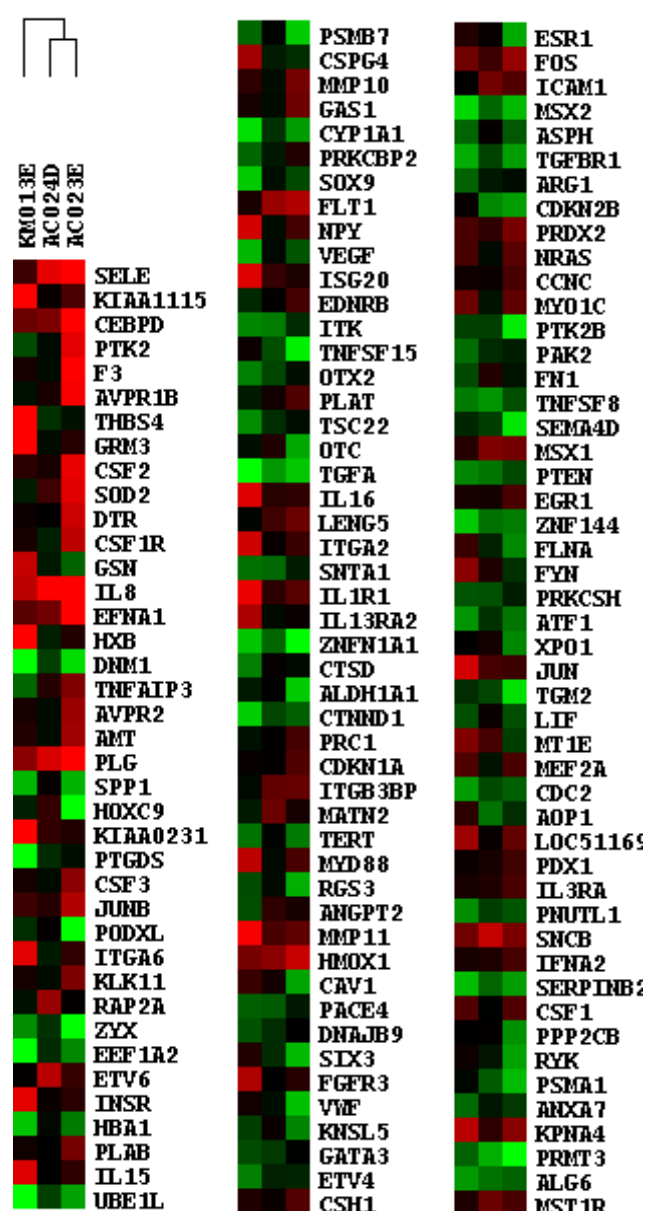


Figure 16 : Clustering du transcriptôme des HUVEC traitées avec différents extraits de cartilage de requin

Corrélation avec l'efficacité obtenue in vivo

Une étude parallèle in vivo a montré que le gavage des souris porteuses de glioblastome avec ces deux lots d'extrait de cartilage de requin prolongeait la survie, contrairement au 3e lot qui semblait avoir une signature transcriptomique différente sur les CE (Figure 17).

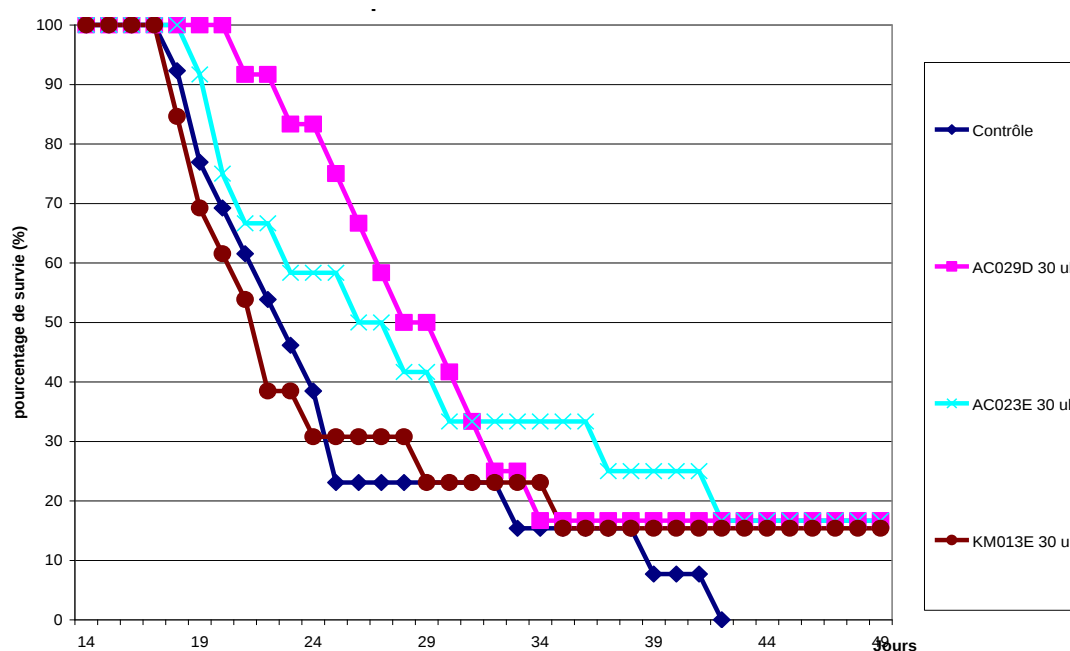


Figure 17 : Effet des différents lots de Névostat sur la survie des souris C57 implantées en intracérébral avec des cellules de glioblastome GL26

En filtrant les gènes différentiellement exprimés, nous avons pu retenir 6 gènes qui seraient potentiellement les meilleurs marqueurs pour discriminer les lots les plus actifs (figure 18).



Figure 18 : Marqueurs différenciant l'efficacité des lots

Passage de la haute densité vers le haut débit

L'étude d'un nombre restreint de marqueurs simplifierait grandement la méthode mais aussi l'analyse, en plus de réduire les coûts. À ce stade, l'utilisation du microarray à haute densité devient inappropriée pour l'étude de ces quelques marqueurs. En effet, avant d'utiliser ces marqueurs, ceux-ci devront impérativement être validés sur un grand nombre d'échantillons. La méthode couramment utilisée est la PCR quantitative, mais nous verrons dans le prochain article qu'une autre méthode pourrait présenter des avantages considérables. Il ne faut pas oublier qu'une fois validés, ces quelques marqueurs auront comme application d'être utilisés pour l'analyse d'une multitude d'échantillons. Nous aurons alors besoin d'une méthode à haut débit, efficace et économique. La compagnie Apibio (acquit par Biomérieux) a donc développé un microarray en format 96 puits permettant d'obtenir les résultats en 1h. Le prochain papier décrit cette nouvelle technologie appelée OLISA et comment elle pourrait compléter la technologie du microarray à haute densité et remplacer celle de la PCR quantitative.

High Density Microarray on Nylon Membrane and Oligo Sorbent Array: Two comparable and complementary methods for analysis of gene expression

Simard Bryan^{1, §}, Abaibou Hafid^{2, §}, Yousefzadeh Camelia¹, Segura Raphaël², Benabid Alim-Louis¹, Cleuziat Philippe² and Berger François^{1,*}

¹: Centre hospitalier universitaire, INSERM Unité 318, Pavillon B, CHU A. Michallon, BP 217
38043 GRENOBLE Cedex, France

²: Apibio, 15 rue des Martyrs, 38054 Grenoble, France.

§ Authors with equal contribution

* To whom correspondence should be addressed: Phone: 33/(0)476765639,

FAX: 33/(0)476765619, E-mail: Francois.Berger@ujf-grenoble.fr

Keywords: OLISA, microarray, gene expression, diagnosis tool

Word count: 2400 (+ 200 in abstract)

ABSTRACT

Microarrays are powerful tools for monitoring the expression levels of thousands of genes. However, validation of important data is essential and often subjected to a quantitative PCR which is not adapted when a great number of genes need to be validated or a great number of samples are involved in a study. We propose to validate classifying genes identified on a high density microarray by monitoring their expression levels in a great number of samples with a low density microarray. Thus, OLISA™, a new generation of microtiter plate format for low density microarrays based on a rapid colorimetric method, could fulfil these requirements. However, before using routinely the two technologies in combination, we need to demonstrate their reliability. We report here that the same RNA preparations, extracted from HUVEC treated in various conditions with an antiangiogenic compound, showed a strong correlation between the gene expression profiling obtained from a high density membrane microarray platform, based on a radioactive labelling, and OLISA™. Moreover, results from the two technologies also strongly correlated with quantitative PCR. In conclusion, OLISA™ provides a rapid low density transcriptomic assay suitable for validation of classifying genes and their use for clinical diagnosis or industrial pharmacoccharacterization of drug candidates.

INTRODUCTION

5 years ago emerged the first molecular classification of lymphoma using transcriptomic tools, in complement to molecular classification [265]. The perspectives of a new molecular medicine were comforted by the demonstration of the impact of transcriptomic analysis in several cancerous and non-cancerous pathologies [266-268]. However, the enthusiasm was moderated by the recent demonstration of technological caveats in transcriptomic analysis [140, 269]. Moreover, most clinical studies were retrospectives, including small cohorts of patients which do not permit at the end any rigorous validation of molecular transcriptomic endpoints. This strongly supports the need for prospective studies, on hundreds of patients to validate the genes of interest emerging from retrospective analysis. However, the lack of transcriptomic tools “for the bedside” makes difficult such studies. Quantitative-PCR (q-PCR) is classically considered as the reference technology to confirm the transcriptomic data [270], but that method is expensive and time consuming. What we need is a low density transcriptomic assay, harbouring clinical compatibility and diagnostic quality. This implies a low cost, fast and sensitive assay. Thus, we have chosen OLISA™ (OLigo Sorbent Array) as a simple versatile oligonucleotides microarray which has been developed by Apibio (Grenoble, France). It is based on a robust colorimetric method with a single temperature and can monitor simultaneously the expression of up to 15 different genes per well of a standard lab 96-well microtiter plate [271, 272]. The 96-well OLISA™ format is easy to fit major

standard laboratory equipment and can be automated to reach high throughput requirements for a multiplex assay of up to 1440 different genes.

As a prerequisite to initiate such study we compared results obtained from classical transcriptomic analysis, OLISA and q-PCR in the context of a production control for a drug. The compound of interest was Neovastat, a purified shark cartilage extract demonstrating antiangiogenic activities and tested in clinical phase I, II and III in lung and kidney carcinoma [273].

MATERIAL AND METHODS

Reagents

Foetal calf serum (FCS), medium E-199, endothelial cell growth serum (ECGS) and trypsin-EDTA were obtained from Sigma Chemicals (St-Louis, MO). Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2) and supplements were from Cambrex Bio Science (Paris, France). Penicillin and streptomycin were from Laboratoires Diamant (Puteaux, France). Neovastat was supplied by Æterna Laboratories (Québec, QC, Canada).

Cell culture

Human umbilical vascular endothelial cells (HUVEC) were obtained from Cambrex (Paris, France). Early passages (p4-5) were grown in a humidified atmosphere (37 °C, 5 % CO₂) to 70 % confluence in EGM-2 (supplemented EBM-2).

HUVEC treatment and RNA preparation

Medium was changed for ½ of M199 supplemented with 10 % FCS, 10 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and 10 µg/ml ECGS and ½ of EGM2, 24 h before treatment with protein extracts. Cells were harvested after 0-24 h and RNA isolated using the RNAgent^R Total RNA isolation system of Promega (Madison, WI, USA). RNA concentration was determined by measuring the absorbance at 260 nm. RNA quality was verified by electrophoresis on 1 % agarose gel containing 0.005 % Ethidium Bromide and also by using AGILENT technology.

High Density Microarray on Nylon Membrane (HDM)

Design, synthesis and spotting of probes.

The method of Long Oligonucleotides Array on Nylon, described by El Atifi et al. [138], was used for large-scale analysis of gene expression. Briefly, the 70-mer sequences of 400 genes were chosen from human gene sequence databases, in the 3' region of the gene transcript, located at a maximum of 800 bp from the poly(A) tail, with a GC ratio between 40 and 70 %. Chemical synthesis was performed by Operon GmbH (Köln, Germany). The oligonucleotides spotting and probe quantification were performed by the Transcriptome team of INSERM U318 (CHRU, Grenoble, France) using an Affymetrix[®] 417 Microarrayer (MWG, Ebersberg, Germany). This arrayer uses Pin-and Ring Technology to ensure consistent spotting delivery from microplate to the nylon membrane. For even more reproducibility, it has been programmed to spot each oligonucleotide in duplicate.

Synthesis of radiolabelled cDNA.

Labelling of cDNA target (using dT25 primers, α [³³P]-dCTP and 2.5 μ g of RNA) and purification were performed according to the method of Nguyen et al. [274].

Hybridisation.

Nylon membranes were prehybridised in a rotative oven at 60°C for 6h in hybridisation buffer containing salmon sperm to avoid unspecific hybridisation. Purified probes were added and allowed to hybridise with membranes for 72h at 60°C. Membranes were washed twice with TBS 0.5 % SDS, 2X SSC for 1h at 45°C under strong agitation.

Revelation and analysis.

Hybridised membrane arrays were exposed on phosphor image plate (Fuji, Raytest, Paris La Défense) for a time corresponding to the intensity of radioactivity measured in the hybridised targets (10 Mcpm ~72h). Scanning and spot quantification were performed using a Phosphor Imager BAS 5000 and the Image Gauge software of Fuji. The level of expression of beta-actin was used to normalise data of each membranes.

Low Density Microarray on 96-well microtiter plate (OLISA™ technology)

Design, synthesis and spotting of probes.

60-mer probes corresponding to all genes were optimised using a proprietary bio-informatics platform. These probes are chemically synthesised according to internal procedures for high efficient coupling oligonucleotides (purity > 95%) then spotted onto 96-well microtiter plate.

Synthesis of labelled cDNA.

15 µg of total RNA were retro-transcribed with Superscript II Reverse-Transcription kit, Invitrogen Corporation; Carlsbad-CA) in the presence of dNTP-biotin. cDNA were purified on microcon filters following the manufacturer's recommendations (Millipore Corp., Canton, Massa).

OLISA™ protocol.

Biotin-labelled targets were denatured using a denaturing solution then hybridised to oligonucleotide probes in the presence of a hybridisation solution for one hour at 37°C. Wells were washed four times with 200 µl of the washing buffer in a fully automated washing system. The conjugate solution was diluted into the dilution buffer, added to each well and incubated at 25°C for 15 minutes. Wells were washed a second time as described above. 50 µl of the staining solution was added to each well and incubated at 25°C for 15 to 60 minutes. If necessary, the stop solution can be added (4µl) to each well to stop the reaction process. A schematic representation of this protocol is

illustrated bellow in figure 19.

OLISA™ reading system and software analysis.

Hybridised arrays were read using a densitometry reading system (Apimager®) and the density ratio measurement was determined in consideration with normalized diameter and background noise. Spots were considered for analysis if their response is significantly higher than the background noise plus three standard deviations. Data analysis was performed using proprietary software (ApiAnalyser).

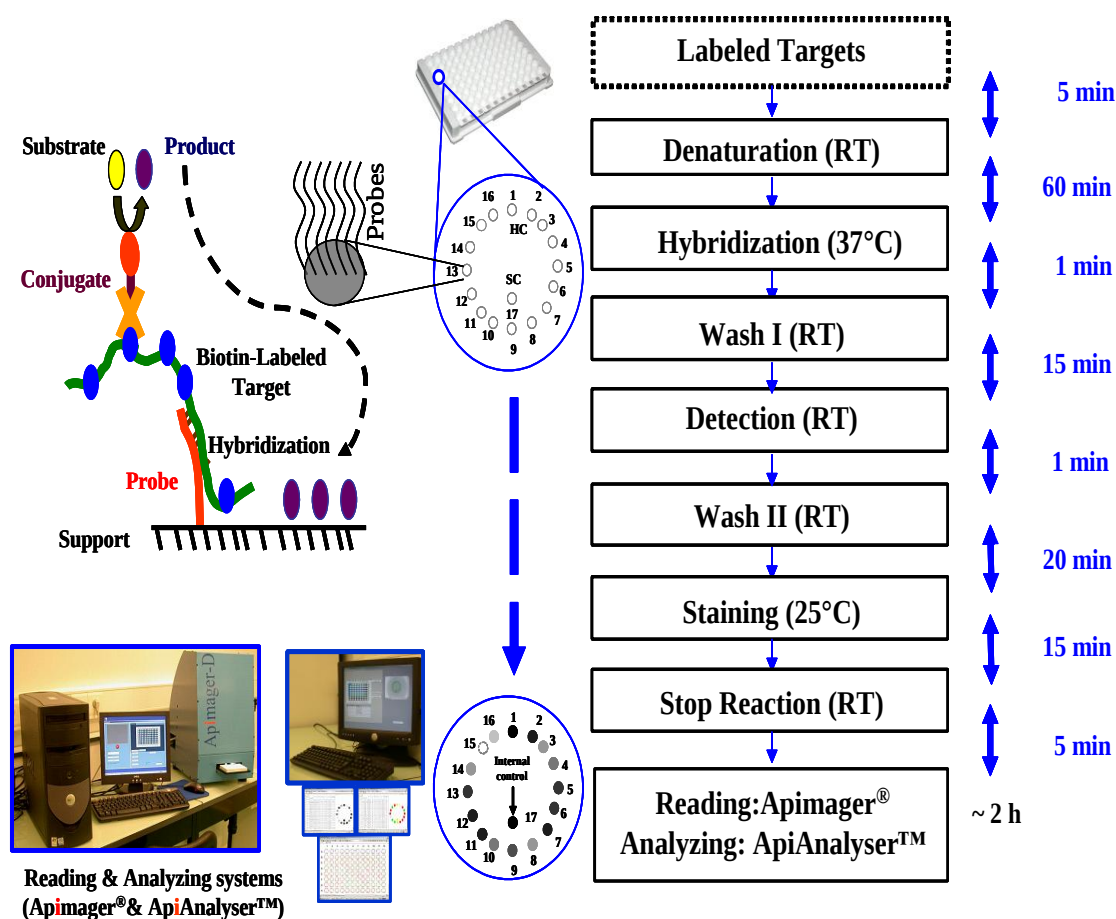


Figure 19: Schematic representation of the OLISA technology and protocol

Assuming that the signal for the housekeeping gene (ACTB) should be unchanged between the growth conditions, a uniform scaling factor was applied to each well for normalizing the data. In other words, the signals from genes of interest were normalized per well using the signal corresponding to the beta-actin gene.

Quantitative PCR

The reaction mixture (10 μ l) contained 0.8 μ l of $MgCl_2$ (2 mM), 0.5 μ l of each specific primer (0.5 μ M), 1 μ l of DNA Master SYBR Green and up 100 pg of cDNA template. Each capillary tube was centrifuged at 3000 rpm for few seconds then placed in the LightCycler thermocycler. As for the other techniques, data were normalised according to beta-actin level of expression.

Statistical analysis.

Spearman's rank-order correlation coefficients between the crude data of the 3 techniques were analysed. Pearson's product moment correlation coefficients were also calculated after heterogeneous intensity scales across the 3 technologies have been rescaled using a Fischer's Z-transformation with mean = 0 and standard deviation = 1 , as described by Cheadle et al. [275].

RESULTS

Six genes were chosen as classifiers for Neovastat antiangiogenic activity *in vitro* and *in vivo*, emerging from a previous large-scaled gene expression study on nylon membrane done by Simard B. *et al.* (article in preparation). They were Plasminogen (PLG), Endothelial selectin (SELE), Interleukin-8 (IL8), Peroxiredoxin-2 (PRDX2), Tissue-plasminogen activator (PLAT) and Ephrin-A1 (EFNA1). Figure 20 shows an image obtained from a nylon membrane spotted in with long oligonucleotides, hybridised with radiolabelled cDNA for 3 days and scanned by the Phosphor Imager BAS 5000 of Fuji after 3 days of exposition.

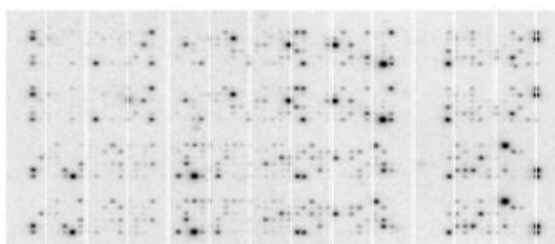


Figure 20: Typical image of a nylon membrane spotted with long oligonucleotides and using radioactive detection for large scaled analysis of gene expression.

Thus, quantitative data showed in table 16 were given by the Image Gauge and the Array Gauge software of Fuji.

	1	2	3	4	5	6
PLG	23.2	93.5	176.3	23.6	289.3	403.1
SELE	0.0	6.8	96.1	0.0	118.8	46.1
IL8	2.7	15.6	93.5	0.0	245.2	347.0
PRDX2	0.0	3.3	4.5	0.0	8.8	7.9
PLAT	0.0	0.0	18.5	0.0	26.9	14.2
EFNA1	0.5	1.5	6.1	1.7	10.6	16.7

Table 16: Quantitative data of 6 classifiers obtained from High Density Microarray on Nylon Membrane (HDM). Level of expression of Plasminogen (PLG), Selectin (SELE), Interleukin-8 (IL8), Peroxiredoxin-2 (PRDX2), Tissue-plasminogen activator (PLAT) and Ephrin-A1 (EFNA1) are shown for the 6 RNA preparations. Human umbilical vein endothelial cells have been treated with saline, crude extract of shark cartilage or Neovastat (purified extract) for 4h (sample 1, 2 and 3) and with Neovastat for 0, 8 and 24h (sample 4, 5 and 6). RNA extracted were radiolabelled with ^{33}P and hybridised for 72h at 60°C on nylon membranes spotted in duplicate with 400 long oligonucleotides (70 mers). Washed membrane were exposed on phosphor image plate (Fuji, Raytest, Paris La Défense) for 72h and scanned with a Phosphor Imager BAS 5000 (Fuji). Spot quantification were performed with the Image Gauge software of Fuji and the level of expression of beta-actin was used to normalise data of each membrane.

Figure 21 shows the Images of OLISA™ for the six biotin-labelled RNA preparations after 1h of hybridisation and less than 1h of staining. The

quantitative data obtained after computerised densitometric analysis are given in table 17.

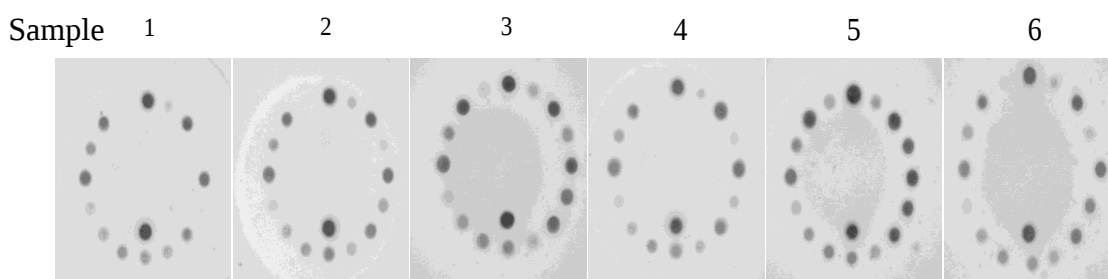


Figure 21: Images of OLISA™ for the 6 RNA samples

	1	2	3	4	5	6
PLG	1361	2071	2738	1620	4834	2260
SELE	757	1176	6799	773	5523	1847
IL8	1475	2845	9680	1693	11224	10534
PRDX2	3123	3009	4229	1254	4537	5227
PLAT	4785	4278	4631	3890	4923	5227
EFNA1	8968	9427	12748	4817	11500	11130

Table 17: Quantitative data obtained from OLISA. The same RNA extracts were biotin-labelled, denatured and then hybridised in well, spotted with 2 different oligonucleotide probes (60 mers) per gene, for one hour at 37°C. After washing, the conjugate solution was added to each well and incubated at 25°C for 15 minutes. Wells were washed a second time and the staining solution was added to each well and incubated at 25°C for 15 to 60 minutes. Hybridised arrays were read using a densitometry reading system (Apimager®). Data were analysed using proprietary software (ApiAnalyser) and normalized per well using the signal corresponding to the beta-actin gene.

Finally, genes expression data obtained for the same genes using q-PCR are given in table 18. Note that data from the 3 technologies have all been normalized in function of beta-actin.

	1	2	3	4	5	6
PLG	1.0	1.3	3.7	1.0	3.5	0.8
SELE	1.0	7.2	10.3	1.0	12.1	7.3
IL-8	1.0	4.9	7.5	1.0	9.7	5.7
PRDX2	1.0	1.3	1.4	1.0	3.9	2.7
PLAT	1.0	3.0	3.5	1.0	2.8	2.4
EFNA1	1.0	5.8	8.7	1.0	9.8	5.7

Table 18: Quantitative RT-PCR data. Reaction mixture (10 µl) contained 0.8 µl of MgCl₂ (2 mM), 0.5 µl of each specific primer (0.5 µM), 1 µl of DNA Master SYBR Green and up 100 pg of cDNA template. Each capillary tube was centrifuged at 3000 rpm for few seconds then placed in the LightCycler thermocycler. As for the other techniques, data were normalised according to beta-actin level of expression.

Correlations between the 3 techniques were first analysed by Spearman's rank-order test (table 19).

OLISA vs HDM	HDM vs q-PCR	OLISA vs q-PCR
0.77	0.68	0.71

Table 19: Spearman's rank-order correlation coefficients for the 3 technologies

To directly compare data, heterogeneous intensity scales across the 3 technologies needed to be converted to a single common scale. To accomplish this, we applied a Fischer's Z-transformation, so that the mean and variance of the signals were equivalent for each gene across the 3 technologies. Finally, the rescaled data (Z-scores represented and compared in figure 22) have been used to calculate Pearson's product moment correlation coefficients for the three technologies (table 20). From these two methods of analysis, a strong correlation was observed between the 3 techniques, the better correlation observed between OLISA and HDM.

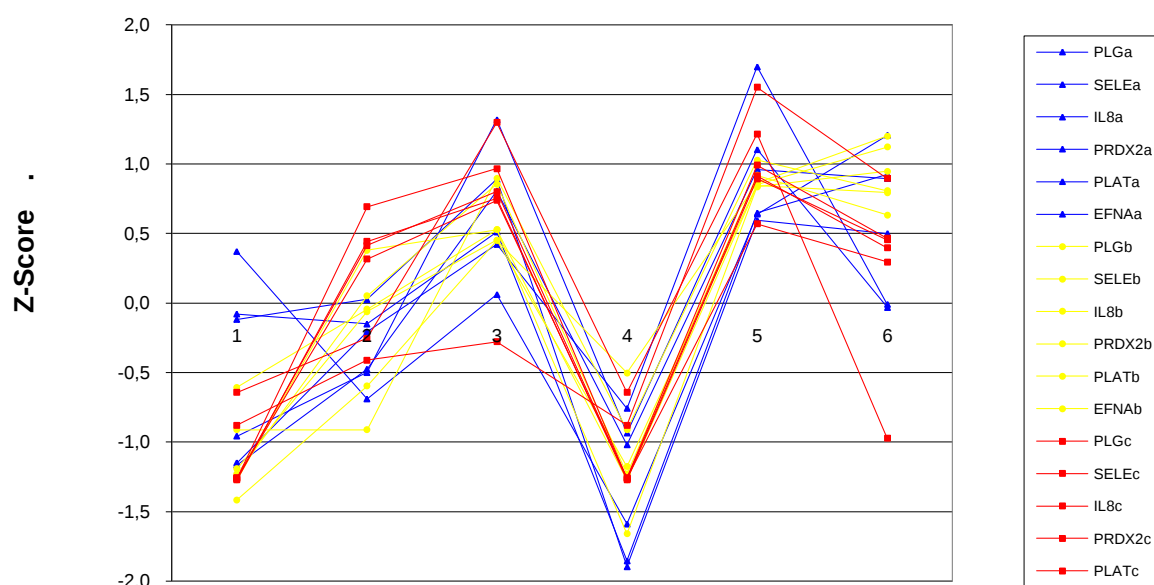


Figure 22 : Comparison of the rescaled data of the 3 technologies.

Heterogeneous intensity scales across the 3 technologies were rescaled using a Fischer's Z-transformation with mean = 0 and standard deviation = 1. Genes profiling of the 6 RNA preparations obtained by High Density Microarrays on Nylon Membrane are represented in blue a) those of OLISA are represented in yellow b) and q-PCR in red c).

OLISA vs HDM	HDM vs q-PCR	OLISA vs q-PCR
0.76	0.75	0.73

Table 20: Pearson's product moment correlation coefficients for the 3 technologies. Coefficients were calculated from the rescaled data (Z-scores) represented in figure 22.

DISCUSSION

Transcriptomic analysis using microarray had a great impact on basic and medical research, generating hope for a new molecular medicine. However, the absence of inter-platform reproducibility reported by several paper [140, 269], supports the need for validation of the data using the reference technology q-PCR [270]. The absence of adequate quality standard probably explains these discrepancies between different pangenomic commercial tools. Moreover, the cost of the technology and difficulties to manage a large amount of data probably explain the second problem which is the absence of clinical validation of the genes set emerging from retrospective study by the indispensable prospective clinical studies. Microarray studies has been focused on large number of genes on low number of patient, providing the emergence of set of gene with powerful clinical impact to classify disease predicted prognosis and therapeutical response. However, in absence of prospective validation on hundreds of patients the clinical signification of these genes is not validated.

The priority is now to confirm these retrospective data using a specific transcriptomic assay including the classifying genes. To confirm transcriptomic classifiers on large cohort of patients, we need a low density transcriptomic assay which should be fast, reliable, cost competitive and sensitive, reaching also all the requirement for future diagnostic application at the bedside in every day medicine. Thus, we have chosen OLISA™ (OLigo Sorbent Array), a simple versatile oligonucleotides microarrays developed by Apibio, based on a robust colorimetric method, using a single temperature

and able to monitor simultaneously the expression of up to 15 different genes per well of a standard lab 96-well microtiter plate. The 96-well OLISA™ format is easy to fit major standard laboratory equipments and can be automated to reach high throughput requirements for a multiplex assay of up to 1440 different genes.

To comfort the use of OLISA we compared the level of expression of 6 genes, validated as classifier for the antiangiogenic activity of many batch of Neovastat, with the level obtained from two other technologies; HDM and q-PCR. The expression quantification using beta-actin normalization showed significant correlation between the 3 technologies. As a matter of comparison, the same approach was done on 3 commercial microarrays platforms, demonstrating a good intra-platform reproducibility (correlation coefficient > 0.9), but large inter-platforms divergences (correlation coefficient ~ 0.5). This may be explained by difficulties encountered with pangenomic microarrays, such as the use of short oligonucleotides, ill-considered choice of sequences and erroneous genes identification, for example. Interestingly, the inter-platform reproducibility is great in our study, close to that observed in intra-platform in the previous publication. In our case, a small number of genes is managed, avoiding the difficulties encountered with pangenomic microarrays and allowing a better quality control. This level of quality will be indispensable to fulfil the criteria for prospective clinical validation on large cohort of patients.

To our knowledge, it is the first time that a low density microarray assay platform was compared to other transcriptomic platforms, including the reference technique q-PCR. Q-PCR has been used to confirm the expression results but is not compatible with the analysis of large cohort of patients.

Because it requires a lot of optimisation, it is a time consuming and expensive technique. However, it remains the reference in transcriptomic studies. OLISA is a deal between microarray and q-PCR, as demonstrated here by the positive and significant correlations between the 3 technologies. The use of colorimetric detection provide a low cost alternative to fluorescent detection and a sensitive assay which has been validated to be as sensitive as radioactive detection. The 96 wells analysis with automated quantification allows getting results in 2 hours. Automation and quality control using high quality long oligonucleotides provide a near “diagnosis” quality.

To conclude, we validate here a low density expression platform which could be a solution for the next prospective transcriptomic studies indispensable to validate the large number but not validated data coming from retrospective clinical and biological studies.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Aeterna-Zentaris Laboratories

CONCLUSION DE LA 1^{ère} PARTIE

Le glioblastome représente le grade le plus élevé des tumeurs cérébrales. Sa croissance est favorisée par une forte néovascularisation, de même que par l'activation du récepteur à l'épidermal growth factor (EGFR).

Dans cette première partie, nous avons montré qu'un traitement à l'extrait de cartilage de requin, par voie orale, réduisait la néovascularisation des tumeurs implantées en intracérébral ou en sous-cutané chez la souris. Cette inhibition de l'angiogenèse fut accompagnée d'une augmentation du volume tumoral causé par de l'œdème. L'histologie des tumeurs traitées a toutefois montré une importante réduction de la densité cellulaire. Dans les modèles intracérébraux, les doses ont dû être réduites afin de minimiser l'œdème et augmenter la survie. L'étude du transcriptôme de cellules endothéliales traitées à l'extrait de cartilage a permis de mieux comprendre les mécanismes d'actions et d'améliorer le bénéfice sur la survie. L'analyse des résultats de microarray a été facilitée par le logiciel Pathway Assist, qui permet d'extraire des relations, entre les différents gènes d'intérêts, à partir de milliers d'articles trouvés dans la littérature. Il a été suggéré que la surexpression des cytokines par l'extrait de cartilage, entraîne la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (DRO), capables d'activer le NF- κ B, qui seraient le régulateur de la majorité des gènes surexprimés dans notre étude. Cette hypothèse a été renforcée par la démonstration que l'extrait de cartilage activait bien le NF- κ B. La sécrétion de cytokines dans le milieu des cellules endothéliales a également été confirmée par ELISA et le TNF fut

capable de reproduire un profil d'expression très similaire à celui de l'extrait de cartilage. Enfin, l'ajout d'un antioxydant a prévenu l'induction de la moitié des gènes normalement induits par l'extrait de cartilage. Parmi les interactions possibles, il a été proposé que les chémokines CSF2 et IL-8 puisse attirer les leucocytes et que les molécules ICAM-1 et E-Sélectine favorise leur adhésion à l'endothélium vasculaire en croissance, entraînant ainsi une réaction inflammatoire qui inhiberait l'angiogenèse. Cette hypothèse a été renforcée l'histologie des tumeurs traitées qui a montré un épaississement de la paroi des vaisseaux ainsi que la présence de cellules accolées à l'endothélium. Ces cellules n'ont malheureusement pas été identifiées par le marquage d'un antigène spécifique aux cellules immunitaire. Cependant des données transcriptômiques préliminaires avaient montrées une surexpression de nombreux gènes typiques des cellules immunitaires dans les tumeurs traitées. Nos efforts se sont plutôt concentrés sur une deuxième hypothèse qui suggérait que la présence de halo autour des vaisseaux des tumeurs traitées puisse résulter d'une protéolyse des protéines matricielles autour des vaisseaux. Cette hypothèse expliquerait bien la formation d'œdème dans les tumeurs. Il a été proposé que la surexpression du plasminogène (PLG) et de son activateur tissulaire (t-PA), observée dans les cellules endothéliale traitées à l'extrait de cartilage, génère une quantité importante de plasmine qui protéolyserait la fibrine, la laminine et la fibronectine, ce qui entrainerait le détachement des cellules endothéliales et par conséquent une inhibition de l'angiogenèse. La présence des protéines du PLG, du t-PA, de la plasmine et de son fragment, l'angiostatine, a été confirmée par immunomarquage des coupes de tumeurs ainsi que par

immunoblot. Une étude fonctionnelle du système fibrinolytique a permis de conclure que l'activation du PLG par le t-PA était essentielle à l'activité antiangiogénique de l'extrait de cartilage et qu'une protéolyse excessive était responsable de la formation de l'œdème tumoral, qui limitait le dosage et le bénéfice sur la survie dans les modèles intracérébraux. Il a été montré que l'acide ϵ -aminocaproïque, un inhibiteur capable de se lier aux résidus lysine contenu dans les kringles du plasminogène et de la plasmine, réduisait la formation d'œdème tumoral, mais qu'il y avait en revanche une réduction de la survie. Le N-Acétylcystéine, capable de réduire une partie de la plasmine en angiotatine, a quant à lui permis de prévenir complètement la formation d'œdème tumoral et a augmenté de façon importante la survie des souris traitées à l'extrait de cartilage. Un test colorimétrique in vitro a également montré que l'extrait de cartilage ne faisait pas qu'induire l'expression du PLG et du t-PA dans les cellules endothéliales, mais qu'il catalysait également l'activité de la protéine du t-PA et que cette catalysation pouvait être bloquée par l'ajout de l'inhibiteur PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1). Une zymographie a ensuite montrée une plus grande activité du t-PA dans les lysats de tumeurs de souris traitées à l'extrait de cartilage, mais pas dans les tumeurs transfectées avec le gène de PAI-1. L'histologie de ces tumeurs a montré une réduction du nombre de vaisseaux uniquement dans les tumeurs non-transfectées avec le gène de PAI-1.

En somme, l'étude suggère que la génération de DRO par les cytokines, médie l'activation du NF- κ B et l'expression subséquente du PLG et du t-PA. Il a été constaté que l'utilisation de corticoïdes entraînait une perte

d'efficacité de l'extrait de cartilage. L'induction du PLG et du t-PA semble être essentielle, mais nécessiter un certain contrôle. Et enfin, le co-traitement au N-Aetylcystéine a permis de réduire l'oedème et d'augmenter le bénéfice de l'extrait de cartilage sur la survie in vivo. Les résultats encouragent leur essai dans la thérapie du glioblastôme en clinique.

Nous avons également voulu montrer comment les marqueurs moléculaires identifiés par la technologie de microarray à haut débit, pouvait être utile au contrôle de la qualité dans la production de l'extrait de cartilage, à condition qu'une technologie à haut débit, tel que l'OLISA, puisse prendre la relève, une fois les marqueurs validés.

2^E PARTIE :

EFFET ANTITUMORAL DU TLN-4601

CONTEXTE

La deuxième thérapie étudiée dans le cadre de cette thèse est elle aussi issue de source naturelle. Le TLN-4601 est un dibenzodiazépinone farnésylé produit par des actinomycètes. L'étude préclinique de son efficacité à différentes doses administrées par différentes voies, dans le modèle de glioblastome chez la souris, prescrit le maintien d'une faible concentration avoisinant son IC50 plutôt que l'obtention d'un Cmax élevé qui serait éliminé rapidement. Par la suite, nous avons étudié les mécanismes d'action du TLN-4601. L'intérêt de ce composé vient du fait qu'il représente une nouvelle classe de molécules chimiques bivalentes qui pourrait potentiellement avoir de multiples cibles. Le TSPO (translocator protein) anciennement nommé récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) et la sous-unité de l'ATP synthase appelée OSCP (oligomycin sensitivity conferring protein) sont, par exemple, deux cibles connues des benzodiazépines. En addition, certaines molécules farnésylées peuvent interagir avec la voie de signalisation Ras-MAPK, dans laquelle la farnésylation des messagers Ras et Raf joue un rôle important dans leur co-localisation à la membrane cytoplasmique, où s'amorce la cascade de phosphorylation par les récepteur à tyrosine kinases tel que l'EGFR. L'analyse transcriptomique des tumeurs semble bien témoigner de la liaison du TLN-4601 au TSPO, étant donné son rôle bien connu dans le transport du cholestérol et la stéroïdogénèse. D'autre part, l'analyse rapporte également l'expression différentielle de plusieurs gènes Rgs, régulant l'activité des GTPases, ainsi que l'expression différentielle des gènes Mapk3 (ERK1), Rhob, Pi3k et Gsk3b, suggérant un

effet du TLN-4601 sur les voies antiapoptotiques du Ras-GTP. Dans l'ensemble, un effet remarquable du TLN-4601 fut l'expression différentielle de plusieurs gènes de l'ATP synthase et de tout un réseau de gènes impliqué dans le catabolisme des graisses, la beta-oxydation des acides gras ainsi que la voie du glycérol et celle des pentoses phosphate, pouvant renforcer la glycolyse. Selon la théorie de Warburg, les cellules tumorales adopteraient ce phénotype lorsque la respiration cellulaire serait compromise.

En plus de l'effet direct de certains benzodiazépines et des stéroïdes sur l'OSCP de l'ATP synthase, les ligands du TSPO ainsi que les effecteurs de Ras; Raf et Akt, sont connus pour régler l'ouverture du pore de perméabilité mitochondriale transitoire (MPTP), pouvant dissiper le potentiel transmembranaire requis pour la synthèse d'ATP lors de la respiration cellulaire. L'ouverture de ce pore peut ultimement entraîner la relâche du cytochrome c et l'initiation de l'apoptose avec l'aide de gènes pro-apoptotiques tel que Granzyme B (Gzmb), Apoptosis activating factor-1 (Apaf-1) et Glycogène synthase 3 beta (Gsk3b).

INTRODUCTION

Récepteurs des benzodiazépines

Le premier récepteur des benzodiazépines découvert fut le CBR. Son expression est restreinte au système nerveux central et il médie l'effet anxiolytique et anticonvulsant des benzodiazépines [276, 277]. À la fin des années 70, un site de liaison alternatif pour le benzodiazépine diazépam (valium[®]), a été identifié et nommé PBR, en raison de sa distribution dans les tissus périphériques [278]. Plus tard, il fut renommé Translocator Protein (TSPO), afin de mieux représenter sa fonction au sein du pore mitochondrial [279].

TSPO

Le TSPO est une protéine de 18 kDa et un constituant primordial d'un complexe de 140-240 kDa appelé le pore de perméabilité mitochondriale transitoire (MPTP) (revu par [280-283]). Le pore est également constitué d'une protéine de 32 kDa, appelée canal anionique voltage-dépendant (VDAC), et d'une protéine de 30 kDa, appelée adénine nucléotide translocase (ANT), aussi nommée transporteur ADP-ATP [284]. D'autres protéines, tel que la Bcl-2, l'hexokinase, la glycérol kinase et la cyclophiline D, semblent également être associées au MPTP (revu par [285]). Ce complexe multiprotéique est situé au site de contact entre les membranes externes et internes de la mitochondrie et est impliqué dans l'initiation de l'apoptose. Bien qu'il soit présent dans la plus part des tissus, le TSPO est hautement exprimé dans les tissus glandulaires et stéroïdogéniques, comme les glandes

adrénales et les gonades [286-288]. Le TSPO est impliqué dans la stéroïdogénèse, la biosynthèse du hème, la réponse immunitaire et celle au stress, la croissance et la différenciation cellulaire, ainsi que le contrôle de la respiration mitochondriale [281, 282, 287, 289]. La surexpression du TSPO est documenté dans plusieurs types de tumeurs comparé aux tissus normaux [290]. Le PK11195 [1-(2-chlorophenyl)-*N*-methyl-*N*-(1-methylpropyl)-3-isoquinoline carboxamide (figure 23B), est actuellement le plus utilisé des ligands du TSPO, en partie dû à sa grande affinité pour ce récepteur ($K_D < 20$ nM) dans l'ensemble des espèces [291]. En se basant sur la nature entropique et enthalpique de l'interaction ligand-récepteur, le PK11195 a été classifié comme antagoniste, alors que le benzodiazépine Ro5-4864, a été qualifié d'agoniste. Cependant, cette classification n'est pas clairement établie, étant donné que les deux ligands peuvent induire des effets semblables dans certaines conditions physiologiques.

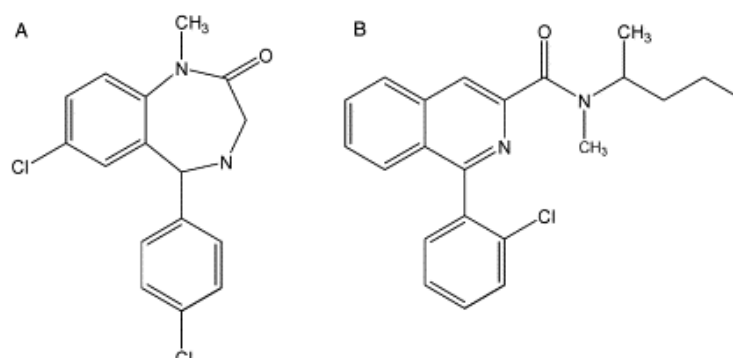


Figure 23 : Structures chimiques de deux ligands archétypiques du TSPO:

(A) le benzodiazépine, Ro5-4864; et (B) l'isoquinoline carboxamide, PK11195.

La liaison du PK11195, est augmentée dans de nombreux types de tumeurs solides incluant celles du colon [292, 293], du sein [294-297], de la

prostate [290], des ovaires [298], du foie [299, 300] et du cerveau [293, 301, 302]. Par ailleurs, les ligands du TSPO ont été utilisés comme outil d'imagerie pour le diagnostic des tumeurs cérébrales [303, 304] et ont montré un effet antiprolifératif et proapoptotique sur la lignée de cellules C6 dérivée de glioblastome de rat [305].

TLN-4601 (anciennement ECO-4601)

Le TLN-4601 (4, 6, 8-trihydroxy-10-(3, 7, 11-trimethyldodeca-2, 6, 10-trienyl)-5, 10-dihydrodi-benzo [b, e] [1, 4] diazépine-11-one) représente une nouvelle classe de molécules constitué d'un noyau benzodiazépine prolongé par une chaîne farnésyl.

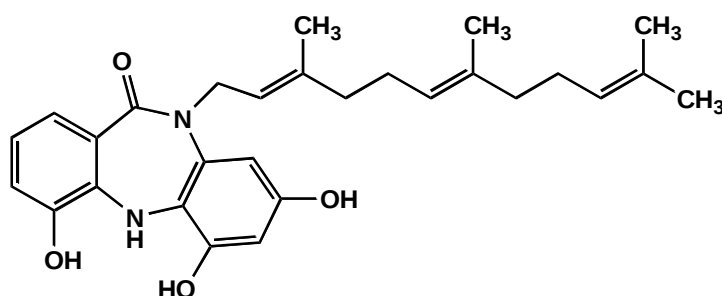


Figure 24 : Structure chimique du TLN-4601

Le composé de 462.58 g/mol a été découvert en utilisant la technologie Decipher de Thallion Pharmaceutic, qui permet l'analyse du génome d'actinomycète encodant la synthèse de molécules bioactives [306, 307]. Le composé a été isolé et caractérisé par les laboratoires Wyeth [308]. Une évaluation initiale in vitro, effectuée par le National Cancer Institute (NCI) américain, a montré que le TLN-4601 avait un large spectre d'activités

cytotoxiques, capables d'inhiber la croissance de lignées de tumeurs solides et hématologiques, à des concentrations de l'ordre du micromolaire [309].

Type de tumeur	Origine	Lignée	IC ₅₀ à 96h (μM)
Oligodendrogliome	Humain	GHA	1.6 ± 0.7 (n=10)
		DN	3.0 ± 0.7 (n=4)
Astrocytome	Humain	U373	3.8 ± 1.4 (n=4)
		HGD	6.5 ± 2.9 (n=8)
Glioblastome	Souris	GL26	8.9 ± 1.1 (n=4)
	Humain	U87MG	10.9 ± 0.5 (n=3)
		SNB-19	5.3 ± 1.3 (n=3)
	Rat	C6	4.3 ± 2.3 (n=5)
Gliosarcome	Rat	9L	8.3 ± 3.8 (n=4)

Tableau 21 : Cytotoxicité du TLN-4601 dans les lignées cérébrales.

De par la structure du composé, trois cibles potentielles ont été proposées : 1) les récepteurs des benzodiazépines, 2) les messagers farnésylés tel que Ras, Raf et RhoB et 3) la sous unités OSCP de l'ATP synthase.

En premier lieu, une étude in vitro a révélé que le TLN-4601 ne se liait pas au CBR, mais qu'en revanche, il se liait au TSPO avec une affinité d'environ 0.3 μM [309].

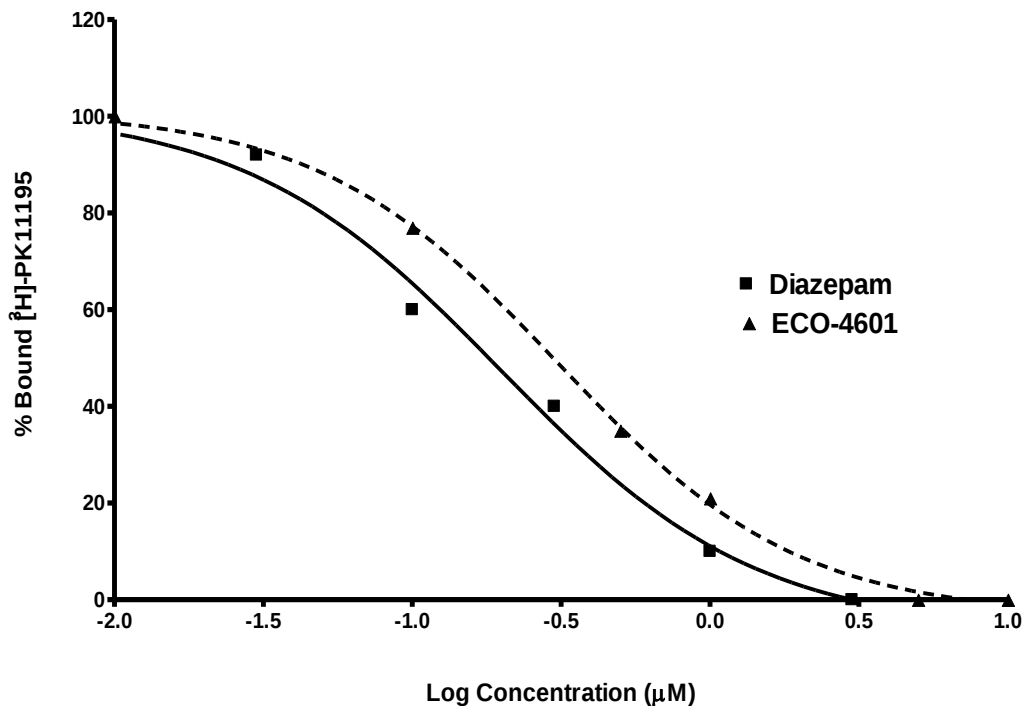


Figure 25 : Liaison compétitive du PK-11195, du diazépam et du ECO-4601 sur le TSPO.

Voie de signalisation de Ras

En addition à son noyau benzodiazépine, le TLN-4601 est prolongé par une chaîne farnésyl. Certaines molécules farnésylées ont pour effet d'inhiber la voie de signalisation de Ras [310]. La farnésylation des messagers Ras et Raf joue un rôle important dans leur co-localisation à la membrane cytoplasmique, où s'amorce la cascade de phosphorylation par les récepteurs à tyrosine kinases. L'EGF par exemple, induit la dimérisation de son récepteur ainsi que l'autophosphorylation des résidus tyrosines. Ces phosphotyrosines servent alors de site d'ancrage pour les molécules de signalisations incluant le complexe Grb2–SOS, qui active la protéine Ras en stimulant l'échange d'un guanosine diphosphate (GDP) pour un guanosine triphosphate (GTP). Cet échange engendre un changement conformationnel

de Ras, lui permettant de se lier à ses effecteurs tel que Raf et PI3K ou des protéines adaptatrices. L'activité de Ras est régulée par des protéines accélératrices ou inhibitrices des GTPases, tel que les RGS (regulators of G-protein signaling) [311, 312]. L'activation de Ras a pour effet d'inhiber l'apoptose et serait responsable de la résistance des tumeurs à la radiothérapie et à la chimiothérapie, grâce à l'activation des voies PI3K-Akt et Raf-MAPK [313]. Puisque Ras se trouve constitutivement activé dans 30% des cancers humains et que la farnésylation de Ras est requise pour induire la transformation maligne des tumeurs [314, 315], des inhibiteurs de farnésyl transférase (FTIs) ont été conçus pour devenir de nouvelles drogues anticancéreuses [316-318].

Dans le cas du TLN-4601, l'inhibition de la voie de Ras ne se produirait pas en inhibant la farnésylation de Ras, mais plutôt en inhibant son activation sous la forme Ras-GTP [319]. Il s'ensuit une inhibition de la phosphorylation de Raf et ERK1 [320, 321], ainsi qu'une inhibition d' Akt [322]. Il serait donc possible que le groupement farnésyl du TLN-4601 ait une affinité pour les protéines Ras et Raf farnésylées ou les sites d'affinité de leur chaperonnes, qui interférerait dans l'activation de Ras-GTP ou la phosphorylation de Raf.

L'étude in vivo qui suit a permis de démontrer l'efficacité du TLN-4601 dans des modèles de glioblastome chez la souris et d'optimiser le régime thérapeutique afin d'orienter les études cliniques. Le transcriptôme des tumeurs extraites sera ensuite analysé afin d'étudier les mécanismes d'actions possibles.

MATÉRIEL & MÉTHODES

Produits Le TLN-4601 (4,6,8-trihydroxy-10-(3,7,11-trimethyldodeca-2,6,10-trienyl)-5,10-dihydrodi-benzo [b,e][1,4]diazepin-11-one; Mm = 462.25 g/mol) a été découvert par Thallion Pharma (Saint-Laurent, QC, Canada) grâce à l'analyse de plus de 500 gènes chez l'actinomycète en utilisant leur plateforme technologique Decipher® [323]. Sa structure moléculaire est illustrée à la figure 24. Des formulations de 8, 16, 24 et 80 mg/mL à base de 20% v/v éthanol, 20% w/v PEG400 et 60% w/v PS80, ont été fournies par Thallion et conservées à -20 °C. Tous les autres réactifs étaient de grade analytique et de source commerciale.

Lignées cellulaires La lignée C6 a été dérivée d'un glioblastome de rat induit par le N-nitrosométhylurée [324]. La lignée U87MG a été dérivée à partir du glioblastome d'une femme caucasienne de 44 ans. Les deux lignées ont été achetées à l'American Type Culture Collection (Manassas, VA).

In vivo. Les études d'efficacité antitumorale *in vivo* ont été réalisées sur des souris suisses athymiques nues (*nu/nu*) femelles âgées de 6-7 semaines (Charles River, Arbresle, France) dans les laboratoires de l'INSERM U836 (Grenoble Institut des Neurosciences, France) en accord avec les recommandations du Comité d'Éthiques Français.

À chaque jour, une aliquote concentrée était décongelée et diluée au 1/4 dans du dextrose 5% afin d'obtenir la concentration nécessaire de TLN-4601 dans un véhicule composé de 5% v/v éthanol, 5% w/v PEG400, 15% w/v PS80 et 4% w/v dextrose.

Traitements Pour l'étude avec la lignée de rat, 40 souris ont été implantées en sous-cutané (SC) avec 5×10^5 cellules C6 au jour 0 (J0). Au jour 6, lorsque les tumeurs devinrent palpables, les souris ont été distribuées au hasard dans 4 différents groupes à raison de 10 souris par groupe. Les souris du Groupe 1 ont été traitées quotidiennement avec le véhicule en IP du jour 6 à 16 (q1d x 11). Le Groupe 2 a reçu une dose de TLN-4601 de 20 mg/kg en IP du jour 6 à 13, puis une dose de 10 mg/kg du jour 14 à 16. Le Groupe 3 a reçu le TLN-4601 en SC à une dose quotidienne de 30 mg/kg du jour 6 à 13, puis à une dose de 15 mg/kg du jour 14 à 16. Les injections SC étaient faites à des sites variés mais toujours distants de la tumeur. Le Groupe 4 a été traité au TLN-4601 à une dose quotidienne de 100 mg/kg administrée en bolus intraveineux, à l'exception des jours 11 et 12 où un répit était accordé. Les souris ont été euthanasiées au jour 19, lorsque les tumeurs du groupe contrôle ont atteint la taille limite prédéterminée d'environ 2000 mm³.

Pour l'étude avec la lignée humaine, 30 souris ont été implantées en sous-cutané (SC) avec 5×10^6 U87MG au jour 0 (J0). Au jour 16, lorsque les tumeurs devinrent palpables, les souris ont été distribuées au hasard dans 3 différents groupes, à raison de 10 souris par groupe. Le Groupe 1 (contrôle) a reçu quotidiennement du véhicule en SC (q1dx 15). Le Groupe 2 a été traité au TLN-4601 à une dose quotidienne de 30 mg/kg en SC, à l'exception des jours 22-23 et 29-30, où un répit était accordé (~ 3 cycles q1d x 5; les jours 17-21, 24-28 et 31-34). Le Groupe 3 (contrôle positif) a été traité au Témolozomide à une dose de 150 mg/kg en PO les jours 17, 21, 25 et 29 (q4d x4). Les souris ont été euthanasiées au jour 34, lorsque les tumeurs du groupe contrôle ont atteint la taille limite prédéterminée d'environ 3500 mm³.

Étude Transcriptomique

Pour l'étude transcriptomique, 20 souris ont été implantées en sous-cutanée (SC) avec 5×10^6 cellules C6 au jour 0 (J0). Au jour 6, lorsque les tumeurs devinrent palpables, les souris ont été distribuées au hasard dans 2 différents groupes à raison de 10 souris par groupe. À partir de ce moment, les souris de chaque groupe ont reçu un volume d'injection de 5 mL/kg en IP. Le Groupe 1 (contrôle) a reçu le véhicule (5% v/v éthanol, 5% w/v PEG400, 15% w/v PS80 et 4% dextrose) et le Groupe 2 a reçu le TLN-4601 (2 mg/mL) à une dose de 10 mg/kg IP, une fois par jour, pour une durée de 2 semaines. Les souris ont été euthanasiées à la fin de l'étude (J19). Les tumeurs ont été enlevées, puis congelées extemporanément à l'aide de vapeur d'azote liquide, pour ensuite être conservées à -80 C.

Quatre tumeurs représentatives de chaque groupes (4x2) ont été sélectionnées et l'ARN total a été extrait à partir d'une vingtaine de coupes au cryostat de 60 μ m en utilisant la trousse RNeasy[®] total RNA isolation system de Promega (Madison, WI). Le marquage des ADNc, à l'aide d'amorces dT25, d' α [³³P]dCTP et de 2.5 μ g d'ARN, ainsi que leur purification, ont été réalisés selon une méthode développée dans le laboratoire et publiée précédemment [325, 326]. Des séquences de 55 oligonucléotides représentatives de 2000 gènes ont été commandées de la bibliothèque RAT96-2 de chez Sigma-Aldrich. De plus, des sondes, correspondant à un standard interne (des séquences d'oligonucléotides complémentaires à l'ARN d'un gène d'*Arabidopsis thaliana*), ont été intégrées pour permettre une normalisation [326]. Le dépôt des oligonucléotides sur membrane de nylon et la quantification des sondes ont été réalisés en utilisant un AffymetrixR417

Microarrayer (MWG, Ebersberg, Germany). Chaque oligonucléotide a été déposé en duplicata et les membranes ont été exposées sur des plaques Fuji phosphor image plate (Raytest, France). La détection et la quantification des sondes hybridées ont été faites avec un Phosphor Imager BAS 5000 et le logiciel Image Gauge (Raytest, France).

RESULTATS

Étude d'efficacité antitumorale

L'efficacité antitumorale du TLN-4601 a d'abord été évaluée dans le modèle de xénogreffe du glioblastome C6 chez la souris. Le TLN-4601 a été administré à différentes doses via trois différentes routes: intrapéritonéale (IP), sous-cutanée (SC) et intraveineuse (IV).

Une perte de poids maximale de 15% a été observée au jour 13 pour le groupe IP recevant 20 mg/kg (q1d x 8) suivi de 10 mg/kg (q1d x 7) et une perte de 11% pour le groupe SC recevant 30 mg/kg (q1d x 8) suivi de 15 mg/kg (q1d x 7). Le groupe IV n'a toutefois pas subi de perte de poids de poids significative. L'effet des différentes routes d'administration sur la croissance tumorale a été analysé au jour 18, en raison de la taille limite atteinte par les tumeurs du groupe contrôle. Les résultats de la figure 26 indiquent que l'administration d'une dose quotidienne de TLN-4601, par les voies IP ou SC, a inhibé la croissance tumorale de 66% et 60% respectivement ($P < 0.0001$). L'administration IV de 2 cycles à 100 mg/kg (q1d x 5) n'a toutefois pas eu d'effet significatif sur le volume tumoral comparé au groupe contrôle.

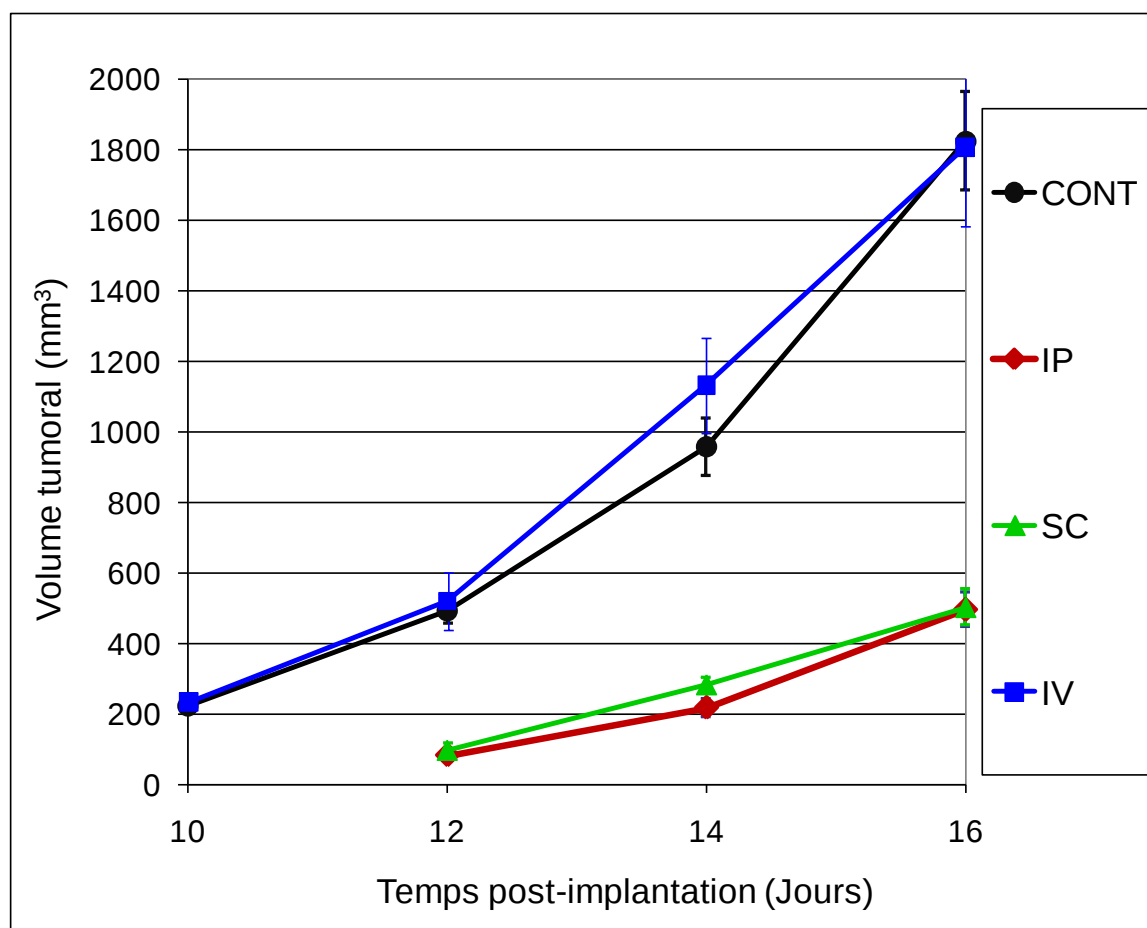


Figure 26 : Effet de la voie d'administration sur l'efficacité antitumorale du TNL-4601 dans le modèle de glioblastome C6 chez la souris. Le groupe CONT (cercle) a reçu du véhicule par la voie i.p. Le nom des autres groupes représente la voie d'administration du TLN-4601.

L'efficacité in vivo du TLN-4601 a par la suite été évaluée dans un second modèle de glioblastome, soit la xénogreffe de la lignée U87MG chez la souris athymique nue. L'administration sous-cutanée de 3 cycles de TLN-4601, à raison de 30 mg/kg (q1d x 5), a bien été tolérée et aucune perte de poids significative n'a été observée durant cette étude. Les résultats de la figure 27 indiquent, qu'au jour 34, le traitement au TLN-4601 a inhibé 36% du volume tumoral par rapport au groupe contrôle ($P = 0.05$).

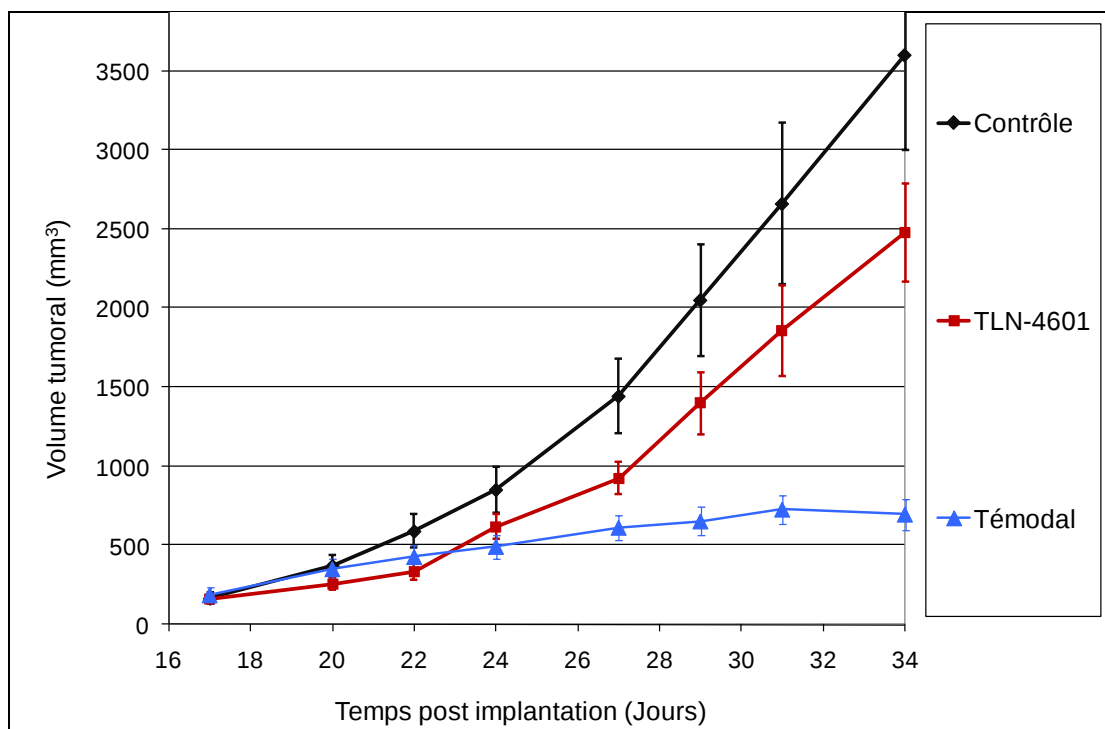


Figure 27 : Effet antitumoral du TLN-4601 dans le modèle de glioblastome U87MG chez la souris. Le témodal a été utilisé comme contrôle positif.

Étude transcriptomiques par microarray

L'analyse transcriptomique de xénogreffes de tumeur C6 par microarray, a montré que le TLN-4601 modulait significativement l'expression de 85 gènes (Tableau 22). Ceux-ci ont été regroupés selon leur fonction dans la synthèse des stéroïdes, la synthèse d'ATP ou le transport d'ions, la signalisation, le métabolisme, l'apoptose, la modification de l'ADN et la transcription.

Gène / Fonction	Symbole	Ratio
SYNTHÈSE DE STÉROÏDES		
Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 5	Hsd3b5	2,0
Hydroxy-delta-5-steroid dehydrogenase, 3 beta- and steroid delta-isomerase 6	Hsd3b6	1,7
Hydroxysteroid dehydrogenase, 11 beta type 2	Hsd11b2	1,9
Gènes inductibles par des stéroïdes		
GABA(A) receptor gamma-1 subunit	Gabrg1	3,0
GABA(A) receptor, alpha 3	Gabra3	2,7
Clone E512, estrogen induced gene [259 nt]	E512	3,2
Clone E5103, estrogen induced gene [148 nt]	E5103	3,6
SYNTHÈSE D'ATP / TRANSPORT D'IONS		
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit c	Atp5g1	2,5
Delta subunit of F1F0 ATPase gene	Atp5d	2,1
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	Atp5b	3,2
ATPase, Na+K+ transporting, alpha 1 polypeptide	Atp1a1	3,2
ATPase, Na+K+ transporting, alpha 3 subunit	Atp1a3	3,5
SIGNALISATION		
Récepteur à facteur de croissance		
Epidermal growth factor receptor	Egfr	0,5
GDNF-family receptor alpha 3	Gfra3	0,4
FGF receptor 1	Fgfr1	2,4
Insulin-like growth factor I	Igf1	2,0
Growth hormone receptor	Ghr	2,9
Régulateur des protéines G		
Regulator of G-protein signaling 12	Rgs12	0,4
Regulator of G-protein signaling similarity (Rgs11)	Rgs11	0,4
Regulator of G-protein signaling 9	Rgs9	0,5
Regulator of G-protein signaling 7	Rgs7	0,5
Regulator of G-protein signalling 14	Rgs14	0,5
Orphan G protein-coupled receptor GPR26	Gpr26	0,5
G protein-coupled receptor LGR4	Gpr48	0,5
70 kd heat-shock-like protein (Hsc70)	Hspa8	3,0
Kinases		
Mitogen-activated protein kinase 3 (ERK1)	Mapk3	0,5
Ras homolog gene family, member B	Rhob	0,5
Ras homolog gene family, member A	RhoA	0,3
Phosphoinositide 3-kinase p85 alpha	Pik3r1	0,5
Glycogen synthase kinase beta (tau protein kinase I)	Gsk3b	2,0
Inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase B	Itpkb	2,2
Phosphatidylinositol 4-kinase	Pik4cb	2,2
Mitogen activated protein kinase 13 (p38delta)	Mapk13	2,0
Serine/threonine kinase 2 (Stk2)	Slk	0,2
MAP kinase kinase (MKK2)	Map2k2	2,5
Protein kinase WNK1	Prkwnk1	0,3
Phosphatidylinositol 3-kinase p85 beta	Pik3r2	3,0
Phosphatases		
Phosphoinositide phosphatase	Sacm1l	2,0
Protein tyrosine phosphatase	Ptp4a2	2,1
Autres		
Calmodulin III	Calm3	2,7
Adenylyl cyclase 6	Adcy6	3,5
V-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	Lyn	2,0
WNT1 inducible signaling pathway protein 1	Wisp1	2,2
Insulin-like growth factor-binding protein 5	Igfbp5	2,2

Tableau 22 : Gènes différentiellement exprimés par le TLN-4601 dans les tumeurs C6.

Gène / Fonction	Symbole	Ratio
MÉTABOLISME		
Catabolisme des graisses		
Lipoprotein lipase	Lpl	2,8
Cytosolic phospholipase A2 isoform clone HISCPLA [320 nt]	Pla2	3,7
Beta-oxidation des acides gras		
Peroxisome proliferator activator receptor, delta	Ppard	3,6
3-keto acyl-CoA thiolase B (peroxisomal Acaa)	Acaa1	5,4
3-oxo acyl-CoA thiolase A (peroxisomal Acaa)	Rgd1562373	2,7
2,4-dienoyl-CoA reductase precursor	Decr1	9,2
Métabolisme du glycérol		
Glycerol kinase	Gk	5,5
Glycerophosphodiester phosphodiesterase 1	Gde1	2,3
Glycerolphosphate dehydrogenase	Gpd	2,0
Glycerol-3-phosphate dehydrogenase 2	Gpd2	3,0
Métabolisme du glycogène		
Glycogen synthase kinase beta (tau protein kinase I)	Gsk3b	2,0
Glycogen synthase 2	Gys2	4,3
Phosphorylase kinase beta	Phkb	2,5
Voie des pentoses phosphate		
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6pd	2,9
Transketolase	Tkt	4,1
Synthèse d'acides nucléiques		
Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	Prps1	2,4
Prps-associated protein (39 kDa)	Prpsap1	3,7
Glycolyse		
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	Pfkfb3	3,2
6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2	Pfkfb2	2,8
Liver aldolase B (fructose-bisphosphatase)	Aldob	2,6
Neuron-specific enolase	Nse	2,0
Aldehyde dehydrogenase	Aldh1a2	2,1
Pyruvate dehydrogenase kinase isoenzyme 4	Pdk4	2,5
Récepteurs prométaboliques		
Insulin-like growth factor I	Igf1	2,0
Thyroid stimulating hormone receptor	Tshr	2,4
APOPTOSE		
Granzyme B	Gzmb	2,4
Apoptosis activating factor	Apaf1	2,0
Glycogen synthase kinase beta (tau protein kinase I)	Gsk3b	2,0
Mitogen-activated protein kinase 3 (ERK1)	Mapk3	0,5
Ras homolog gene family, member B	Rhob	0,5
Ras homolog gene family, member A	RhoA	0,3
NLR family, apoptosis inhibitory protein 2 (Birc1)	Naip2	4,1

Tableau 22 : (suite)

Gène / Fonction	Symbole	Ratio
MODIFICATION DE L'ADN		
Histone H1-0	H1f0	3,8
DNA topoisomerase IIA	Top2a	4,0
DNA topoisomerase IIB	Top2b	3,6
DNA cytosine 5 methyltransferase	Dnmt1	3,7
DNA ligase I	Lig1	4,0
Deoxyribonuclease I	Dnase1	2,9
Cellular nucleic acid binding protein	Cnbp1	2,1
TRANSCRIPTION		
RNA polymerase I 194 kDa subunit (RPA1)	Rpo1-4	3,1
C2-HC type zinc finger protein r-MyT13	St18	2,4
RNA polymerase II-like protein	Polr2g	2,3
Zinc finger protein 637	Zfp637	4,1
Zinc finger protein 5 (DZF5)	Znf569	2,1
Transcription factor 1 (HNF1)	Tcf1	2,8
pEachy	pEachy	3,2
Nuclear factor I/C	Nfic	2,9

Tableau 22 : (suite)

DISCUSSION

Efficacité in vivo

Étant donné le bon profil de cytotoxicité du TLN-4601 in vitro, nous étions intéressés de voir si ce composé pouvait démontrer des propriétés antitumorales in vivo. Nous avons pu démontrer que le TLN-4601 avait une activité antitumorale modérée vis-à-vis de la lignée humaine U87MG (36% d'inhibition) et une activité antitumorale plus significative envers la lignée de rat C6 (60-66% d'inhibition). Ces résultats in vivo corrélaient bien avec les IC50 déterminés *in vitro* qui indiquaient une plus grande sensibilité pour la lignée C6 [309].

Cette étude a également indiqué que l'activité du TLN-4601 était grandement affectée par la route d'administration en raison de sa pharmacocinétique particulière. En effet, bien que l'administration IV soit la mieux tolérée et qu'elle résulte en une absorption de 100% avec un Cmax et

un AUC élevé, l'administration de 100 mg/kg/jour en bolus IV n'a pas donné d'effet antitumoral. À l'opposé, l'administration SC et IP n'ont pas été aussi bien tolérée en raison de toxicité locale, occasionnant des occlusions intestinales par la voie IP ou de l'inflammation et un épaissement de la peau par la voie SC. Toutefois, malgré l'utilisation de plus faibles doses, les traitements par ces voies se sont néanmoins avérés plus efficaces. L'étude de la pharmacocinétique nous a montré que le TLN-4601 avait une distribution et une élimination très rapide ($t_{1/2} = 5$ min). En effet, la concentration de TLN-4601 peut passer de 425 μM à 1 μM en ~ 1 heure suivant l'injection intraveineuse. Bien que l'absorption plus lente par les voies IP et SC résulte en un C_{max} beaucoup plus petit (7.8 μM après 15 min IP et 2.3 μM après 1h SC), elle permet toutefois d'obtenir une concentration supérieure à 1 μM jusqu'à 8h suivant l'injection par ces voies [309]. L'efficacité antitumorale du TLN-4601 *in vivo* dépendrait donc du maintien d'une concentration plasmatique près de la valeur de l' IC_{50} et non d'une exposition maximale (C_{max}) qui serait suivie d'une élimination rapide.

Selon une étude réalisée dans un modèle orthotopique, la concentration de TLN-4601 mesurée dans la tumeur cérébrale (176 $\mu\text{g/g}$) était plus de 200 fois supérieure à celle mesurée dans le cerveau mais aussi, 7 et 11 fois supérieure à celle mesurée dans le foie et le plasma respectivement [327]. Cette distribution préférentielle du TLN-4601 aurait comme effet d'augmenter son activité dans la tumeur tout en diminuant la toxicité dans les autres tissus. Comme l' IC_{50} varie entre 4.3 et 10.9 μM dans les différentes lignées de glioblastome *in vitro*, nous avons estimé que le

maintien d'une concentration plasmatique autour de 0.4 à 1 μ M, grâce à des pompes portatives, serait idéal pour des essais cliniques.

Transcriptôme des tumeurs traitées

Nous avons ensuite tenté de déterminer les mécanismes d'actions du TLN-4601. Les résultats *in vitro* ont montré que le TLN-4601 se liait spécifiquement au récepteur périphérique des benzodiazépines (TSPO) [309]. D'autres résultats ont démontrés que le TLN-4601 inhibait l'activation de Ras et les voies de signalisation qui en découle [319]. Nous avons également émis l'hypothèse que le TLN-4601 puisse agir sur l'ATP synthase en se liant à sa sous-unité OSCP.

TSPO

Dans un premier temps, l'analyse transcriptomique semble bien témoigner d'un effet du TLN-4601 sur le TSPO *in vivo*. Le récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR), maintenant appelé protéine translocatrice (TSPO), est pharmacologiquement, anatomiquement, structurellement et fonctionnellement distinct du récepteur central des benzodiazépines (CBR ou GABAA) [286]. Il s'agit d'une protéine mitochondriale de 18kDa associée au canal anionique voltage-dépendant (VDAC) et au translocateur du nucléotide adénine (ANT), qui contribuent tous ensemble à la formation du pore mitochondrial de perméabilité transitoire (MPTP), un complexe jouant un rôle clef dans le transport du cholestérol entre les membranes interne et externe de la mitochondrie, qui s'avère l'étape limitante de la synthèse des hormones stéroïdiennes (figure 28).

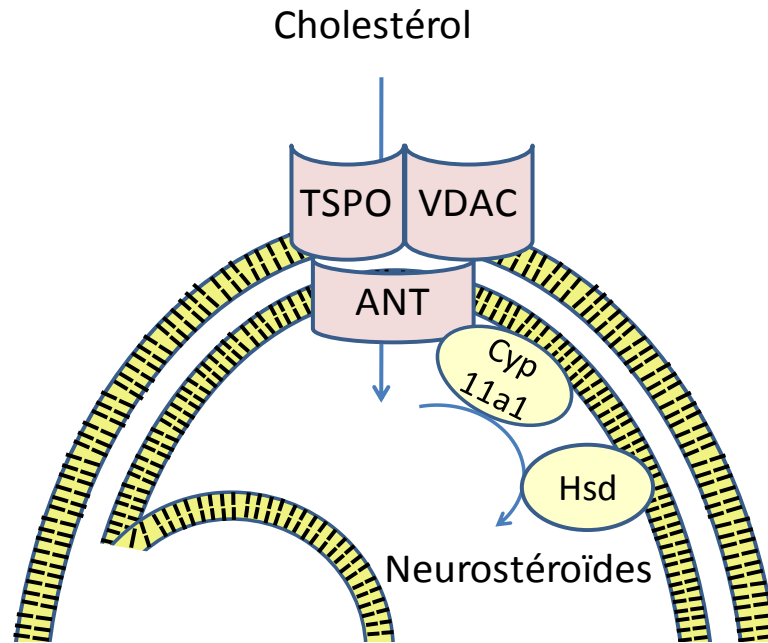


Figure 28 : Rôle du MPTP dans la stéroïdogénèse.

Entrée du cholestérol et stéroïdogénèse

L'analyse transcriptomique a révélé que le TLN-4601 induisait l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la synthèse de stéroïdes (hydroxy-stéroïdes déshydrogénases HSD11B2, HSD3B5 et HSD3B6). La surexpression de plusieurs gènes inductibles par des stéroïdes tel que le GABRG1, le GABRA3 et les clones E512 et E5103, semble témoigner que le TLN-4601 ait favorisé la synthèse de stéroïdes *in vivo*. L'effet d'autres ligands du TSPO sur le transport du cholestérol et la stéroïdogénèse a par ailleurs été largement décrit [328-333]. L'impact que pourrait avoir le transport du cholestérol sur la croissance cellulaire et la mitose a fait l'objet d'une revue [334]. Il a été démontré que l'inhibition du trafic intracellulaire du cholestérol [335] ou l'accumulation de cholestérol libre [336] pouvaient causer des dysfonctions mitochondriales variées et que la déficience en cholestérol pouvait mener à l'arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose [337]. Il

est à préciser que cet apoptose induite par le cholestérol pourrait être médié par la protéine kinase p38 [338]. Or, nous avons observé que le TLN-4601 induisait l'expression de la p38 MAPK (Mapk13), comme le firent d'autres ligands du TSPO dans une étude précédente [339]. Enfin, un impact additionnel de la synthèse accrue de stéroïdes est à considérer, étant donné que les stéroïdes sont capables d'exercer un effet anxiolytique [340, 341], en plus d'induire l'apoptose dans le cancer du sein, du col et de la prostate [342-344].

Voies de signalisation de Ras

Compte tenu que le TLN-4601 est prolongé par un groupement farnésyl, nous avons émis l'hypothèse qu'il puisse aussi interagir avec les messagers Ras et Raf dont la farnésylation joue un rôle important dans leur co-localisation à la membrane cytoplasmique, où s'amorce la cascade de phosphorylation par les récepteurs à tyrosine kinases tel que l'EGFR. Certaines molécules farnésylées, tel que l'acide farnésylthiosalicylique, sont en effet des inhibiteurs de Ras [310]. La figure 29 présente les voies de signalisation des récepteurs à tyrosine kinase, impliquant la protéine Ras. L'expression différentielle de plusieurs médiateurs de cette voie semble témoigner d'un effet du TLN-4601 sur Ras.

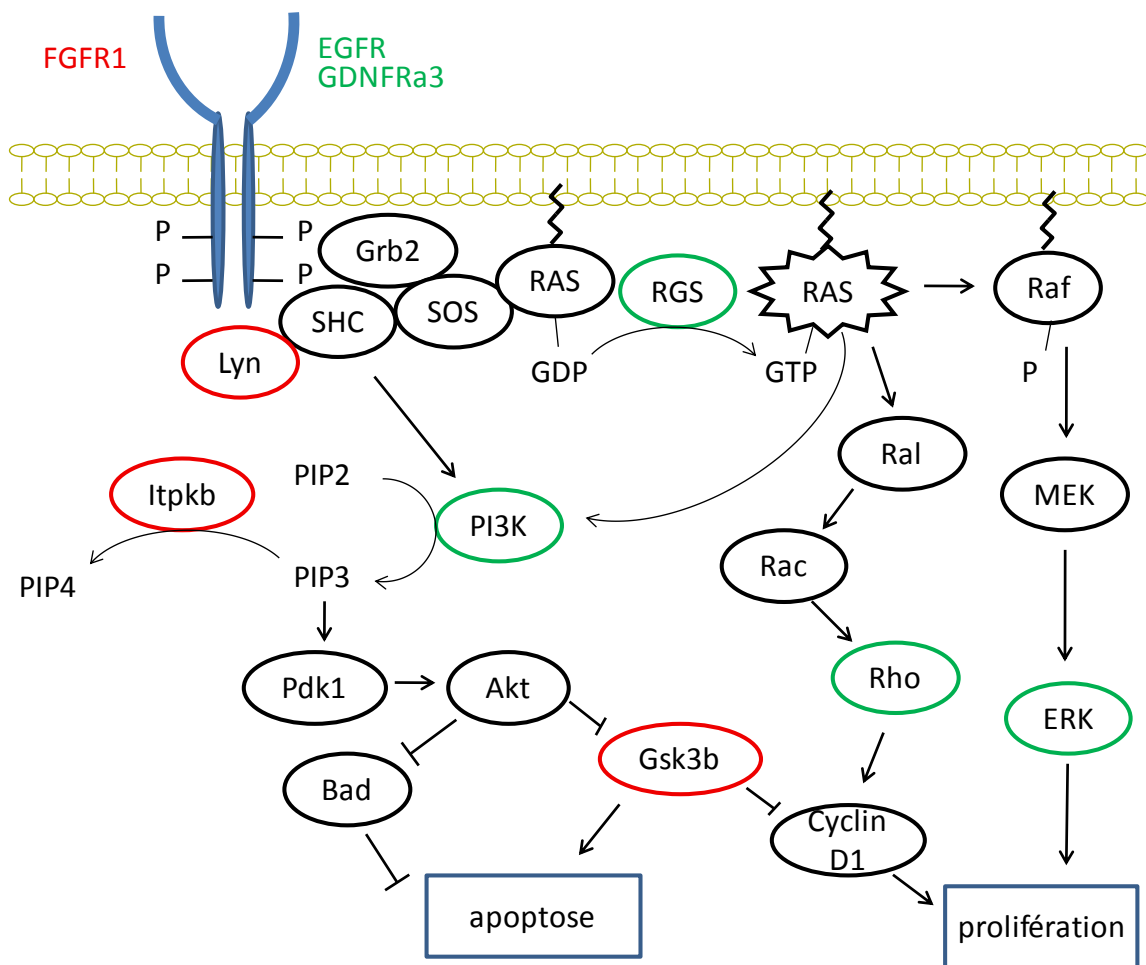


Figure 29 : Effets du TLN-4601 sur les voies de signalisation de Ras

Outre la diminution de l'expression des récepteurs EGFR et GDNFRa3, la diminution des protéines régulatrices des GTPases; Rgs 12 et 14, peut inhiber l'activation de Ras [311, 312]. L'inhibition d'ERK1 (Mapk3), RhoB et PI3K (Pik3r1) et l'induction de l'IP3-kinase B (Itpkb) et de Gsk3b abonderait dans ce sens. En revanche, la surexpression d'IGF1, du récepteur FGFR1, de la protéine tyrosine kinase Lyn et de la PI3K beta (Pik3r2), aurait un effet contraire.

Des études *in vitro* ont par la suite montré que le TLN-4601 inhibait l'activation de Ras-GTP [319] et la phosphorylation de Raf et ERK-1 [320, 321] dans les cellules de cancer du sein, du pancréas ou de la prostate,

stimulées à l'EGF. Il a également été rapporté une inhibition d'Akt [322]. Le fait que le TLN-4601 interfère dans la signalisation après la prénylation de Ras offre un avantage par rapport aux inhibiteurs classiques de farnésyl transférase (FTIs), car ces derniers deviennent inefficaces lorsque Ras est prénylé alternativement par la protéine géranylgéranyl transférase (GGT) [345].

En somme, l'inhibition de l'expression de RhoB et ERK1 et l'induction de Gsk3b, en aval de la voie de Ras, peuvent être bénéfique puisque l'activation de RhoB mène à l'inactivation de p21Waf1/Cip1, à la progression du cycle cellulaire en phase S et à une transformation maligne médiée par Ras [346]. De plus, RhoB serait impliqué dans la radiorésistance des gliomes et cet effet serait renversé par l'inhibiteur de farnésyl transférase R115777 [347]. Quant à ERK1, il serait surexprimé et activé dans le glioblastome multiforme [34] et jouerait un rôle important dans la survie des gliomes [35]. Par exemple, le PD98059, un inhibiteur spécifique d'ERK1/2, ralentit la prolifération des cellules de gliome C6 [348]. Enfin, le rôle de Gsk3b demeure controversé; alors qu'il agit comme suppresseur de tumeur dans certains types de cancer, il stimuler aussi la croissance et le développement de d'autres types de tumeur [349]. Néanmoins, l'inhibition d'Akt et l'activation subséquente de Gsk3b par la tétrandrine [350], l'A443654 [351], le trichostatin A [352], les KP-372-1 et 2 [353], les KCA075 et KCC009 [354], l'enzastaurin [355], et l'UCN-01 [356], induit l'apoptose dans les lignées de cancer du côlon, des lymphocytes, du sein et du cerveau, respectivement.

Effets sur le métabolisme

Dans l'ensemble, un effet remarquable du TLN-4601 fut l'expression différentielle de tout un réseau de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique. Le catabolisme des graisses, puis du glycérol et des acides gras libérés, ainsi que la voie du pentose phosphate (PPP), semblent impliqués et pourraient constituer un mécanisme pour relancer la glycolyse. La figure 30 montre les effets possibles du TLN-4601 sur la mitochondrie qui seront discutés.

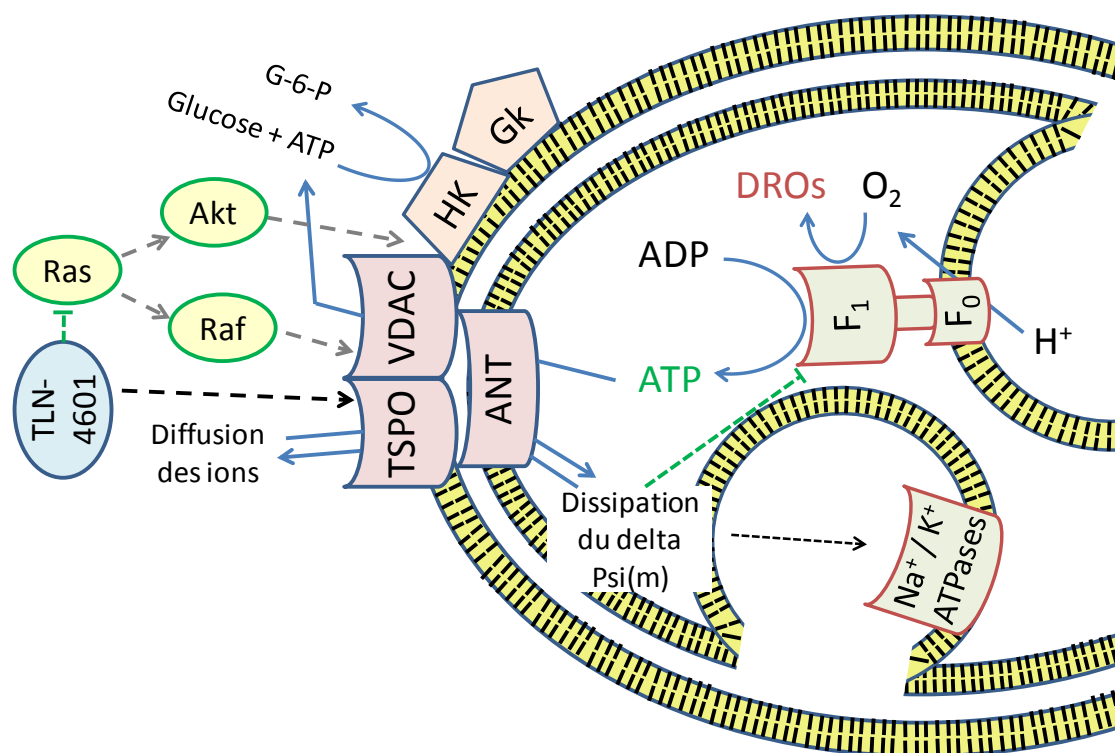


Figure 30 : Effets possibles du TLN-4601 sur la mitochondrie

F₁F₀ ATP synthase

Selon une théorie stipulée par Warburg en 1929, les cellules tumorales adopteraient une glycolyse accrue lorsque la respiration cellulaire serait compromise. En plus de l'effet direct de certains benzodiazépines et des stéroïdes sur l'OSCP de l'ATP synthase [357, 358], les ligands du TSPO [359,

360] ainsi que les protéines Raf [361] et Akt [362, 363] sont connus pour régler l'ouverture du pore de perméabilité mitochondriale transitoire (MPTP), pouvant dissiper le potentiel transmembranaire requis pour la synthèse d'ATP lors de la respiration cellulaire [364].

- Dissipation du potentiel transmembranaire

Il a été rapporté que certains ligands du TSPO causent une ouverture prolongée du MPTP entraînant une dissipation du potentiel transmembranaire [359, 360]. Il a également été démontré que Raf [361] et Akt [363] contrôlent la fermeture du VDAC, un constituant du MPTP. La phosphorylation oxydative serait alors compromise puisque la chaîne du cytochrome et l'ATP synthase requièrent un gradient électrochimique pour fonctionner.

- Liaison directe

Un autre mécanisme possible serait que le TLN-4601, indépendamment du TSPO, inhibe directement la F_1F_0 ATP synthase, entraînant la génération de DROs et par conséquent, l'initiation de l'apoptose. Cette hypothèse a été soulevée par le fait que certains benzodiazépines possèdent une activité cytotoxique à des concentrations beaucoup plus élevées que leur affinité pour le TSPO et que certains se sont avérés actifs auprès de cellules dépourvues de TSPO [365]. L'hypothèse est appuyée par le fait que le complexe F_1F_0 ATP synthase contient une protéine (l'OSCP) qui possède un site de liaison pour les benzodiazépines [357]. À titre d'exemple, il a été rapporté que l'inhibition de la F_1F_0 ATP synthase par le 1,4-benzodiazépine Bz-423 induisait un état de transition dans la mitochondrie, favorisant la production d' O_2^- par la chaîne respiratoire [366]. Cette augmentation d' O_2^- était dose-dépendante et le degré d'apoptose induit par le

Bz-423 était directement proportionnel à la quantité d' O_2^- produit et pouvait être inhibé par des antioxydants [367].

Que ce soit par liaison directe du TLN-4601 à l'ATP synthase ou par dissipation du gradient électrochimique suite à l'ouverture du MPTP, il s'ensuivrait une inhibition de la phosphorylation oxydative et par conséquent une carence en ATP. Des effets des ligands du TSPO ont d'ailleurs été rapportés sur la respiration cellulaire [368, 369]. Le LY294002, un inhibiteur d'Akt, aurait également des effets sur la respiration cellulaire [370]. Lorsque la phosphorylation oxydative serait inhibé ou incomplète, l'ATP synthase amorcerait en contrepartie l'hydrolyse d'ATP [371] et la génération de dérivés réactifs de l'oxygène (DROs) [372]. Allant dans ce sens, Gourdeau, Zvereff et al. ont rapporté l'induction d' O_2^- et des caspases 3 et 7 par le TLN-4601 dans une panoplie de lignées tumorales humaines, incluant les cellules de gliome SF188 [320]. Dans cette étude, nous avons observé que le TLN-4601 induisait l'expression des gènes d'ATPases 1a1, 1a3, 5d et 5g1. Les 2 premières sont des transporteuses d'ions Na^+ et K^+ et les deux suivantes pompent des ions H^+ . L'activation des ATPases pourrait constituer une tentative de rétablir le potentiel transmembranaire requis pour la synthèse d'ATP [371].

Inspiré par la théorie de Warburg, des auteurs ont démontré que les gliomes étaient capables d'orienter leur métabolisme énergétique vers une glycolyse accrue pour générer leur approvisionnement en ATP cellulaire [373]. Une corrélation a d'ailleurs été démontrée entre la densité de TSPO, le métabolisme du glucose et la malignité des gliomes [374]. La même

corrélation a été observée entre l'activation d'Akt le métabolisme du glucose et la malignité des gliomes [375].

Hexokinase

La glycolyse est une voie beaucoup moins rentable que celle de la phosphorylation oxydative mitochondriale, mais elle s'avère beaucoup plus rapide, se déroule dans le cytoplasme et ne requiert ni oxygène ni potentiel transmembranaire. L'hexokinase et la glycérol kinase sont deux enzymes de la glycolyse, qui se trouvent liées au VDAC, qui se trouve lui-même associé au TSPO sur la membrane externe de la mitochondrie [284, 376]. L'association de l'hexokinase au canal VDAC-ANT confère aux deux kinases un accès direct et préférentiel à l'ATP généré par la F_1F_0 ATP synthase située dans la membrane interne de la mitochondrie [26, 27]. L'hexokinase ou la glycérol kinase utiliserait alors cet ATP pour phosphoryler le glucose ou le glycérol en glucose-6-phosphate ou en glycérol-3-phosphate (figure 31). Il est possible que la liaison d'un ligand au TSPO puisse inhiber l'activité de ces deux kinases. Le diazépam, par exemple, est capable d'empêcher l'activation de la glycolyse et de la consommation d'ATP en réponse au stress [377]. La voie de Ras-Akt quant à elle favorise l'activité de l'hexokinase (Hk) en maintenant l'ouverture du canal VDAC [363]. L'activation de la Gsk3b entraîne en revanche la dissociation de l'hexokinase en phosphorylant le VDAC [378].

PFK-1

Le glucose-6-P est alors converti en fructose-6-P, puis en fructose-1,6-biphosphate grâce à la phosphofructokinase-1 (Pfk1). Cette dernière réaction est une étape clef de la glycolyse qui est régulée allostériquement par le fructose-2,6-biphosphate produit grâce à la fructose-6-phosphate-2-kinase (Pfkfb3). L'activation de cette enzyme est contrôlée par Akt [379-381]. Blum et al. ont d'ailleurs rapporté que l'acide farnésylthiosalicylique, un inhibiteur de Ras, causait une inhibition générale des enzymes de la glycolyse [382].

Métabolismes des acides gras

La formation de la membrane lipidique, nécessaire à la croissance et à la division cellulaire, reposerait principalement sur la biosynthèse des acides gras à partir de l'acétyl CoA [383] plutôt que sur l'utilisation des triglycérides circulants [384]. Plusieurs effecteurs d'Akt tel que mTOR [385], p70-S6K [386] et AMPK [387], peuvent stimuler la synthèse des acides gras et inhiber leur beta-oxydation [388-392].

Comme le montre la figure 31, sous l'effet du TLN-4601, les cellules C6 ont surexprimés tout un réseau de gènes impliqués dans le catabolisme des graisses et d'autres impliqués dans des voies alternatives venant relancer la voie de la glycolyse.

pentoses phosphate [393], pour catalyser l'étape limitante d'un processus préparant les acides gras à être utilisé comme substrat pour la beta-oxydation [394]. L'expression de cette enzyme s'avère dramatiquement réduite dans de nombreux cancers du sein et la réexpression de DecR1 dans les tumeurs mammaires supprime fortement leur croissance [395]. Le peroxisome proliferator activated receptor delta (PPARD) induit quant à lui la beta-oxydation des acides gras ainsi que le flux du glucose vers la voie des pentoses phosphate [396]. Enfin, la 3-oxo acyl-CoA thiolase A (Acaa1) et la 3-ketoacyl-CoA thiolase B (Rgd1562373) sont deux enzymes peroxysomales catalysant les dernières étapes de la beta-oxydation des acides gras pour former l'acétyl CoA [397, 398]. Outre l'inhibition d'Akt et mTOR, d'autres mécanismes peuvent induire la beta-oxydation des acides gras. En effet, un ratio élevé d'ADP/ATP, peut activer l'adénylate kinase qui converti alors deux molécules d'ADP en une molécule d'ATP et une molécule d'AMP, qui stimule l'AMP-activated protein kinase, un modulateur de l'apport en nutriments et du catabolisme des acides gras [399]. La beta-oxydation des acides gras peut générer de l'Acétyl-CoA, indépendamment du pyruvate [400]. Ce changement de voie pourrait également être contrôlé par la surexpression du gène de PPARdelta, puisque ce dernier est un régulateur clef des gènes de la pyruvate déshydrogénase kinase (Pdk) et particulièrement du Pdk4 [401] qui empêche la conversion du pyruvate. La Pdk peut également être stimulée par l'acétyl-CoA [402, 403]. En somme, le catabolisme des graisses peut avoir comme effet d'inhiber la croissance cellulaire, car la formation de la membrane lipidique repose principalement sur la biosynthèse des acides gras

à partir de l'acétyl CoA [383] plutôt que sur l'utilisation des triglycérides circulants [384].

En revanche, selon Chen et al., l'expression des gènes de l'ATP synthase, de la voie des pentoses phosphates et de la beta-oxydation, dans les cellules de cancer du sein métastasées au cerveau, représenterait une adaptation métabolique qui favoriserait leur survie [404]. Allant dans ce sens, la production concomitante d'une molécule de glycérol ainsi que la surexpression de la glycérol kinase (Gk) et de la glycérol phosphate déshydrogénase (Gpdh) peut générer du glycéraldéhyde-3-P et relancer la glycolyse lorsque la Pfk-1 est inhibée. De façon analogue, l'activation de la glycogène synthase kinase 3 beta (Gsk3b) découlant de l'inhibition d'Akt, inhibe l'emmagasiner du glucose-6-phosphate sous forme de glycogène par la glycogène synthase (Gys2) [405]. À l'inverse, la dégradation du glycogène est favorisée par la surexpression de la phosphorylase kinase beta (Phkb) qui stimule la glycogène phosphorylase cérébrale (Pygb). Le glucose-6-P peut alors servir de substrat à la glucose-6-phosphate déshydrogénase (G6PD) qui est la première enzyme et l'étape limitante de la voie des pentoses phosphates. Cette voie peut servir à générer du ribose-5-P qui sera ensuite transformé en phosphorybosyl pyrophosphate (PRPP), le précurseur des acide nucléiques, grâce à la PRP synthase 1 (Prps1) et l'interaction de la Prps associated protein 1 (Prpsap1). Enfin, le ribose-5-P peut également être converti par la transkétolase (Tkt) en glycéraldéhyde-3-P et relancer la glycolyse lorsque la Pfk-1 est inhibée.

Apoptose

Au-delà de leur rôle comme centrale énergétique de la cellule, les mitochondries exercent une fonction majeure comme organelle de suicide. Un des rôles les plus importants du TSPO est celui qu'il joue dans la survie cellulaire, puisque l'ouverture du pore de perméabilité mitochondriale transitoire (MPTP) est une étape clef dans la régulation de l'apoptose. Il fut intéressant de constater que le TLN-4601 induisait l'expression des gènes de la glycogène synthase kinase beta (Gsk3b) et du granzyme beta (Gzmb), qui sont deux activateurs connus de la perméabilité mitochondriale transitoire et de l'apoptose [406, 407]. Par exemple, il a été rapporté que la dépolarisation membranaire induisait la phosphorylation/déphosphorylation alternative de Gsk3b dans les cellules de neuroblastome humain [408]. Il a également été rapporté qu'une élévation de la concentration nucléaire de Gsk3b, précédait l'activation des caspases 9 et 3, suite à un choc thermique ou à un traitement à la staurosporine [409]. De son côté, le Gzmb a été impliqué dans l'initiation de la perméabilité mitochondriale transitoire et la relâche du cytochrome c [410-412]. Des effets antitumoraux lui auraient également été attribués {revu par [413]}. Une fois relâché dans le cytosol, le cytochrome c forme un complexe avec le facteur d'activation de l'apoptose 1 (APAF-1) et induit l'apoptose dans les tumeurs cérébrales, mais pas dans les tissus normaux [414]. Dans la présente étude, l'expression du gène d'APAF-1 a été induite dans les gliomes traités au TLN-4601. Ce facteur serait essentiel à l'induction de l'apoptose par le cytochrome c [415] et serait fréquemment inactivé dans les glioblastomes [416]. Il est à noter qu' Akt pourrait être un régulateur d'APAF-1 [417]. Enfin, il a été rapporté que la surexpression

d'APAF-1 dans les gliomes augmentait l'apoptose dans les cellules résistantes à l'apoptose induite par l'oncogène p53 [418] ainsi que l'apoptose induite par la chimio [419] ou la radiothérapie [420].

En conclusion, même si l'efficacité du TLN-4601 contre les lignées C6 et U87MG semble corrélée avec leur niveau de TSPO [302, 421], la lignée de lymphocytes-T immortalisés "Jurkat" s'est toutefois montrée sensible au TLN-4601 en dépit de l'absence de TSPO [422]. D'autres cibles des benzodiazépines, tel que la protéine OSCP du complexe F_1F_0 ATPsynthase [357], sont à considérer. En addition, il est aussi possible que ce soit le groupement farnésyl du TLN-4601 qui conduise à un effet antitumoral en agissant sur d'autres voies de signalisation, impliquant des messagers farnésylés tel que Ras, Raf ou RhoB. Quoiqu'il en soit, beaucoup de crédit devrait être accordé à l'interaction du TLN-4601 avec le TSPO, car elle permet d'augmenter spécifiquement la concentration du composé dans la tumeur [327], favorisant un bon profil thérapeutique et une faible toxicité [423]. De façon analogue, le melphalan et la gentamicine ont déjà été combiné à des ligands du TSPO pour accroître leur distribution dans le cerveau et leur sélectivité pour les tumeurs [424, 425]. En bref, les résultats obtenus in vivo ont généré beaucoup d'enthousiasme autour de ce composé issu de source naturelle et représentant une toute nouvelle classe de molécules bivalentes. Ils auront permis d'initier et d'orienter la 1^{ère} phase des essais cliniques. Dans cette étude clinique, un dosage croissant, administré à des patients atteints de divers cancers, montra que le TLN-4601 s'avéra bien toléré et qu'aucune dose maximale tolérée ne fut atteinte. Parmi sept patients ayant complété six cycles de traitement ou plus, quatre ont démontré une

stabilisation de leur cancer. En février 2009, a débuté le recrutement de patients atteints d'un glioblastome multiforme pour un essai de Phase II.

CONCLUSION DE LA 2^e PARTIE

La deuxième partie de cette thèse, montre l'efficacité antitumorale d'une toxine produite par des actinomycètes. L'étude de la pharmacocinétique a montré que la molécule, appelée TLN-4601, était distribuée et éliminée très rapidement. L'administration par différentes voie a révélé que l'efficacité du TLN-4601 était liée à une concentration plasmatique chronique, plutôt qu'à une exposition maximale de courte durée. A la lumière de ces résultats, la stratégie adoptée pour les essais cliniques, fut d'infuser le TLN-4601 au moyen d'une pompe portative relié à une veine centrale. La molécule étant constituée d'un noyau dibenzodiazépine, prolongé d'une chaîne farnésyl, il a été proposé qu'elle puisse cibler les récepteurs des benzodiazépines ou bien la signalisation de messenger farnésylés tel que Ras, Raf, ou Rho. L'étude du transcriptôme des tumeurs de souris traitées, a montré l'expression de plusieurs gènes responsables de la synthèse de stéroïdes ainsi que de plusieurs gènes inductibles par les stéroïdes. Le récepteur périphérique des benzodiazépines (PBR) fait partie d'un complexe appelé pore de perméabilité mitochondriale transitoire (MPTP). Ce complexe joue un rôle déterminant dans le transport du cholestérol à l'intérieur de la mitochondrie, qui s'avère l'étape limitante de la stéroïdogénèse. Les résultats suggèrent donc, que la liaison du TLN-4601 au PBR entraîne une ouverture du pore mitochondrial in vivo. Comme c'est le cas pour plusieurs ligands du PBR, l'ouverture du pore peut entraîner le passage d'ions et la dissipation du potentiel

transmembranaire, nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase. Une surexpression de plusieurs gènes des pompes Na⁺, K⁺ ou H⁺ ATPases a été observée dans les tumeurs traitées. Il pourrait s'agir d'un mécanisme visant à repomper les ions et rétablir le potentiel transmembranaire, afin de contrer l'effet du TLN-4601. La forte expression du PBR dans la lignée C6, a été corrélée avec une meilleure efficacité du TLN-4601, comparée à la lignée U87, qui exprime moins fortement le récepteur. Le PBR semble également avoir favorisé l'accumulation du TLN-4601 dans la tumeur plutôt que dans le tissu cérébral sain. Le TLN-4601, a également réduit l'expression du gène de l'epidermal growth factor et de plusieurs régulateurs de l'activité des GTPases. Ces changements seraient susceptibles d'inhiber l'activation de Ras-GTP. Le TLN-4601 a également inhibé l'expression des gènes de la pi3k, de rhob et d'erk1 et induit l'expression de gsk3b, qui témoigneraient tous d'une inhibition de Ras. Selon la littérature, ces résultats seraient favorables à une réduction de la prolifération et de la survie des gliomes. Le TLN-4601 a également induit l'expression de tout un réseau de gènes reliés au catabolisme du glycérol et des acides gras. Ce catabolisme serait susceptible de priver la synthèse des phospholipides membranaires, des substrats dont elle a besoin, et inhiberait la croissance tumorale. L'inhibition d'Akt, qui est un effecteur de Ras, pourrait être à l'origine de cet important effet. Nos résultats découragent donc la sélection des patients qui présentent les mutations de MDM2, de p53 ou de PTEN, rencontrées fréquemment dans les GBM, car elles sont susceptibles d'activer la voie en aval de l'effet du TLN-4601. En revanche, la surexpression du PBR paraît un critère de sélection essentiel.

CONCLUSION GENERALE

Les premières thérapies visant une cible moléculaire du glioblastome ont souvent montré de bons résultats lors des essais cliniques de phase II, mais la grande majorité ne se sont pas qualifiées pour une phase III, n'ont pas atteint leurs objectifs ou n'ont pas eu d'impact significatif sur la pratique clinique courante. La chimiothérapie est parfois limitée par l'inaccessibilité des tumeurs intracrânielles en raison de la barrière hématoencéphalique, par l'utilisation de voies de signalisation alternatives par les cellules ou par la sélection de clones génétiquement favorisés. La thérapie antiangiogénique avait été proposée en raison de la dépendance des tumeurs vis-à-vis de la néovascularisation, de l'accessibilité directe des cellules endothéliales depuis la circulation et de la grande stabilité génétique des cellules endothéliales. En revanche, il est possible que la thérapie antiangiogénique crée un microenvironnement hypoxique dans la tumeur, propice à la sélection de cellules plus adaptées à survivre et à croître dans ce genre de milieu et moins susceptibles à l'apoptose. Par ailleurs, les agents antiangiogéniques ne possèdent habituellement pas la propriété d'éradiquer les tumeurs, mais plutôt celle de ralentir leur croissance. Leur utilisation comme monothérapie sur des tumeurs volumineuses déjà établies paraît donc illusoire. Utilisés cependant comme pré ou co-thérapie, ils pourraient permettre une normalisation des vaisseaux qui résulterait en l'inhibition de la dissémination de métastases et une meilleure distribution des agents chimiothérapeutiques. Les agents antiangiogéniques pourraient également être utilisés en prévention de la récurrence tumorale étant donné que les cellules infiltrées ont la capacité de réactiver l'angiogenèse et de former de nouveaux sites de croissance.

Pour être plus efficace, la prochaine génération de thérapies tentera de viser plusieurs cibles moléculaires à l'aide d'une drogue à cibles multiple ou bien à l'aide d'une combinaison de plusieurs molécules. Le TLN-4601 et le Néovastat sont deux exemples qui illustrent bien ces deux stratégies. La démonstration de leur très faible toxicité pourrait permettre de les combiner ensemble ou à d'autres drogues déjà utilisées en clinique, ce qui apporterait l'opportunité unique de passer à des essais sur des tumeurs nouvellement diagnostiquées au lieu de tumeurs récurrentes. Cette nouvelle approche aura pour effet d'accroître les chances de succès et de faciliter l'enrôlement de patients. Par ailleurs, les études débutant par une chirurgie, permettant l'évaluation biomoléculaire et pharmacodynamique deviennent de plus en plus populaire et feront évoluer nos connaissances des mécanismes in vivo de la sensibilité ou de la résistance aux drogues. Une sélection prospective des patients basée sur les caractéristiques moléculaires de leur tumeur devient aussi une réalité et permettra d'offrir des thérapies individualisées.

La prochaine étape serait d'identifier, par une étude prospective, les mécanismes de compensation pouvant se développer au cours du traitement. Il s'agirait ensuite de déterminer, grâce à des marqueurs, le moment où la thérapie perd de son efficacité et qu'il devient opportun de la corriger.

RÉFÉRENCES

1. Legler, J.M., et al., *Cancer surveillance series [corrected]: brain and other central nervous system cancers: recent trends in incidence and mortality*. J Natl Cancer Inst, 1999. **91**(16): p. 1382-90.
2. Radhakrishnan, K., et al., *The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota*. Ann Neurol, 1995. **37**(1): p. 67-73.
3. Figarella-Branger, D. and C. Bouvier, *[Histological classification of human gliomas: state of art and controversies]*. Bull Cancer, 2005. **92**(4): p. 301-9.
4. Salcman, M., *Survival in glioblastoma: historical perspective*. Neurosurgery, 1980. **7**(5): p. 435-9.
5. Ohgaki, H., et al., *Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study*. Cancer Res, 2004. **64**(19): p. 6892-9.
6. Stark, A.M., et al., *Glioblastoma multiforme-report of 267 cases treated at a single institution*. Surg Neurol, 2005. **63**(2): p. 162-9; discussion 169.
7. Fleury, A., et al., *Descriptive epidemiology of cerebral gliomas in France*. Cancer, 1997. **79**(6): p. 1195-202.
8. Shinoda, J., et al., *Selection of eligible patients with supratentorial glioblastoma multiforme for gross total resection*. J Neurooncol, 2001. **52**(2): p. 161-71.
9. Simpson, J.R., et al., *Influence of location and extent of surgical resection on survival of patients with glioblastoma multiforme: results of three consecutive Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) clinical trials*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1993. **26**(2): p. 239-44.
10. DeAngelis, L.M., *Brain tumors*. N Engl J Med, 2001. **344**(2): p. 114-23.
11. Yang, X., et al., *Radiosensitivity, recovery and dose-rate effect in three human glioma cell lines*. Radiother Oncol, 1990. **19**(1): p. 49-56.
12. Cadirola, S. and B. Dutrillaux, *Study of chromosome lesions induced by gamma-rays during the G2 and mitotic phases of the cell cycle*. Ann Genet, 1984. **27**(3): p. 154-7.
13. Dewit, L., *Combined treatment of radiation and cisdiamminedichloroplatinum (II): a review of experimental and clinical data*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1987. **13**(3): p. 403-26.
14. Fine, H.A., et al., *Meta-analysis of radiation therapy with and without adjuvant chemotherapy for malignant gliomas in adults*. Cancer, 1993. **71**(8): p. 2585-97.
15. Stewart, L.A., *Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials*. Lancet, 2002. **359**(9311): p. 1011-8.
16. Chang, S.M., et al., *Temozolomide in the treatment of recurrent malignant glioma*. Cancer, 2004. **100**(3): p. 605-11.
17. Friedman, H.S., T. Kerby, and H. Calvert, *Temozolomide and treatment of malignant glioma*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(7): p. 2585-97.
18. Giocanti, N., et al., *DNA repair and cell cycle interactions in radiation sensitization by the topoisomerase II poison etoposide*. Cancer Res, 1993. **53**(9): p. 2105-11.

19. Mattern, M.R., et al., *Synergistic cell killing by ionizing radiation and topoisomerase I inhibitor topotecan (SK&F 104864)*. Cancer Res, 1991. **51**(21): p. 5813-6.
20. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
21. Bota, D.A., et al., *Interstitial chemotherapy with biodegradable BCNU (Gliadel) wafers in the treatment of malignant gliomas*. Ther Clin Risk Manag, 2007. **3**(5): p. 707-15.
22. Fults, D., et al., *p53 mutation and loss of heterozygosity on chromosomes 17 and 10 during human astrocytoma progression*. Cancer Res, 1992. **52**(3): p. 674-9.
23. Knobbe, C.B., A. Merlo, and G. Reifenberger, *Pten signaling in gliomas*. Neuro-oncol, 2002. **4**(3): p. 196-211.
24. Biernat, W., et al., *Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas*. J Neuropathol Exp Neurol, 1997. **56**(2): p. 180-5.
25. Hayashi, Y., et al., *Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme*. Brain Pathol, 1997. **7**(3): p. 871-5.
26. Arora, K.K. and P.L. Pedersen, *Functional significance of mitochondrial bound hexokinase in tumor cell metabolism. Evidence for preferential phosphorylation of glucose by intramitochondrially generated ATP*. J Biol Chem, 1988. **263**(33): p. 17422-8.
27. BeltrandelRio, H. and J.E. Wilson, *Coordinated regulation of cerebral glycolytic and oxidative metabolism, mediated by mitochondrially bound hexokinase dependent on intramitochondrially generated ATP*. Arch Biochem Biophys, 1992. **296**(2): p. 667-77.
28. Barker, F.G., 2nd, et al., *EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2001. **51**(2): p. 410-8.
29. Prigent, S.A., et al., *Enhanced tumorigenic behavior of glioblastoma cells expressing a truncated epidermal growth factor receptor is mediated through the Ras-Shc-Grb2 pathway*. J Biol Chem, 1996. **271**(41): p. 25639-45.
30. Stambolic, V., et al., *Regulation of PTEN transcription by p53*. Mol Cell, 2001. **8**(2): p. 317-25.
31. Maehama, T. and J.E. Dixon, *The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate*. J Biol Chem, 1998. **273**(22): p. 13375-8.
32. Bouali, S., et al., *P53 and PTEN expression contribute to the inhibition of EGFR downstream signaling pathway by cetuximab*. Cancer Gene Ther, 2009. **16**(6): p. 498-507.
33. Haas-Kogan, D., et al., *Protein kinase B (PKB/Akt) activity is elevated in glioblastoma cells due to mutation of the tumor suppressor PTEN/MMAC*. Curr Biol, 1998. **8**(21): p. 1195-8.
34. Lama, G., et al., *Activated ERK1/2 expression in glioblastoma multiforme and in peritumor tissue*. Int J Oncol, 2007. **30**(6): p. 1333-42.
35. Leirdal, M. and M. Sioud, *Protein kinase Calpha isoform regulates the activation of the MAP kinase ERK1/2 in human glioma cells: involvement in cell survival and gene expression*. Mol Cell Biol Res Commun, 2000. **4**(2): p. 106-10.

36. Kato, K., et al., *Isoprenoid addition to Ras protein is the critical modification for its membrane association and transforming activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(14): p. 6403-7.
37. Plate, K.H., G. Breier, and W. Risau, *Molecular mechanisms of developmental and tumor angiogenesis*. Brain Pathol, 1994. **4**(3): p. 207-18.
38. Hanahan, D. and J. Folkman, *Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell, 1996. **86**(3): p. 353-64.
39. Yancopoulos, G.D., et al., *Vascular-specific growth factors and blood vessel formation*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 242-8.
40. Yuan, F., et al., *Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(25): p. 14765-70.
41. Kunkel, P., et al., *Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2*. Cancer Res, 2001. **61**(18): p. 6624-8.
42. Vajkoczy, P., et al., *Inhibition of tumor growth, angiogenesis, and microcirculation by the novel Flk-1 inhibitor SU5416 as assessed by intravital multi-fluorescence videomicroscopy*. Neoplasia, 1999. **1**(1): p. 31-41.
43. Goldman, C.K., et al., *Paracrine expression of a native soluble vascular endothelial growth factor receptor inhibits tumor growth, metastasis, and mortality rate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(15): p. 8795-800.
44. de Bouard, S., et al., *Antiangiogenic and anti-invasive effects of sunitinib on experimental human glioblastoma*. Neuro Oncol, 2007. **9**(4): p. 412-23.
45. Laird, A.D., et al., *SU6668 is a potent antiangiogenic and antitumor agent that induces regression of established tumors*. Cancer Res, 2000. **60**(15): p. 4152-60.
46. Bernsen, H.J., et al., *Suramin treatment of human glioma xenografts; effects on tumor vasculature and oxygenation status*. J Neurooncol, 1999. **44**(2): p. 129-36.
47. Stan, A.C., et al., *In vivo inhibition of angiogenesis and growth of the human U-87 malignant glial tumor by treatment with an antibody against basic fibroblast growth factor*. J Neurosurg, 1995. **82**(6): p. 1044-52.
48. Sills, A.K., Jr., et al., *Squalamine inhibits angiogenesis and solid tumor growth in vivo and perturbs embryonic vasculature*. Cancer Res, 1998. **58**(13): p. 2784-92.
49. Farrell, C.L., J. Megyesi, and R.F. Del Maestro, *Effect of ibuprofen on tumor growth in the C6 spheroid implantation glioma model*. J Neurosurg, 1988. **68**(6): p. 925-30.
50. Kirsch, M., et al., *Angiostatin suppresses malignant glioma growth in vivo*. Cancer Res, 1998. **58**(20): p. 4654-9.
51. Joe, Y.A., et al., *Inhibition of human malignant glioma growth in vivo by human recombinant plasminogen kringle 1-3*. Int J Cancer, 1999. **82**(5): p. 694-9.
52. Zhang, X., J. Wu, and Z. Fei, *[Research of cloning, expression of human endostatin gene and its inhibition effects to the glioma in vivo]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2001. **81**(13): p. 783-7.
53. Sorensen, D.R., et al., *Endostatin reduces vascularization, blood flow, and growth in a rat gliosarcoma*. Neuro Oncol, 2002. **4**(1): p. 1-8.

54. Abdollahi, A., et al., *Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects*. Cancer Res, 2003. **63**(24): p. 8890-8.
55. Isobe, N., et al., *Antitumor effect of TNP-470 on glial tumors transplanted in rats*. Anticancer Res, 1996. **16**(1): p. 71-6.
56. Zhou, R., R. Mazurchuk, and R.M. Straubinger, *Antivasculature effects of doxorubicin-containing liposomes in an intracranial rat brain tumor model*. Cancer Res, 2002. **62**(9): p. 2561-6.
57. Hong, Y.K., et al., *Efficient inhibition of in vivo human malignant glioma growth and angiogenesis by interferon-beta treatment at early stage of tumor development*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3354-60.
58. Yamada, S., et al., *Effect of the angiogenesis inhibitor Cilengitide (EMD 121974) on glioblastoma growth in nude mice*. Neurosurgery, 2006. **59**(6): p. 1304-12; discussion 1312.
59. MacDonald, T.J., et al., *Preferential susceptibility of brain tumors to the antiangiogenic effects of an alpha(v) integrin antagonist*. Neurosurgery, 2001. **48**(1): p. 151-7.
60. Bello, L., et al., *Simultaneous inhibition of glioma angiogenesis, cell proliferation, and invasion by a naturally occurring fragment of human metalloproteinase-2*. Cancer Res, 2001. **61**(24): p. 8730-6.
61. Gondi, C.S., et al., *Expression of antisense uPAR and antisense uPA from a bicistronic adenoviral construct inhibits glioma cell invasion, tumor growth, and angiogenesis*. Oncogene, 2003. **22**(38): p. 5967-75.
62. Lakka, S.S., et al., *Synergistic down-regulation of urokinase plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 in SNB19 glioblastoma cells efficiently inhibits glioma cell invasion, angiogenesis, and tumor growth*. Cancer Res, 2003. **63**(10): p. 2454-61.
63. Mishima, K., et al., *A peptide derived from the non-receptor-binding region of urokinase plasminogen activator inhibits glioblastoma growth and angiogenesis in vivo in combination with cisplatin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(15): p. 8484-9.
64. Kim, C.K., et al., *The recombinant kringle domain of urokinase plasminogen activator inhibits in vivo malignant glioma growth*. Cancer Sci, 2007. **98**(2): p. 253-8.
65. Murphy, S., et al., *Enhancement of cisplatin efficacy by thalidomide in a 9L rat gliosarcoma model*. J Neurooncol, 2007. **85**(2): p. 181-9.
66. Devineni, D., A. Klein-Szanto, and J.M. Gallo, *Uptake of temozolomide in a rat glioma model in the presence and absence of the angiogenesis inhibitor TNP-470*. Cancer Res, 1996. **56**(9): p. 1983-7.
67. Bello, L., et al., *Low-dose chemotherapy combined with an antiangiogenic drug reduces human glioma growth in vivo*. Cancer Res, 2001. **61**(20): p. 7501-6.
68. Weingart, J.D., E.P. Sipos, and H. Brem, *The role of minocycline in the treatment of intracranial 9L glioma*. J Neurosurg, 1995. **82**(4): p. 635-40.
69. Teicher, B.A., et al., *Antiangiogenic and antitumor effects of a protein kinase Cbeta inhibitor in human T98G glioblastoma multiforme xenografts*. Clin Cancer Res, 2001. **7**(3): p. 634-40.
70. Arrieta, O., et al., *Protamine inhibits angiogenesis and growth of C6 rat glioma; a synergistic effect when combined with carmustine*. Eur J Cancer, 1998. **34**(13): p. 2101-6.

71. Mauceri, H.J., et al., *Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy*. Nature, 1998. **394**(6690): p. 287-91.
72. Lund, E.L., L. Bastholm, and P.E. Kristjansen, *Therapeutic synergy of TNP-470 and ionizing radiation: effects on tumor growth, vessel morphology, and angiogenesis in human glioblastoma multiforme xenografts*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(3): p. 971-8.
73. Geng, L., et al., *Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor signaling leads to reversal of tumor resistance to radiotherapy*. Cancer Res, 2001. **61**(6): p. 2413-9.
74. Schueneman, A.J., et al., *SU11248 maintenance therapy prevents tumor regrowth after fractionated irradiation of murine tumor models*. Cancer Res, 2003. **63**(14): p. 4009-16.
75. Kang, K.B., et al., *Enhancement of glioblastoma radioresponse by a selective COX-2 inhibitor celecoxib: inhibition of tumor angiogenesis with extensive tumor necrosis*. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2007. **67**(3): p. 888-96.
76. Kozin, S.V., et al., *Vascular endothelial growth factor receptor-2-blocking antibody potentiates radiation-induced long-term control of human tumor xenografts*. Cancer Res, 2001. **61**(1): p. 39-44.
77. Hurwitz, H.I., et al., *Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(15): p. 3502-8.
78. Folkman, J., *Tumor angiogenesis*. Adv Cancer Res, 1985. **43**: p. 175-203.
79. Lee, A. and R. Langer, *Shark cartilage contains inhibitors of tumor angiogenesis*. Science, 1983. **221**(4616): p. 1185-7.
80. Oikawa, T., et al., *A novel angiogenic inhibitor derived from Japanese shark cartilage (I). Extraction and estimation of inhibitory activities toward tumor and embryonic angiogenesis*. Cancer Lett, 1990. **51**(3): p. 181-6.
81. McGuire, T.R., et al., *Antiproliferative activity of shark cartilage with and without tumor necrosis factor-alpha in human umbilical vein endothelium*. Pharmacotherapy, 1996. **16**(2): p. 237-44.
82. Sheu, J.R., et al., *Effect of U-995, a potent shark cartilage-derived angiogenesis inhibitor, on anti-angiogenesis and anti-tumor activities*. Anticancer Res, 1998. **18**(6A): p. 4435-41.
83. Liang, J.H. and K.P. Wong, *The characterization of angiogenesis inhibitor from shark cartilage*. Adv Exp Med Biol, 2000. **476**: p. 209-23.
84. Rabbani-Chadegani, A., et al., *Identification of low-molecular-weight protein (SCP1) from shark cartilage with anti-angiogenesis activity and sequence similarity to parvalbumin*. J Pharm Biomed Anal, 2008. **46**(3): p. 563-7.
85. Hassan, Z.M., et al., *Low molecular weight fraction of shark cartilage can modulate immune responses and abolish angiogenesis*. Int Immunopharmacol, 2005. **5**(6): p. 961-70.
86. Langer, R., et al., *Isolations of a cartilage factor that inhibits tumor neovascularization*. Science, 1976. **193**(4247): p. 70-2.
87. Shen, X.R., et al., *Purification and Functional Characterization of a Shark Cartilage Factor Inhibitory to Angiogenesis*. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 2000. **32**(1): p. 43-48.
88. Gabrielides, C. and F. Barreau, *A vertebrate interstitial collagenase inhibitor from bovine scapular cartilage: purification and characterization*. Biochim Biophys Acta, 1987. **924**(1): p. 238-47.

89. Pufe, T., et al., *Endostatin/collagen XVIII--an inhibitor of angiogenesis--is expressed in cartilage and fibrocartilage*. Matrix Biol, 2004. **23**(5): p. 267-76.
90. Moses, M.A., et al., *Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(6): p. 2645-50.
91. Kang, J.A., et al., *Anti-angiogenic and anti-tumor invasive activities of tissue inhibitor of metalloproteinase-3 from shark, Scyliorhinus torazame*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1620**(1-3): p. 59-64.
92. Zafarullah, M., et al., *Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) mRNA is constitutively expressed in bovine, human normal, and osteoarthritic articular chondrocytes*. J Cell Biochem, 1996. **60**(2): p. 211-7.
93. Kitahara, H., et al., *Chondromodulin-I expression in rat articular cartilage*. Arch Histol Cytol, 2003. **66**(3): p. 221-8.
94. Murray, J.B., et al., *Purification and partial amino acid sequence of a bovine cartilage-derived collagenase inhibitor*. J Biol Chem, 1986. **261**(9): p. 4154-9.
95. Moses, M.A., J. Sudhalter, and R. Langer, *Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes*. J Cell Biol, 1992. **119**(2): p. 475-82.
96. Liu, N., et al., *Metastatin: a hyaluronan-binding complex from cartilage that inhibits tumor growth*. Cancer Res, 2001. **61**(3): p. 1022-8.
97. Yamana, K., et al., *Molecular cloning and characterization of CHM1L, a novel membrane molecule similar to chondromodulin-I*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **280**(4): p. 1101-6.
98. Ratel, D., et al., *Direct-acting fibrinolytic enzymes in shark cartilage extract: potential therapeutic role in vascular disorders*. Thromb Res, 2005. **115**(1-2): p. 143-52.
99. Shen, X.R., et al., *SCAIF80, a Novel Inhibitor of Angiogenesis, and Its Effect on Tumor Growth*. Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai), 2001. **33**(1): p. 99-104.
100. Miller, R.R. and C.A. McDevitt, *Thrombospondin is present in articular cartilage and is synthesized by articular chondrocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1988. **153**(2): p. 708-14.
101. Borchardt, R.T., et al., *Improvement of oral peptide bioavailability: Peptidomimetics and prodrug strategies*. Adv Drug Deliv Rev, 1997. **27**(2-3): p. 235-256.
102. Burton, P.S., et al., *How structural features influence the biomembrane permeability of peptides*. J Pharm Sci, 1996. **85**(12): p. 1336-40.
103. Heljasvaara, R., et al., *Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases*. Exp Cell Res, 2005. **307**(2): p. 292-304.
104. Clapp, C., et al., *Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function*. Front Horm Res, 2006. **35**: p. 64-73.
105. Kwon, M., et al., *p22 is a novel plasminogen fragment with antiangiogenic activity*. Biochemistry, 2001. **40**(44): p. 13246-53.
106. Lucas, R., et al., *Multiple forms of angiostatin induce apoptosis in endothelial cells*. Blood, 1998. **92**(12): p. 4730-41.
107. Davis, P.F., et al., *Inhibition of angiogenesis by oral ingestion of powdered shark cartilage in a rat model*. Microvasc Res, 1997. **54**(2): p. 178-82.
108. Berbari, P., et al., *Antiangiogenic effects of the oral administration of liquid cartilage extract in humans*. J Surg Res, 1999. **87**(1): p. 108-13.

109. Morris, G.M., et al., *Boron neutron capture therapy of the rat 9L gliosarcoma: evaluation of the effects of shark cartilage*. Br J Radiol, 2000. **73**(868): p. 429-34.
110. Gonzalez, R.P., et al., *Demonstration of inhibitory effect of oral shark cartilage on basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in the rabbit cornea*. Biol Pharm Bull, 2001. **24**(2): p. 151-4.
111. Miller, D.R., et al., *Phase I/II trial of the safety and efficacy of shark cartilage in the treatment of advanced cancer*. J Clin Oncol, 1998. **16**(11): p. 3649-55.
112. Horsman, M.R., J. Alsner, and J. Overgaard, *The effect of shark cartilage extracts on the growth and metastatic spread of the SCCVII carcinoma*. Acta Oncol, 1998. **37**(5): p. 441-5.
113. Gingras, D., et al., *Shark cartilage extracts as antiangiogenic agents: smart drinks or bitter pills?* Cancer Metastasis Rev, 2000. **19**(1-2): p. 83-6.
114. Dupont, E., et al., *Antiangiogenic properties of a novel shark cartilage extract: potential role in the treatment of psoriasis*. J Cutan Med Surg, 1998. **2**(3): p. 146-52.
115. Beliveau, R., et al., *The antiangiogenic agent neovastat (AE-941) inhibits vascular endothelial growth factor-mediated biological effects*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(4): p. 1242-50.
116. Dupont, E., et al., *Antiangiogenic and antimetastatic properties of Neovastat (AE-941), an orally active extract derived from cartilage tissue*. Clin Exp Metastasis, 2002. **19**(2): p. 145-53.
117. Weber, M.H., J. Lee, and F.W. Orr, *The effect of Neovastat (AE-941) on an experimental metastatic bone tumor model*. Int J Oncol, 2002. **20**(2): p. 299-303.
118. Dupont, E., et al., *Modulation of the contact hypersensitivity response by AE-941 (Neovastat), a novel antiangiogenic agent*. J Cutan Med Surg, 2003. **7**(3): p. 208-16.
119. Lee, S.Y., S.Y. Paik, and S.M. Chung, *Neovastat (AE-941) inhibits the airway inflammation and hyperresponsiveness in a murine model of asthma*. J Microbiol, 2005. **43**(1): p. 11-6.
120. Lee, S.Y. and S.M. Chung, *Neovastat (AE-941) inhibits the airway inflammation via VEGF and HIF-2 alpha suppression*. Vascul Pharmacol, 2007. **47**(5-6): p. 313-8.
121. Hillman, J.D., et al., *Treatment of Kaposi sarcoma with oral administration of shark cartilage in a human herpesvirus 8-seropositive, human immunodeficiency virus-seronegative homosexual man*. Arch Dermatol, 2001. **137**(9): p. 1149-52.
122. Batist, G., et al., *Neovastat (AE-941) in refractory renal cell carcinoma patients: report of a phase II trial with two dose levels*. Ann Oncol, 2002. **13**(8): p. 1259-63.
123. Sauder, D.N., et al., *Neovastat (AE-941), an inhibitor of angiogenesis: Randomized phase I/II clinical trial results in patients with plaque psoriasis*. J Am Acad Dermatol, 2002. **47**(4): p. 535-41.
124. Latreille, J., et al., *Phase I/II trial of the safety and efficacy of AE-941 (Neovastat) in the treatment of non-small-cell lung cancer*. Clin Lung Cancer, 2003. **4**(4): p. 231-6.
125. Escudier, B., et al., *Prognostic factors of metastatic renal cell carcinoma after failure of immunotherapy: new paradigm from a large phase III trial with shark cartilage extract AE 941*. J Urol, 2007. **178**(5): p. 1901-5.

126. Jekunen, A. and K. Kairemo, *Inhibition of angiogenesis at endothelial cell level*. Microsc Res Tech, 2003. **60**(1): p. 85-97.
127. Folkman, J., *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. Nat Med, 1995. **1**(1): p. 27-31.
128. Weidner, N., et al., *Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma*. N Engl J Med, 1991. **324**(1): p. 1-8.
129. Gimbrone, M.A., Jr., et al., *Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization*. J Exp Med, 1972. **136**(2): p. 261-76.
130. Matsumoto, T. and L. Claesson-Welsh, *VEGF receptor signal transduction*. Sci STKE, 2001. **2001**(112): p. RE21.
131. Brem, H. and J. Folkman, *Inhibition of tumor angiogenesis mediated by cartilage*. J Exp Med, 1975. **141**(2): p. 427-39.
132. Gingras, D., et al., *Neovastat--a novel antiangiogenic drug for cancer therapy*. Anticancer Drugs, 2003. **14**(2): p. 91-6.
133. Boivin, D., et al., *The antiangiogenic agent Neovastat (AE-941) induces endothelial cell apoptosis*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(10): p. 795-802.
134. Gingras, D., et al., *Matrix proteinase inhibition by AE-941, a multifunctional antiangiogenic compound*. Anticancer Res, 2001. **21**(1A): p. 145-55.
135. Gingras, D., et al., *The antiangiogenic agent Neovastat (AE-941) stimulates tissue plasminogen activator activity*. Invest New Drugs, 2004. **22**(1): p. 17-26.
136. Gingras, D., et al., *Activation of tissue plasminogen activator gene transcription by Neovastat, a multifunctional antiangiogenic agent*. Biochem Biophys Res Commun, 2004. **320**(1): p. 205-12.
137. el Atifi, M., et al., *Quantification of DNA probes on nylon microarrays using T4 polynucleotide kinase labeling*. Biotechniques, 2003. **35**(2): p. 262-4, 266.
138. El Atifi, M., et al., *Long oligonucleotide arrays on nylon for large-scale gene expression analysis*. Biotechniques, 2002. **33**(3): p. 612-6, 618.
139. Jordan, B.R., *Large-scale expression measurement by hybridization methods: from high-density membranes to "DNA chips"*. J Biochem (Tokyo), 1998. **124**(2): p. 251-8.
140. Tan, P.K., et al., *Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(19): p. 5676-84.
141. Griffioen, A.W., et al., *Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium*. Blood, 1996. **88**(2): p. 667-73.
142. Griffioen, A.W., et al., *Angiogenesis inhibitors overcome tumor induced endothelial cell anergy*. Int J Cancer, 1999. **80**(2): p. 315-9.
143. Kofler, S., T. Nickel, and M. Weis, *Role of cytokines in cardiovascular diseases: a focus on endothelial responses to inflammation*. Clin Sci (Lond), 2005. **108**(3): p. 205-13.
144. Bonizzi, G., et al., *Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor-kappaB activation by interleukin-1*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(1): p. 7-11.
145. Rahman, A., et al., *E-selectin expression in human endothelial cells by TNF-alpha-induced oxidant generation and NF-kappaB activation*. Am J Physiol, 1998. **275**(3 Pt 1): p. L533-44.

146. Pfeffer, U., et al., *Molecular mechanisms of action of angiopreventive antioxidants on endothelial cells: Microarray gene expression analyses*. Mutat Res, 2005.
147. Jiang, M.Z., et al., *Effects of antioxidants and nitric oxide on TNF-alpha-induced adhesion molecule expression and NF-kappaB activation in human dermal microvascular endothelial cells*. Life Sci, 2004. **75**(10): p. 1159-70.
148. Munoz, C., et al., *Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity*. Blood, 1996. **88**(9): p. 3482-90.
149. Ferran, C., et al., *Inhibition of NF-kappa B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **214**(1): p. 212-23.
150. Kumar, S., et al., *Isoliquiritigenin inhibits IkappaB kinase activity and ROS generation to block TNF-alpha induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells*. Biochem Pharmacol, 2007. **73**(10): p. 1602-12.
151. Garg, A.K. and B.B. Aggarwal, *Reactive oxygen intermediates in TNF signaling*. Mol Immunol, 2002. **39**(9): p. 509-17.
152. Schreck, R., P. Rieber, and P.A. Baeuerle, *Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1*. Embo J, 1991. **10**(8): p. 2247-58.
153. Li, A.E., et al., *A role for reactive oxygen species in endothelial cell anoikis*. Circ Res, 1999. **85**(4): p. 304-10.
154. Kroll, J. and J. Waltenberger, *VEGF-A induces expression of eNOS and iNOS in endothelial cells via VEGF receptor-2 (KDR)*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **252**(3): p. 743-6.
155. Feliers, D., et al., *VEGF regulation of endothelial nitric oxide synthase in glomerular endothelial cells*. Kidney Int, 2005. **68**(4): p. 1648-59.
156. Huie, R.E. and S. Padmaja, *The reaction of no with superoxide*. Free Radic Res Commun, 1993. **18**(4): p. 195-9.
157. Thum, T., et al., *Growth hormone induces eNOS expression and nitric oxide release in a cultured human endothelial cell line*. FEBS Lett, 2003. **555**(3): p. 567-71.
158. Peng, H.B., P. Libby, and J.K. Liao, *Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B*. J Biol Chem, 1995. **270**(23): p. 14214-9.
159. Mohan, S., et al., *IkappaBalpha-dependent regulation of low-shear flow-induced NF-kappa B activity: role of nitric oxide*. Am J Physiol Cell Physiol, 2003. **284**(4): p. C1039-47.
160. Peng, H.B., et al., *Nitric oxide inhibits macrophage-colony stimulating factor gene transcription in vascular endothelial cells*. J Biol Chem, 1995. **270**(28): p. 17050-5.
161. Wang, W., et al., *T-cell lymphokines, interleukin-4 and gamma interferon, modulate the induction of vascular smooth muscle cell tissue plasminogen activator and migration by serum and platelet-derived growth factor*. Circ Res, 1995. **77**(6): p. 1095-106.
162. Iafrati, M.D., et al., *Compensatory mechanisms influence hemostasis in setting of eNOS deficiency*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(4): p. H1627-32.

163. Ferrier, C.M., et al., *High tPA-expression in primary melanoma of the limb correlates with good prognosis*. Br J Cancer, 2000. **83**(10): p. 1351-9.
164. Chappuis, P.O., et al., *Functional evaluation of plasmin formation in primary breast cancer*. J Clin Oncol, 2001. **19**(10): p. 2731-8.
165. Sawaya, R., et al., *Biological significance of tissue plasminogen activator content in brain tumors*. J Neurosurg, 1991. **74**(3): p. 480-6.
166. Reijerkerk, A., E.E. Voest, and M.F. Gebbink, *No grip, no growth: the conceptual basis of excessive proteolysis in the treatment of cancer*. Eur J Cancer, 2000. **36**(13 Spec No): p. 1695-705.
167. Chen, Z.L. and S. Strickland, *Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin*. Cell, 1997. **91**(7): p. 917-25.
168. Zhang, X., A. Chaudhry, and S.K. Chintala, *Inhibition of plasminogen activation protects against ganglion cell loss in a mouse model of retinal damage*. Mol Vis, 2003. **9**: p. 238-48.
169. Bonnefoy, A. and C. Legrand, *Proteolysis of subendothelial adhesive glycoproteins (fibronectin, thrombospondin, and von Willebrand factor) by plasmin, leukocyte cathepsin G, and elastase*. Thromb Res, 2000. **98**(4): p. 323-32.
170. Reijerkerk, A., et al., *Amyloid endostatin induces endothelial cell detachment by stimulation of the plasminogen activation system*. Mol Cancer Res, 2003. **1**(8): p. 561-8.
171. Reinartz, J., et al., *Plasmin abrogates alpha v beta 5-mediated adhesion of a human keratinocyte cell line (HaCaT) to vitronectin*. Exp Cell Res, 1995. **220**(2): p. 274-82.
172. Rossignol, P., et al., *Protease nexin-1 inhibits plasminogen activation-induced apoptosis of adherent cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(11): p. 10346-56.
173. Liu, D., et al., *Tissue plasminogen activator neurovascular toxicity is controlled by activated protein C*. Nat Med, 2004. **10**(12): p. 1379-83.
174. Kilic, E., et al., *Aggravation of focal cerebral ischemia by tissue plasminogen activator is reversed by 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor but does not depend on endothelial NO synthase*. Stroke, 2005. **36**(2): p. 332-6.
175. Cao, Y., et al., *Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29461-7.
176. Pascaud, M.A., et al., *Lung overexpression of angiostatin aggravates pulmonary hypertension in chronically hypoxic mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2003. **29**(4): p. 449-57.
177. Luo, J., et al., *Angiostatin upregulates E-selectin in proliferating endothelial cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **245**(3): p. 906-11.
178. Hanford, H.A., et al., *Angiostatin(4.5)-mediated apoptosis of vascular endothelial cells*. Cancer Res, 2003. **63**(14): p. 4275-80.
179. Guenzi, E., et al., *The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression*. Embo J, 2003. **22**(15): p. 3772-82.
180. De Caterina, R., et al., *Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines*. J Clin Invest, 1995. **96**(1): p. 60-8.
181. Sultana, C., et al., *Interaction of sickle erythrocytes with endothelial cells in the presence of endothelial cell conditioned medium induces oxidant stress*

- leading to transendothelial migration of monocytes. *Blood*, 1998. **92**(10): p. 3924-35.
182. Yang, C.R., et al., *Decoy receptor 3 increases monocyte adhesion to endothelial cells via NF-kappa B-dependent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1, VCAM-1, and IL-8 expression*. *J Immunol*, 2005. **174**(3): p. 1647-56.
 183. Budson, A.E., et al., *The angiogenesis inhibitor AGM-1470 selectively increases E-selectin*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996. **225**(1): p. 141-5.
 184. Craig, L.E., et al., *Endothelial cells from diverse tissues exhibit differences in growth and morphology*. *Microvasc Res*, 1998. **55**(1): p. 65-76.
 185. van de Wiel, P.A., et al., *Factors that define the susceptibility of endothelial cells to tumor necrosis factor and lipid A*. *Immunopharmacology*, 1992. **23**(1): p. 49-56.
 186. Smith, L.E., et al., *Alterations in endothelial superoxide dismutase levels as a function of growth state in vitro*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1992. **33**(1): p. 36-41.
 187. Oguey, D., P.W. George, and C. Ruegg, *Disruption of integrin-dependent adhesion and survival of endothelial cells by recombinant adenovirus expressing isolated beta integrin cytoplasmic domains*. *Gene Ther*, 2000. **7**(15): p. 1292-303.
 188. Palladini, G., et al., *Association of melphalan and high-dose dexamethasone is effective and well tolerated in patients with AL (primary) amyloidosis who are ineligible for stem cell transplantation*. *Blood*, 2004. **103**(8): p. 2936-8.
 189. Butterfield, L.H., et al., *From cytoprotection to tumor suppression: the multifactorial role of peroxiredoxins*. *Antioxid Redox Signal*, 1999. **1**(4): p. 385-402.
 190. Turkseven, S., et al., *Antioxidant mechanism of heme oxygenase-1 involves an increase in superoxide dismutase and catalase in experimental diabetes*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005. **289**(2): p. H701-7.
 191. Yamauchi, T., et al., *Hemin induces heme oxygenase-1 in spinal cord vasculature and attenuates barrier disruption and neutrophil infiltration in the injured murine spinal cord*. *J Neurotrauma*, 2004. **21**(8): p. 1017-30.
 192. Andreasen, P.A., R. Egelund, and H.H. Petersen, *The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis*. *Cell Mol Life Sci*, 2000. **57**(1): p. 25-40.
 193. Collen, D., *The plasminogen (fibrinolytic) system*. *Thromb Haemost*, 1999. **82**(2): p. 259-70.
 194. Carmeliet, P. and D. Collen, *Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease*. *J Pathol*, 2000. **190**(3): p. 387-405.
 195. Pepper, M.S., et al., *Angiogenesis: a paradigm for balanced extracellular proteolysis during cell migration and morphogenesis*. *Enzyme Protein*, 1996. **49**(1-3): p. 138-62.
 196. Mignatti, P. and D.B. Rifkin, *Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis*. *Enzyme Protein*, 1996. **49**(1-3): p. 117-37.
 197. Cavallaro, U., et al., *Response of bovine endothelial cells to FGF-2 and VEGF is dependent on their site of origin: Relevance to the regulation of angiogenesis*. *J Cell Biochem*, 2001. **82**(4): p. 619-33.
 198. Pepper, M.S., et al., *Synergistic induction of t-PA by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor and localization of t-PA to*

- Weibel-Palade bodies in bovine microvascular endothelial cells.* Thromb Haemost, 2001. **86**(2): p. 702-9.
199. Kroon, M.E., et al., *Urokinase receptor expression on human microvascular endothelial cells is increased by hypoxia: implications for capillary-like tube formation in a fibrin matrix.* Blood, 2000. **96**(8): p. 2775-83.
 200. Uchiyama, T., et al., *Hypoxia induces transcription of the plasminogen activator inhibitor-1 gene through genistein-sensitive tyrosine kinase pathways in vascular endothelial cells.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(4): p. 1155-61.
 201. Pepper, M.S., et al., *Plasminogen activator inhibitor-1 is induced in migrating endothelial cells.* J Cell Physiol, 1992. **153**(1): p. 129-39.
 202. Pepper, M.S., et al., *Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells.* J Cell Biol, 1993. **122**(3): p. 673-84.
 203. Pepper, M.S., et al., *Urokinase-type plasminogen activator is induced in migrating capillary endothelial cells.* J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 1): p. 2535-41.
 204. Bacharach, E., A. Itin, and E. Keshet, *Apposition-dependent induction of plasminogen activator inhibitor type 1 expression: a mechanism for balancing pericellular proteolysis during angiogenesis.* Blood, 1998. **92**(3): p. 939-45.
 205. Carmeliet, P., et al., *Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice.* Nature, 1994. **368**(6470): p. 419-24.
 206. Pepper, M.S., *Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2001. **21**(7): p. 1104-17.
 207. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis.* Am J Pathol, 1995. **146**(5): p. 1029-39.
 208. Yamashita, J., et al., *Breast cancer prognosis is poor when total plasminogen activator activity is low.* Br J Cancer, 1993. **67**(2): p. 374-8.
 209. Ganesh, S., et al., *Contribution of plasminogen activators and their inhibitors to the survival prognosis of patients with Dukes' stage B and C colorectal cancer.* Br J Cancer, 1997. **75**(12): p. 1793-801.
 210. Bindal, A.K., et al., *Prognostic significance of proteolytic enzymes in human brain tumors.* J Neurooncol, 1994. **22**(2): p. 101-10.
 211. Sun, Z., et al., *The blockage of the high-affinity lysine binding sites of plasminogen by EACA significantly inhibits prourokinase-induced plasminogen activation.* Biochim Biophys Acta, 2002. **1596**(2): p. 182-92.
 212. Gately, S., et al., *The mechanism of cancer-mediated conversion of plasminogen to the angiogenesis inhibitor angiostatin.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(20): p. 10868-72.
 213. Merchan, J.R., et al., *In vitro and in vivo induction of antiangiogenic activity by plasminogen activators and captopril.* J Natl Cancer Inst, 2003. **95**(5): p. 388-99.
 214. Brem, S., *The role of vascular proliferation in the growth of brain tumors.* Clin Neurosurg, 1976. **23**: p. 440-53.
 215. Brem, S., R. Cotran, and J. Folkman, *Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading.* J Natl Cancer Inst, 1972. **48**(2): p. 347-56.
 216. Wesseling, P., et al., *Quantitative analysis of microvascular changes in diffuse astrocytic neoplasms with increasing grade of malignancy.* Hum Pathol, 1998. **29**(4): p. 352-8.

217. Moses, M.A., J. Sudhalter, and R. Langer, *Identification of an inhibitor of neovascularization from cartilage*. Science, 1990. **248**(4961): p. 1408-10.
218. Tabruyn, S.P. and A.W. Griffioen, *Molecular pathways of angiogenesis inhibition*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **355**(1): p. 1-5.
219. Brew, K., D. Dinakarpandian, and H. Nagase, *Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1477**(1-2): p. 267-83.
220. Albright, L., et al., *Therapy in an intracerebral murine glioma model, using Bacillus Calmette-Guerin, neuraminidase-treated tumor cells, and 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-1-nitrosourea*. Cancer Res, 1975. **35**(3): p. 658-65.
221. Naldini, L., et al., *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector*. Science, 1996. **272**(5259): p. 263-7.
222. Pernod, G., et al., *Increasing lentiviral vector titer using inhibitors of protein kinase R*. Biotechniques, 2004. **36**(4): p. 576-8, 580.
223. Dupont E, B.P., Juneau C., *Extract of shark cartilage having an antiangiogenic activity and effect on tumor regression*. United States Patent 5,618,925. Government Printing Office Washington, DC, 1997.
224. Padro, T., C.M. van den Hoogen, and J.J. Emeis, *Distribution of tissue-type plasminogen activator (activity and antigen) in rat tissues*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1990. **1**(6): p. 601-8.
225. Pernod, G., et al., *Retinoids induced t-PA synthesis by C6 glioma cells--role in tumoral haemorrhagic necrosis*. Thromb Haemost, 1996. **75**(2): p. 332-8.
226. Granelli-Piperno, A. and E. Reich, *A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids*. J Exp Med, 1978. **148**(1): p. 223-34.
227. Volm, M., J. Mattern, and R. Koomagi, *Angiostatin expression in non-small cell lung cancer*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(8): p. 3236-40.
228. Stewart, P.A., et al., *A quantitative study of blood-brain barrier permeability ultrastructure in a new rat glioma model*. Acta Neuropathol (Berl), 1985. **67**(1-2): p. 96-102.
229. Nishio, S., et al., *Microvascular abnormalities in ethylnitrosourea (ENU)-induced rat brain tumors: structural basis for altered blood-brain barrier function*. Acta Neuropathol (Berl), 1983. **59**(1): p. 1-10.
230. Hilfiker, P.R., et al., *Enhancement of neointima formation with tissue-type plasminogen activator*. J Vasc Surg, 2001. **33**(4): p. 821-8.
231. Larsson, A. and B. Astedt, *Immunohistochemical localisation of tissue plasminogen activator and urokinase in the vessel wall*. J Clin Pathol, 1985. **38**(2): p. 140-5.
232. Steins, M.B., et al., *Overexpression of tissue-type plasminogen activator in atherosclerotic human coronary arteries*. Atherosclerosis, 1999. **145**(1): p. 173-80.
233. Salame, M.Y., et al., *Expression of the plasminogen activator system in the human vascular wall*. Atherosclerosis, 2000. **152**(1): p. 19-28.
234. Caccamo, D.V., M.E. Keohane, and P.E. McKeever, *Plasminogen activators and inhibitors in gliomas: an immunohistochemical study*. Mod Pathol, 1994. **7**(1): p. 99-104.
235. Landau, B.J., et al., *Elevated levels of urokinase-type plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type-1 in malignant human brain tumors*. Cancer Res, 1994. **54**(4): p. 1105-8.
236. Emeis, J.J., et al., *An endothelial storage granule for tissue-type plasminogen activator*. J Cell Biol, 1997. **139**(1): p. 245-56.

237. van den Eijnden-Schrauwen, Y., et al., *Studies on the acute release of tissue-type plasminogen activator from human endothelial cells in vitro and in rats in vivo: evidence for a dynamic storage pool*. Blood, 1995. **85**(12): p. 3510-7.
238. Kooistra, T., et al., *Regulation of endothelial cell t-PA synthesis and release*. Int J Hematol, 1994. **59**(4): p. 233-55.
239. Bell, W.R., *The fibrinolytic system in neoplasia*. Semin Thromb Hemost, 1996. **22**(6): p. 459-78.
240. Wojtukiewicz, M.Z., et al., *The hemostatic system and angiogenesis in malignancy*. Neoplasia, 2001. **3**(5): p. 371-84.
241. Palumbo, J.S., et al., *Fibrinogen is an important determinant of the metastatic potential of circulating tumor cells*. Blood, 2000. **96**(10): p. 3302-9.
242. Trikha, M. and M.T. Nakada, *Platelets and cancer: implications for antiangiogenic therapy*. Semin Thromb Hemost, 2002. **28**(1): p. 39-44.
243. Palumbo, J.S. and J.L. Degen, *Fibrinogen and tumor cell metastasis*. Haemostasis, 2001. **31 Suppl 1**: p. 11-5.
244. Franks, A.J. and E. Ellis, *Immunohistochemical localisation of tissue plasminogen activator in human brain tumours*. Br J Cancer, 1989. **59**(3): p. 462-6.
245. Castronovo V, D.V., Savard P, Rivière M, Dupont E., *Cartilage as a source of natural inhibitors of angiogenesis*. In: Teicher B, editor. Antiangiogenic agents in cancer therapy, Totowa (NJ): Humana Press Inc, 1999: p. 175-183.
246. O'Reilly, M.S., *Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth*. Exs, 1997. **79**: p. 273-94.
247. Stathakis, P., et al., *Angiostatin formation involves disulfide bond reduction and proteolysis in kringle 5 of plasmin*. J Biol Chem, 1999. **274**(13): p. 8910-6.
248. Stathakis, P., et al., *Generation of angiostatin by reduction and proteolysis of plasmin. Catalysis by a plasmin reductase secreted by cultured cells*. J Biol Chem, 1997. **272**(33): p. 20641-5.
249. Lay, A.J., et al., *Phosphoglycerate kinase acts in tumour angiogenesis as a disulphide reductase*. Nature, 2000. **408**(6814): p. 869-73.
250. Griscelli, F., et al., *Combined effects of radiotherapy and angiostatin gene therapy in glioma tumor model*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6698-703.
251. Ma, H.I., et al., *Suppression of intracranial human glioma growth after intramuscular administration of an adeno-associated viral vector expressing angiostatin*. Cancer Res, 2002. **62**(3): p. 756-63.
252. Soff, G.A., et al., *In vivo generation of angiostatin isoforms by administration of a plasminogen activator and a free sulfhydryl donor: a phase I study of an angiostatic cocktail of tissue plasminogen activator and mesna*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(17): p. 6218-25.
253. Bajou, K., et al., *The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies*. J Cell Biol, 2001. **152**(4): p. 777-84.
254. Bugge, T.H., et al., *Reduced metastasis of Polyoma virus middle T antigen-induced mammary cancer in plasminogen-deficient mice*. Oncogene, 1998. **16**(24): p. 3097-104.
255. Bugge, T.H., et al., *Growth and dissemination of Lewis lung carcinoma in plasminogen-deficient mice*. Blood, 1997. **90**(11): p. 4522-31.

256. Tarui, T., et al., *Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 33564-70.
257. Devy, L., et al., *The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent*. Faseb J, 2002. **16**(2): p. 147-54.
258. Davis, G.E., et al., *Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 5): p. 917-30.
259. Lijnen, H.R., et al., *Function of the plasminogen/plasmin and matrix metalloproteinase systems after vascular injury in mice with targeted inactivation of fibrinolytic system genes*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1998. **18**(7): p. 1035-45.
260. Pavey, S.J., G.A. Hawson, and N.A. Marsh, *Alterations to the fibrinolytic enzyme system in patients with non-small cell lung carcinoma*. Blood Coagul Fibrinolysis, 1999. **10**(5): p. 261-7.
261. Pavey, S.J., G.A. Hawson, and N.A. Marsh, *Impact of the fibrinolytic enzyme system on prognosis and survival associated with non-small cell lung carcinoma*. Blood Coagul Fibrinolysis, 2001. **12**(1): p. 51-8.
262. Sandstrom, M., et al., *Expression of the proteolytic factors, tPA and uPA, PAI-1 and VEGF during malignant glioma progression*. Int J Dev Neurosci, 1999. **17**(5-6): p. 473-81.
263. Baker, E.A., F.G. Bergin, and D.J. Leaper, *Plasminogen activator system, vascular endothelial growth factor, and colorectal cancer progression*. Mol Pathol, 2000. **53**(6): p. 307-12.
264. Matsuyama, W., et al., *Serum levels of vascular endothelial growth factor dependent on the stage progression of lung cancer*. Chest, 2000. **118**(4): p. 948-51.
265. Alizadeh, A.A., et al., *Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling*. Nature, 2000. **403**(6769): p. 503-11.
266. Masters, J.R. and S.R. Lakhani, *How diagnosis with microarrays can help cancer patients*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 921.
267. Brugarolas, J., B.F. Haynes, and J.R. Nevins, *Towards a genomic-based diagnosis*. Lancet, 2001. **357**(9252): p. 249-50.
268. Ramaswamy, S. and C.M. Perou, *DNA microarrays in breast cancer: the promise of personalised medicine*. Lancet, 2003. **361**(9369): p. 1576-7.
269. Miklos, G.L. and R. Maleszka, *Microarray reality checks in the context of a complex disease*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(5): p. 615-21.
270. Rajeevan, M.S., et al., *Validation of array-based gene expression profiles by real-time (kinetic) RT-PCR*. J Mol Diagn, 2001. **3**(1): p. 26-31.
271. Perrin, A., et al., *A combined oligonucleotide and protein microarray for the codetection of nucleic acids and antibodies associated with human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and hepatitis C virus infections*. Anal Biochem, 2003. **322**(2): p. 148-55.
272. Sauvaigo, S., et al., *An oligonucleotide microarray for the monitoring of repair enzyme activity toward different DNA base damage*. Anal Biochem, 2004. **333**(1): p. 182-92.
273. Falardeau, P., et al., *Neovastat, a naturally occurring multifunctional antiangiogenic drug, in phase III clinical trials*. Semin Oncol, 2001. **28**(6): p. 620-5.

274. Nguyen, C., et al., *Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones*. Genomics, 1995. **29**(1): p. 207-16.
275. Cheadle, C., et al., *Analysis of microarray data using Z score transformation*. J Mol Diagn, 2003. **5**(2): p. 73-81.
276. Olsen, R.W. and A.J. Tobin, *Molecular biology of GABAA receptors*. Faseb J, 1990. **4**(5): p. 1469-80.
277. Stephenson, F.A., *The GABAA receptors*. Biochem J, 1995. **310** (Pt 1): p. 1-9.
278. Braestrup, C. and R.F. Squires, *Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(9): p. 3805-9.
279. Papadopoulos, V., et al., *Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function*. Trends Pharmacol Sci, 2006. **27**(8): p. 402-9.
280. Papadopoulos, V., et al., *Structure, function and regulation of the mitochondrial peripheral-type benzodiazepine receptor*. Therapie, 2001. **56**(5): p. 549-56.
281. Galiegue, S., N. Tinel, and P. Casellas, *The peripheral benzodiazepine receptor: a promising therapeutic drug target*. Curr Med Chem, 2003. **10**(16): p. 1563-72.
282. Papadopoulos, V., *Peripheral Benzodiazepine Receptor: Structure and Function in Health and Disease*. Ann pharm Fr, 2003. **61** (1): p. 30-50.
283. Decaudin, D., *Peripheral benzodiazepine receptor and its clinical targeting*. Anticancer Drugs, 2004. **15**(8): p. 737-45.
284. McEnery, M.W., et al., *Isolation of the mitochondrial benzodiazepine receptor: association with the voltage-dependent anion channel and the adenine nucleotide carrier*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(8): p. 3170-4.
285. Verrier, F., et al., *Study of PTPC composition during apoptosis for identification of viral protein target*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **1010**: p. 126-42.
286. Zisterer, D.M. and D.C. Williams, *Peripheral-type benzodiazepine receptors*. Gen Pharmacol, 1997. **29**(3): p. 305-14.
287. Beurdeley-Thomas, A., et al., *The peripheral benzodiazepine receptors: a review*. J Neurooncol, 2000. **46**(1): p. 45-56.
288. Bribes, E., et al., *Immunohistochemical assessment of the peripheral benzodiazepine receptor in human tissues*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(1): p. 19-28.
289. Krueger, K.E., *Molecular and functional properties of mitochondrial benzodiazepine receptors*. Biochim Biophys Acta, 1995. **1241**(3): p. 453-70.
290. Han, Z., et al., *Expression of peripheral benzodiazepine receptor (PBR) in human tumors: relationship to breast, colorectal, and prostate tumor progression*. J Recept Signal Transduct Res, 2003. **23**(2-3): p. 225-38.
291. Le Fur, G., et al., *Differentiation between two ligands for peripheral benzodiazepine binding sites, [3H]RO5-4864 and [3H]PK 11195, by thermodynamic studies*. Life Sci, 1983. **33**(5): p. 449-57.
292. Katz, Y., A. Eitan, and M. Gavish, *Increase in peripheral benzodiazepine binding sites in colonic adenocarcinoma*. Oncology, 1990. **47**(2): p. 139-42.
293. Maaser, K., et al., *Overexpression of the peripheral benzodiazepine receptor is a relevant prognostic factor in stage III colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(10): p. 3205-9.

294. Beinlich, A., et al., *Specific binding of benzodiazepines to human breast cancer cell lines*. Life Sci, 1999. **65**(20): p. 2099-108.
295. Carmel, I., et al., *Peripheral-type benzodiazepine receptors in the regulation of proliferation of MCF-7 human breast carcinoma cell line*. Biochem Pharmacol, 1999. **58**(2): p. 273-8.
296. Hardwick, M., et al., *Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) in human breast cancer: correlation of breast cancer cell aggressive phenotype with PBR expression, nuclear localization, and PBR-mediated cell proliferation and nuclear transport of cholesterol*. Cancer Res, 1999. **59**(4): p. 831-42.
297. Hardwick, M., et al., *Peripheral-type benzodiazepine receptor (PBR) gene amplification in MDA-MB-231 aggressive breast cancer cells*. Cancer Genet Cytogenet, 2002. **139**(1): p. 48-51.
298. Batra, S., I. Larsson, and E. Boven, *Mitochondrial and microsomal peripheral benzodiazepine receptors in human ovarian cancer xenografts*. Int J Mol Med, 2000. **5**(6): p. 619-23.
299. Venturini, I., et al., *Up-regulation of peripheral benzodiazepine receptor system in hepatocellular carcinoma*. Life Sci, 1998. **63**(14): p. 1269-80.
300. Venturini, I., et al., *Increased expression of peripheral benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor in human tumors sited in the liver*. Life Sci, 1999. **65**(21): p. 2223-31.
301. Cornu, P., et al., *Increase in omega 3 (peripheral-type benzodiazepine) binding site densities in different types of human brain tumours. A quantitative autoradiography study*. Acta Neurochir (Wien), 1992. **119**(1-4): p. 146-52.
302. Veenman, L., et al., *Peripheral-type benzodiazepine receptor density and in vitro tumorigenicity of glioma cell lines*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(4): p. 689-98.
303. Broaddus, W.C. and J.P. Bennett, Jr., *Peripheral-type benzodiazepine receptors in human glioblastomas: pharmacologic characterization and photoaffinity labeling of ligand recognition site*. Brain Res, 1990. **518**(1-2): p. 199-208.
304. Maeda, J., et al., *Novel peripheral benzodiazepine receptor ligand [11C]DAA1106 for PET: an imaging tool for glial cells in the brain*. Synapse, 2004. **52**(4): p. 283-91.
305. Chelli, B., et al., *Peripheral benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial transmembrane potential depolarization and apoptosis induction in rat C6 glioma cells*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(1): p. 125-34.
306. Zazopoulos, E., et al., *A genomics-guided approach for discovering and expressing cryptic metabolic pathways*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(2): p. 187-90.
307. McAlpine, J.B., et al., *Microbial genomics as a guide to drug discovery and structural elucidation: ECO-02301, a novel antifungal agent, as an example*. J Nat Prod, 2005. **68**(4): p. 493-6.
308. Charan, R.D., et al., *Diazepinomicin, a new antimicrobial alkaloid from a marine Micromonospora sp.* J Nat Prod, 2004. **67**(8): p. 1431-3.
309. Gourdeau, H., et al., *Identification, characterization and potent antitumor activity of ECO-4601, a novel peripheral benzodiazepine receptor ligand*. Cancer Chemother Pharmacol, 2008. **61**(6): p. 911-21.

310. Rotblat, B., et al., *The Ras inhibitor farnesylthiosalicylic acid (Salirasib) disrupts the spatiotemporal localization of active Ras: a potential treatment for cancer*. Methods Enzymol, 2008. **439**: p. 467-89.
311. Willard, F.S., et al., *Regulator of G-protein signaling 14 (RGS14) is a selective H-Ras effector*. PLoS ONE, 2009. **4**(3): p. e4884.
312. Willard, M.D., et al., *Selective role for RGS12 as a Ras/Raf/MEK scaffold in nerve growth factor-mediated differentiation*. Embo J, 2007. **26**(8): p. 2029-40.
313. Chakravarti, A., et al., *The epidermal growth factor receptor pathway mediates resistance to sequential administration of radiation and chemotherapy in primary human glioblastoma cells in a RAS-dependent manner*. Cancer Res, 2002. **62**(15): p. 4307-15.
314. Guha, A., *Ras activation in astrocytomas and neurofibromas*. Can J Neurol Sci, 1998. **25**(4): p. 267-81.
315. Shapiro, P., *Ras-MAP kinase signaling pathways and control of cell proliferation: relevance to cancer therapy*. Crit Rev Clin Lab Sci, 2002. **39**(4-5): p. 285-330.
316. Haluska, P., G.K. Dy, and A.A. Adjei, *Farnesyl transferase inhibitors as anticancer agents*. Eur J Cancer, 2002. **38**(13): p. 1685-700.
317. Bredel, M., et al., *Inhibition of Ras and related G-proteins as a therapeutic strategy for blocking malignant glioma growth*. Neurosurgery, 1998. **43**(1): p. 124-31; discussion 131-2.
318. Pollack, I.F., et al., *Inhibition of Ras and related guanosine triphosphate-dependent proteins as a therapeutic strategy for blocking malignant glioma growth: II--preclinical studies in a nude mouse model*. Neurosurgery, 1999. **45**(5): p. 1208-14; discussion 1214-5.
319. Gourdeau, H., Boufaied, N., Thibaudeau, E. and Falardeau, P. . *TLN-4601: A Potential New Therapeutic for the Treatment of Mutated K-Ras Mediated Cancers*. in AACR Annual meeting. 2008. San Diego, CA.
320. Gourdeau, H., Zvereff, V., Wioland, M.-A., Lobreau, D. and Farlardeau, P. *ECO-4601, a novel antitumor compound targeting the RAS-MAPK pathway induces apoptosis*. in Targeting the Kinome. 2006. Basel, Switzerland.
321. Boufaied, N., Farlardeau, P. and Gourdeau, H. *TLN-4601 specifically inhibits Ras-MAPK signaling upstream of MEK*. in AACR 100th Annual Meeting. 2009. Denver, CO, USA.
322. Annabi, B., Cajina, M., Farlardeau, P. and Gourdeau, H. *A structurally novel farnesylated dibenzodiazepinone, TLN-4601*, inhibits wild-type, amplified and mutated EGFR glioma cell migration*. in AACR Annual Meeting. 2008. San Diego, CA.
323. Bachmann, B.O., McAlpine, J.B., Zazopoulos, E., Farnet, C.M. and Pirae, M., *Farnesyl dibenzodiazepinones, processes for their production and their use as pharmaceuticals*. 2004: US Patent No. 7,101,872.
324. Benda, P., et al., *Differentiated rat glial cell strain in tissue culture*. Science, 1968. **161**(839): p. 370-1.
325. El Atifi, M., et al., *Quantification of DNA Probes on Nylon Microarrays Using T4 Polynucleotide Kinase Labeling*. Biotechniques, 2003. **Aug 35**(2): p. 262-6.
326. Bernard, K., et al., *Multiplex messenger assay: simultaneous, quantitative measurement of expression of many genes in the context of T cell activation*. Nucleic Acids Res, 1996. **24**(8): p. 1435-42.

327. Gourdeau, H., Ibrahim, A., Zehntner, S., Rosa-Neto, P., Bedell, B.J. and Falardeau, P. *Targeted Delivery of ECO-4601 to Brain Tumors in an Orthotopic Model*. in *3rd Modern Drug Discovery & Development Summit*. 2007. San Francisco, CA.
328. Brown, R.C. and V. Papadopoulos, *Role of the peripheral-type benzodiazepine receptor in adrenal and brain steroidogenesis*. *Int Rev Neurobiol*, 2001. **46**: p. 117-43.
329. Danovich, L., et al., *The influence of clozapine treatment and other antipsychotics on the 18 kDa translocator protein, formerly named the peripheral-type benzodiazepine receptor, and steroid production*. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2008. **18**(1): p. 24-33.
330. Falchi, A.M., et al., *Intracellular cholesterol changes induced by translocator protein (18 kDa) TSPO/PBR ligands*. *Neuropharmacology*, 2007. **53**(2): p. 318-29.
331. Lacapere, J.J. and V. Papadopoulos, *Peripheral-type benzodiazepine receptor: structure and function of a cholesterol-binding protein in steroid and bile acid biosynthesis*. *Steroids*, 2003. **68**(7-8): p. 569-85.
332. McCauley, L.D., et al., *Benzodiazepines and peptides stimulate pregnenolone synthesis in brain mitochondria*. *Eur J Pharmacol*, 1995. **276**(1-2): p. 145-53.
333. Papadopoulos, V., et al., *Peripheral-type benzodiazepine receptor in neurosteroid biosynthesis, neuropathology and neurological disorders*. *Neuroscience*, 2006. **138**(3): p. 749-56.
334. Russell, D.W., *Cholesterol biosynthesis and metabolism*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1992. **6**(2): p. 103-10.
335. Huang, Z., et al., *Neuronal cell death caused by inhibition of intracellular cholesterol trafficking is caspase dependent and associated with activation of the mitochondrial apoptosis pathway*. *J Neurochem*, 2006. **97**(1): p. 280-91.
336. Yao, P.M. and I. Tabas, *Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(45): p. 42468-76.
337. Fernandez, C., et al., *Cholesterol is essential for mitosis progression and its deficiency induces polyploid cell formation*. *Exp Cell Res*, 2004. **300**(1): p. 109-20.
338. Calleros, L., et al., *RhoA and p38 MAPK mediate apoptosis induced by cellular cholesterol depletion*. *Apoptosis*, 2006. **11**(7): p. 1161-73.
339. Sutter, A.P., et al., *Ligands of the peripheral benzodiazepine receptor induce apoptosis and cell cycle arrest in oesophageal cancer cells: involvement of the p38MAPK signalling pathway*. *Br J Cancer*, 2003. **89**(3): p. 564-72.
340. Serra, M., et al., *2-Phenyl-imidazo[1,2-a]pyridine derivatives as ligands for peripheral benzodiazepine receptors: stimulation of neurosteroid synthesis and anticonflict action in rats*. *Br J Pharmacol*, 1999. **127**(1): p. 177-87.
341. Bitran, D., R.J. Hilvers, and C.K. Kellogg, *Anxiolytic effects of 3 alpha-hydroxy-5 alpha[beta]-pregnan-20-one: endogenous metabolites of progesterone that are active at the GABAA receptor*. *Brain Res*, 1991. **561**(1): p. 157-61.
342. Li, L., et al., *Induction of apoptosis and G2/M arrest by 2-methoxyestradiol in human cervical cancer HeLaS3 cells*. *Anticancer Res*, 2004. **24**(2B): p. 873-80.
343. Nomoto, S., et al., *Oestrogen causes G2/M arrest and apoptosis in breast cancer cells MDA-MB-231*. *Oncol Rep*, 2002. **9**(4): p. 773-6.

344. Qadan, L.R., et al., *2-Methoxyestradiol induces G2/M arrest and apoptosis in prostate cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **285**(5): p. 1259-66.
345. Mazet, J.L., et al., *Combination of the novel farnesyltransferase inhibitor RPR130401 and the geranylgeranyltransferase-1 inhibitor GGTI-298 disrupts MAP kinase activation and G(1)-S transition in Ki-Ras-overexpressing transformed adrenocortical cells*. FEBS Lett, 1999. **460**(2): p. 235-40.
346. Olson, M.F., H.F. Paterson, and C.J. Marshall, *Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1*. Nature, 1998. **394**(6690): p. 295-9.
347. Delmas, C., et al., *Farnesyltransferase inhibitor, R115777, reverses the resistance of human glioma cell lines to ionizing radiation*. Int J Cancer, 2002. **100**(1): p. 43-8.
348. *[Intracerebral progression of transplanted rat C6 glioblastoma cells pretreated with neuropeptides and MAPK inhibitor]*. Morfologia, 2007. **132**(6): p. 26-9.
349. Luo, J., *Glycogen synthase kinase 3beta (GSK3beta) in tumorigenesis and cancer chemotherapy*. Cancer Lett, 2009. **273**(2): p. 194-200.
350. Chen, X.L., et al., *Involvement of PI3K/AKT/GSK3beta pathway in tetrandrine-induced G1 arrest and apoptosis*. Cancer Biol Ther, 2008. **7**(7): p. 1073-8.
351. Fala, F., et al., *Proapoptotic activity and chemosensitizing effect of the novel Akt inhibitor (2S)-1-(1H-Indol-3-yl)-3-[5-(3-methyl-2H-indazol-5-yl)pyridin-3-yl]oxyprop an2-amine (A443654) in T-cell acute lymphoblastic leukemia*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(3): p. 884-95.
352. Alao, J.P., et al., *Role of glycogen synthase kinase 3 beta (GSK3beta) in mediating the cytotoxic effects of the histone deacetylase inhibitor trichostatin A (TSA) in MCF-7 breast cancer cells*. Mol Cancer, 2006. **5**: p. 40.
353. Koul, D., et al., *Inhibition of Akt survival pathway by a small-molecule inhibitor in human glioblastoma*. Mol Cancer Ther, 2006. **5**(3): p. 637-44.
354. Yuan, L., et al., *Tissue transglutaminase 2 inhibition promotes cell death and chemosensitivity in glioblastomas*. Mol Cancer Ther, 2005. **4**(9): p. 1293-302.
355. Graff, J.R., et al., *The protein kinase Cbeta-selective inhibitor, Enzastaurin (LY317615.HCl), suppresses signaling through the AKT pathway, induces apoptosis, and suppresses growth of human colon cancer and glioblastoma xenografts*. Cancer Res, 2005. **65**(16): p. 7462-9.
356. Shankar, S.L., et al., *UCN-01 alters phosphorylation of Akt and GSK3beta and induces apoptosis in six independent human neuroblastoma cell lines*. J Neurochem, 2004. **90**(3): p. 702-11.
357. Johnson, K.M., et al., *Identification and validation of the mitochondrial F1F0-ATPase as the molecular target of the immunomodulatory benzodiazepine Bz-423*. Chem Biol, 2005. **12**(4): p. 485-96.
358. Zheng, J. and V.D. Ramirez, *Purification and identification of an estrogen binding protein from rat brain: oligomycin sensitivity-conferring protein (OSCP), a subunit of mitochondrial F0F1-ATP synthase/ATPase*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1999. **68**(1-2): p. 65-75.
359. Chelli, B., et al., *Peripheral benzodiazepine receptor ligands: mitochondrial transmembrane potential depolarization and apoptosis induction in rat C6 glioma cells*. Biochem Pharmacol, 2004. **68**(1): p. 125-34.

360. Tanimoto, Y., et al., *Benzodiazepine receptor agonists modulate thymocyte apoptosis through reduction of the mitochondrial transmembrane potential*. Jpn J Pharmacol, 1999. **79**(2): p. 177-83.
361. Le Mellay, V., et al., *Negative regulation of mitochondrial VDAC channels by C-Raf kinase*. BMC Cell Biol, 2002. **3**: p. 14.
362. Majewski, N., et al., *Hexokinase-mitochondria interaction mediated by Akt is required to inhibit apoptosis in the presence or absence of Bax and Bak*. Mol Cell, 2004. **16**(5): p. 819-30.
363. Gottlob, K., et al., *Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and mitochondrial hexokinase*. Genes Dev, 2001. **15**(11): p. 1406-18.
364. Ly, J.D., D.R. Grubb, and A. Lawen, *The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi(m)$) in apoptosis; an update*. Apoptosis, 2003. **8**(2): p. 115-28.
365. Gorman, A.M., et al., *Antiproliferative action of benzodiazepines in cultured brain cells is not mediated through the peripheral-type benzodiazepine acceptor*. J Neurochem, 1989. **53**(3): p. 849-55.
366. Johnson, K.M., et al., *Mechanistic basis for therapeutic targeting of the mitochondrial F1F0-ATPase*. ACS Chem Biol, 2006. **1**(5): p. 304-8.
367. Blatt, N.B., et al., *Benzodiazepine-induced superoxide signals B cell apoptosis: mechanistic insight and potential therapeutic utility*. J Clin Invest, 2002. **110**(8): p. 1123-32.
368. Hirsch, J.D., et al., *Mitochondrial benzodiazepine receptors mediate inhibition of mitochondrial respiratory control*. Mol Pharmacol, 1989. **35**(1): p. 157-63.
369. Moreno-Sanchez, R., et al., *Inhibition of substrate oxidation in mitochondria by the peripheral-type benzodiazepine receptor ligand AHN 086*. Biochem Pharmacol, 1991. **41**(10): p. 1479-84.
370. Shaik, Z.P., E.K. Fifer, and G. Nowak, *Akt activation improves oxidative phosphorylation in renal proximal tubular cells following nephrotoxicant injury*. Am J Physiol Renal Physiol, 2008. **294**(2): p. F423-32.
371. Rego, A.C., S. Vesce, and D.G. Nicholls, *The mechanism of mitochondrial membrane potential retention following release of cytochrome c in apoptotic GT1-7 neural cells*. Cell Death Differ, 2001. **8**(10): p. 995-1003.
372. Roy, A., et al., *Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F0F1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite Leishmania donovani*. Mol Pharmacol, 2008. **74**(5): p. 1292-307.
373. Oudard, S., et al., *Gliomas are driven by glycolysis: putative roles of hexokinase, oxidative phosphorylation and mitochondrial ultrastructure*. Anticancer Res, 1997. **17**(3C): p. 1903-11.
374. Ferrarese, C., et al., *Peripheral benzodiazepine receptors and glucose metabolism in human gliomas*. J Neurooncol, 1994. **22**(1): p. 15-22.
375. Elstrom, R.L., et al., *Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells*. Cancer Res, 2004. **64**(11): p. 3892-9.
376. Adams, V., et al., *Porin interaction with hexokinase and glycerol kinase: metabolic microcompartmentation at the outer mitochondrial membrane*. Biochem Med Metab Biol, 1991. **45**(3): p. 271-91.
377. Shaheen, A.A., et al., *Effect of pretreatment with vitamin E or diazepam on brain metabolism of stressed rats*. Biochem Pharmacol, 1993. **46**(1): p. 194-7.
378. Pastorino, J.G., J.B. Hoek, and N. Shulga, *Activation of glycogen synthase kinase 3 β disrupts the binding of hexokinase II to mitochondria by*

- phosphorylating voltage-dependent anion channel and potentiates chemotherapy-induced cytotoxicity. Cancer Res, 2005. 65(22): p. 10545-54.*
379. Kole, H.K., et al., *Regulation of 6-phosphofructo-1-kinase activity in ras-transformed rat-1 fibroblasts. Arch Biochem Biophys, 1991. 286(2): p. 586-90.*
 380. Okar, D.A. and A.J. Lange, *Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. Biofactors, 1999. 10(1): p. 1-14.*
 381. Deprez, J., et al., *Phosphorylation and activation of heart 6-phosphofructo-2-kinase by protein kinase B and other protein kinases of the insulin signaling cascades. J Biol Chem, 1997. 272(28): p. 17269-75.*
 382. Blum, R., et al., *Ras inhibition in glioblastoma down-regulates hypoxia-inducible factor-1alpha, causing glycolysis shutdown and cell death. Cancer Res, 2005. 65(3): p. 999-1006.*
 383. Bauer, D.E., et al., *ATP citrate lyase is an important component of cell growth and transformation. Oncogene, 2005. 24(41): p. 6314-22.*
 384. Ookhtens, M., et al., *Liver and adipose tissue contributions to newly formed fatty acids in an ascites tumor. Am J Physiol, 1984. 247(1 Pt 2): p. R146-53.*
 385. Hu, X., et al., *mTOR promotes survival and astrocytic characteristics induced by Pten/AKT signaling in glioblastoma. Neoplasia, 2005. 7(4): p. 356-68.*
 386. Rebholz, H., et al., *Receptor association and tyrosine phosphorylation of S6 kinases. Febs J, 2006. 273(9): p. 2023-36.*
 387. Kovacic, S., et al., *Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart. J Biol Chem, 2003. 278(41): p. 39422-7.*
 388. Aguilar, V., et al., *S6 kinase deletion suppresses muscle growth adaptations to nutrient availability by activating AMP kinase. Cell Metab, 2007. 5(6): p. 476-87.*
 389. Blazquez, C., et al., *The AMP-activated protein kinase is involved in the regulation of ketone body production by astrocytes. J Neurochem, 1999. 73(4): p. 1674-82.*
 390. Muoio, D.M., et al., *AMP-activated kinase reciprocally regulates triacylglycerol synthesis and fatty acid oxidation in liver and muscle: evidence that sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase is a novel target. Biochem J, 1999. 338 (Pt 3): p. 783-91.*
 391. Um, S.H., et al., *Absence of S6K1 protects against age- and diet-induced obesity while enhancing insulin sensitivity. Nature, 2004. 431(7005): p. 200-5.*
 392. Sipula, I.J., N.F. Brown, and G. Perdomo, *Rapamycin-mediated inhibition of mammalian target of rapamycin in skeletal muscle cells reduces glucose utilization and increases fatty acid oxidation. Metabolism, 2006. 55(12): p. 1637-44.*
 393. Kruger, N.J. and A. von Schaewen, *The oxidative pentose phosphate pathway: structure and organisation. Curr Opin Plant Biol, 2003. 6(3): p. 236-46.*
 394. Fillgrove, K.L. and V.E. Anderson, *The mechanism of dienoyl-CoA reduction by 2,4-dienoyl-CoA reductase is stepwise: observation of a dienolate intermediate. Biochemistry, 2001. 40(41): p. 12412-21.*
 395. Ursini-Siegel, J., et al., *Elevated expression of DecR1 impairs ErbB2/Neu-induced mammary tumor development. Mol Cell Biol, 2007. 27(18): p. 6361-71.*
 396. Lee, C.H., et al., *PPARdelta regulates glucose metabolism and insulin sensitivity. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(9): p. 3444-9.*

397. Hijikata, M., et al., *Rat peroxisomal 3-ketoacyl-CoA thiolase gene. Occurrence of two closely related but differentially regulated genes.* J Biol Chem, 1990. **265**(8): p. 4600-6.
398. Uchida, Y., et al., *Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein.* J Biol Chem, 1992. **267**(2): p. 1034-41.
399. Carling, D., *The role of the AMP-activated protein kinase in the regulation of energy homeostasis.* Novartis Found Symp, 2007. **286**: p. 72-81; discussion 81-5, 162-3, 196-203.
400. Kunau, W.H., V. Dommès, and H. Schulz, *beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress.* Prog Lipid Res, 1995. **34**(4): p. 267-342.
401. Degenhardt, T., et al., *Three members of the human pyruvate dehydrogenase kinase gene family are direct targets of the peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta.* J Mol Biol, 2007. **372**(2): p. 341-55.
402. Kerbey, A.L., P.M. Radcliffe, and P.J. Randle, *Diabetes and the control of pyruvate dehydrogenase in rat heart mitochondria by concentration ratios of adenosine triphosphate/adenosine diphosphate, of reduced/oxidized nicotinamide-adenine dinucleotide and of acetyl-coenzyme A/coenzyme A.* Biochem J, 1977. **164**(3): p. 509-19.
403. Pettit, F.H., J.W. Pelley, and L.J. Reed, *Regulation of pyruvate dehydrogenase kinase and phosphatase by acetyl-CoA/CoA and NADH/NAD ratios.* Biochem Biophys Res Commun, 1975. **65**(2): p. 575-82.
404. Chen, E.I., et al., *Adaptation of energy metabolism in breast cancer brain metastases.* Cancer Res, 2007. **67**(4): p. 1472-86.
405. Villar-Palasi, C. and J.J. Guinovart, *The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase.* Faseb J, 1997. **11**(7): p. 544-58.
406. Alimonti, J.B., et al., *Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition.* J Biol Chem, 2001. **276**(10): p. 6974-82.
407. Murphy, E., *Inhibit GSK-3beta or there's heartbreak dead ahead.* J Clin Invest, 2004. **113**(11): p. 1526-8.
408. Lee, Y.I., et al., *Membrane depolarization induces the undulating phosphorylation/dephosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta, and this dephosphorylation involves protein phosphatases 2A and 2B in SH-SY5Y human neuroblastoma cells.* J Biol Chem, 2005. **280**(23): p. 22044-52.
409. Bijur, G.N. and R.S. Jope, *Proapoptotic stimuli induce nuclear accumulation of glycogen synthase kinase-3 beta.* J Biol Chem, 2001. **276**(40): p. 37436-42.
410. Heibein, J.A., et al., *Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential (Delta Psi m) and cytochrome c release are caspase independent.* J Immunol, 1999. **163**(9): p. 4683-93.
411. Thomas, D.A., et al., *Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 14985-90.
412. Waterhouse, N.J., et al., *Functional dissociation of DeltaPsi m and cytochrome c release defines the contribution of mitochondria upstream of caspase activation during granzyme B-induced apoptosis.* Cell Death Differ, 2006. **13**(4): p. 607-18.

413. Trapani, J.A. and V.R. Sutton, *Granzyme B: pro-apoptotic, antiviral and antitumor functions*. Curr Opin Immunol, 2003. **15**(5): p. 533-43.
414. Johnson, C.E., et al., *Differential Apaf-1 levels allow cytochrome c to induce apoptosis in brain tumors but not in normal neural tissues*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(52): p. 20820-5.
415. Jia, L., et al., *Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells*. Blood, 2001. **98**(2): p. 414-21.
416. Watanabe, T., et al., *Frequent LOH at chromosome 12q22-23 and Apaf-1 inactivation in glioblastoma*. Brain Pathol, 2003. **13**(4): p. 431-9.
417. Zhou, H., et al., *Akt regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level*. J Cell Biol, 2000. **151**(3): p. 483-94.
418. Shinoura, N., et al., *Transduction of Apaf-1 or caspase-9 induces apoptosis in A-172 cells that are resistant to p53-mediated apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **272**(3): p. 667-73.
419. Shinoura, N., et al., *Co-transduction of Apaf-1 and caspase-9 augments etoposide-induced apoptosis in U-373MG glioma cells*. Jpn J Cancer Res, 2001. **92**(4): p. 467-74.
420. Shinoura, N., et al., *Over-expression of APAF-1 and caspase-9 augments radiation-induced apoptosis in U-373MG glioma cells*. Int J Cancer, 2001. **93**(2): p. 252-61.
421. Starosta-Rubinstein, S., et al., *Imaging of a glioma using peripheral benzodiazepine receptor ligands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(3): p. 891-5.
422. Bertomeu, T., Boufaied, N., Boufaied, I. and Gourdeau, H. *Induction of Apoptosis in Immortalized T-Lymphocytes by TLN-4601 is Independent of Peripheral Benzodiazepine Receptor (PBR/TSPO) Binding*. in Gordon Research Conferences on CELL DEATH. 2008. Lucca (Barga) Italy.
423. Falardeau, P., Baker, S.D., Kavan, P., Samson, B., Bélanger, R., Ranger, M., Harvey, M.D., Gourdeau, H. and Batist, G. *Phase I Pharmacokinetic Study of ECO-4601, a Novel Anticancer Bifunctional Targeting Agent*. in AACR-NCI-EORTC. 2007. San Francisco, CA.
424. Guo, P., et al., *Targeted delivery of a peripheral benzodiazepine receptor ligand-gemcitabine conjugate to brain tumors in a xenograft model*. Cancer Chemother Pharmacol, 2001. **48**(2): p. 169-76.
425. Trapani, G., et al., *Peripheral benzodiazepine receptor ligand-melphalan conjugates for potential selective drug delivery to brain tumors*. Bioconjug Chem, 2003. **14**(4): p. 830-9.