



HAL
open science

Rôle de la lysyl oxidase-like-2 endothéliale et tumorale au cours de l'angiogenèse dans le carcinome du rein à cellules claires

Virginie Lelarge

► **To cite this version:**

Virginie Lelarge. Rôle de la lysyl oxidase-like-2 endothéliale et tumorale au cours de l'angiogenèse dans le carcinome du rein à cellules claires. Physiologie [q-bio.TO]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. NNT : 2015PA066421 . tel-01609776

HAL Id: tel-01609776

<https://theses.hal.science/tel-01609776>

Submitted on 4 Oct 2017

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

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

THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE

Spécialité
Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Présentée par

Mlle Lelarge Virginie

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

Rôle de la lysyl oxidase-like-2 endothéliale et tumorale au cours de
l'angiogenèse dans le carcinome du rein à cellules claires

Directeur de thèse : Catherine Monnot

soutenue le 2 octobre 2015
devant le jury composé de :

Madame le Docteur Brigitte Lelongt

Madame le Docteur Judith Favier

Monsieur le Professeur Stéphane Dedieu

Madame le Docteur Danijela Vignjevic

Monsieur le Docteur Guilhem Bousquet

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

SOMMAIRE

FIGURES ET TABLEAUX.....	4
ABREVIATIONS.....	5
CHAPITRE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	7
<u>I. L'angiogenèse.....</u>	8
A- L'angiogenèse physiologique.....	8
1) La vasculogenèse.....	9
2) L'angiogenèse au cours du développement.....	10
B- L'angiogenèse pathologique.....	12
1) Les pathologies ischémiques cardiovasculaires.....	13
2) L'angiogenèse tumorale.....	13
a. Les caractéristiques de l'angiogenèse tumorale.....	13
b. L'effet des traitements anti-angiogéniques sur la vascularisation tumorale.....	15
C- Les mécanismes moléculaires de l'angiogenèse par bourgeonnement.....	16
1) L'hypoxie.....	16
a. La famille des HIFs.....	16
b. La régulation de HIF dépendante de l'oxygène.....	17
c. La régulation de HIF indépendante de l'oxygène.....	18
d. Les gènes cibles de HIF.....	20
2) Les facteurs de croissance.....	22
a. La famille des VEGFs.....	22
i. Les VEGFs et leurs récepteurs.....	22
ii. Les PIGFs.....	25
b. Les PDGFs et leurs récepteurs.....	28
c. Les FGFs et leurs récepteurs.....	29
D- Les mécanismes cellulaires de l'angiogenèse par bourgeonnement.....	30
1) La différenciation tip cells/stalk cells.....	30
2) La formation de la lumière.....	32
3) Le recrutement des péricytes.....	34
<u>II. Le microenvironnement tumoral.....</u>	35
A- Les cellules stromales.....	35
1) Les cellules endothéliales.....	35
2) Les cellules inflammatoires.....	36
3) Les fibroblastes associés au cancer.....	37
B- La matrice extracellulaire stromale.....	39
1) Les collagènes.....	41
a. La famille des collagènes.....	41
b. Le collagène de type I.....	42
2) La fibronectine.....	44
3) La membrane basale.....	46
C- La matrice extracellulaire endothéliale.....	47
1) Structure et assemblage de la matrice extracellulaire endothéliale.....	47

2) Remodelage de la matrice extracellulaire endothéliale au cours de l'angiogenèse..	48
a. Dégradation de la matrice extracellulaire endothéliale.....	48
i. Les métalloprotéases matricielles.....	49
ii. La libération de facteurs angiogeniques.....	50
iii. Le rôle des MMPs au cours de l'angiogenèse tumorale.....	50
b. Synthèse d'une nouvelle matrice extracellulaire endothéliale.....	51
i. Le collagène IV.....	51
ii. Les laminines.....	52
iii. Les héparanes sulfates protéoglycans et les nidogènes.....	55
iv. Les protéines matricielles.....	57
c. Les interactions cellules-matrice extracellulaire via les intégrines.....	58
i. La famille des intégrines.....	58
ii. Les intégrines au cours de l'angiogenèse.....	59
III. Le carcinome du rein à cellules claires	62
A- Les différents types de carcinomes du rein.....	62
B- Le carcinome du rein à cellules claires (ccRCC)	63
1) Les différents types de mutations impliquées dans le ccRCC.....	63
2) Les voies de signalisations impliquées dans le ccRCC.....	64
3) L'angiogenèse et les traitements anti-angiogéniques dans le ccRCC.....	66
IV. Les lysyl oxydases	69
A- La famille des lysyl oxydases.....	69
1) La structure des lysyl oxydases.....	69
2) L'activité catalytique des lysyl oxydases.....	70
a. L'activation des LOXs.....	70
b. Les substrats des LOXs.....	71
c. La réaction enzymatique des LOXs.....	72
d. L'inhibition de l'activité catalytique des LOXs.....	74
3) Le rôle physiologique des lysyl oxydases.....	75
4) Le rôle pathologique des lysyls oxydases.....	75
B- La lysyl oxydase like 2 (LOXL2)	77
1) Expression tissulaire et cellulaire de LOXL2.....	77
2) Le rôle physiologique de LOXL2.....	78
3) Le rôle de LOXL2 dans les cancers.....	79
CHAPITRE II : OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	82
CHAPITRE III : RESULTATS	85
I. Expression de LOXL2 dans le ccRCC humain	86
A- Expression tissulaire de LOXL2.....	86
B- Expression cellulaire de LOXL2.....	86
II. Rôle de LOXL2 au cours de l'angiogenèse tumorale	89
A- Rôle de LOXL2 microenvironnementale.....	89
B- Rôle de LOXL2 sécrétée par les cellules endothéliales.....	89
C- Rôle de LOXL2 sécrétée par les cellules tumorales.....	91

<u>III. Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au cours de l'angiogenèse du ccRCC régulée par LOXL2</u>	95
A- Rôle de LOXL2 sécrétée par les cellules tumorales de ccRCC sur la migration et la prolifération des cellules endothéliales.....	95
B- Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'angiogenèse du ccRCC induite par LOXL2	96
CHAPITRE IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES	118
<u>I. Expression tissulaire et cellulaire de LOXL2</u>	119
<u>II. LOXL2 dans l'angiogenèse tumorale</u>	122
<u>III. Les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de l'angiogenèse du ccRCC régulée par LOXL2</u>	124
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	127
ANNEXE	155
The interaction of heparan sulfate proteoglycans with endothelial transglutaminase-2 limits VEGF165-induced angiogenesis (Beckouche et al., 2015)	

FIGURES ET TABLEAUX

- Figure 1 : Les différents types de vaisseaux sanguins et leur composition
- Figure 2 : Représentation en 3D et en 2D du processus d'angiogenèse par intussusception
- Figure 3 : Représentation schématisée de l'angiogenèse par bourgeonnement
- Figure 4 : Comparaison de la microvascularisation entre tissus normaux et tumeurs
- Figure 5 : Schématisation de l'évolution de la vascularisation tumorale au cours de thérapies anti-angiogéniques
- Figure 6 : La régulation de HIF par l'oxygène
- Figure 7 : La régulation de la synthèse de HIF indépendante de l'oxygène
- Figure 8 : Gènes dont la transcription est activée par HIF
- Tableau 1 : Gènes associés à la MEC et régulés par HIF dans les cellules endothéliales
- Figure 9 : Les différents types de VEGFs et leur(s) récepteur(s) associé(s)
- Figure 10 : Les principales isoformes du VEGF-A
- Figure 11 : Les différentes isoformes de PlGFs et leur(s) récepteur(s) associé(s)
- Figure 12 : Les mécanismes moléculaires de l'angiogenèse induite par le PlGF
- Figure 13 : Les mécanismes moléculaires de la différenciation tip cells contre stalk cells
- Figure 14 : Les mécanismes moléculaires de la formation de la lumière d'un vaisseau
- Figure 15 : Le microenvironnement tumoral
- Figure 16 : Illustration de la signalisation intercellulaire dans le microenvironnement tumoral
- Figure 17 : Remodelage du collagène de type I au cours de la tumorigenèse
- Figure 18 : Structure d'un monomère de fibronectine avec ses différents partenaires d'interaction
- Figure 19 : Assemblage de la membrane basale
- Figure 20 : Assemblage du collagène de type IV
- Figure 21 : Structure des laminines 411 et 511 avec leurs sites de liaison potentiels aux intégrines
- Figure 22 : Ensemble des intégrines exprimées par les cellules endothéliales
- Figure 23 : Schéma récapitulatif des différents traitements utilisés dans le cas du ccRCC
- Figure 24 : Structure des membres de la famille des lysyl oxydases
- Figure 25 : Stœchiométrie de la réaction catalysée par les lysyl oxydases
- Figure 26 : La réaction de déamination par les lysyl oxydases sur les collagènes
- Figure 27 : La réaction de déamination par les lysyl oxydases sur l'élastine
- Figure 28 : Caractérisation de l'origine des CAFs
- Figure 29 : Caractérisation de l'expression de HIF-1 α par les RCC-4
- Figure 30 : Effet de la mutation de VHL sur la prolifération et la migration des RCC-4
- Figure 31 : Caractérisation de l'expression de LOXL2 par les RCC-4
- Figure 32 : Contribution de LOXL2 endothéliale sur l'expression de facteurs angiogéniques
- Figure 33 : Contribution de LOXL2 tumorale sur l'expression de CREB par les cellules endothéliales

ABBREVIATIONS

ANGPTL4 = Angiopoietin like-4
β-APN = beta-Aminopropionitrile
BMDC = Bone marrow derived cells
BMP-1 = Bone morphogenetic protein 1
CAF = Cancer associated fibroblast
CAM = Chorioallantoic membrane
cAMP = cyclic Adenosine monophosphate
CMLV = Cellule musculaire lisse vasculaire
CREB = cAMP response element binding protein
DLL4 = Delta-like 4
EGFL7 = Epidermal growth factor like-7
EMT = Transition épithélio-mésenchymateuse
EPC = Endothelial progenitor cells
ERK = Extracellular signal-regulated kinase
FAK = Focal adhesion kinase
bFGF = basic Fibroblast growth factor
GPI = Glycosyl phosphatidyl inositol
GSK3 = Glycogen synthase kinase 3
HGF = Hepatocyte growth factor
HIF = Hypoxia inducible factor
HRE = Hypoxia response element
HS = Heparan sulfate
HSGP = Heparan sulfate proteoglycan
HUVEC = Human umbilical vein endothelial cells
LOX = Lysyl oxydase
LOXL = Lysyl oxydase like
LTQ = Lysyl tyrosylquinone
MAPK = Mitogen-activated protein kinase
MEC = Matrice extracellulaire
MMP = Matrix metalloproteinase
mTLD = mammalian Tolloid
mTLL = mammalian Tolloid like
mTOR = mammalian Target of rapamycin
NHDF = Normal human dermal fibroblast
PDGF = Platelet derived growth factor
PHD = Prolyl hydroxylase
PI3K = Phosphatidylinositol 3-kinase
PIGF = Placenta growth factor
RCC = Renal cell carcinoma
ccRCC = Clear cell renal cell carcinoma
SRCR = Scavenger receptor cysteine-rich
TAM = Tumor associated macrophage
TG2 = Transglutaminase 2
TGF-β = Transforming growth factor-beta

TIMP = Tissue inhibitors of metalloproteinases
VEGF = Vascular endothelial growth factor
VEGFR = Vascular endothelial growth factor receptor
VHL = von Hippel Lindau

CHAPITRE I : CONTEXTE SCIENTIFIQUE

I. L'angiogenèse

A- L'angiogenèse physiologique

Le système vasculaire possède plusieurs fonctions. Il permet un apport en oxygène et nutriments, essentiels à l'organisme mais également l'évacuation des déchets produits par le métabolisme cellulaire. Les vaisseaux sanguins sont composés d'une monocouche de cellules endothéliales, interconnectées les unes aux autres. Ces cellules sont polarisées et alignées dans la direction du flux sanguin pour une perfusion optimale du vaisseau.

La stabilisation et la maturation du capillaire nouvellement formé sont indispensables pour son fonctionnement et son intégrité. Ces processus peuvent se mettre en place notamment grâce aux cellules murales qui se divisent en deux types cellulaires : les péricytes et les cellules musculaires lisses vasculaires (CMLV). Ces cellules se distinguent par leur densité, leur morphologie, leur localisation et l'expression de marqueurs spécifiques. Elles possèdent cependant des fonctions communes comme la régulation de la perméabilité vasculaire et du diamètre des vaisseaux. En effet, les cellules murales permettent de réguler le flux sanguin par contraction (Peppiatt et al., 2006). Les CMLV sont associées aux artères et aux veines autour desquelles elles forment de multiples couches concentriques. Les péricytes sont eux associés aux vaisseaux de diamètre inférieur (artérioles, capillaires et veinules) et partagent leur membrane basale (décrite dans la partie II) avec les cellules endothéliales. Ils sont associés soit de façon isolée, soit en formant une simple monocouche souvent discontinue autour de l'endothélium. De plus, la morphologie des péricytes et le degré avec lequel ils s'associent à l'endothélium varient entre les différents tissus (Gaengel et al., 2009). (Figure 1)

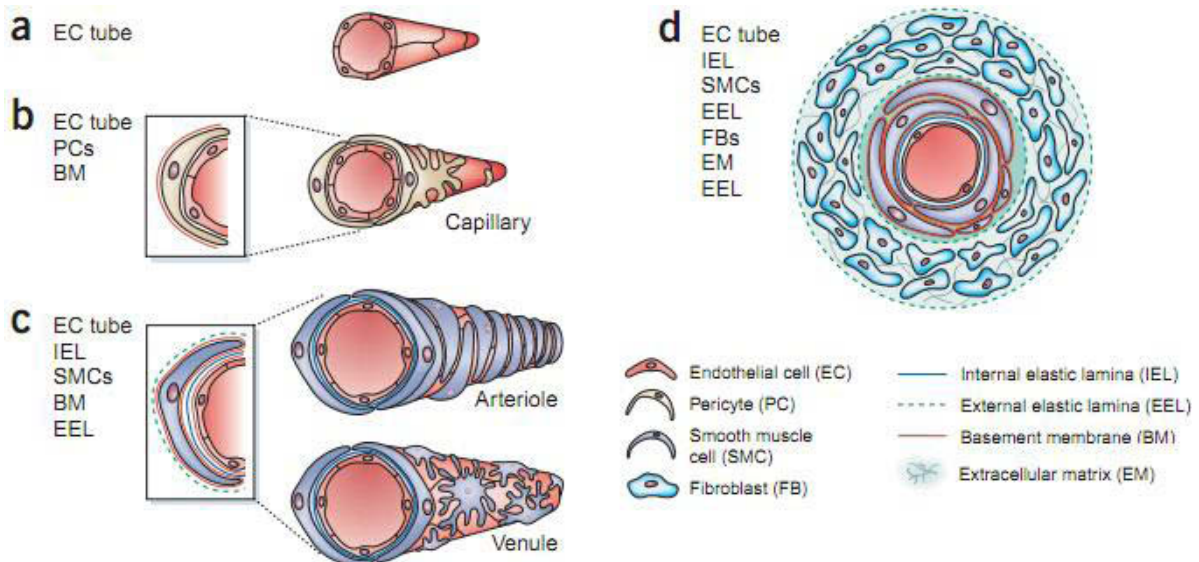


Figure 1 : Les différents types de vaisseaux sanguins et leur composition. a- Les vaisseaux naissants sont composés d'une monocouche de cellules endothéliales. b- Les capillaires constituent les vaisseaux les plus abondants de l'organisme. Ils sont entourés d'une couche épaisse de péricytes. c- Les artérioles et les veinules ont une couverture de cellules murales plus importante que celle des capillaires. Les artérioles sont recouvertes de cellules musculaires lisses tandis que les veinules sont entourées de péricytes. d- Les vaisseaux plus larges sont constitués de trois couches successives : l'intima composée de cellules endothéliales, la média composée de cellules musculaires lisses et l'adventice constituée de fibroblastes, d'une matrice extracellulaire et d'une lame élastique. (Adapté de (Jain, 2003))

Au cours du développement, deux mécanismes distincts vont se succéder, afin de permettre la formation d'un réseau vasculaire fonctionnel : la vasculogenèse et l'angiogenèse.

1) La vasculogenèse

La vasculogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de progéniteurs endothéliaux : les hémangioblastes et les angioblastes. Au cours de l'embryogenèse, les hémangioblastes qui ont une origine extra-embryonnaire forment des îlots sanguins. Ainsi, les hémangioblastes situés au niveau de la partie externe des îlots sanguins, prolifèrent et se différencient en cellules endothéliales, alors que les hémangioblastes internes donnent les cellules souches hématopoïétiques. La coalescence des îlots sanguins voisins via les cellules endothéliales permet la formation d'un réseau de capillaire appelé plexus primaire. Les angioblastes, qui ont une origine intra-embryonnaire, forment quant à eux l'aorte dorsale et la veine cardinale (Flamme et al., 1997).

La vasculogenèse se produit principalement au cours du développement embryonnaire, cependant ce processus a également été décrit chez l'adulte avec une vasculogenèse dite post-natale. Elle peut se faire via le recrutement de progéniteurs cellulaires dérivant de la moelle osseuse appelés BMDCs (Bone-marrow-derived cells) et/ou de progéniteurs endothéliaux appelés EPC (Endothelial progenitor cells) provenant de la paroi vasculaire. Ces cellules progénitrices circulantes s'incorporent dans les

vaisseaux en croissance et participent ainsi à la réparation de vaisseaux endommagés chez l'adulte sain, mais également à l'expansion de vaisseaux pathologiques, notamment au cours de la progression tumorale (Carmeliet and Jain, 2011).

2) L'angiogenèse au cours du développement

L'angiogenèse qui correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants, permet le remodelage du réseau vasculaire formé lors de la vasculogenèse. L'angiogenèse est un processus complexe qui requiert un contrôle fin et la coordination des cellules endothéliales. Il existe deux types d'angiogenèse : l'angiogenèse par intussusception et l'angiogenèse par bourgeonnement.

L'angiogenèse par intussusception permet la formation de nouveaux vaisseaux à partir de la division interne d'un vaisseau ou plexus préexistant. Ce processus est initié par l'invagination des parois vasculaires opposées dans la lumière du vaisseau, créant une zone de contact entre les deux couches de cellules endothéliales. La bicouche endothéliale est ensuite perforée en son centre et un pilier transluminal est formé, entraînant une réorganisation des jonctions intercellulaires. Cette étape est suivie par l'invasion de péricytes et de myofibroblastes impliqués dans le dépôt de fibres de collagène, permettant un élargissement rapide du pilier (Djonov et al., 2003). (Figure 2) L'angiogenèse par intussusception est un processus rapide qui peut se produire en quelques heures, voire quelques minutes. Ce type d'angiogenèse ne nécessite pas une prolifération importante des cellules endothéliales, contrairement à l'angiogenèse par bourgeonnement qui est un processus plus lent.

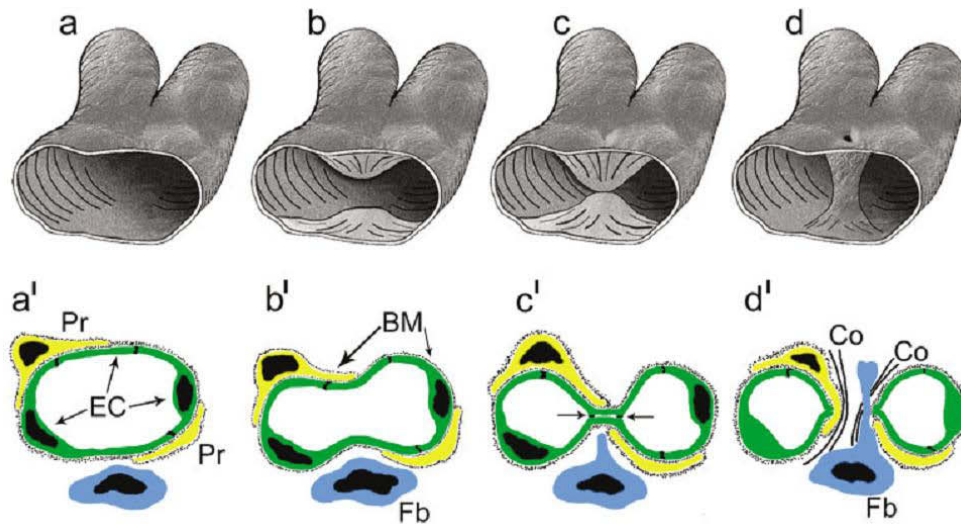


Figure 2 : Représentation en 3D (a-d) et en 2D (a'-d') du processus d'angiogenèse par intussusception. a, b, a', b' : Le processus commence par l'invagination des parois vasculaires opposées dans la lumière du vaisseau. Après l'établissement d'un contact entre les cellules endothéliales (c, c'), la bicouche endothéliale (EC) et la membrane basale (BM) sont centralement perforées et le pilier nouvellement formé croît après l'invasion des péricytes (Pr) et des fibroblastes (Fb). Ces derniers produisent des fibres de collagène (Co) (d, d'). (Burri et al., 2004)

L'angiogenèse par bourgeonnement est un processus dynamique qui requiert de nombreuses étapes individuelles telles que : la prolifération des cellules endothéliales, leur migration directionnelle, l'établissement de connections appropriées entre les cellules, la formation de tubes présentant une lumière (appelée tubulogenèse) mais également le remodelage et l'élagage des vaisseaux formés, ainsi que le recrutement de cellules murales permettant la maturation du vaisseau. (Figure 3)

Dans cette introduction, seul l'ensemble des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans l'angiogenèse par bourgeonnement seront abordés (voir parties I.C. et I.D.). En effet, il s'agit du processus angiogénique qui a été le mieux caractérisé dans la littérature. De plus, notre laboratoire a développé des méthodes d'angiogenèse *in vitro*, que j'ai utilisé au cours de ma thèse, permettant d'étudier plus particulièrement ce processus.

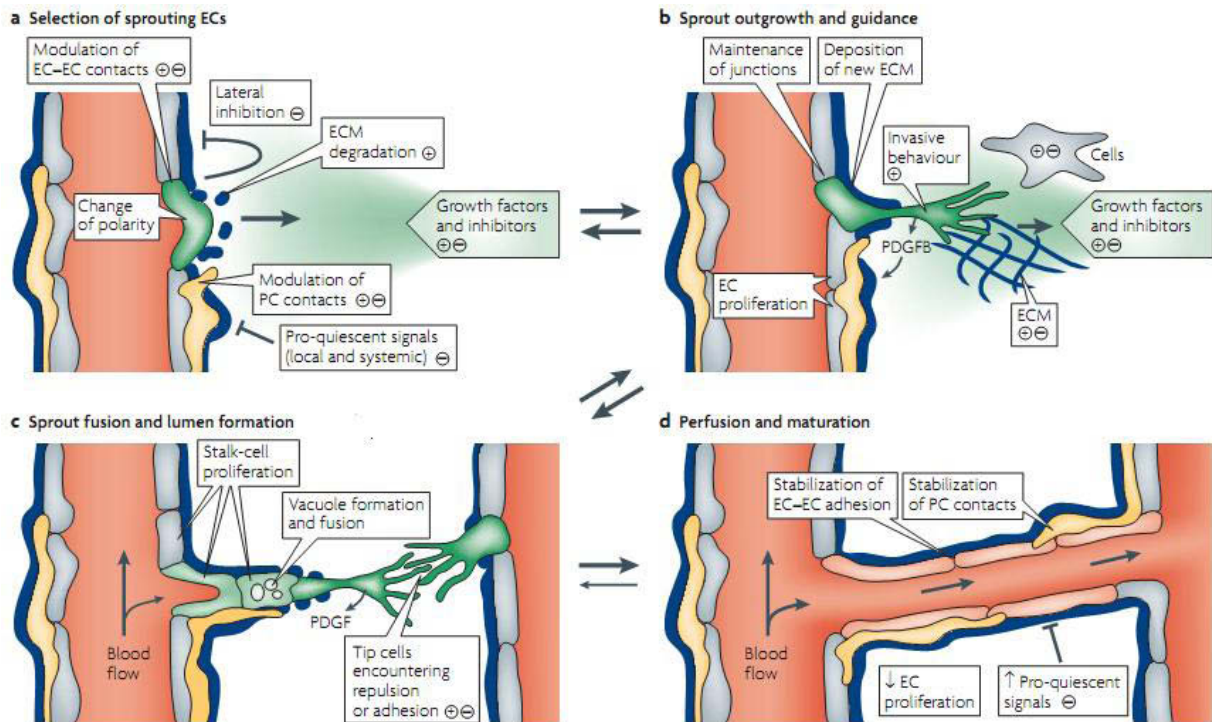


Figure 3 : Représentation schématique de l'angiogenèse par bourgeonnement. a- Le bourgeonnement de cellules endothéliales est contrôlé par la balance entre facteurs pro- et anti- angiogéniques. Il requiert notamment la modulation des contacts entre les cellules endothéliales ainsi que la dégradation locale de la MEC. b- La croissance du bourgeon est guidée par un gradient de VEGF. c- Les cellules endothéliales situées à l'extrémité du bourgeon régulent sa fusion avec les vaisseaux sanguins adjacents. La lumière du vaisseau se forme à partir des cellules endothéliales situées plus en arrière. d- La fusion entre les cellules endothéliales entraîne la formation d'un vaisseau avec une lumière continue, permettant au sang de circuler. (Adapté de (Adams and Alitalo, 2007))

B- L'angiogenèse pathologique

Chez l'adulte, la néo-vascularisation est quiescente, avec seulement 0,01% des cellules endothéliales en division. Cependant, la formation de nouveaux vaisseaux peut être observée chez l'adulte, dans certains contextes physiologiques tels que la cicatrisation ou encore le cycle utérin, mais également dans des contextes pathologiques, tels que les ischémies cardiovasculaires ou la croissance tumorale. Les pathologies ischémiques cardiovasculaires seront abordées de façon succincte dans la partie suivante car elles ne constituent pas le sujet de mon travail de thèse.

Dans les tissus normaux, l'action des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF (Vascular endothelial growth factor), le FGF (Fibroblast growth factor) et le PDGF (Platelet derived growth factor) (voir partie I.C.2.a, b et c) est contrebalancée par l'action des facteurs anti-angiogéniques, telle que la thrombospondine (voir partie II.C.2.b.iv). Cette balance bascule en faveur des facteurs pro-angiogéniques à la fois dans les contextes physiologiques et pathologiques. Cependant, dans les contextes tumoraux, ce déséquilibre appelé « switch » angiogénique persiste (Carmeliet and Jain, 2011).

1) Les pathologies ischémiques cardiovasculaires

Les maladies cardiovasculaires représentent la cause de mortalité la plus importante dans le monde. En fonction de l'organe touché, les maladies cardiovasculaires peuvent être classifiées en maladie coronarienne, vasculaire cérébrale, artérielle périphérique et aortique (thoracique et abdominale). Ces maladies sont associées à une obstruction partielle ou complète du réseau vasculaire, due majoritairement à l'athérosclérose. La restauration du flux sanguin est donc primordiale dans l'ensemble de ces pathologies. Les traitements actuellement mis en place ont pour but d'induire l'angiogenèse dans le tissu lésé, avec notamment l'utilisation de facteurs de croissance. Parmi eux, le VEGF et le FGF sont les plus couramment utilisés. Cependant, le VEGF, en plus de son rôle pro-angiogénique, augmente la perméabilité des vaisseaux, entraînant leur instabilité. Des traitements combinés de facteurs de croissance associant par exemple le PDGF au VEGF, permettent de stabiliser les vaisseaux grâce au recrutement de cellules murales (Richardson et al., 2001). Cependant, les effets thérapeutiques des facteurs de croissance sont limités, de part leur diffusion rapide, leur faible biodisponibilité et leur courte demi-vie *in vivo*. De plus, ces thérapies requièrent souvent l'administration de doses supra-physiologiques ou de multiples injections, conduisant à la formation non contrôlée et excessive de vaisseaux dans des tissus non ciblés. Au cours de ces dernières années, de nouvelles thérapies ont été développées, combinant notamment cellules souches et thérapie génique (Deveza et al., 2012). Enfin, notre équipe a démontré que l'angiopoïétin-like 4 (ANGPTL4) pourrait constituer un candidat thérapeutique intéressant, de part son rôle protecteur de l'intégrité vasculaire en contrecarrant l'effet du VEGF, au cours de l'ischémie cardiaque et cérébrale (Galaup et al., 2012 et Bouleti et al., 2013).

2) L'angiogenèse tumorale

a. Les caractéristiques de l'angiogenèse tumorale

Dans les tumeurs, la diffusion de l'oxygène est limitée à une distance comprise entre 100 et 200 μm à partir des vaisseaux (Carmeliet and Jain, 2000). L'angiogenèse est donc un processus majeur indispensable à la croissance tumorale et à l'initiation du processus métastatique, et est due à la dérégulation de la balance entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. De nombreux signaux peuvent être à l'origine de l'augmentation de l'expression de facteurs pro-angiogéniques tels que : un stress métabolique comme une diminution du pH, un stress mécanique qui peut être généré par une augmentation de la pression interstitielle due à la prolifération cellulaire, une réponse immunitaire/inflammatoire via l'infiltration des cellules immunitaires/inflammatoires dans le tissu et des mutations génétiques avec l'activation d'oncogènes ou la délétion de gènes suppresseurs de tumeur, qui contrôlent la production de régulateurs de l'angiogenèse (Carmeliet and Jain, 2000).

Les facteurs pro- et anti-angiogéniques peuvent provenir à la fois des cellules tumorales, des cellules stromales (cellules endothéliales, inflammatoires et fibroblastes associés au cancer) mais également du sang et de la matrice extracellulaire (MEC) (Fukumura et al., 1998a).

Les vaisseaux tumoraux peuvent croître par bourgeonnement, intussusception ou par incorporation de précurseurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse (BMDC). Dans d'autres cas, les cellules tumorales détournent la vascularisation préexistante (« vessel co-option ») ou encore elles créent leurs propres canaux pour le transport de fluides dont le sang au cours d'un processus appelé « vascular mimicry ». Enfin, les vaisseaux tumoraux pourraient croître à partir de cellules souches cancéreuses ayant la capacité de se différencier en cellules endothéliales. (Carmeliet and Jain, 2011) Ces vaisseaux se caractérisent par de nombreuses anomalies structurales incluant une taille et une forme irrégulières, des branchements irréguliers et une diminution des jonctions intercellulaires. (Figure 4) De plus, dans certaines tumeurs, les pores présents dans les vaisseaux sont cent fois plus grands que ceux observés dans les vaisseaux normaux (Hobbs et al., 1998). Ainsi, ces anomalies structurales engendrent des anomalies fonctionnelles telles qu'une haute résistance luminale, une augmentation de la perméabilité des cellules endothéliales et un flux sanguin chaotique et variable (McDonald and Baluk, 2005).

Les vaisseaux tumoraux peuvent être hétérogènes, c'est-à-dire composés à la fois de cellules endothéliales et tumorales, pour former des vaisseaux dits « mosaïques », établissant ainsi une porte de sortie pour les cellules tumorales qui sont exposées à la circulation sanguine (Jain, 2003).

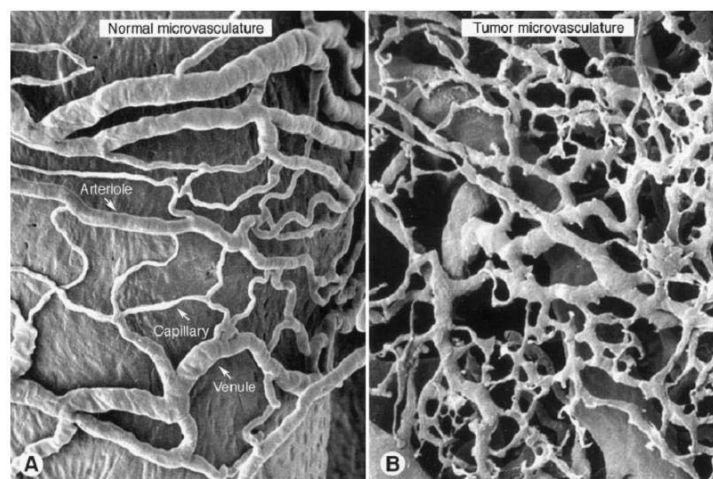


Figure 4 : Comparaison de la microvascularisation entre tissus normaux et tumeurs. A : Vasa vasorum de sinus carotidiens de rat ayant une organisation simple et séparés en artérioles, capillaires et veinules. B : Xénogreffe humaine chez des souris nude montrant des vaisseaux tumoraux désorganisés, présentant de nombreux branchements et bourgeonnements et sans organisation hiérarchique (artérioles, capillaires et veinules). (Adapté de (McDonald and Baluk, 2005))

b. L'effet des traitements anti-angiogéniques sur la vascularisation tumorale

Dès 1971, Juda Folkman montrait que la croissance tumorale et la dissémination métastatique étaient dépendantes de l'angiogenèse et donc que l'inhibition du processus angiogénique pouvait être une stratégie efficace contre la croissance tumorale (Folkman, 2000). Ainsi, depuis ces quarante dernières années, le développement de traitements anti-angiogéniques constitue un enjeu thérapeutique majeur, mais les mécanismes mis en jeu au cours de l'angiogenèse restent encore peu connus. En effet, même si beaucoup de facteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale ont été identifiés, permettant de contribuer au développement de nombreux traitements, ces derniers se sont souvent avérés peu efficaces chez l'homme. C'est le cas par exemple des thérapies dirigées contre le VEGF, qui constitue l'une des cibles principales de l'angiogenèse tumorale. En effet, ces traitements induisent l'élagage et le remodelage des vaisseaux tumoraux, contribuant à leur « normalisation », c'est-à-dire à l'amélioration de leur structure et de leur fonction. En retour, la diminution de l'hypoxie (voir partie suivante) et de la pression sanguine entraînent une amélioration des résultats de chimio-, radio- et immuno-thérapies. Néanmoins, si l'agent anti-angiogénique est trop puissant ou à une dose trop élevée, l'élagage des vaisseaux tumoraux est trop important. La vascularisation tumorale devient alors insuffisante pour permettre l'administration de médicaments et l'apparition de zones hypoxiques au sein de la tumeur entraîne une résistance aux traitements, contribuant à accroître les capacités métastatiques des cellules tumorales. Ces tumeurs peuvent également utiliser d'autres facteurs impliqués dans l'angiogenèse, afin d'engendrer à nouveau la formation de vaisseaux anormaux (Jain, 2001 ; Jain, 2005 et Jain and Carmeliet, 2012). (Figure 5) Des stratégies thérapeutiques alternatives demeurent donc nécessaires, avec notamment la mise en place de combinaisons de thérapies.

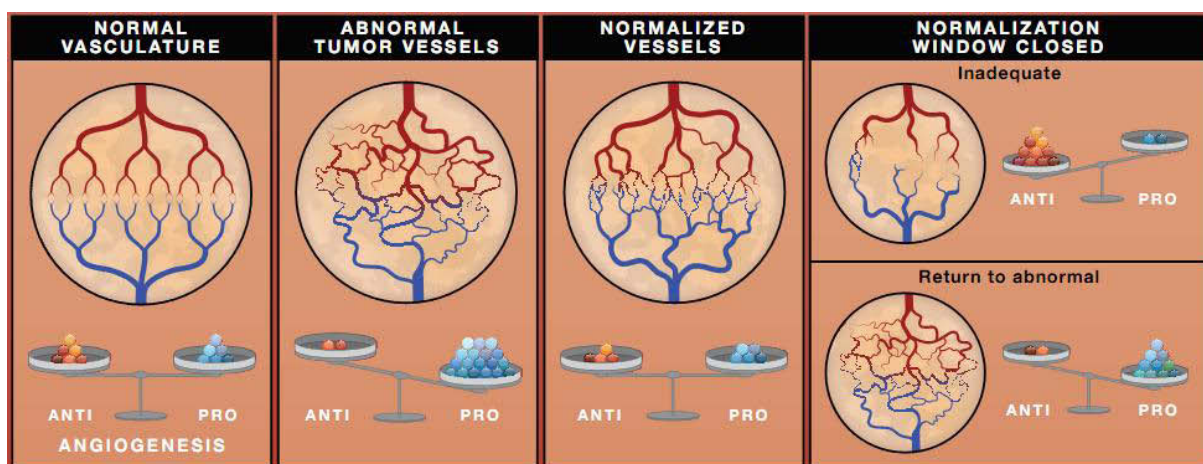


Figure 5 : Schématisation de l'évolution de la vascularisation tumorale au cours de thérapies anti-angiogéniques. A : Vascularisation normale. B : Vascularisation tumorale anormale. C : Normalisation des vaisseaux après un traitement anti-angiogénique de la tumeur. D : La fenêtre de normalisation est fermée. (haut) Le traitement anti-angiogénique peut conduire à un élagage trop important des vaisseaux, entraînant l'impossibilité de traiter la tumeur avec d'autres thérapies. (bas) D'autres facteurs de croissance sont capables de surmonter l'inhibition du VEGF, rendant la tumeur résistante aux traitements anti-angiogéniques et le retour à une vascularisation anormale. (Jain and Carmeliet, 2012)

C- Les mécanismes moléculaires de l'angiogenèse par bourgeonnement

De nombreux mécanismes moléculaires participent à l'angiogenèse par bourgeonnement. L'hypoxie et le VEGF constituent les deux stimuli principaux impliqués dans ce processus.

1) L'hypoxie

Dans un tissu, le phénomène d'hypoxie correspond à une diminution de la pression partielle (pO_2) en oxygène. Il peut se produire dans des contextes physiologiques, comme au cours de l'embryogenèse ou d'un effort physique prolongé (Ryan et al., 1998) ; mais également dans des contextes pathologiques tels que les maladies vasculaires aiguës ou chroniques, les maladies pulmonaires et les cancers. Dans ces conditions, l'organisme est capable de mettre en place une réponse dite adaptative, via une série de mécanismes visant à réduire les effets délétères induits par le manque d'oxygénation. Cette réponse adaptative implique la régulation de l'expression d'un grand nombre de gènes, conduisant à la régulation du métabolisme cellulaire, de la vasodilatation, de l'érythropoïèse, de l'angiogenèse et du remodelage cardiaque (Semenza, 2000). Cependant, si cette baisse est sévère ou prolongée, elle peut conduire à la mort cellulaire.

De nombreux facteurs sont induits en réponse à l'hypoxie, parmi eux, les facteurs de transcription HIFs (Hypoxia inducible factor) sont les plus importants.

a. La famille des HIFs

HIF est un hétérodimère appartenant à la famille des facteurs de transcription hélice-boucle-hélice-PAS (bHLH/PAS). HIF est composé de deux sous-unités : une sous-unité α (HIF-1 α , 2 α ou 3 α), dont la

demi-vie est régulée par la concentration en oxygène et d'une sous unité β (HIF-1 β ou ARNT), maintenue à une concentration constante dans la cellule. HIF-1 α est exprimée de façon ubiquitaire alors que HIF-2 α (EPAS1) est exprimée de façon spécifique selon les tissus, incluant les cellules endothéliales, les hépatocytes, les cellules interstitielles du rein, les cardiomyocytes et les astrocytes (Talks et al., 2000). HIF-3 α constitue un régulateur dominant négatif de la voie HIF (Hara et al., 2001). Dans les cancers, les cellules endothéliales répondent à l'hypoxie via HIF, qui régule de nombreux processus impliqués dans la vascularisation et la progression tumorale, comme la prolifération, la migration, l'adhésion cellulaires et la perméabilité vasculaire. En effet, HIF induit la transcription de nombreux gènes cibles qui seront abordés un peu plus bas. L'augmentation de l'expression de HIF dans les tumeurs est associée avec une augmentation de la malignité, une diminution de la réponse aux thérapies et de l'espérance de vie (Evans et al., 2012). HIF constitue donc une cible majeure dans les traitements visant à ralentir la progression tumorale, par son action sur tous les types cellulaires et en particulier les cellules tumorales et les cellules endothéliales, comme décrit ci-dessous.

b. La régulation de HIF dépendante de l'oxygène

En normoxie, les sous-unités HIF- α sont régulées de façon post-traductionnelle. Elles sont hydroxylées en permanence sur deux résidus proline, par des enzymes appelées les prolyl hydroxylases (PHD 1 à 3). Cette hydroxylation entraîne la reconnaissance de HIF- α par le suppresseur de tumeur von Hippel Lindau (VHL). VHL, qui appartient au complexe ubiquitine-ligase E3 composé notamment des élongines B et C, de la culline 2 et de RBX-1 (Ring-box protein-1), entraîne la poly-ubiquitinylation de HIF- α et sa dégradation par le protéasome. HIF est également régulé par une asparaginyl hydroxylase, appelée « Factor inhibiting HIF-1 » (FIH1), qui hydroxyle une asparagine située en C-terminal de la sous-unité α , empêchant l'interaction de HIF-1 α avec les co-activateurs p300/CBP et donc l'activité transcriptionnelle de HIF (Lando et al., 2002).

En hypoxie, les PHD sont inactives et ne peuvent plus modifier HIF- α . VHL ne peut donc plus de lier à HIF- α , entraînant son accumulation dans le cytoplasme. HIF- α interagit alors avec HSP90 (Heat shock protein 90) induisant sa translocation au noyau et son association avec la sous-unité HIF- β . HIF peut ainsi se fixer aux gènes contenant des éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) en présence de co-activateurs (p300 et CBP pour CREB-binding protein) et entraîner la transcription de gène cibles (voir partie I.C.1.d). (Figure 6)

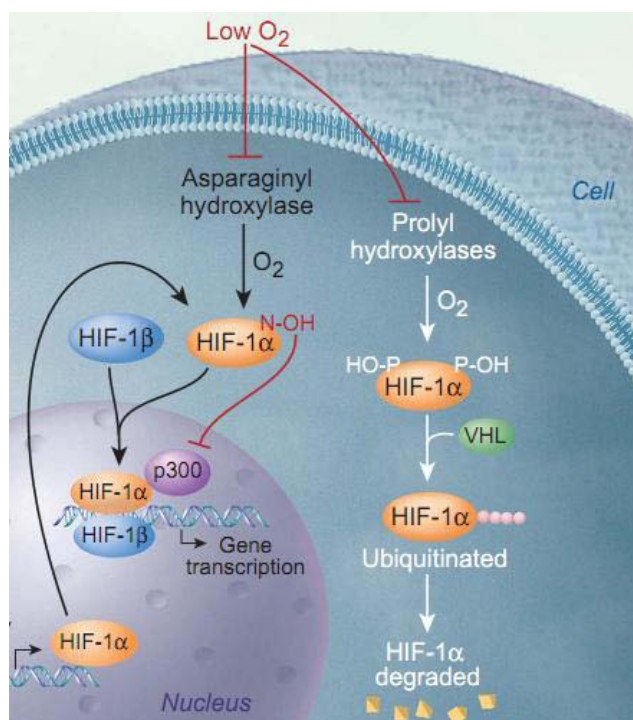


Figure 6 : La régulation de HIF par l'oxygène. En présence d'oxygène, les prolyl-hydroxylases sont activées et entraînent la dégradation de la sous-unité HIF-1 α par le protéasome. En hypoxie, les prolyl-hydroxylases sont inactives et HIF promeut la transcription de nombreux gènes cibles. L'hydroxylation de HIF-1 α par les asparaginyl hydroxylases constitue une voie secondaire de régulation. (Adapté de (Marx, 2004))

c. La régulation de HIF indépendante de l'oxygène

Si la concentration en oxygène constitue le mécanisme majeur de la régulation de HIF, il n'est cependant pas le seul. En effet, les facteurs de croissance, les cytokines ainsi que d'autres molécules de signalisation peuvent stimuler l'expression de HIF indépendamment de l'hypoxie. Contrairement à l'hypoxie qui permet d'activer HIF dans tous les types cellulaires, les facteurs de croissance permettent l'expression de HIF dans un type cellulaire particulier, dont les cellules endothéliales (Medici and Olsen, 2012 et Park et al., 2014). De plus, l'hypoxie contribue à inhiber la dégradation de HIF par le protéasome, alors que les facteurs de croissance vont au contraire promouvoir sa synthèse sans avoir d'effet sur sa dégradation (Semenza, 2003). Ainsi, l'augmentation de l'expression de HIF par les facteurs de croissance est induite via l'activation des voies PI3K (Phosphatidylinositol 3-kinase) ou MAPK (Mitogen-activated protein kinase), notamment dans les cancers de la prostate, du sein et du colon (Zhong et al., 2000 ; Laughner et al., 2001 et Fukuda et al., 2002). (Figure 7)

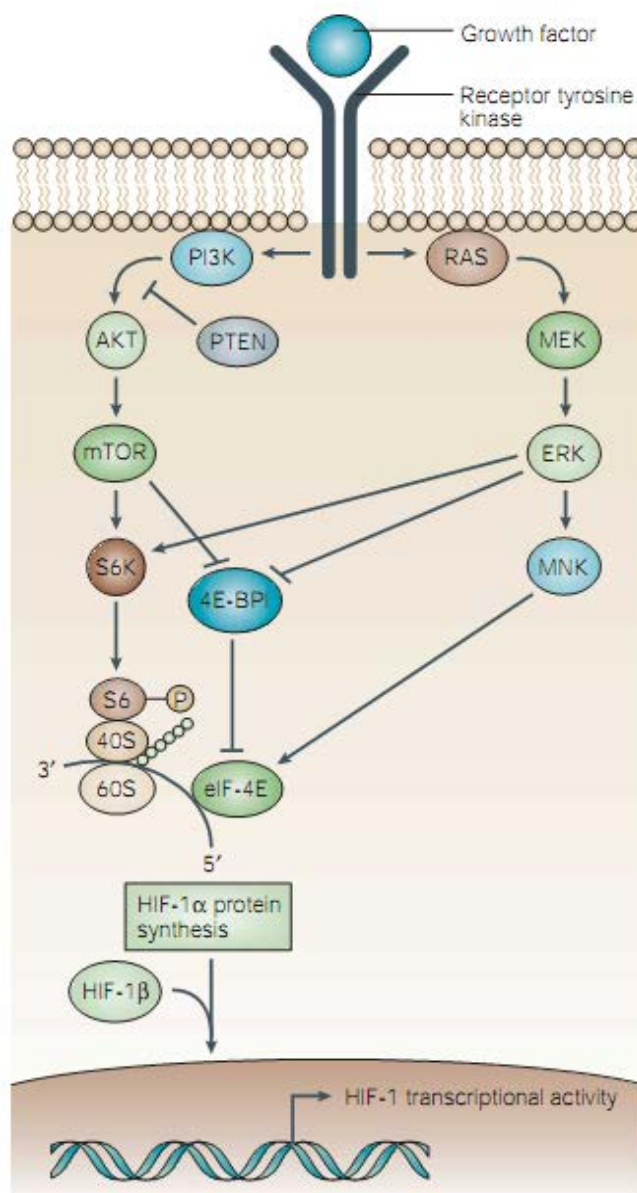


Figure 7 : La régulation de la synthèse de HIF indépendante de l'oxygène. La liaison d'un facteur de croissance sur un récepteur tyrosine-kinase active les voies de signalisation PI3K et MAPK. PI3K active AKT qui active mTOR (mammalian Target of rapamycin) par phosphorylation, tandis que RAS active MEK qui active ERK (Extracellular-signal regulated kinase) qui active MNK également par une série de phosphorylations. ERK et mTOR phosphorylent S6K (S6 kinase) qui en retour phosphorylent la protéine ribosomale S6 et 4E-BP1 (4E-binding protein), empêchant l'inactivation de eIF-4E (eukaryotic translation initiation factor 4E) par 4E-BP1. MNK phosphoryle eIF-4E permettant la transcription de HIF-1 α . HIF-1 α promeut ensuite la transcription de nombreux gènes cibles. (Semenza, 2003)

De nombreuses altérations génétiques inactivant des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *VHL*, *PTEN* et *ARF* ou au contraire, activant des oncogènes tels que *ERBB2* et *SRC*, contribuent également à l'activation de HIF indépendamment de l'hypoxie (Bertout et al., 2008). Certaines de ces altérations, dont celles touchant *VHL*, seront décrites dans la partie concernant le carcinome du rein à cellules claires.

d. Les gènes cibles de HIF

Les HIFs régulent la transcription de plusieurs centaines de gènes impliqués dans l'homéostasie tissulaire et cellulaire, en réponse à une adaptation des cellules à l'hypoxie. (Figure 8) Un nombre important de ces gènes codent pour des protéines qui promeuvent l'initiation et la croissance tumorale mais également le processus métastatique. Parmi elles, on trouve des protéines impliquées dans : le recrutement de cellules inflammatoires (SDF-1 α , CXCR4), la prolifération (cycline D2, IGF-2), la survie (érythropoïétine), le métabolisme/la fonction mitochondriale (enzymes glycolytiques, PDK-1), la fonction de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène de type I, la lysyl oxydase like-2), la motilité (c-MET, SPF-1 α), l'angiogenèse (VEGF, PDGF) et la régulation du pH (anhydrase carbonique 9) (Chowdhury et al., 2008 ; Germain et al., 2010 et Semenza, 2010). (Tableau 1)

L'expression de plusieurs gènes cibles de HIF, tel que le VEGF, est induite par l'hypoxie dans la plupart des types cellulaires. Cependant, l'expression de la majorité des gènes cibles de HIF est induite par l'hypoxie dans un type cellulaire spécifique. De plus, certains gènes sont exclusivement activés par HIF-1 α ou HIF-2 α alors que d'autres sont activés par les deux concomitamment. Cependant, HIF-1 α induit préférentiellement des gènes impliqués dans le métabolisme du glucose (Hu et al., 2003 et Wang et al., 2005) alors que HIF-2 α est impliqué dans la régulation de gènes importants pour la croissance tumorale, la progression du cycle cellulaire et la maintenance du caractère pluripotent des cellules souches.

Bien que HIF-1 α et HIF-2 α puissent se compenser partiellement l'un et l'autre dans les cellules endothéliales au cours du développement embryonnaire, la modulation de l'activité vasculaire et de l'angiogenèse en réponse à l'hypoxie, semble être majoritairement régulée par HIF-2 α , fortement exprimée dans les cellules endothéliales. En effet, une étude a montré que les souris invalidées pour *Hif-2 α* dans les cellules endothéliales, se développent normalement mais présentent une augmentation de la perméabilité vasculaire ainsi qu'une ultra-structure endothéliale aberrante (Skuli et al., 2009). De plus, les cellules endothéliales invalidées pour *Hif-2 α* , isolées *in vitro*, ont permis l'identification de gènes cibles tels que delta-like-4 (DLL4), l'angiopoïétine-2 (facteur de croissance régulant l'angiogenèse), la fibronectine, et les récepteurs 1 et 2 du VEGF (VEGFR) (Skuli et al., 2009).

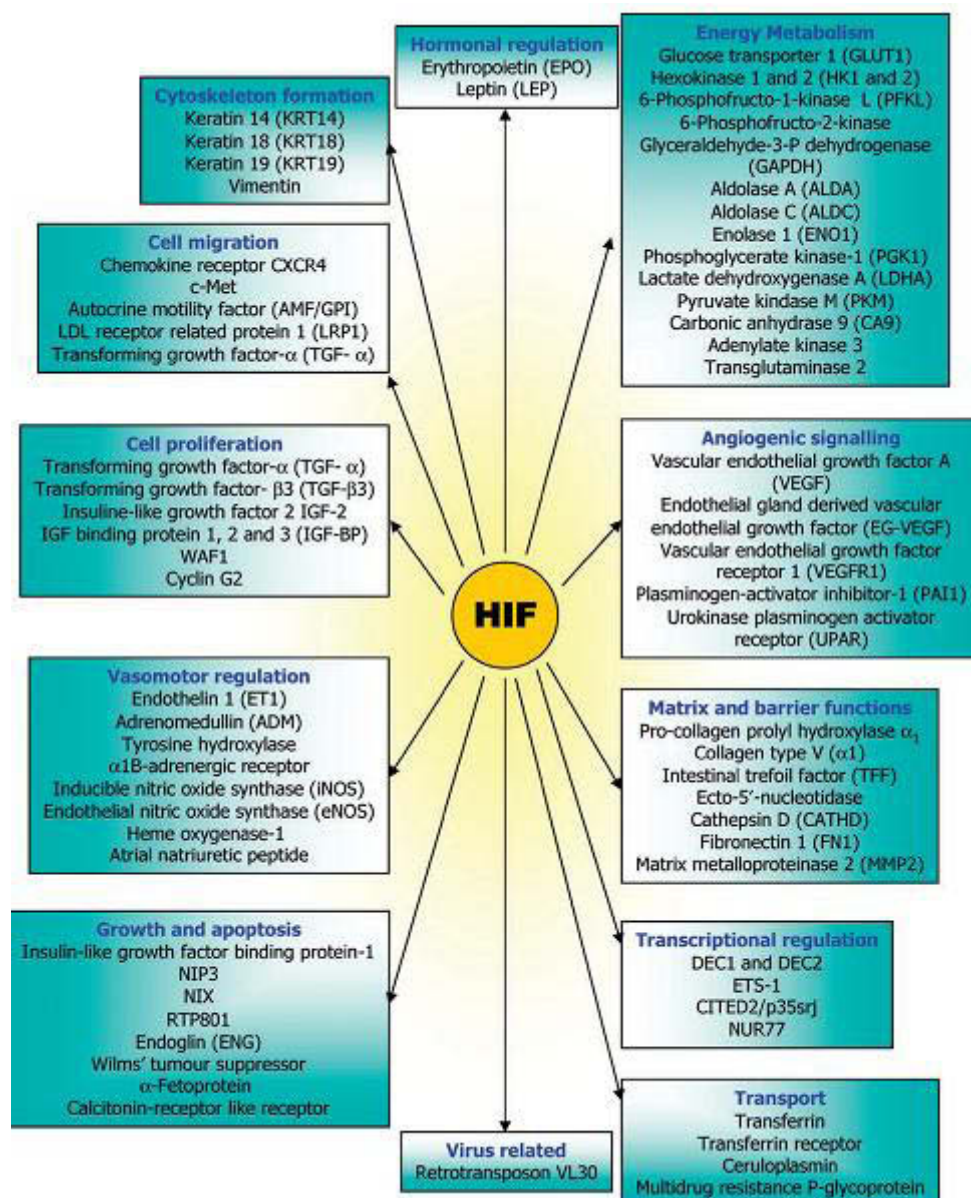


Figure 8 : Gènes dont la transcription est activée par HIF. Les gènes cibles de HIF sont impliqués dans de multiples processus biologiques. (Chowdhury et al., 2008)

Protein family	Stimulus
ECM components	
Fibronectin	Hypoxia, DFO, AdHIF-2 α
Collagen α 2(I) (<i>Col1a2</i>)	Hypoxia, AdHIF-1 α , AdHIF-2 α
Collagen α 1(IV) (<i>Col4a1</i>)	Hypoxia, AdHIF-1 α
Collagen α 2(IV) (<i>Col4a2</i>)	Hypoxia, AdHIF-1 α , AdHIF-2 α
Collagen α 5(IV) (<i>Col4a5</i>)	Hypoxia
Collagen α 6(IV) (<i>Col4a6</i>)	Hypoxia
Collagen α 1(V) (<i>Col5a1</i>)	Hypoxia, DFO, AdHIF-1 α
Collagen α 1(XVIII) (<i>Col18a1</i>)	Hypoxia, AdHIF-1 α
Heparan sulfate proteoglycans	
Perlecan	AdHIF-2 α
Biglycan	Hypoxia, AdHIF-1 α
Glypican	Hypoxia, AdHIF-1 α
ECM-modifying enzymes	
Lysyl-hydroxylase 1 (<i>PLOD1</i>)	Hypoxia, AdHIF-1 α
Lysyl-hydroxylase 2 (<i>PLOD2</i>)	Hypoxia, AdHIF-1 α , AdHIF-2 α
Procollagen prolyl-4-hydroxylase 1 (<i>P4HA1</i>)	Hypoxia, AdHIF-1 α , AdHIF-2 α
Procollagen prolyl-4-hydroxylase 2 (<i>PAHA2</i>)	Hypoxia, DFO, AdHIF-1 α , AdHIF-2 α
Lysyl oxidase (<i>LOX</i>)	Hypoxia, DFO, AdHIF-1 α
Lysyl oxidase like 2 (<i>LOXL2</i>)	Hypoxia, DFO, AdHIF-1 α
Matricellular	
TSP1	Hypoxia, DFO
ANGPTL4	Hypoxia, DFO, AdHIF-1 α , AdHIF-2 α
CTGF	Hypoxia
Angiopoietin 2	AdHIF-2 α
Fibulin 2	AdHIF-2 α
Growth factors	
VEGF-A	Hypoxia, AdHIF-1 α , AdHIF-2 α
VEGF-C	Hypoxia, AdHIF-1 α
TGF- β	Hypoxia, AdHIF-1 α , AdHIF-2 α
PDGF-B	Hypoxia, DFO, AdHIF-1 α
IGFBP3	Hypoxia, DFO, AdHIF-1 α , AdHIF-2 α

ANGPTL4, angiopoietin-like 4; CTGF, connective tissue growth factor; ECM, extracellular matrix; IGFBP3, insulin-like growth factor binding protein 3; PDGF; platelet-derived growth factor; TSP, thrombospondin; VEGF, vascular endothelial growth factor. This table summarizes in-vitro studies performed on endothelial cells cultured under 1 or 2% oxygen (hypoxia) or treated by desferoxamine (DFO) or infected with adenovirus encoding a constitutively active form of HIF-1 α (AdHIF-1 α) or with adenovirus encoding HIF-2 α (AdHIF-2 α).

Tableau 1 : Gènes associés à la MEC et régulés par HIF dans les cellules endothéliales. HIF régule l'expression de nombreux gènes associés à la MEC des cellules endothéliales tels que des gènes codant pour des constituants de la MEC ou encore des enzymes de modification de la MEC. On notera la présence de la lysyl oxydase like-2. (Germain et al., 2010)

2) Les facteurs de croissance

De nombreux facteurs de croissance et les voies de signalisation qui leur sont associées contrôlent le comportement des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse par bourgeonnement.

a. La famille du VEGF

i. Les VEGFs et leurs récepteurs

La famille du VEGF est composée de sept membres : le VEGF-A, le VEGF-B, le VEGF-C, le VEGF-D, le VEGF-E, le VEGF-F et le placenta growth factor (PlGF). Ces facteurs sont des glycoprotéines sécrétées

par de nombreux types cellulaires et dont l'expression est régulée majoritairement par l'hypoxie. Il existe trois récepteurs principaux du VEGF : le VEGFR1, le VEGFR2 et le VEGFR3 ; ainsi que deux co-récepteurs non enzymatiques : la neuropiline 1 et la neuropiline 2. Ces VEGFRs sont des récepteurs transmembranaires possédant une activité tyrosine kinase. Ainsi, la liaison du ligand sur son récepteur entraîne une homo- ou une hétéro-dimérisation de ce dernier et son activation par phosphorylation, conduisant au recrutement de plusieurs voies de signalisation. Le VEGF-A se lie au VEGFR2 et VEGFR1. Les VEGF-C et VEGF-D se lient aux VEGFR2 et 3. Enfin, le PlGF (voir partie suivante) et le VEGF-B se lient exclusivement au VEGFR1. (Figure 9)

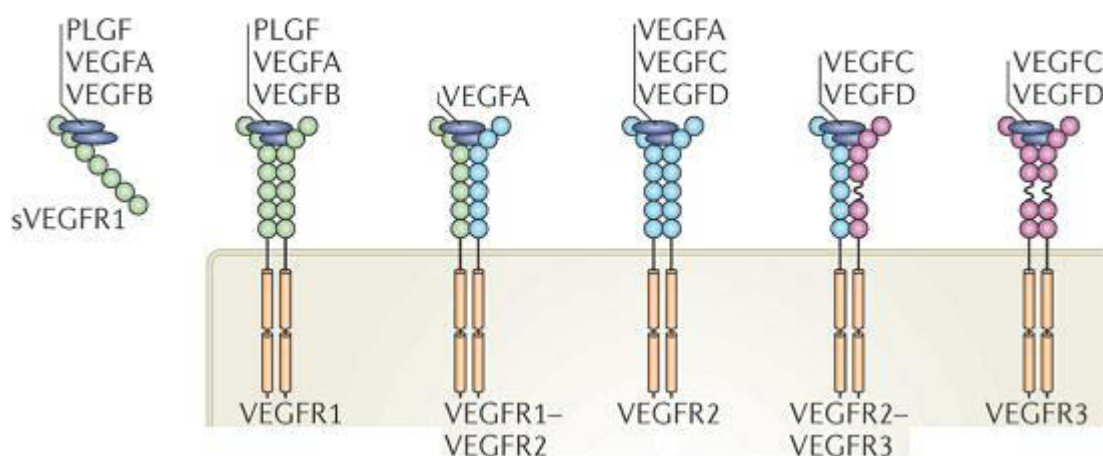


Figure 9 : Les différents types de VEGFs et leur(s) récepteur(s) associé(s). Les VEGFs se lient sur trois récepteurs différents au VEGF (VEGFRs) homo- ou hétéro- dimériques. (Adapté de (Herbert and Stainier, 2011))

Le VEGF-A représente le membre le plus important de la famille des VEGFs, dans la régulation de la formation des vaisseaux sanguins, aussi bien dans des contextes physiologiques que pathologiques. En effet, le VEGF-A est essentiel à la vasculogénèse et à l'angiogénèse au cours du développement embryonnaire, mais également dans la néo-vascularisation des tumeurs, où il se lie préférentiellement sur le VEGFR2. Des études ont montré que l'inactivation d'un allèle du *Vegf-a* chez la souris, entraîne une létalité embryonnaire au cours du développement entre les jours embryonnaires 11 et 12 (E11-E12), dû à des défauts d'organisation des vaisseaux (Carmeliet et al., 1996 et Ferrara et al., 1996). Chez l'homme, il existe cinq isoformes différentes du VEGF-A, issus de l'épissage alternatif de son ARN messager : VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 et VEGF206. Les VEGF121 et VEGF165 et leurs équivalents chez d'autres espèces (VEGF120 et VEGF164 respectivement chez la souris) sont les deux isoformes majeures. Chacune de ces protéines possède des fonctions différentes et une biodisponibilité variable au cours de la morphogénèse vasculaire (Adams and Alitalo, 2007 ; Lodomery et al., 2007 et Carmeliet and Jain, 2011). Par exemple, le VEGF165 s'associe à la matrice extracellulaire via sa liaison aux héparanes sulfates, formant un

gradient de VEGF et promouvant ainsi l'extension des filopodes, la migration directionnelle des cellules endothéliales et le branchement des vaisseaux sanguins. Notre équipe a montré très récemment que la transglutaminase 2 (TG2) (enzyme sécrétée dans la MEC endothéliale) limite l'angiogenèse induite par le VEGF165, en se liant aux héparanes sulfates (Beckouche et al., 2015) (cf. article annexe).

A contrario, le VEGF121 est incapable de se lier aux héparanes sulfates, il diffuse donc librement, permettant la prolifération des cellules endothéliales mais pas leur migration (Ruhrberg et al., 2002). (Figure 10)

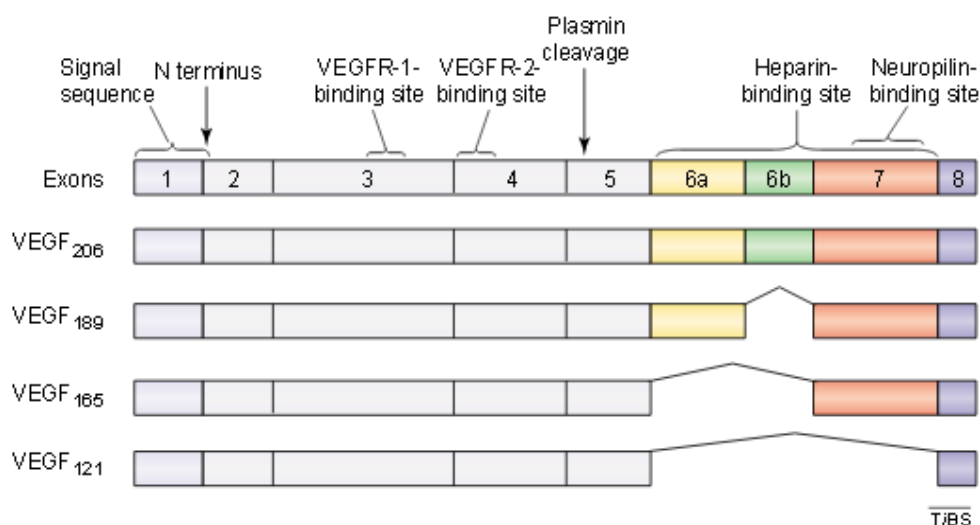


Figure 10 : Les principales isoformes du VEGF-A. L'épissage alternatif de l'ARNm *vegfa* produit différentes isoformes qui varient en fonction du nombre d'acides aminés les constituant. Les domaines d'interaction avec les VEGFR1 et 2, les héparanes sulfates protéoglycans, ainsi que la neuropiline sont représentés. (Cross et al., 2003)

Le VEGF-A peut également se lier au VEGFR1. Le VEGFR1 possède une plus forte affinité pour le VEGF-A que le VEGFR2. Cependant, l'activité tyrosine kinase du VEGFR1 est plus faible que celle du VEGFR2, après liaison du VEGF-A. Les souris invalidées pour le *Vegfr1* meurent entre E8,5-E9 et présentent une production excessive de cellules endothéliales et une désorganisation vasculaire (Fong et al., 1995 et Fong et al., 1999). Ces résultats suggèrent que le VEGFR1 joue un rôle de régulateur négatif de l'angiogenèse en séquestrant le VEGF-A via sa forte affinité, empêchant sa fixation sur le VEGFR2.

Dans de nombreux cancers, les membres de la famille du VEGF et leurs récepteurs sont surexprimés, constituant des cibles majeures dans les thérapies anti-angiogéniques. Ainsi, de petites molécules inhibant l'activité tyrosine kinase des récepteurs tels que le Sorafenib (ou Nexavar) ou encore le Sunitinib (ou Sutent), ont été développées par les industries pharmaceutiques, notamment pour le traitement de carcinomes rénaux et hépatiques. Des anticorps monoclonaux inhibiteurs dirigés

directement contre les VEGFs comme le Bevacizumab (ou Avastin) est utilisé dans le traitement de tumeurs colorectales, du poumon, du sein, du rein, ou encore les glioblastomes (Ferrara et al., 2004). (voir partie III.B.3) D'autres stratégies comme des pièges anti-VEGF ou des anticorps inhibiteurs de ces récepteurs comme le Ramucirumab ont été également développées (Lu et al., 2002).

ii. Les PlGFs

Le PlGF est une glycoprotéine qui existe sous quatre isoformes (PlGF-1 à -4), issues de l'épissage alternatif de leur ARN messenger. Le PlGF est le plus souvent homodimérique mais peut former des hétérodimères en se liant avec le VEGF-A. Les PlGF-1 et -2 correspondent aux isoformes prédominantes. Chez la souris, une seule forme de PlGF est exprimée, équivalente au PlGF-2 humain. Le PlGF se fixe uniquement sur le VEGFR1 ainsi que sur sa forme soluble (sVEGFR1) qui ne possède ni de domaine transmembranaire, ni de domaine intracellulaire. Cependant, les PlGF-2 et -4 possèdent des domaines de liaison à l'héparine et peuvent également se lier sur les neuropilines 1 et 2, de façon dépendante de l'héparine. Au contraire, les PlGF-1 et -3 ne possèdent pas de domaines de liaison à l'héparine et diffusent librement. Lorsque le PlGF forme un hétérodimère avec le VEGF, celui-ci peut soit se fixer sur le VEGFR1, soit sur un dimère de VEGFR1 et VEGFR2. (Figure 11)

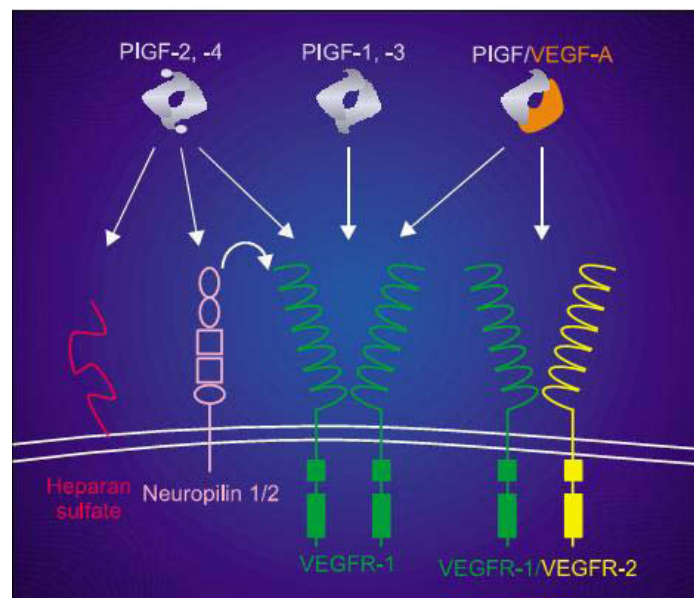


Figure 11: Les différentes isoformes de PlGFs et leur(s) récepteur(s) associé(s). Les PlGFs se lient principalement au VEGFR1 mais certaines isoformes peuvent se lier aux héparanes sulfates et aux neuropilines 1 et 2. De plus, le PlGF peut former un hétérodimère avec le VEGF-A qui se lie soit au VEGFR1, soit au dimère VEGFR1/VEGFR2. (De Falco, 2012)

Contrairement au VEGF, le PlGF n'est pas indispensable au cours du développement. En effet, les souris invalidées pour le *Plgf* ne présentent pas de phénotype anormal (Carmeliet et al., 2001). Cependant, Carmeliet et al. ont montré dans cette étude l'importance du PlGF dans l'angiogenèse

chez ces souris, au cours de la cicatrisation mais aussi dans des contextes pathologiques tels que l'inflammation, l'ischémie de la patte ou encore le cancer.

Au cours du développement, où l'expression du PlGF est minimale, le VEGFR1 agit comme un piège du VEGF-A, empêchant l'activation excessive du VEGFR2 (voir partie précédente). Dans les contextes pathologiques tel que le cancer, l'expression du PlGF augmente via les cellules tumorales et stromales, entraînant sa fixation sur le VEGFR1. Cette interaction conduit à une augmentation de la biodisponibilité du VEGF-A, sa fixation sur le VEGFR2 et l'activation de voies pro-angiogéniques (Park et al., 1994 et Carmeliet et al., 2001). La fixation du PlGF sur le VEGFR-1 induit ainsi l'activation de voies de signalisation via la phosphorylation de résidus tyrosine, différents de ceux phosphorylés après fixation du VEGF-A, au niveau du domaine intracellulaire. Ces voies de signalisation sont impliquées dans la migration, la prolifération ainsi que la survie des cellules endothéliales (Ziche et al., 1997 ; Adini et al., 2002 et Fischer et al., 2007) mais aussi dans la migration des cellules tumorales (Fischer et al., 2007), l'activation et le recrutement de macrophages (Selvaraj et al., 2003) et le recrutement de progéniteurs endothéliaux (EPC) (Li et al., 2006) dans les tumeurs. De plus, la stimulation du VEGFR1 par le PlGF amplifie la signalisation du VEGFR2 par le VEGF-A par transphosphorylation de résidus lysine au niveau du VEGFR2, permettant d'augmenter le processus angiogénique (Autiero et al., 2003). (Figure 12)

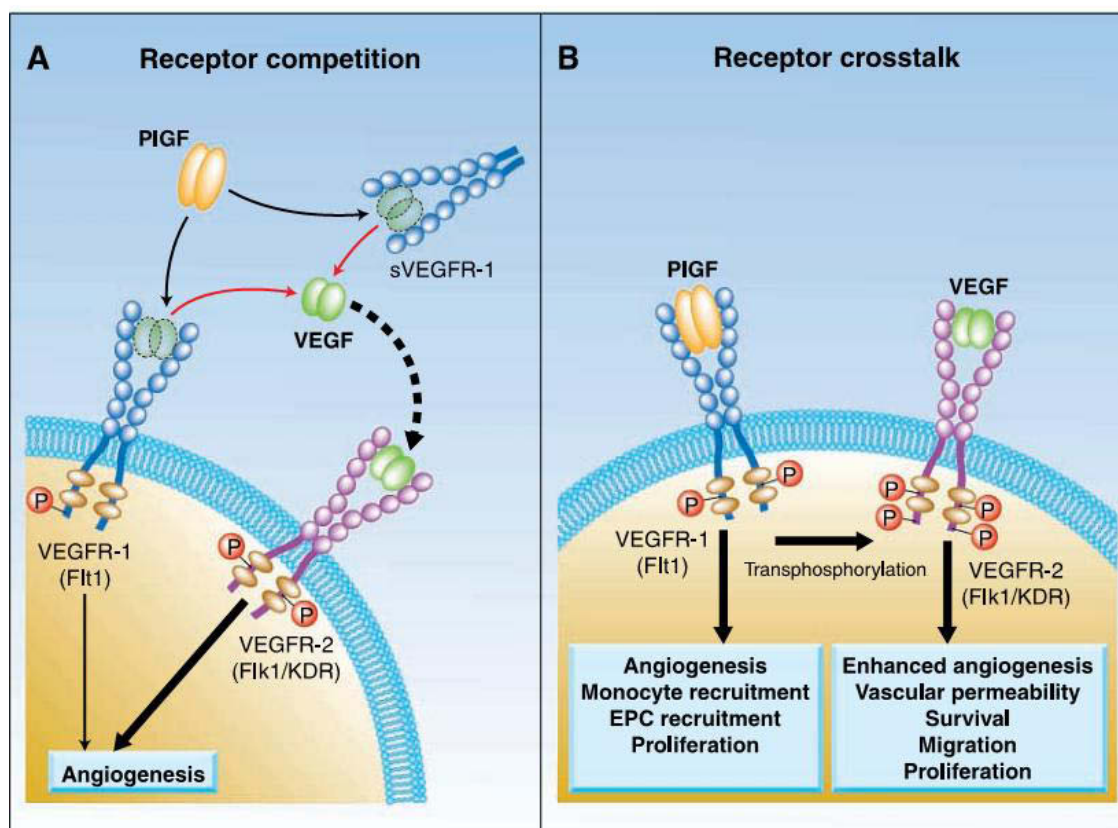


Figure 12 : Les mécanismes moléculaires de l'angiogenèse induite par le PlGF. A- Au cours du développement, le PlGF est faiblement exprimé et la liaison du VEGF-A au VEGFR1 limite le processus angiogénique. Au contraire, dans des contextes pathologiques, l'expression du PlGF est augmentée, conduisant à l'augmentation de la biodisponibilité du VEGF-A et sa fixation au VEGFR2, induisant le processus angiogénique. B- La fixation du PlGF sur le VEGFR1 entraîne l'activation de voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse. De plus, la stimulation du VEGFR1 par le PlGF amplifie la signalisation du VEGFR2 par le VEGF-A par transphosphorylation, conduisant à l'augmentation de l'angiogenèse. (Loges et al., 2009)

L'expression du PlGF dans les tumeurs a été décrite pour la première fois dans le carcinome du rein (Takahashi et al., 1994) et a été observée depuis dans de nombreux autres types de cancers. Cependant, si l'expression du PlGF est détectée dans le stroma de ces tumeurs, sa sécrétion par les cellules tumorales qui en sont issues n'est pas toujours observée, contrairement au VEGF. C'est le cas par exemple dans le carcinome du rein, où le PlGF est exprimé par les cellules stromales mais pas par les cellules tumorales (Takahashi et al., 1999).

L'effet du PlGF sur l'angiogenèse tumorale est un sujet controversé. En effet, certaines études ont montré que l'inhibition du PlGF dans les tumeurs augmente le processus angiogénique (Xu et al., 2006 et Bais et al., 2010). Cependant, la majorité d'entre elles s'accordent à montrer que le PlGF promeut l'angiogenèse et la croissance tumorale et confère une résistance aux traitements anti-angiogéniques. En outre, en plus de son effet stimulateur sur la prolifération et la migration des cellules tumorales et endothéliales, le PlGF régule également le processus métastatique en participant à la formation de niches métastatiques (Kaplan et al., 2005). Enfin, tout comme le VEGF, l'expression du PlGF est majoritairement régulée par l'hypoxie. Il constitue donc un régulateur clef de

l'échappement tumoral et représente une cible thérapeutique majeure pour inhiber l'angiogenèse dans le cancer. Fisher et al. ont montré qu'un anticorps bloquant dirigé contre le PlGF (empêchant sa fixation au VEGFR1) diminue la croissance tumorale et le processus métastatique dans plusieurs types de tumeurs, dont certaines sont résistantes aux inhibiteurs de VEGFR, dans des modèles syngéniques ou de xéno greffes chez la souris. De plus, cette étude montre que cet anticorps améliore l'efficacité des chimiothérapies et des inhibiteurs de VEGFR (Fischer et al., 2007). Van de Veire et al. ont quant à eux confirmé l'efficacité et la spécificité de cet anticorps pour certains types de tumeurs et ont montré son rôle dans la normalisation des vaisseaux sans affecter leur densité (Van de Veire et al., 2010).

b. Les PDGFs et leurs récepteurs

La famille du PDGF est constituée de cinq polypeptides : quatre homodimères avec PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC et PDGF-DD et un hétérodimère avec PDGF-AB. Le PDGF-A et le PDGF-C sont exprimés majoritairement dans les cellules épithéliales, le muscle et les progéniteurs neuronaux. L'expression du PDGF-D est moins bien caractérisée. Le PDGF-B est majoritairement exprimé par les cellules endothéliales, les mégacaryocytes et les neurones. Ce sont des glycoprotéines dont la fonction est régulée par deux récepteurs ayant une activité tyrosine kinase : le PDGFR- α et le PDGFR- β , capables de se lier sous forme homo- ou hétéro- dimérique, permettant leur autophosphorylation et l'activation de nombreuses voies de signalisation. Le PDGFR- α est fortement exprimé par des progéniteurs mésenchymateux dans le poumon, la peau et l'intestin et des progéniteurs d'oligodendrocytes. Le PDGFR- β est exprimé dans le mésenchyme, et plus particulièrement au niveau des cellules murales.

La voie de signalisation du PDGF-B/PDGFR- β joue un rôle primordial dans l'angiogenèse et plus particulièrement dans la maturation des vaisseaux sanguins. En effet, les souris *Pdgfb*^{-/-} meurent à partir de E17 jusqu'au jour 2 après la naissance. Cette létalité est causée par des défauts de formation des glomérules rénaux, due à l'absence de cellules mésangiales, une dilatation du cœur et des vaisseaux (tortueux et présentant des micro-anévrismes) et l'absence de couverture péricytaire au niveau des vaisseaux du cerveau, du cœur, des poumons et du tissu adipeux, causant des hémorragies sévères (Leveen et al., 1994 et Lindahl et al., 1997). Par ailleurs, ces souris présentent un phénotype similaire à celui observé pour les souris invalidées pour le *Pdgfr- β* (Soriano, 1994 et Hellstrom et al., 1999). Ainsi, au cours de l'angiogenèse, le PDGF-B produit par les cellules endothéliales permet le recrutement des cellules murales (CMLV et péricytes), via sa fixation sur le PDGFR- β .

Lorsque le PDGF-B est sécrété par les cellules endothéliales, celui-ci se fixe à la MEC et plus particulièrement aux HSPGs (Héparanes sulfates protéoglycans). Les souris invalidées pour le domaine de rétention du PDGF-B aux HSPGs présentent également des défauts de couverture péricytaire (Abramsson et al., 2007), suggérant que le PDGF-B doit être lié à la MEC pour permettre le recrutement des péricytes.

Dans les cancers, le rôle du PDGF-B dans l'angiogenèse tumorale, au niveau des interactions entre cellules endothéliales et péricytes, est controversé, dû à ses relations complexes avec les autres facteurs de croissance et son implication dans la normalisation des vaisseaux tumoraux (Carmeliet and Jain, 2011) (voir partie I.D.3.).

c. Les FGFs et leurs récepteurs

Chez l'homme, la famille du FGF est constituée de 22 membres présentant entre 30 et 70% d'homologie dans leur séquence primaire d'acides aminés. Le FGF-1 (ou acide FGF (aFGF)) et le FGF-2 (ou basic FGF (bFGF)) représentent les membres les mieux caractérisés de la famille du FGF. Ces deux protéines ne possèdent pas de peptide signal et ne sont donc pas sécrétées en dehors de la cellule, contrairement à la plupart des facteurs de croissance.

Cependant, il existe des modes de transports alternatifs, différents de la sécrétion, permettant de retrouver le FGF en dehors de la cellule. Ainsi, le FGF2 serait relargué en dehors de la cellule notamment via le clivage de vésicules membranaires (Taverna et al., 2003). Les FGF-1 et -2 possèdent une forte affinité aux HSPGs. Les HSPGs sont exprimés à la surface de nombreux types cellulaires ainsi qu'au niveau de la MEC. Ils jouent un rôle important dans la biodisponibilité et l'interaction des FGFs avec les cellules endothéliales (Presta et al., 2005). Les HSPGs ont également une fonction de co-récepteurs avec les FGFRs, permettant de moduler l'effet du FGF *in vitro* et *in vivo* et donc de réguler l'activation de voies de signalisation (Matsuo and Kimura-Yoshida, 2013). Les études menées sur des souris invalidées pour les différents membres de la famille des FGFs apportent très peu d'informations sur leur rôle, et notamment au cours de l'angiogenèse. En effet, l'inactivation du *Fgf-2* n'entraîne pas d'anomalies morphologiques, mais provoque une diminution de la contraction vasculaire et de la pression sanguine (Dono et al., 1998).

Les FGFs exercent leurs effets biologiques via leur fixation spécifique sur des récepteurs ayant une activité tyrosine kinase : les FGFRs. Il existe quatre récepteurs au FGF (FGFR-1 à 4), présentant différents variants issus de l'épissage alternatif de leur ARN messager. L'activation de ces récepteurs par phosphorylation, après fixation du ligand, entraîne le recrutement de nombreuses voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération, la migration et la différenciation de nombreux types cellulaires et notamment, des cellules endothéliales.

Les souris invalidées pour *Fgfr1* et *Fgfr2* sont létales au stade embryonnaire, avant la gastrulation (Deng et al., 1994 et Xu et al., 1998). La létalité précoce de ces souris n'a malheureusement pas permis d'identifier le rôle de ces récepteurs à des stades plus tardifs du développement, ainsi qu'au cours de l'angiogenèse. Cependant, une étude a montré chez l'embryon de souris, par l'utilisation d'adénovirus permettant l'expression d'un dominant négatif du FGFR1, que ce récepteur est nécessaire au développement et au maintien de l'intégrité vasculaire (Lee et al., 2000). Les souris *Fgfr3*^{-/-} présentent des défauts de formation du squelette (Colvin et al., 1996) alors que l'inactivation de *Fgfr4* ne donne aucun phénotype visible.

De nombreuses études ont aussi montré un rôle indirect du FGF-2 au cours de l'angiogenèse. Le FGF-2 régulerait l'expression d'autres facteurs de croissance tel que le VEGF dans les cardiomyocytes et les cellules endothéliales, résultant de l'activation de la signalisation du VEGF dans ces dernières (Seghezzi et al., 1998). Cet effet du FGF sur le VEGF a également été observé dans les tumeurs et plus particulièrement dans le stroma, induisant une augmentation de la néovascularisation (Claffey et al., 2001 et Tsunoda et al., 2007). Le FGF induit également l'expression du PDGFR- β au niveau des cellules murales, contribuant ainsi à la maturation vasculaire (Kano et al., 2005).

D- Les mécanismes cellulaires de l'angiogenèse par bourgeonnement

Dans les vaisseaux sanguins, les cellules endothéliales sont quiescentes. Ce phénotype est maintenu jusqu'à ce que ces cellules soient exposées, dans des contextes physiologiques et pathologiques, à des signaux pro-angiogéniques tel que le VEGF, qui induisent d'importants changements dans leur comportement. En réponse à ces signaux, les cellules endothéliales perdent leurs contacts avec d'autres cellules endothéliales, activent des protéases qui dégradent la membrane basale environnante et acquièrent un comportement invasif et motile, afin d'initier l'angiogenèse par bourgeonnement (Eilken and Adams, 2010 et Carmeliet and Jain, 2011).

1) La différenciation tip cells/stalk cells

Parmi l'ensemble des cellules endothéliales exposées à ces stimuli angiogéniques, seule une petite proportion est sélectionnée afin d'engager le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux. Ces cellules endothéliales, appelées « tip cells », migrent et émettent de nombreux filopodes capables de sentir et de répondre aux signaux de répulsion ou d'attraction provenant du microenvironnement vasculaire (Ruhrberg et al., 2002 et Gerhardt et al., 2003). A contrario, les cellules endothéliales qui suivent les tip cells (appelées « stalk cells ») sont moins motiles mais prolifèrent, permettant l'extension du nouveau vaisseau en bourgeonnement, tout en gardant leur connexion avec le

vaisseau préexistant (Gerhardt et al., 2003). Les stalk cells participent également à la formation de la lumière du vaisseau. Ce processus sera détaillé dans la partie suivante.

Le bourgeonnement des cellules endothéliales est directionnel, jusqu'à la connexion d'une tip cell avec un vaisseau adjacent, provoquant une anastomose, c'est-à-dire la fusion des deux vaisseaux en contact. Lorsque les tip cells entrent en contact avec d'autres cellules endothéliales, elles perdent leur motilité, générant des jonctions serrées entre les cellules, permettant ainsi la synthèse d'un nouveau vaisseau présentant une lumière et perfusé (Lenard et al., 2013).

La différenciation entre tip cells et stalk cells est principalement régulée par la voie NOTCH, un régulateur clef de nombreux processus cellulaires, dans une grande variété de cellules et d'organismes (Garcia and Kandel, 2012 et Benedito and Hellström, 2013). Ainsi, les cellules endothéliales se trouvant au front vasculaire entrent en compétition les unes avec les autres, à travers la voie de signalisation NOTCH. En réponse au VEGF, l'expression du ligand DLL4 est augmentée au niveau de la tip cell, entraînant une augmentation de la voie NOTCH dans les stalk cells adjacentes et leur incapacité à se différencier à leur tour en tip cell (Hellström et al., 2007 ; Leslie et al., 2007 ; Lobov et al., 2007 et Suchting et al., 2007). La tip cell correspond alors à la cellule endothéliale où la signalisation du VEGF est la plus élevée. Dans les stalk cells, l'activation de la voie NOTCH conduit à l'inhibition du VEGFR2 et du VEGFR3, mais régule positivement l'expression du VEGFR1 (Funahashi et al., 2010). Le VEGFR1 jouant un rôle de modulateur de l'angiogenèse via la séquestration du VEGF-A (voir partie I.C.2.a), il agirait comme un régulateur négatif du phénotype tip cell. (Figure 13) Si le phénotype tip cell est inhibé par la liaison de DLL4 sur son récepteur NOTCH au niveau des stalk cells ; la liaison du ligand JAGGED1 (exprimé par les stalk cells) sur NOTCH (exprimé par les tip cells) antagonise la signalisation DLL4/NOTCH dans les tip cells, jouant ainsi un rôle de régulateur pro-angiogénique (Benedito et al., 2009 et Pedrosa et al., 2015).

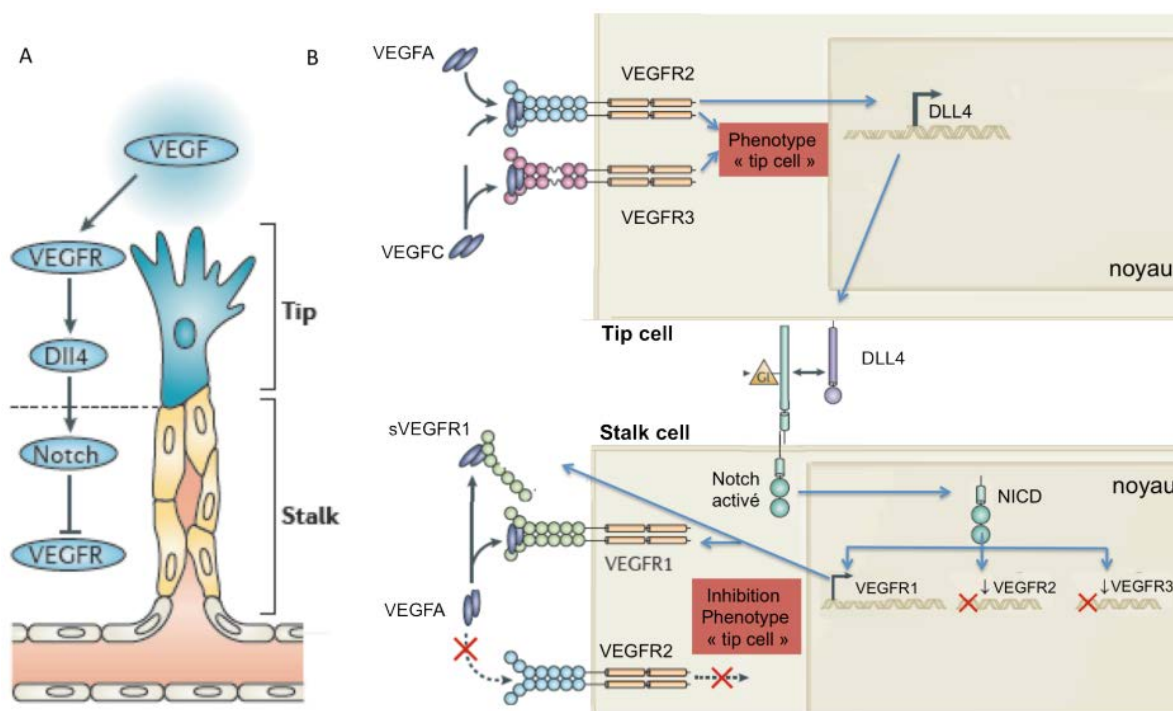


Figure 13 : Les mécanismes moléculaires de la différenciation tip cell contre stalk cell. A- Le bourgeonnement des cellules endothéliales est organisé de façon hiérarchique entre les tip cells à l'avant et les stalk cells situées juste derrière, présentant chacune des comportements différents et spécialisés. B- La signalisation du VEGF-A et du VEGF-C via le VEGFR2 et le VEGFR3 induisent le comportement motile et invasif des tip cells, conduisant à l'initiation de l'angiogenèse par bourgeonnement. L'activation du VEGFR2 induit l'expression de DLL4 dans la tip cell, activant la voie NOTCH dans les stalk cells adjacentes. Dans les stalk cells, la voie NOTCH inhibe l'expression du VEGFR3 et augmente l'expression du VEGFR1, réprimant ainsi la fonction du VEGFR2 et bloquant la différenciation en tip cell (Adapté de (Herbert and Stainier, 2011)).

2) La formation de la lumière

Au cours de l'angiogenèse par bourgeonnement, les vaisseaux sanguins forment une lumière afin d'établir le flux sanguin et ainsi devenir fonctionnels.

Dans la littérature, il existe quatre mécanismes permettant la formation d'une lumière *de novo* dans un vaisseau : le « cord hollowing », le « cell hollowing », la cavitation et l'invagination de la membrane plasmique (Sigurbjörnsdóttir et al., 2014). Le cord hollowing consiste en l'apparition d'espaces vides entre au moins deux cellules initialement jointives. La création d'une lumière dans une cellule à partir de vacuoles intracellulaires est décrite comme le cell hollowing. Enfin, la cavitation est un processus où la mort cellulaire entraîne la création d'un espace vide au centre d'un complexe multicellulaire. Nous nous concentrerons ici sur le cord hollowing qui constitue le modèle le mieux caractérisé.

Avant la formation de la lumière, les vaisseaux sanguins consistent en une tige multicellulaire de cellules endothéliales, interconnectées les unes aux autres par des jonctions uniformes et dépourvues de polarité apico-basale. La protéine PAR3 (partitioning defective 3) est déterminante dans la polarité cellulaire. Elle permet l'acquisition d'une polarité apico-basale par les cellules

endothéliales et la redistribution latérale des protéines de jonction telles que ZO-1 (Zonula occludens 1), la claudine 5, CD99, et la VE-cadhérine (Vascular endothelial cadherin), à partir de la surface apicale des cellules endothéliales (Zovein et al., 2010). Ainsi, l'acquisition d'une polarité apico-basale et la redistribution des jonctions entre les cellules endothéliales initient la formation de la lumière vasculaire. Lorsque la polarité endothéliale est établie, CD34 et la podocalyxine (glycoprotéines exprimées par l'endothélium vasculaire), qui se trouvent initialement aux points de contact entre les cellules endothéliales adjacentes, sont recrutées au niveau du côté apical par l'intégrine $\beta 1$ et la VE-cadhérine. La podocalyxine recrute ensuite à son tour la moésine, permettant l'initiation de la formation de la lumière. En effet, l'accumulation de la moésine (phosphorylée par la PKC (Protein kinase C)) du côté apical permettrait le contrôle de la morphogenèse de la lumière et le recrutement de l'actine filamenteuse (actine F). De plus, la podocalyxine pourrait initier la formation de la lumière en induisant une répulsion électrostatique entre les surfaces apicales des cellules endothéliales (Strilić et al., 2009 et Wang et al., 2010). Ainsi, l'acquisition de la polarité apico-basale semble être en partie dépendante de la séquestration de protéines clefs de la machinerie de la tubulogenèse aux sites de formation de la lumière. Enfin, l'expansion de la lumière vasculaire semble pouvoir se faire à travers une variété de mécanismes. La signalisation via le VEGFR2 et l'activation de ROCK (RHO-associated coiled-coil kinase) promeuvent l'association de la myosine II non musculaire avec l'actine F conduisant à des changements morphologiques des cellules endothéliales, via la contraction de l'actomyosine (Strilić et al., 2009). Au contraire, RASIP1 (RAS-interacting protein 1) est impliquée dans la répression de la contractilité de l'actomyosine afin d'affiner cette réponse (Xu et al., 2011). De plus, la fusion de vacuoles d'exocytose avec la surface apicale conduirait à l'expansion de la lumière (Zovein et al., 2010). (Figure 14)

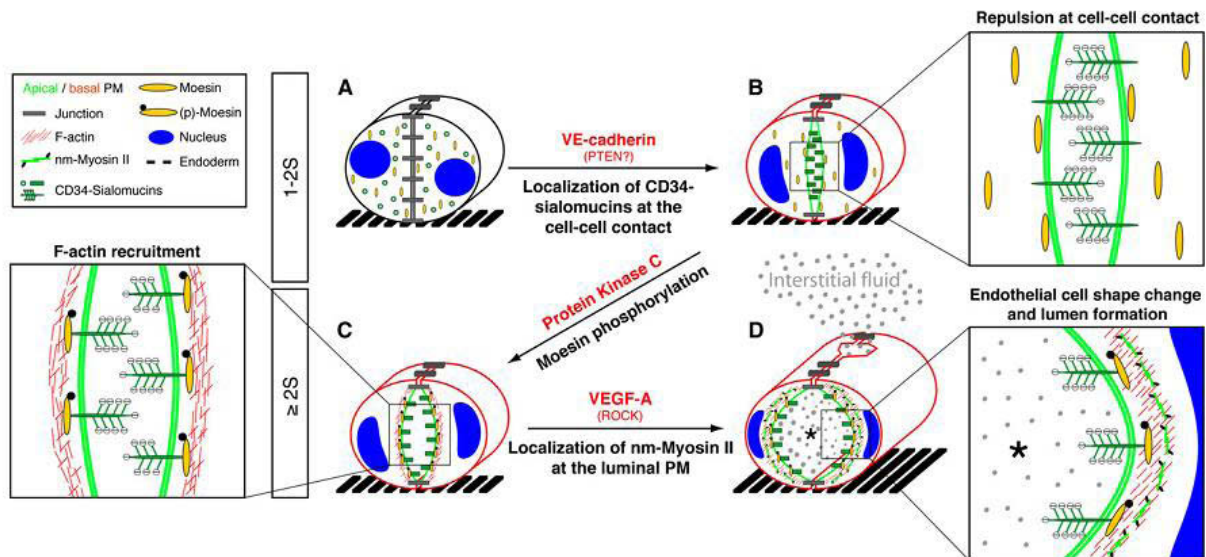


Figure 14 : Les mécanismes moléculaires de la formation de la lumière d'un vaisseau. A- Les cellules endothéliales adjacentes adhèrent les unes avec les autres via de nombreuses jonctions. B- La VE-cadhérine recrute CD34 au niveau des jonctions entre les cellules, entraînant la séparation apicale des cellules endothéliales entre elles. C- La moésine recrute à son tour l'actine F du côté apical. D- Le VEGF-A et ROCK permettent la séparation apicales des cellules endothéliales, leur changement de forme et la formation de la lumière, via le recrutement de la myosine II non musculaire, capable de se lier à l'actine F. (Strilić et al., 2009)

3) Le recrutement des péricytes

Au cours de l'angiogenèse, les péricytes sont recrutés par les cellules endothéliales via la voie de signalisation PDGF-B/PDGFR- β (voir partie I.C.2.b).

Dans les tumeurs, les péricytes pourraient constituer une cible thérapeutique majeure afin de cibler l'angiogenèse tumorale. En effet, les cellules endothéliales dépourvues de péricytes semblent plus dépendantes à la signalisation du VEGF-A pour survivre, entraînant leur remodelage et leur bourgeonnement (Benjamin et al., 1998). A contrario, l'inhibition de la signalisation du VEGF-A augmente la couverture péricytaire des vaisseaux tumoraux, suggérant que les péricytes pourraient protéger les cellules endothéliales d'une privation en VEGF (Benjamin et al., 1999). Ainsi, une thérapie combinée conduisant à l'inhibition de la signalisation du VEGF au niveau de l'endothélium et de la signalisation du PDGFR- β dans les péricytes, avec des inhibiteurs de kinase différents, pourrait permettre une diminution de l'angiogenèse tumorale.

II. Le microenvironnement tumoral

Bien que les altérations génétiques des cellules tumorales soient essentielles au développement d'une tumeur, elles ne sont pas suffisantes pour permettre aux cellules tumorales d'acquérir des propriétés malignes. L'infiltration de la tumeur par de nombreux types cellulaires conduit à la formation d'un compartiment stromal en étroite relation avec les cellules tumorales, requis pour créer un environnement permettant l'invasion des cellules tumorales (épi)-génétiquement modifiées. Le microenvironnement tumoral est un réseau dynamique composé de cellules stromales avec les cellules endothéliales, les cellules inflammatoires et les fibroblastes, ainsi que de la matrice extracellulaire englobant toute la tumeur et ses cellules. (Figure 15) (Hanahan and Weinberg, 2011 et Lu et al., 2012)

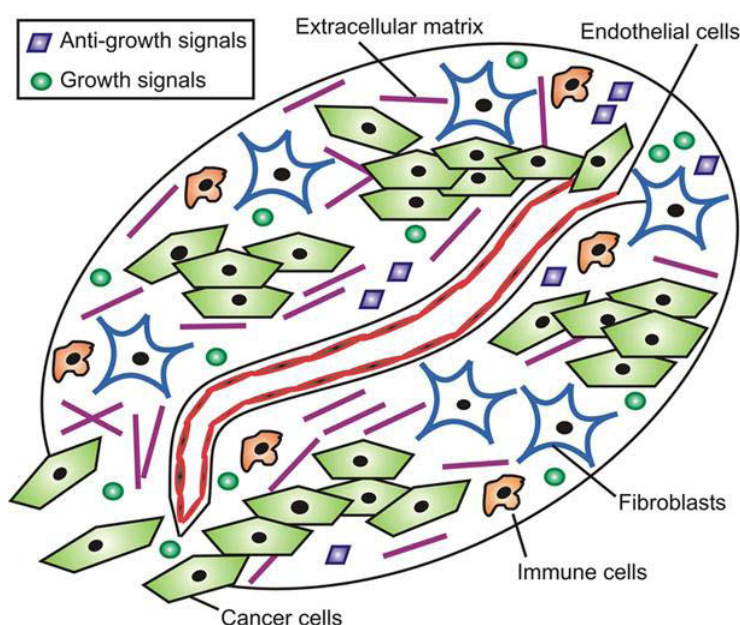


Figure 15 : Le microenvironnement tumoral. Le microenvironnement tumoral est une structure complexe composée de la matrice extracellulaire et de multiples types cellulaires. En plus des cellules tumorales, les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules immunitaires ainsi que les molécules de la MEC contribuent elles aussi à la progression tumorale. Les tumeurs sont auto-suffisantes pour les signaux de croissance et insensibles aux signaux inhibiteurs de croissance. Les différents types cellulaires constituant la tumeur peuvent remodeler et sécréter des facteurs pro- et anti-tumoraux et répondre aux stimuli sécrétés par les autres cellules ; créant ainsi un environnement favorable pour la croissance tumorale et la dissémination métastatique (Adapté de (Nyberg et al., 2008)).

A- Les cellules stromales

1) Les cellules endothéliales

Dans les tumeurs, les cellules endothéliales sont actives. Elles perdent leur polarité, peuvent se détacher de la membrane basale et s'empiler les unes sur les autres. Ces cellules endothéliales sont souvent fuyantes, avec des jonctions discontinues et présentent de multiples fenestrations. Ces

caractéristiques conduisent à des hémorragies et à une augmentation de la pression du liquide interstitiel (Jain, 2005).

Contrairement aux autres cellules endothéliales, les cellules endothéliales participant à l'angiogenèse tumorale peuvent subir la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (cellules épithéliales/endothéliales acquérant un phénotype et des caractéristiques de cellules mésenchymateuses) et migrer loin de leur site d'origine, laissant derrière elles des manchons de matrice dépourvus de cellules endothéliales, ne pouvant supporter que des flux sanguins lents.

Dans les tumeurs, les cellules endothéliales sont hétérogènes, elles présentent des différences moléculaires, mais aussi au niveau de l'expression de certains gènes par rapport aux autres cellules endothéliales (St. Croix et al., 2000 et Seaman et al., 2007). Enfin, une étude a montré que les cellules endothéliales localisées dans les tumeurs pouvaient présenter des anomalies d'un point de vue cytogénétique. En effet, elles présentent une aneuploïdie (nombre anormal de chromosomes) par rapport aux cellules endothéliales normales diploïdes (Hida et al., 2004). La notion de cellule endothéliale tumorale reste cependant soumise à discussion en l'absence de preuves directes publiées dans la littérature, comme l'expression de marqueurs spécifiques pour ces cellules.

L'ensemble des différences décrites ci-dessus entre les cellules endothéliales normales et celles présentes dans les tumeurs, sont associées à des différences morphologiques observées entre les vaisseaux normaux et tumoraux (voir partie I.B.2).

2) Les cellules inflammatoires

Le microenvironnement tumoral se caractérise par la présence de cellules inflammatoires. Ainsi, les cellules tumorales produisent de nombreuses cytokines et chémokines capables d'attirer les leucocytes, qui en retour, contribuent à l'inflammation chronique de la tumeur et au développement tumoral. En effet, la présence et l'activation de cellules immunitaires innées tels que les neutrophiles, les macrophages et les mastocytes promeuvent la croissance et/ou facilitent la survie des cellules tumorales (Hanahan and Coussens, 2012). Les cellules immunitaires polarisées et actives produisent également un grand nombre de chémokines, cytokines, facteurs de croissance et protéases conduisant au remodelage du tissu ainsi qu'à l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, l'instabilité génétique et l'invasion métastatique (DeNardo et al., 2009 et Fridlender et al., 2009).

Les TAMs (Tumor associated macrophages) représentent les principaux leucocytes qui infiltrent la plupart des tumeurs (Mantovani et al., 1992) et s'accumulent dans les zones hypoxiques (Murdoch et al., 2004). Ils dérivent de précurseurs de monocytes circulants et sont dirigés dans la tumeur par des chémokines. Lorsque les TAMs sont convenablement activés, ils peuvent provoquer la mort des cellules tumorales ou détruire des tissus, et plus particulièrement l'endothélium vasculaire.

Cependant, les TAM peuvent également stimuler l'angiogenèse tumorale via la sécrétion de nombreux facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF, le FGF, le PDGF, le TGF β (Transforming growth factor beta) et des chémokines angiogéniques (Leek et al., 1996 et Bingle et al., 2006). De plus, Leek et al. ont démontré qu'il existait une corrélation entre la densité de micro-vaisseaux présents dans les tumeurs et l'étendue de l'infiltration des macrophages. Les TAMs sécrètent des protéases (qui seront décrites dans la partie II.C.2.a.) dont les MMP-9 (Matrix metalloproteinase 9) impliquées notamment dans la dégradation de la matrice extracellulaire, contribuant à l'angiogenèse et à la croissance tumorale, dans le cancer de l'ovaire (Huang et al., 2002). Enfin, les TAMs peuvent avoir un rôle de suppresseur de la réponse immunitaire adaptative, à travers des mécanismes incluant une faible activité de présentation de l'antigène des lymphocytes T mais également une diminution de leur prolifération (Mantovani et al., 2002).

Ce paragraphe concernant les cellules inflammatoires dans le microenvironnement tumoral a été abordé de façon très succincte car elles ne constituent pas le sujet de mon travail de thèse. Il est cependant à noter qu'il existe un nombre croissant de travaux, aussi bien en recherche fondamentale qu'en recherche clinique sur ce sujet, démontrant l'importance de traitements ciblant le système immunitaire dans les thérapies anti-tumorales.

3) Les fibroblastes associés au cancer

Les fibroblastes correspondent aux cellules les plus abondantes du tissu conjonctif. Ils synthétisent des constituants de la MEC tels que la fibronectine et les collagènes (types I, III et IV), mais participent également à sa dégradation via l'expression de MMPs. Par conséquent, ils sont donc responsables de l'intégrité structurale de nombreux tissus. Dans certains contextes comme la cicatrisation et la fibrose, les fibroblastes qui étaient dans un état quiescent, deviennent « activés » et participent au remodelage du tissu (Räsänen and Vaheri, 2010). Cette « activation » serait due à l'action concertée de cytokines comme le TGF- β et de constituants spécifiques de la MEC comme la fibronectine cellulaire (Serini et al., 1998). D'autres études ont montré que l'activation et le maintien du phénotype fibroblaste activé pourrait être dus à des tensions mécaniques régulées par des interactions continues entre la rigidité de la MEC et l'activité contractile de ces cellules (Arora et al., 1999 et Hinz et al., 2001). Contrairement aux fibroblastes quiescents avec une forme allongée et fusiforme, les fibroblastes activés présentent une morphologie différente avec un phénotype de cellules mésenchymateuses. La détection des fibroblastes est difficile, notamment *in vivo*, car de nombreux marqueurs ne sont pas spécifiques de ces cellules. Alors que le co-marquage de la vimentine (associée aux filaments intermédiaires) et de la fibroblast-specific protein-1 (FSP1, associée aux filaments intermédiaires) peut être considéré comme une signature des fibroblastes

dans les tissus normaux ; les fibroblastes activés se caractérisent par l'expression de l' α -SMA (alpha Smooth muscle actin) (Kalluri and Zeisberg, 2006).

Ces fibroblastes activés, également appelés myofibroblastes, deviennent les fibroblastes associés au cancer (CAF) dans les tumeurs et représentent les cellules prédominantes du stroma tumoral. Dans une tumeur, les CAFs représentent un type cellulaire hétérogène et cette diversité pourrait notamment s'expliquer par leurs nombreuses origines cellulaires possibles. En effet, les CAFs peuvent provenir de fibroblastes résidents mais également de cellules souches mésenchymateuses provenant de la moelle ou de cellules tumorales et endothéliales ayant subi l'EMT (Xing et al., 2010). Tout comme les fibroblastes activés dans le processus de cicatrisation, il est difficile d'identifier les CAFs avec des marqueurs spécifiques et de les distinguer d'autres types cellulaires. Cependant, l'utilisation concomitante de certains marqueurs comme la fibroblast-activation protein (FAP, protéine de surface), le PDGFR- α et le PDGFR- β permettent la caractérisation des CAFs, en plus des autres marqueurs décrits précédemment (Kalluri and Zeisberg, 2006 et Mao et al., 2012).

Les CAFs sont impliqués dans la croissance et la progression tumorale à travers de nombreux rôles. Ces fibroblastes jouent tout d'abord un rôle majeur dans le remodelage de la MEC. Ils entraînent une desmoplasie importante, caractéristique de nombreuses tumeurs. La desmoplasie correspond à l'accumulation des collagènes de type I et III (voir II.B.1. et II.C.2.b.i.) et est associée avec une diminution de l'espérance de vie (Kauppila et al., 1998). Cette augmentation du dépôt matriciel est associée avec une augmentation de la rigidité de la MEC. Les CAFs servent également de guide aux cellules tumorales via la sécrétion de protéases. Ainsi, les CAFs se comportent comme des cellules meneuses en dégradant la MEC et en créant des voies permettant aux cellules tumorales de migrer (Gaggioli et al., 2007). Les CAFs sont également impliqués dans l'angiogenèse tumorale, notamment avec la sécrétion de facteur de croissance tel que le VEGF-A (Fukumura et al., 1998b). De plus, Lederle et al. ont démontré que MMP-13 sécrétée par les CAFs promeut l'angiogenèse tumorale en relarguant le VEGF lié à la MEC, conduisant à l'invasion des cellules tumorales, notamment dans le carcinome épidermoïde (Lederle et al., 2010). Enfin, les CAFs sécrètent des cytokines, leur permettant de jouer un double rôle dans la progression tumorale. Ainsi, Orimo et al. ont montré que le SDF-1 (Stromal cell-derived factor 1) sécrété par les CAFs était impliqué dans la mobilisation de précurseurs de cellules endothéliales provenant de la moelle osseuse, induisant la vascularisation *de novo*, mais également la croissance tumorale (Orimo et al., 2005).

L'interaction entre cellules stromales et tumorales dans une tumeur fait intervenir de nombreuses voies de signalisation, rendant cette interaction complexe mais indispensable à la croissance tumorale. De plus, les échanges entre cellules stromales et tumorales sont régulés par les

caractéristiques physiques, biochimiques et biomécaniques de la MEC, jouant donc un rôle central dans les tumeurs. (Figure 16)

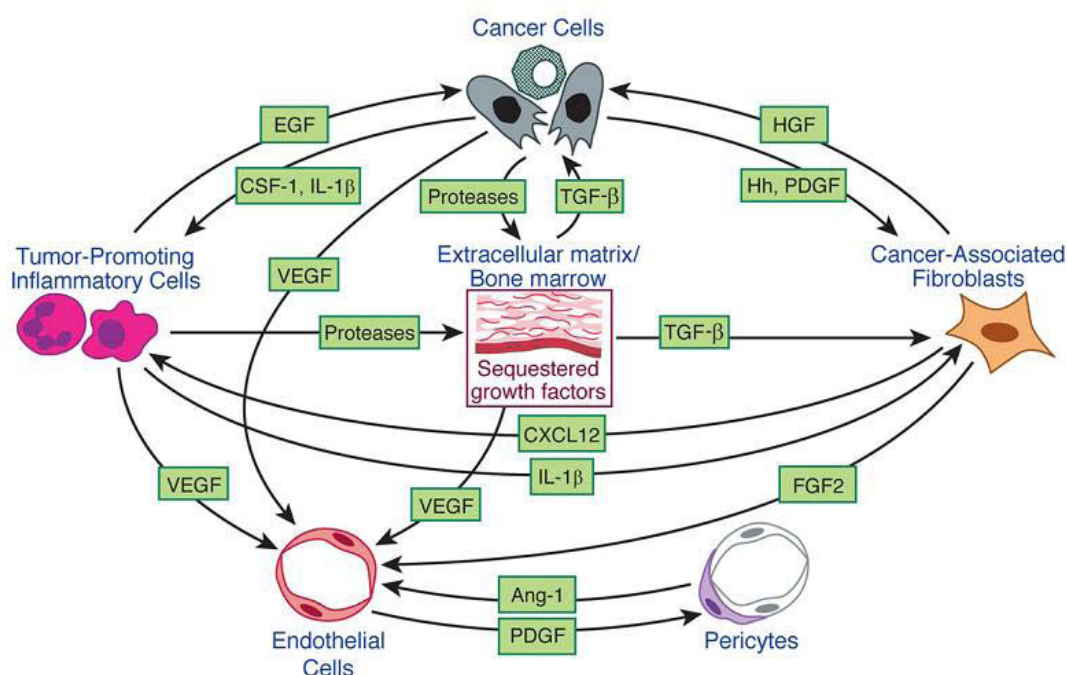


Figure 16 : Illustration de la signalisation intercellulaire dans le microenvironnement tumoral. Il existe une contribution collective des cellules stromales, constituant le microenvironnement tumoral, à l'angiogenèse et à la croissance tumorale. Ces processus sont orchestrés par de nombreuses voies de signalisation interagissant entre les différents types cellulaires, dont seulement quelques-unes sont représentées ici. (Adapté de (Hanahan and Weinberg, 2011))

B- La matrice extracellulaire stromale

La matrice extracellulaire stromale représente la structure physique, biochimique et biomécanique qui régule l'organisation en 3D et la fonction des cellules, telles que la prolifération et la migration, dans un tissu donné (Georges and Janmey, 2005).

La MEC existe sous deux formes biochimiques et structurales différentes : la membrane basale et la MEC stromale interstitielle.

La membrane basale est située au niveau basal de la plupart des monocouches de cellules épithéliales et endothéliales. Celle-ci est majoritairement constituée de laminines, collagène de type IV, héparanes sulfates, protéoglycans et nidogène/entactine et a pour fonction de séparer l'épithélium ou l'endothélium du mésenchyme sous-jacent. Dans une organisation établie et stable d'organe, la membrane basale renforce la polarité apico-basale de l'épithélium ; alors que dans des contextes physiologiques en évolution tel que le développement, ou encore des contextes pathologiques tel que le cancer, la membrane basale est souvent fine et/ou discontinue.

A l'opposé, l'essentiel du mésenchyme/MEC stromale interstitielle est dense et synthétisé par les fibroblastes. Cette MEC se compose essentiellement de collagène de type I et III et de fibronectine, détaillés ci-dessous. (Malik et al., 2015) La MEC présente au niveau des cellules endothéliales possède des caractéristiques qui lui sont propres, qui seront abordées dans la partie suivante. Dans les tumeurs, la MEC est anormale et ceci se traduit par des défauts de synthèse, d'accumulation, de dégradation, de densité et/ou de rigidité. L'architecture de la matrice permet également le guidage physique des cellules au cours de la tumorigenèse, influençant la migration et l'invasion des cellules, ainsi que le processus métastatique. Ces mécanismes sont régulés via une interaction fine entre la MEC, les cellules stromales et/ou tumorales. Ainsi, les enzymes de remodelage de la matrice, telles que les MMPs (voir partie II.C.2.a) ou les lysyl oxydases (voir partie II.B.1.a, IV.A.4 et IV.B.3) sont essentielles pour réguler l'organisation de la MEC. Cependant, d'autres molécules impliquées dans la signalisation participent à la régulation de l'architecture de la matrice. En effet, Goetz et al. ont montré que la cavéoline-1 (protéine membranaire) entraîne la contraction des CAFs via la voie RHO (RAS homology small GTPase), conduisant à un alignement de la MEC ainsi qu'une augmentation de sa rigidité, favorisant la migration directionnelle et l'invasion des cellules tumorales (Goetz et al., 2011). Provenzano et al. ont quant à eux montré que les cellules tumorales participent elles-mêmes, via leur contraction contrôlée par la voie RHO, à la déformation et à la réorganisation du collagène de type I *in vitro* et *in vivo*, au niveau de l'interface tumeur-stroma, afin de faciliter l'invasion locale des cellules tumorales (Provenzano et al., 2006 et Provenzano et al., 2008) (voir partie II.B.1.b). Le remodelage de la matrice joue également un rôle important dans l'activation des fibroblastes. En effet, Calvo et al. ont montré que l'augmentation de la rigidité matricielle par des facteurs solubles, sécrétés notamment par les cellules tumorales, permet la translocation au noyau du facteur de transcription YAP, via la contraction du cytosquelette, induisant l'activation de fibroblastes normaux. Les fibroblastes activés acquièrent la capacité à se contracter, conduisant à l'augmentation de la rigidité matricielle, générant ainsi une boucle de rétrocontrôle positive (Calvo et al., 2013). Au cours de la tumorigenèse, certains constituants matriciels jouent également un rôle sur le comportement des cellules endothéliales. Ainsi, l'inhibition des intégrines $\alpha1\beta1$ et $\alpha2\beta1$, récepteurs transmembranaires du collagène de type I (voir partie II.C.2.c), par un anticorps bloquant, inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales ainsi que l'angiogenèse tumorale, induites par la voie du VEGF (Senger et al., 2002). De plus, la tenascine-C dont l'expression est augmentée dans de nombreux cancers, et notamment dans le gliome, entraîne une augmentation de la capacité proliférative des cellules endothéliales (Alves et al., 2011). Tout comme pour les cellules tumorales, les fibroblastes et les cellules endothéliales, la MEC affecte le comportement des cellules immunitaires. Ainsi, le versican induit l'activation des macrophages, conduisant à la sécrétion de

cytokines dont le TNF- α (Tumor necrosis factor-alpha) promouvant l'inflammation et le processus métastatique (Kim et al., 2009). Le remodelage de la MEC peut également influencer l'immunité anti-tumorale, en contrôlant la localisation et la migration des lymphocytes T (Salmon et al., 2012). En effet, les lymphocytes T s'accumulent plus dans le stroma que dans les îlots tumoraux, du fait de la présence de régions matricielles denses et composées de fibres alignées autour des vaisseaux et au niveau de l'interface tumeur-stroma.

Cet environnement extracellulaire favorable est également à l'origine des niches métastatiques.

1) Les collagènes

a. La famille des collagènes

Les collagènes représentent une famille hétérogène de 28 membres classés en sous groupes. Ce sont des glycoprotéines composées d'homo- ou d'hétéro- trimères de chaînes α pour former une triple hélice. Les chaînes α sont constituées d'une séquence répétée de trois acides aminés (Gly-X-Y). Les acides aminés en positions X et Y sont généralement des prolines et hydroxyprolines respectivement. Les collagènes sont répartis en huit familles : 1/ les collagènes fibrillaires (avec notamment les collagènes de type I, II et III), 2/ les collagènes associés aux collagènes fibrillaires de type I et II, appelés FACIT (Fibril-Associated Collagens with Interrupted Triple Helix), 3/ le collagène de type IV que l'on retrouve dans les membranes basales et qui s'associe en réseau (voir partie C.2.b.i.), 4/ le collagène VI dit filamenteux, 5/ le collagène VII dit à longue chaîne, avec des fibres d'ancrages s'associant à la membrane basale, 6/ les collagènes VIII et X à chaînes courtes, formant un réseau hexagonal, 7/ les multiplexines (collagènes de types XV et XVIII) et 8/ les collagènes possédant un domaine transmembranaire (collagène de type XIII,...), appelés MACIT (Membrane-Associated Collagens with Interrupted Triple Helix) (Mouw et al., 2014).

Le collagène de type III est un collagène fibrillaire qui colocalise avec le collagène de type I dans plusieurs types de tissus (Vuorio et De Combrugghe, 1990). Les souris invalidées pour la chaîne $\alpha 1$ du collagène de type III meurent dans 90% des cas, de manière périnatale (les 10% restants ont une faible espérance de vie à l'âge adulte), dû à une rupture des vaisseaux sanguins (Liu et al., 1997). De plus, cette étude montre que le collagène de type III joue un rôle dans la régulation du diamètre des fibres de collagène de type I. En effet, en l'absence de collagène de type III, le diamètre des fibres de collagène de type I est deux fois plus important par rapport aux souris sauvages et leur nombre total est diminué de 30%.

b. Le collagène de type I

Le collagène de type I constitue le composant majeur de la MEC. Il est présent dans la plupart des tissus et plus particulièrement dans le tissu conjonctif et consiste en deux chaînes α différentes ($\alpha 1$ et $\alpha 2$) qui s'assemblent pour former un hétérotrimère unique : $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$. Le rôle central du collagène de type I est de servir d'échafaudage mécanique et organisationnel de la MEC, ainsi que de molécule de signalisation dans la détermination de la fonction et de la forme des cellules, constituant donc un paramètre important dans des contextes physiologiques et pathologiques. Dans les cancers, il promeut la migration cellulaire ainsi que l'angiogenèse et la croissance tumorale. La régulation de sa synthèse et de sa dégradation est donc primordiale au maintien de la bonne fonctionnalité de la MEC.

Les souris invalidées pour la chaîne $\alpha 1(I)$ du collagène de type I meurent entre E12 et E14, dû à une rupture de vaisseaux sanguins et une mort cellulaire importante au niveau des cellules hématopoïétiques et des cellules mésenchymateuses, montrant l'importance du collagène de type I dans la stabilité mécanique du système circulatoire (Löhler et al., 1984).

Dans les tumeurs, la MEC est produite en excès avec notamment une augmentation du dépôt de collagène de type I (Kauppila et al., 1998). De plus, les fibres constituant la matrice et plus particulièrement les fibres de collagène de type I sont linéaires et orientées soit de façon adjacente à l'épithélium, soit en se projetant perpendiculairement au tissu ; contrairement aux conditions normales, où les fibres de collagène de type I sont disposées de façon anarchique (Provenzano et al., 2006 et Provenzano et al., 2008). (Figure 17) Ces changements architecturaux sont associés à une faible espérance de vie chez les patients (Conklin et al., 2011). En effet, ces fibres servent de voies d'échappement, notamment aux cellules cancéreuses pour migrer et métastaser (Wang et al., 2002 ; Provenzano et al., 2006 et Provenzano et al., 2008).

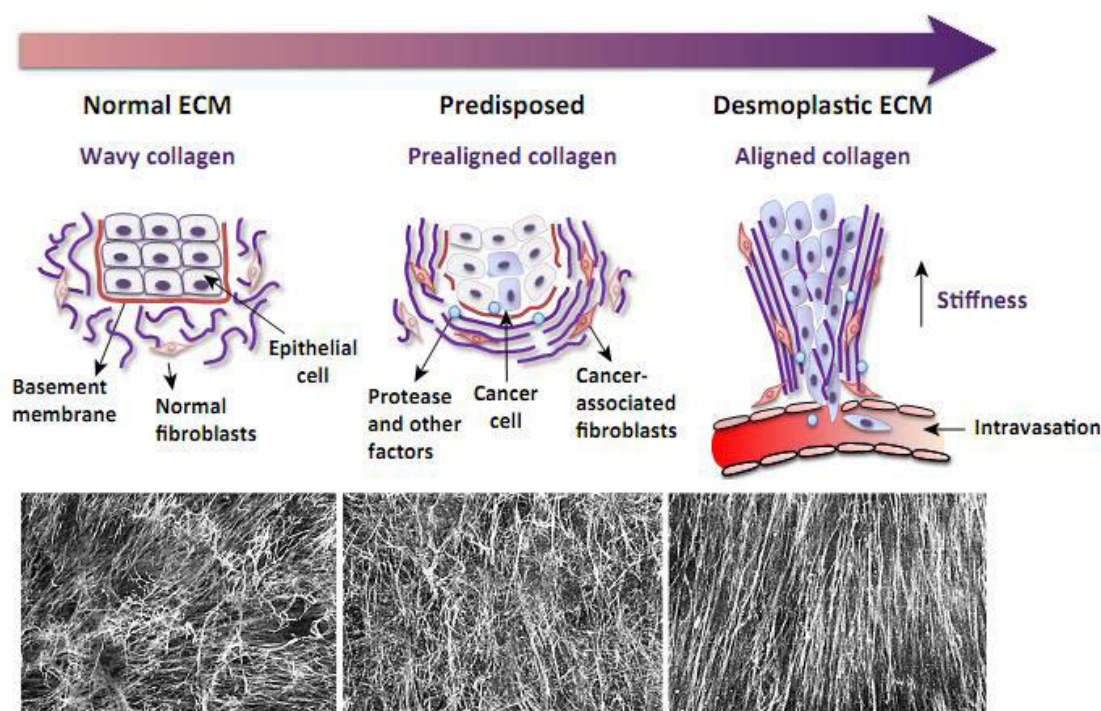


Figure 17 : Remodelage du collagène de type I au cours de la tumorigénèse. Haut : Représentation schématique du changement architectural du collagène de type I au cours de la croissance tumorale. Bas : Images représentatives du dépôt de MEC par les fibroblastes associés au cancer *in vitro*, dans le carcinome épidermoïde murin. (Adapté de (Malik et al., 2015))

La linéarisation des fibres de collagènes de type I dans le stroma tumoral rend la MEC plus rigide que dans un stroma normal. C'est par exemple le cas, dans le cancer du sein, où la rigidité est dix fois plus importante que dans le sein normal (Levental et al., 2009 et Lopez et al., 2011). Cette augmentation de la rigidité est en partie due à l'activité excessive de la famille des lysyl oxydases et plus particulièrement de LOX et LOXL2 (lysyl oxydase-like 2) (voir partie III), qui jouent un rôle dans le pontage du collagène et de l'élastine. Une étude a ainsi montré que la surexpression de LOX augmente la rigidité de la MEC et promeut l'invasion et la progression tumorale *in vivo* (Levental et al., 2009).

Si les traitements anti-angiogéniques constituent aujourd'hui la priorité de nombreuses thérapies anti-tumorales afin de normaliser les vaisseaux sanguins, la normalisation de la MEC semble également constituer un enjeu majeur dans le traitement des tumeurs. En effet, la MEC semble à la fois ralentir la pénétration des drogues et leur efficacité, et plus particulièrement dans les tumeurs où la desmoplasie est importante. En effet, Netti et al. ont montré dès les années 2000 que la diffusion de macromolécules était ralentie en présence d'une matrice rigide et riche en collagène ; et que cet effet était contrecarré après un traitement à la collagénase (Netti et al., 2000). Depuis, de nombreux traitements ciblant directement ou non les collagènes fibrillaires et plus particulièrement le collagène I, ont été testés chez la souris et ont permis d'améliorer la distribution et l'efficacité des

thérapies anti-tumorales (Mok et al., 2007 ; Diop-Frimpong et al., 2011 et Liu et al., 2012), montrant ainsi la nécessité de traitements combinés.

2) La fibronectine

La fibronectine est une glycoprotéine sécrétée de 240-270 kDa, qui s'assemble en structure fibrillaire autour de la cellule, via des processus régulés par cette dernière. La fibronectine existe sous deux formes : la fibronectine plasmatique, qui est une molécule soluble synthétisée par les hépatocytes et qui circule dans le sang à forte concentration ; et la fibronectine cellulaire, produite par les tissus et incorporée à une matrice fibrillaire. La fibronectine forme un dimère antiparallèle qui est composé de deux monomères identiques, liés par une paire de ponts disulfures à leur extrémité C-terminale. Chaque monomère est constitué de trois modules d'unités répétées : type I, type II et type III. (Figure 18) L'épissage alternatif de l'ARNm de la fibronectine engendre la formation de différentes isoformes, spécifiquement dans les régions EDA et EDB, situées au niveau du module de type III. Les modules contiennent des motifs de liaison qui sont importants pour faciliter l'auto-assemblage de la fibronectine mais aussi son interaction avec des molécules de la MEC, tels que les collagènes, le fibrinogène, l'héparine, la thrombospondine et la ténacine, servant ainsi d'échafaudage pour l'assemblage des composants de la matrice. La fibronectine possède également un motif RGD (Arginine-Glycine-Asparagine), situé dans le module de type III, permettant sa liaison aux intégrines (récepteurs de surface) (voir partie II.C.2.c.). (Kostourou and Papalazarou, 2014)

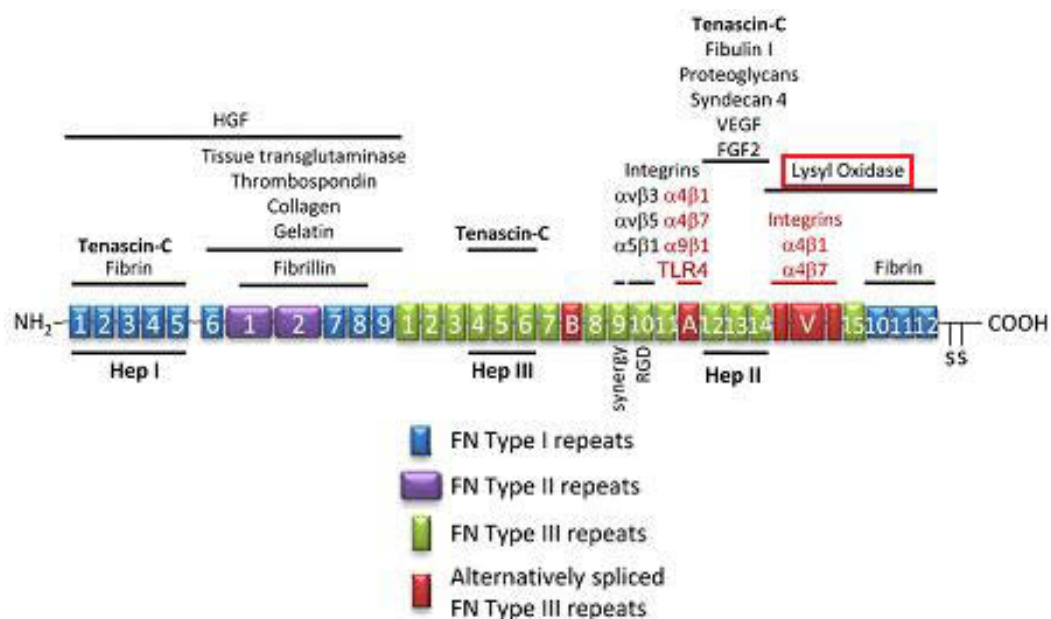


Figure 18 : Structure d'un monomère de fibronectine avec ses différents partenaires d'interaction. Les domaines de liaison à l'héparine (Hep I à III) ainsi que les domaines de liaison aux récepteurs cellulaires, aux constituants de la MEC, aux enzymes et aux facteurs de croissance sont indiqués. On notera la lysyl oxydase. (Adapté de (Van Obberghen-Schilling et al., 2011))

Ces interactions ont un rôle dans les processus de méchanotransduction et la modification du comportement cellulaire. Les fonctions de la fibronectine ne dépendent pas seulement de sa séquence linéaire mais également de sa structure en trois dimensions et de son assemblage correct dans une matrice fonctionnelle.

La fibronectine est un composant important de la MEC, essentiel au développement vasculaire. Les souris invalidées pour la fibronectine présentent des défauts au niveau du mésoderme, du tube neural mais surtout au niveau cardiovasculaire, conduisant à une létalité embryonnaire à environ E8,5 (George et al., 1993). En effet, chez ces souris la spécification initiale des précurseurs endothéliaux est observée, alors que la morphogenèse du cœur et des vaisseaux est totalement absente (George et al., 1997). De plus, alors que la fibronectine est fortement exprimée autour des vaisseaux sanguins au cours de l'embryogenèse (Peters and Hynes, 1996), son expression diminue dans les vaisseaux matures et est à peine détectable dans les vaisseaux adultes (French-Constant and Hynes, 1989 et Peters et al., 1996). Ainsi, l'expression de la fibronectine chez l'adulte est observée au cours de la cicatrisation, dans les fibroses mais aussi dans les maladies vasculaires et les cancers. En accord avec un rôle pro-angiogénique de la fibronectine, l'augmentation de la fibrillogenèse est observée dans les sites d'angiogenèse active. De plus, l'inhibition de la polymérisation de la fibronectine diminue la prolifération des cellules endothéliales et la formation de tubes, dans un modèle de culture *in vitro* en trois dimensions et dans un modèle de CAM (membrane chorio-allantoïdienne de poulet) (Zhou et al., 2008). Enfin, la fibronectine joue

également un rôle dans la régulation de la biodisponibilité de facteurs angiogéniques solubles. En effet, la liaison du VEGF au niveau du module de type III de la fibronectine promeut la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Wijelath et al., 2006). Dans cette étude, l'effet de la fibronectine sur la prolifération et la migration requiert à la fois les sites de liaison au VEGF mais aussi de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$, montrant la nécessité de juxtaposition du VEGFR-2 et de l' $\alpha 5\beta 1$ au niveau des cellules endothéliales. Stenzel et al. ont montré que la liaison de la fibronectine au VEGF, secrétée par les astrocytes au cours de la vascularisation de la rétine chez la souris, promeut la migration directionnelle des tip cells alors que la liaison de la fibronectine à l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ permet l'adhésion des filopodes (Stenzel et al., 2011a).

De nombreuses études ont montré que l'expression de la fibronectine, dont les isoformes EDA et EDB, est augmentée autour des vaisseaux sanguins dans les tumeurs chez l'homme et la souris (Lorn et al., 1995 ; D'Ovidio et al., 1998 et Castellani et al., 2002). Ainsi, plusieurs études impliquent la fibronectine et son récepteur $\alpha 5\beta 1$ dans l'angiogenèse tumorale (Kim et al., 2000 et Bhaskar et al., 2007). De plus, une étude récente a montré que l'expression de la fibronectine dans le glioblastome augmente la migration collective des cellules tumorales mais également l'angiogenèse et la croissance tumorale (Serres et al., 2014). En dépit de la régulation fine des EDA et EDB dans la vascularisation tumorale, les souris invalidées pour *Eda* ou *Edb* sont viables, fertiles et ne présentent pas de défauts de vascularisation dans des contextes physiologiques ou tumoraux (Astrof et al., 2004). Le rôle des différents variants de la fibronectine et leur interaction avec la MEC dans le développement des tumeurs reste donc encore à élucider.

3) La membrane basale

Si la composition protéique globale de la membrane basale est toujours la même d'un tissu à un autre (voir partie II.B), les variations concernant la quantité et la structure de chaque protéine font que chaque membrane basale est spécifique d'un tissu donné. C'est par exemple le cas pour le collagène de type IV qui peut s'assembler en trois hétérotrimères différents ayant chacun une distribution tissu spécifique (voir partie II.C.2.b.i).

Dans les cancers, la membrane basale varie en fonction du type de tumeurs mais aussi de son niveau de différenciation (Benton et al., 2014). Elle est fine et discontinue, facilitant la migration des cellules tumorales qui se retrouvent alors directement en contact avec la MEC stromale interstitielle, favorisant ainsi l'invasion et le processus métastatique (voir partie II.B).

De nombreuses études dans le domaine de la cancérologie utilisent le Matrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) comme matrice. Le Matrigel est un assortiment de protéines extraites à partir d'une tumeur murine (Engelbreth-Holm-Swarm). Il est majoritairement constitué de laminine

111, du collagène de type IV (chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$), des héparanes sulfates et des nidogènes. Il contient également des facteurs de croissance comme le FGF et le TGF- β (Hughes et al., 2010). Ainsi, le Matrigel est considéré comme une reconstitution de la membrane basale dans le microenvironnement tumoral. Il permet notamment d'étudier l'invasion, la migration et la prolifération des cellules tumorales *in vitro* mais également l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro* dans des modèles en trois dimensions (Benton et al., 2014).

Mon travail de thèse étant basé sur l'étude de l'angiogenèse tumorale, j'ai choisi de décrire plus en détails la composition de la membrane basale vasculaire ainsi que le rôle des protéines la constituant sur l'angiogenèse (voir partie suivante).

C- La matrice extracellulaire endothéliale

1) Structure et assemblage de la matrice extracellulaire endothéliale

La matrice extracellulaire endothéliale est composée d'une membrane basale et de protéines associées.

La membrane basale vasculaire entoure les vaisseaux normaux de toute taille. Elle est située au niveau de la face abluminale de l'endothélium et constitue une structure de soutien entre les cellules endothéliales et les péricytes (voir Figure 1). Une des caractéristiques de la membrane basale consiste en la capacité d'auto-assemblage de ses constituants, afin de former une structure en feuillets. La membrane basale est formée de réseaux indépendants de collagène de type IV et de laminine, interconnectés par le perlecan et le nidogène. (Figure 19) L'assemblage de la membrane basale est initié par la polymérisation de la laminine au niveau de la face basolatérale des cellules. La laminine se lie alors aux cellules endothéliales via des récepteurs protéiques telles que les intégrines. Cette protéine est indispensable à l'initiation de la formation de la membrane basale (De Arcangelis et al., 1996), alors que le collagène de type IV est important pour le maintien de son intégrité (Poschl, 2004).

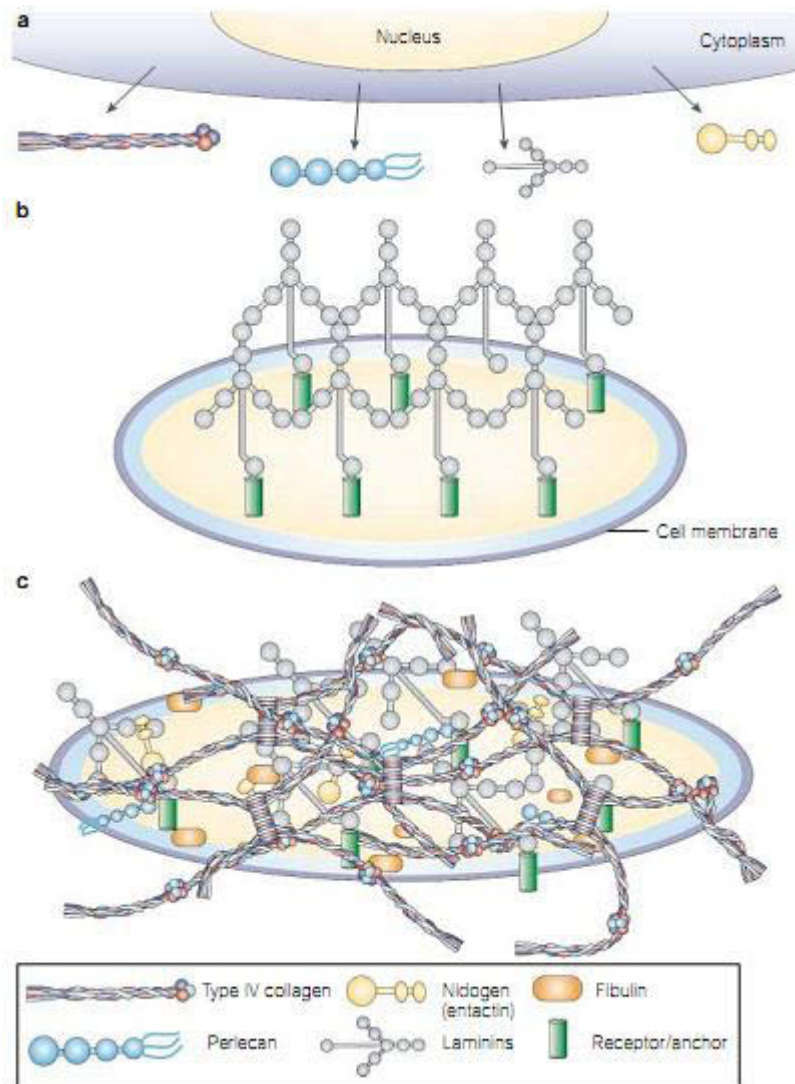


Figure 19 : **Assemblage de la membrane basale.** a- La cellule synthétise des constituants de la membrane basale en unités fonctionnelles puis les sécrète. b- La formation de la membrane basale est initiée par le réseau de laminine. c- La connexion entre le réseau de laminine et le réseau de collagène de type IV est réalisée via le perlecan et le nidogène. (Kalluri, 2003)

Sont associés à la membrane basale : des protéines impliquées dans la régulation de l'activité cellulaire comme les protéines matricellulaires (Thrombospondine, ANGPTL4,...) (voir partie II.C.2.b.iv.), des protéines impliquées dans l'adhésion cellulaire comme la fibronectine, ou encore des facteurs de croissance (VEGF, FGF,...).

2) Remodelage de la matrice extracellulaire endothéliale au cours de l'angiogenèse

a. Dégradation de la matrice extracellulaire endothéliale

L'angiogenèse est un processus invasif qui requiert la présence d'activités protéolytiques. Ces activités sont nécessaires à la dégradation de la membrane basale des cellules endothéliales, permettant leur invasion et leur migration dans le tissu. De plus, il a été démontré que les protéases jouent un rôle dans l'activation et la modification de facteurs de croissance, de cytokines et de

récepteurs ; mais également dans la libération de facteurs angiogéniques liés à la MEC. Ces protéases sont sécrétées par de nombreux types cellulaires (voir Figure 16, dans le cas du microenvironnement tumoral), dont les cellules endothéliales. Parmi elles, les MMPs (Matrix metalloproteinases) jouent un rôle prédominant.

i. Les métalloprotéases matricielles

La famille des MMPs est divisées en trois groupes : les MMPs, les ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase domain) et les ADAMTs (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif).

Le groupe des MMPs comprend 23 membres qui correspondent à des endopeptidases jouant un rôle dans la dégradation de protéines de la MEC au cours de l'angiogenèse. Ce groupe est composé de MMPs sécrétées et de MT-MMPs (membrane-type MMPs). Les MT-MMPs comprennent quatre membres avec un domaine transmembranaire (MT1-, MT2-, MT3- et MT5-MMPs) et deux membres avec une ancre GPI (Glycosyl phosphatidyl inositol) (MT4- et MT6-MMPs). L'ensemble de ces protéines sont produites sous forme de pro-enzymes activées par clivage protéolytique de leur propeptide, situé en N-terminal.

La plupart des souris invalidées pour les MMP ne montrent pas de phénotype angiogénique visible, du fait de la compensation de leurs activités par d'autres membres de la famille. Seules les souris *Mt1-mmp*^{-/-} présentent des défauts sévères d'angiogenèse et de formation du squelette conduisant à la mort de la souris, entre trois et seize semaines après la naissance (Zhou et al., 2000). D'autre part, même si les souris invalidées pour *Mmp-9* n'ont pas de défaut d'angiogenèse à l'âge adulte, elles présentent une vascularisation anormale au niveau de la plaque de croissance (Vu et al., 1998).

Les cellules endothéliales quiescentes produisent peu de MMPs ou des MMPs non actives. Cependant, dans des contextes de cicatrisation ou encore de croissance tumorale, ces protéases, dont la majorité peut être produite par les cellules endothéliales, sont fortement induites et activées au cours de l'angiogenèse *in vivo* (Egeblad and Werb, 2002 et Caley et al., 2015), mais également dans les cellules endothéliales *in vitro* (Hanemaaijer et al., 1993).

L'activité des MMPs est principalement régulée par les TIMPs (Tissu inhibitors of metalloproteinases). Il existe quatre TIMPs (TIMP-1 à 4) dont le domaine N-terminal est responsable de leur activité inhibitrice sur les MMPs. Bien que tous les TIMPs soient capables de se lier fortement à la plupart des MMPs, leur activité inhibitrice est spécifique à certains MMPs. Par exemple, TIMP-1 est un faible inhibiteur des MT1-, MT3- et MT5-MMPs mais aussi de MMP19. Des études ont montré que l'expression des TIMPs, et plus particulièrement TIMP-1, augmente dans de nombreux cancers et est positivement corrélée avec un faible pronostic. De plus, il semblerait que les TIMPs présentent

dans ces contextes de multiples fonctions promouvant la tumorigenèse, en plus de leur fonction inhibitrice des MMPs. C'est le cas notamment de TIMP-1 dans le cancer du sein. En effet, Barker et al, ont montré que la lysyl oxydase like-2 promeut l'expression de TIMP-1, impliqué dans l'invasion tumorale (Barker et al., 2011) (voir partie IV.B.3). Une étude très récente a quant à elle montré que l'augmentation de l'expression de TIMP-1 dans le cancer du poumon induit l'angiogenèse et l'invasion tumorale (Rojiani et al., 2015).

ii. La libération de facteurs angiogéniques

L'angiogenèse est contrôlée par une régulation fine de la balance entre régulation positive et négative des protéases. En effet, en plus de leur activité de remodelage, les MMPs sont impliquées dans le relargage de fragments protéiques pro- ou anti-angiogéniques. Ainsi, la biodisponibilité de certains facteurs de croissance est régulée par leur liaison aux protéoglycans ou à d'autres protéines. C'est le cas par exemple du VEGF qui est inactif lorsqu'il est lié au CTGF (Connecting tissue growth factor), mais devient actif après clivage protéolytique du CTGF par MT1-MMP, MMP-1, MMP-3 ou MMP-13 (Hashimoto et al., 2002). Néanmoins, la libération de facteurs de croissance peut être délétère. Le VEGF-165, de part sa fixation aux HSPGs, régule la migration directionnelle des cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse (voir partie I.C.2.a.). Le clivage du VEGF-165 par MMP-3 ou MMP-9 génère une forme active comparable au VEGF-121, conduisant à la formation de vaisseaux chaotiques (Lee et al., 2005). La libération de fragments protéiques ayant des propriétés anti-angiogéniques provient quant à elle du clivage de protéines de la MEC par les MMPs. En effet, le clivage du domaine NC1 du collagène de type XVIII par les MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13 et MMP-20 permet la formation de l'endostatine, qui inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Ferrerias et al., 2000).

iii. Le rôle des MMPs au cours de l'angiogenèse tumorale

Au cours de l'angiogenèse physiologique, il existe une balance entre la signalisation des facteurs pro-angiogéniques, l'activité des MMPs, les facteurs anti-angiogéniques et les inhibiteurs de MMPs. Dans des contextes pathologiques, cette balance est perturbée. L'expression et l'activité des MMPs sont augmentées dans la plupart des cancers humains par rapport aux tissus sains. Ces enzymes, et plus particulièrement les MMP-2 et -9, jouent un rôle dans la croissance et la progression tumorale, notamment via la régulation de l'angiogenèse. Ainsi, les souris invalidées pour *Mmp-2* présentent une diminution de la croissance et de l'angiogenèse tumorale par rapport aux souris sauvages (Itoh et al., 1998). De plus, des études menées sur des souris *Mmp-9*^{-/-} ont montré que cette protéase

joue un rôle dans l'angiogenèse tumorale (Coussens et al., 2000), en augmentant notamment la biodisponibilité du VEGF (Bergers et al., 2000).

b. Synthèse d'une nouvelle matrice extracellulaire endothéliale

i. Le collagène de type IV

Le collagène de type IV est le constituant le plus abondant de la membrane basale. Il est capable de s'auto-assembler (contrairement aux collagènes fibrillaires) afin de former un réseau organisé, crucial pour la stabilité et l'assemblage de la membrane basale. Il existe six chaînes α différentes de collagène de type IV ($\alpha 1$ à $\alpha 6$) qui peuvent s'assembler en trois hétérotrimères différents, avec une distribution tissu-spécifique : $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$. Ainsi, $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$ est exprimé dans toutes les membranes basales dont la membrane basale vasculaire, alors que $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ est exprimé dans la membrane basale des glomérules du rein, la cochlée, les yeux, les testicules et les poumons, et $\alpha 5\alpha 5\alpha 6$ dans la membrane basale du rein, de la peau, de l'œsophage et des cellules musculaires lisses (Kruegel and Miosge, 2010). Chaque trimère est composé de trois domaines : un domaine 7S collagénique en N-terminal, un domaine triple hélice situé au milieu et un domaine globulaire non collagénique (NC1) en C-terminal. L'assemblage d'un trimère débute par l'interaction entre les domaines NC1 des différentes chaînes, aboutissant à la formation d'un protomère. La trimérisation du protomère se poursuit à partir du domaine C-terminal afin d'aboutir à un protomère assemblé flexible, qui peut se plier à chaque point d'interruption de la triple hélice dans la molécule. L'étape suivante consiste en la formation du dimère de collagène de type IV, où deux protomères de collagène de type IV s'associent via leur trimère NC1 situé en C-terminal, formant un hexamère de NC1. Puis l'interaction de quatre protomères au niveau de leur domaine 7S en N-terminal permet la formation d'un tétramère. (Kalluri, 2003)

Ces interactions sont stabilisées par la présence de ponts disulfures dans les domaines NC1 et 7S (Bailey et al., 1984), ainsi que par la présence de pontages covalents non réductibles de type lysyl oxydase dans le domaine 7S (Avery and Bailey, 2006). Ces interactions servent de base pour l'échafaudage du réseau de collagène de type IV et la formation d'une suprastructure. (Figure 20)

Le clivage du domaine NC1 du collagène de type IV par des protéases engendre la formation de fragments anti-angiogéniques tels que l'arrestine issue de la chaîne $\alpha 1$ (Colorado et al., 2000), la canstatine issue de la chaîne $\alpha 2$ (Kamphaus et al., 2000) et la tumstatine issue de la chaîne $\alpha 3$ (Maeshima, 2000).

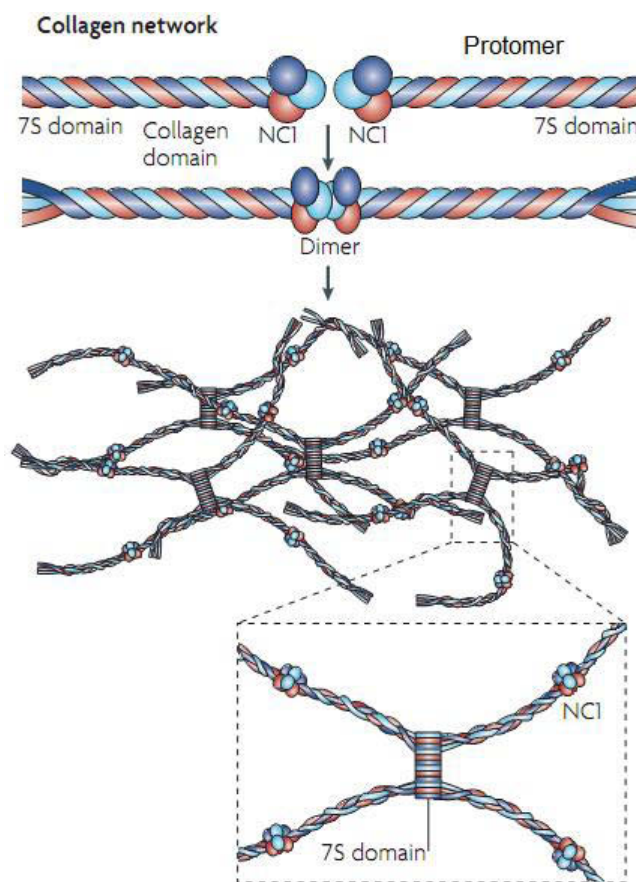


Figure 20 : Assemblage du collagène de type IV. Les domaines NC1 forment des dimères de collagène de type IV, tandis que les domaines 7S s'assemblent en tétramères. (Adapté de (Sorokin, 2010))

Au cours du développement, l'inactivation des sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ chez la souris, n'empêche pas la formation de la membrane basale mais conduit à une létalité embryonnaire comprise entre E10,5-E11,5 (Poschl, 2004). La mort des souris est due à des défauts de stabilité de la membrane basale, montrant que le collagène de type IV n'est pas indispensable à sa formation mais est nécessaire au maintien de son intégrité. De plus, la présence de mutations au niveau de la chaîne $\alpha 1$ est associée à l'apparition de porencéphalies (maladie neurologique liée à la formation de cavité intracérébrales, dues à une dégénérescence cérébrale impliquant des hémorragies, au cours de la gestation) (Gould et al., 2005) et d'accidents vasculaires cérébraux (Gould et al., 2006). En effet, ces mutations entraînent des défauts d'assemblage entre les chaînes, conduisant à une réduction du collagène de type IV, suggérant que le collagène de type IV joue un rôle critique dans la stabilisation des microvaisseaux.

ii. Les laminines

Les laminines sont des glycoprotéines hétérotrimériques constituées d'une chaîne α , une chaîne β et une chaîne γ liées entre elles par des ponts disulfures. Chez les vertébrés, cinq chaînes α , trois

chaines β et trois chaines γ , dont l'expression varie en fonction des types cellulaires et au cours du développement, ont été identifiées. Ainsi, 18 trimères différents de laminine ont pu être observés à ce jour sur les 45 trimères possibles (Kostourou and Papalazarou, 2014). Selon la nomenclature actuelle, les laminines sont nommées en fonction de leur composition en chaines α , β et γ . Par exemple, une laminine composée des chaines $\alpha4$, $\beta1$ et $\gamma1$ est appelée laminine 411. En général, les domaines N-terminaux des chaines de laminine sont impliqués dans leur auto-assemblage à la membrane basale, alors que leurs domaines C-terminaux (composés entièrement de séquences de la chaîne α) permettent l'interaction des laminines avec des récepteurs cellulaires dont les intégrines, impliqués dans la signalisation intracellulaire (Suzuki et al., 2005).

Les cellules endothéliales expriment majoritairement les laminines 411 et 511. (Figure 21)

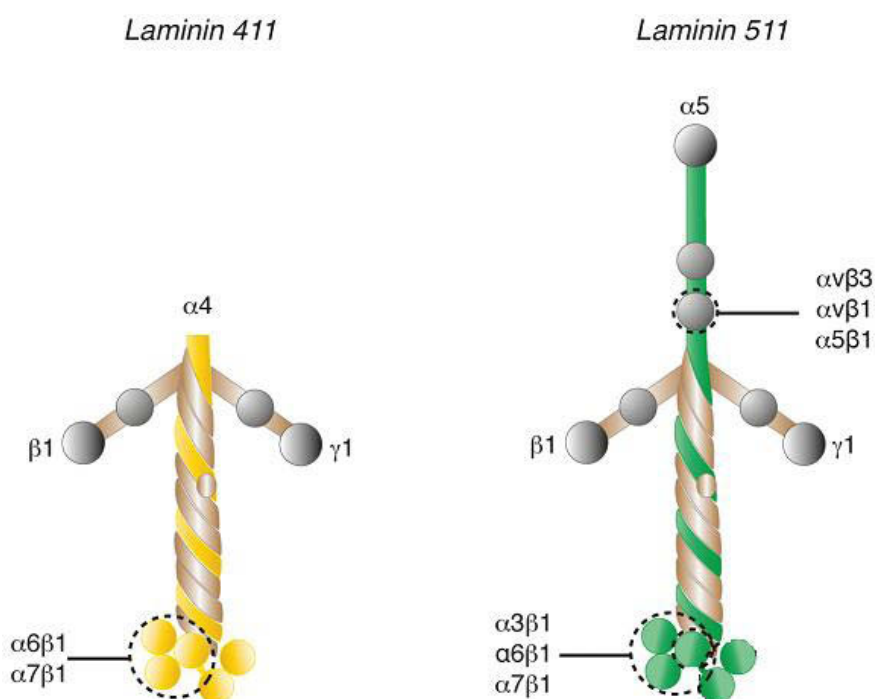


Figure 21 : Structure des laminines 411 et 511 avec leurs sites de liaison potentiels aux intégrines. Les cellules endothéliales expriment majoritairement les laminines 411 et 511, capables de se lier aux intégrines. (Adapté de (Yousif et al., 2013))

La laminine $\alpha4$ est exprimée de façon ubiquitaire dans la membrane basale endothéliale des différents types de vaisseaux, quelque soit le stade du développement (Frieser et al., 1997). L'expression de la laminine $\alpha5$ est observée en postnatale et est corrélée avec la maturité sexuelle de la souris. De plus, sa distribution varie en fonction du type de vaisseau (Sorokin et al., 1997). En effet, Sorokin et al. ont montré qu'au cours de l'embryogenèse la laminine $\alpha5$ est principalement exprimée par les gros vaisseaux mais pas par les capillaires. En revanche, chez les souris adultes, la chaîne $\alpha5$ est exprimée dans les capillaires et est considérée comme un marqueur de vaisseaux quiescents

matures. Les souris invalidées pour $\alpha 5$ meurent à E16,5 et ne présentent pas de phénotype vasculaire, mais des défauts de vascularisation du placenta. Ceci se traduit par une diminution du nombre de branchements et un élargissement du diamètre des vaisseaux, mais également une membrane basale discontinue et irrégulière (Miner et al., 1998). Les souris $\alpha 4^{-/-}$ se caractérisent par des défauts transitoires au niveau de la membrane basale vasculaire qui est discontinue et irrégulière, engendrant des hémorragies chez l'embryon et le nouveau né, mais pas chez la souris adulte (Thyboll et al., 2002). De façon concomitante à la perte d'expression de la chaîne $\alpha 4$, une diminution de l'expression des chaînes $\beta 1$ et $\gamma 1$, ainsi qu'une diminution de l'expression du collagène de type IV et du nidogène sont observées dans les capillaires des muscles squelettiques chez ces souris. Cependant, aucun phénotype n'est observé chez les souris adultes invalidées pour ce gène et l'expression de constituants de la membrane basale tel que le collagène de type IV est restauré, générant une membrane basale identique aux souris sauvages. De plus, il n'y a pas de différence de densité vasculaire entre les souris mutées et les souris sauvages, suggérant que l'angiogenèse développementale se déroule normalement. A contrario, dans le modèle de vascularisation de la cornée, l'invalidation de la chaîne $\alpha 4$ conduit, en réponse au FGF-2, à une augmentation transitoire du diamètre des vaisseaux, la formation de nouveaux vaisseaux par bourgeonnement et des hémorragies, avant d'être finalement converti en un réseau vasculaire apparemment normal après quelques jours (Thyboll et al., 2002). Ainsi, cette étude montre que la laminine 411 est nécessaire à la stabilisation des vaisseaux et que son absence conduit à la formation excessive de nouveaux vaisseaux sanguins, en présence de facteurs pro-angiogéniques. En accord avec ces résultats, Stenzel et al. ont montré que la perte d'expression de la chaîne $\alpha 4$ entraîne une augmentation de l'angiogenèse par bourgeonnement, dans le modèle de vascularisation de la rétine. Dans cette étude, la laminine $\alpha 4$ régule le nombre de tip cells ainsi que la densité vasculaire, en induisant la voie de signalisation DLL4/NOTCH. La laminine $\alpha 4$ est exclusivement exprimée au niveau du front de migration vasculaire, avec une expression plus importante au niveau des tip cells. La laminine $\alpha 5$ est quant à elle exprimée de façon plus distale par les cellules endothéliales de l'arbre vasculaire. En effet, les souris invalidées pour $\alpha 4$ présentent une formation excessive de filopodes et de tip cells dans la rétine, qui correspond au même phénotype que celui observé avec l'inhibition pharmacologique de NOTCH, conduisant à un bourgeonnement et à un branchement aberrant des vaisseaux nouvellement formés (Stenzel et al., 2011b). Ces résultats suggèrent que la laminine $\alpha 4$ induirait directement l'expression de DLL4 au niveau des tip cells, via des mécanismes régulés par l'intégrine $\beta 1$. Enfin, une autre équipe a démontré que la laminine 111 régule l'expression de la voie NOTCH via sa liaison aux intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ *in vitro* (Estrach et al., 2011).

Dans la littérature, peu d'études ont décrit le rôle des laminines dans l'angiogenèse tumorale. Ding et al. ont montré que l'utilisation de nanoparticules dirigées spécifiquement contre la laminine 411 conduit à une diminution de l'angiogenèse dans le gliome (Ding et al., 2010). Cependant, Zhou et al. ont publié des résultats opposés sur le rôle de cette laminine dans l'angiogenèse tumorale. En effet, la xélogreffe de cellules de carcinome du poumon en sous-cutané chez des souris invalidées pour $\alpha 4$ entraîne une augmentation de l'angiogenèse et de la croissance tumorale, par rapport aux souris contrôles (Zhou et al., 2004). Ce résultat pourrait être dû à une compensation par d'autres laminines et notamment la laminine 511, qui pourrait être induite en l'absence de la laminine 411.

iii. Les héparanes sulfates protéoglycans et les nidogènes

Les HSPGs sont des composants exprimés de façon ubiquitaire. Ils sont composés d'un cœur protéique avec entre une et quatre chaînes de polysaccharides, appelés héparanes sulfates (HS). Les HS sont des polysaccharides linéaires composés de polymères de N-acétylglucosamine et d'acide glucuronique. Le cœur protéique peut être soit transmembranaire, soit attaché aux GPIs, soit incorporé à la matrice. Les HSPGs peuvent se lier à de nombreux ligands dont les facteurs de croissance et leurs récepteurs mais aussi à des protéases, des chémokines et des protéines d'adhésion. Ces interactions permettent de réguler l'activité, la formation de gradient et la stabilité des complexes ligand/récepteur. La plupart de ces interactions se font directement via les HS. (Fuster and Wang, 2010)

Les HSPGs sont impliqués dans le processus angiogénique via de nombreux facteurs de croissance. Une étude a ainsi montré l'importance des HSPGs *in vitro* et *in vivo* dans la régulation de l'activité du VEGF, et plus particulièrement de sa régulation dans l'espace, afin de créer un gradient permettant la formation de branchements vasculaires (Ruhrberg et al., 2002) (voir partie I.C.2.a.). En effet, les HSPGs peuvent stimuler l'angiogenèse via le domaine N-terminal de leurs chaînes HS, en se fixant aux facteurs de croissance et en les concentrant à proximité de récepteurs de surface cellulaire, où ils sont présentés sous une forme active. Les HSPGs peuvent également avoir un rôle anti-angiogénique, en réduisant la signalisation, via la restriction de la diffusion des facteurs de croissance sur des distances plus petites. De plus, le clivage protéolytique du domaine C-terminal des HSPGs, entraîne la libération de fragments anti-angiogéniques tels que l'endostatine (Sasaki et al., 1999) et l'endorepelline (Mongiati et al., 2003).

Il existe différentes sous famille d'HSPGs :

- Les syndécans : Ce sont des protéines transmembranaires présentes sous quatre isoformes.
- Les glypicans : Il s'agit d'une protéine présente sous six isoformes qui est ancrée à la membrane plasmique via sa liaison à un GPI.

- L'agrine

- Le collagène de type XVIII

- Le perlecan : Il représente l'HSPG majoritaire dans la MEC vasculaire. Le cœur protéique du perlecan est divisé en cinq domaines qui possèdent chacun un ou plusieurs sites de liaisons pour des ligands, incluant des composants de la membrane basale, des molécules d'adhésion cellulaire et des facteurs de croissance. Le cœur protéique peut ainsi interagir avec la fibronectine, la laminine mais aussi le nidogène et la fibuline ; alors que les chaînes HS interagissent avec la laminine, le collagène de type IV et la fibronectine (Iozzo, 2005). Le perlecan est exprimé de façon ubiquitaire dans les membranes basales. Les souris invalidées pour le perlecan meurent de façon précoce entre E10 et E12 pour 50% d'entre elles, dû à des hémorragies au niveau de la cavité péricardiale, suggérant que l'absence de perlecan cause des anomalies de la membrane basale (Costell et al., 1999). Les 50% restant meurent après la naissance, à cause de défauts cérébraux et squelettiques (Arikawa-Hirasawa et al., 1999).

Aviezer et al. ont montré que le perlecan est impliqué dans l'angiogenèse *in vivo* dans un modèle de vascularisation des oreilles chez le lapin. Dans ce modèle, l'ajout de perlecan en présence de FGF-2 entraîne la fixation du facteur de croissance sur ce dernier, conduisant à l'augmentation de la vascularisation par rapport à la présence de FGF-2 seul. De plus, cette étude montre que le perlecan seul induit la vascularisation des oreilles par rapport au contrôle. (Aviezer et al., 1994). Sharma et al. ont quant à eux montré l'implication du perlecan dans l'angiogenèse et la croissance tumorale, via sa fixation au FGF-7, en invalidant son expression dans des modèles de xélogreffe de carcinome du colon et d'allogreffe de mélanome (Sharma et al., 1998). Si le perlecan est capable de se lier au VEGF, peu d'études ont été publiées *in vitro* ou *in vivo*, sur cette interaction. Néanmoins, une étude récente montre que les chaînes HS du perlecan sont des médiateurs importants de la réponse angiogénique dans l'ischémie de la patte chez la souris, via un mécanisme encore non déterminé, qui implique une augmentation de l'expression du VEGF (Qiang et al., 2014). De plus, notre équipe a très récemment montré que la liaison du VEGF165 au perlecan, qui peut être réprimée par la transglutaminase 2, augmente *in vivo* chez la souris, la vascularisation d'implants de Matrigel et la vascularisation de la rétine au cours du développement, contrairement au VEGF121. Ce travail montre également que cette interaction augmente la formation de capillaires *ex vivo* dans le modèle des anneaux d'aorte et la tubulogenèse *in vitro* dans le modèle des cytodex (Beckouche et al., 2015) (cf. article annexe).

Enfin, le clivage du perlecan permet la libération d'un fragment anti-angiogénique : l'endorepelline (voir plus haut), qui induit le désassemblage des fibres de stress et des adhésions focales, ainsi que l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales via l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (Bix et al., 2004).

Les nidogènes (également appelés entactines) sont des glycoprotéines exprimées de façon ubiquitaire. Il existe deux nidogènes (nidogène-1 et -2) codés par deux gènes différents et structuralement très similaires. Chacun d'eux est composé de trois domaines globulaires, deux amines (G1 et G2) et un domaine carboxyle (G3), interconnectés par un domaine linéaire. Le domaine G2 se lie au perlecan et au collagène de type IV, tandis que le domaine G3 se lie avec une forte affinité à la chaîne γ de la laminine (Kramer, 2005). Les souris invalidées pour le nidogène-1 ou le nidogène-2 ne présentent aucun défaut au niveau de la membrane basale (Murshed et al., 2000 et Schymeinsky et al., 2002), suggérant des phénomènes de compensation entre les deux protéines (Miosge et al., 2002 et Salmivirta et al., 2002). En effet, la double invalidation de ces gènes conduit à la mort périnatale des souris, due à des anomalies au niveau des poumons et du cœur, causées par des défauts au niveau de la membrane basale de ces organes (Bader et al., 2005). Ces souris présentent également des défauts au niveau de la membrane basale vasculaire, conduisant à une réduction de l'expression du collagène de type IV et du perlecan et à une perte pratiquement totale de l'expression de la laminine 411, causant des hémorragies au niveau de la peau (Mokkapati et al., 2008). Cependant, en dépit de l'expression ubiquitaire des nidogènes dans les membranes basales, les défauts observés ne sont pas présents dans tous les tissus, ni dans toutes les membranes basales, suggérant des rôles variés pour les nidogènes en fonction de leur localisation.

3) Les protéines matricellulaires

Les protéines matricellulaires ne jouent pas un rôle structural important. Elles interagissent cependant avec des protéines de la matrice, tels que les collagènes et participent donc à la régulation de l'assemblage de la MEC. Les protéines matricellulaires ont également une activité dépendante du contexte et du type cellulaire et modulent le comportement cellulaire en interagissant avec des récepteurs, des protéases et des hormones. Parmi elles on trouve notamment : SPARC (Secreted protein acidic and rich in cysteine), les ténascines-C et -X, ainsi que les thrombospondines 1 et 2 et ANGPTL4, plus particulièrement étudiées au laboratoire (Germain et al., 2010).

Les thrombospondines constituent une famille de glycoprotéines composée de cinq membres, qui ont une fonction de molécules adaptatrices pour guider la synthèse et le remodelage de la MEC (Tan and Lawler, 2009). Ces protéines se lient à la fibronectine, la laminine ou encore aux collagènes. Les thrombospondines 1 et 2 sont des molécules anti-angiogéniques associées à l'organisation de la MEC et à la modulation de la biodisponibilité des facteurs de croissance comme le FGF-2, le VEGF et ses récepteurs, le TGF- β ainsi que les MMP-2 et -9 (Iruela-Arispe et al., 2004). De nombreuses études ont également montré que les thrombospondines 1 et 2 sont impliquées dans la régulation de la

néovascularisation dans divers contextes physiologiques et pathologiques (Favier et al., 2005 ; Bréchet et al., 2008 ; Krady et al., 2008 ; Isenberg et al., 2009 et Sun et al., 2009).

ANGPTL4 est produite par de nombreux types cellulaires dont les cellules endothéliales en hypoxie (Le Jan et al., 2003). Elle appartient à la superfamille des angiopoïétines, impliquées dans la stabilisation et la maturation des vaisseaux. ANGPTL4 est impliquée dans l'angiogenèse et le métabolisme lipidique. Cette protéine interagit avec les HSPGs (Chomel et al., 2009) et possède des propriétés anti-angiogéniques, en inhibant l'adhésion, la migration et le bourgeonnement des cellules endothéliales (Cazes et al., 2006). Enfin ANGPTL4 joue un rôle dans l'inhibition de la perméabilité vasculaire dans des contextes de pathologies ischémiques cardiovasculaires et tumorales (Galaup et al., 2006 ; Galaup et al., 2012 et Bouleti et al., 2013).

c. Les interactions cellules-matrice extracellulaire via les intégrines

Au cours de l'angiogenèse, chaque protéine de la MEC possède des récepteurs se trouvant à la surface des cellules. Parmi eux les intégrines constituent les récepteurs majoritaires.

i. La famille des intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines transmembranaires hétérodimériques composées d'une sous-unité α et d'une sous-unité β . Elles sont impliquées dans la régulation cellule-cellule et cellule-matrice. Cette famille est composée de 18 sous-unités α différentes et 8 sous-unités β , capables de se lier de façon non covalente afin de former 24 intégrines (Hynes, 2002).

Il existe quatre sous-groupes d'intégrines en fonction de leur ligand : les récepteurs aux RGD (arginine-glycine-aspartate) représentant la sous-famille la plus importante, les récepteurs aux collagènes reconnaissant la triple hélice de leur ligand, les récepteurs spécifiques aux leucocytes et les récepteurs à la laminine. La liaison du ligand à l'intégrine entraîne la formation d'un agglomérat d'intégrines et la transduction de signaux intracellulaires. Contrairement aux facteurs de croissance, les intégrines ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque ou d'activité kinase, mais activent des voies de signalisation complexes en recrutant des kinases, telles que FAK (Focal adhesion kinase) ou SRC, et des protéines adaptatrices, telles que SHC et des RHO GTPases ou encore des protéines se fixant au cytosquelette d'actine, pour former des complexes d'adhésion focale. La signalisation induite par les intégrines promeut l'adhésion, la prolifération, la migration et la survie de nombreux types cellulaires. (Avraamides et al., 2008)

Les intégrines α_v ont pour ligand les protéines ayant un motif RGD comme la vitronectine, la fibronectine, le fibrinogène ou l'ostéopontine. L'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ par les cellules endothéliales, au cours de l'angiogenèse, est stimulée par des facteurs de croissance. Alors que des études basées sur l'utilisation d'antagonistes montrent que l' α_v promeut l'angiogenèse, les études d'inactivation de gène montrent que l'intégrine α_v n'est pas requise pour l'angiogenèse développementale. Une des hypothèses mise en avant pour expliquer ces résultats contradictoires serait qu'il existe une compensation via la voie de signalisation du VEGF, qui permettrait le processus angiogénique au cours de l'embryogenèse chez les souris $\alpha_v^{-/-}$. Les souris invalidées pour β_3 présentent quant à elles des défauts de maturation des capillaires coronaires, associés avec une augmentation de la signalisation du VEGF. Ces défauts peuvent être compensés par l'administration d'inhibiteurs du VEGF ou du VEGFR-2, entraînant la normalisation des vaisseaux (Weis et al., 2007). De plus, chez les souris $\beta_3^{-/-}$ l'angiogenèse tumorale est augmentée par rapport aux souris sauvages (Reynolds et al., 2002), avec une augmentation de l'expression et de la signalisation du VEGFR-2 (Reynolds et al., 2004). L'ensemble de ces résultats suggèrent ainsi que l'intégrine β_3 joue un rôle dans la réponse des cellules endothéliales au VEGF. D'autre part, la liaison de facteurs de croissance sur les intégrines tel que le VEGF, entraîne l'association de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ avec le VEGFR-2. Ce complexe agit de façon synergique dans la régulation de l'adhésion et de la migration des cellules endothéliales au cours du développement vasculaire, mais également dans la régulation de l'induction de l'angiogenèse par le VEGF (Mahabeleshwar et al., 2007). Les souris $\beta_5^{-/-}$ quant à elles, ne présentent aucun défaut de développement et une angiogenèse normale (Huang et al., 2000), montrant que $\alpha_v\beta_5$ n'est pas nécessaire au développement vasculaire.

La fibronectine possède un domaine RGD qui lui permet de se lier à l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ mais également à l'intégrine $\alpha_5\beta_1$. L'inactivation de la sous-unité α_5 est létale à l'état embryonnaire entre E10 et E11. Les embryons présentent des défauts de maturation et de stabilité des vaisseaux sanguins (Yang et al., 1993). Les souris invalidées pour β_1 meurent également à l'état embryonnaire avant le développement vasculaire, dû à des défauts d'implantation. La délétion spécifique de β_1 dans les cellules endothéliales est létale entre E9,5-11,5 et entraîne des défauts de maturation des vaisseaux via la régulation de l'adhésion, la migration et la survie des cellules, mais n'est pas nécessaire à la vasculogenèse (Carlson et al., 2008 ; Lei et al., 2008 et Tanjore et al., 2008). Enfin, l'utilisation d'antagonistes dirigés contre $\alpha_5\beta_1$ entraîne une diminution de l'angiogenèse physiologique mais également de l'angiogenèse tumorale (Kim et al., 2000). Les souris $\alpha_4^{-/-}$ sont létales à l'état embryonnaire et présentent quant à elles, des anomalies de formation des vaisseaux du cœur conduisant à des hémorragies (Yang et al., 1995).

La sous-unité $\alpha 6$ peut former des hétérodimères avec les sous-unités $\beta 1$ et $\beta 4$. Ces deux hétérodimères constituent des récepteurs aux laminines. L'intégrine $\alpha 6\beta 1$ est fortement exprimée par les capillaires endothéliaux *in vivo*. De plus, l'utilisation d'anticorps inhibiteurs dirigés contre $\alpha 6$, empêche la formation de tubes endothéliaux *in vitro*, suggérant l'importance d' $\alpha 6$ dans le processus angiogénique. La migration et la tubulogénèse des cellules endothéliales de microvaisseaux du cerveau sont également affectées après l'utilisation d'un siRNA dirigé contre $\alpha 6$ (Lee et al., 2006). L'intégrine $\alpha 6\beta 4$ n'affecte pas la prolifération des cellules endothéliales mais est requise pour leur adhésion et leur migration. Cependant, les souris invalidées pour $\alpha 6$ ou $\beta 4$ ne manifestent aucun défaut vasculaire (Georges-Labouesse et al., 1996 et van der Neut et al., 1996).

L'ensemble des études décrites montrent que les intégrines endothéliales, capables de se lier à divers ligands de la MEC, jouent un rôle important dans l'angiogenèse développementale et tumorale. L'invalidation des gènes codant pour ces intégrines n'entraîne pas de phénotype létal chez l'embryon dans la plupart des cas, suggérant une compensation fonctionnelle entre ces différentes intégrines au cours du développement.

D'autres mécanismes de régulation sont impliqués dans l'interaction cellules-MEC, en particulier dans les contextes tumoraux (Brock et al., 2015).

III. Le carcinome du rein à cellules claires

Le carcinome du rein (RCC) représente le cancer du rein le plus commun avec plus de 80% des cas et représente environ 3% des cancers chez l'adulte, avec une incidence en constante augmentation. Le tabac et le surpoids constituent des facteurs de risque, tout comme l'hypertension et les maladies rénales kystiques. La plupart des carcinomes du rein sont sporadiques mais dans 2 à 4% des cas, ils sont héréditaires.

A- Les différents types de carcinomes du rein

On distingue quatre types de carcinomes du rein selon leur origine: à cellules claires, papillaire, chromophile et du canal collecteur. Les carcinomes du rein à cellules claires et papillaires surviennent au niveau de l'épithélium du tubule proximal, alors que les carcinomes chromophobes et du canal collecteur surviennent au niveau du tubule collecteur.

Le carcinome du rein à cellules claires (ccRCC) représente le RCC le plus commun constituant 75 à 80% des cas. D'un point de vue histologique, le ccRCC se caractérise par un cytoplasme clair et des clusters de cellules entourées par un réseau vasculaire dense. Le carcinome papillaire compte entre 10 et 15% des cas, avec typiquement la présence de cellules ayant un cytoplasme basophile et des histiocytes spumeux. Les RCC chromophobes représentent environ 5% des cas. Dans ces tumeurs, les cellules tumorales ont un cytoplasme en général vide et se caractérisent par des espaces péri-nucléaires et un taux mitotique faible. De plus, dans la plupart des cas, ces tumeurs ont de plus faibles risques de développer des métastases. Enfin, les RCC du canal collecteur représentent moins de 1% des cas.

Notre équipe s'intéresse depuis de nombreuses années au carcinome du rein et plus particulièrement au ccRCC, qui constitue donc le type de cancer sur lequel mon projet de thèse est basé. Le terme cellules claires vient du fait que le cytoplasme des cellules tumorales est généralement composé de lipides et de glycogène, qui sont dissous au cours des processus histologiques, créant un cytoplasme clair entouré par une membrane cellulaire distincte. Cependant, les ccRCC sont également composés de populations de cellules tels que les CAFs ou encore les cellules endothéliales, avec un cytoplasme éosinophile. Le ccRCC se caractérise par la formation de nombreux vaisseaux sanguins et des cellules tumorales différentes d'un point de vue architectural et cytologique, mais partageant des caractéristiques moléculaires communes. De plus, ce carcinome métastase par voie hématogène via la veine cave, principalement dans le poumon. Des métastases rétrogrades sont également observées le long des veines paravertébrales jusqu'aux os. Peu de marqueurs de diagnostics ont été mis en évidence à ce jour dans le ccRCC. Cependant, notre équipe

a pu identifier ANGPTL4 comme étant un marqueur de diagnostic à la fois dans les tumeurs primaires et les métastases de ccRCC, indépendamment de leur statut VHL (Verine et al., 2010).

Ainsi dans le contexte du ccRCC correspondant à un carcinome très vascularisé dont la dissémination métastatique emprunte les voies de la circulation sanguine, mon travail de thèse répondait à la nécessité de mieux comprendre la contribution des cellules tumorales à l'angiogenèse.

B- Le carcinome du rein à cellules claires (ccRCC)

1) Les différents types de mutations impliquées dans le ccRCC

L'altération génétique du gène suppresseur de tumeur *VHL* (von Hippel Lindau) constitue la principale cause de ccRCC. Le syndrome de VHL est le syndrome tumoral héréditaire le plus commun conduisant au ccRCC, qui se caractérise par de multiples néoplasmes incluant : le ccRCC, des kystes rénaux, des hémangiomes de la rétine (tumeur vasculaire due à la prolifération anormale des cellules endothéliales), des hémangioblastomes du cervelet et de la moelle épinière (tumeur vasculaire), des phéochromocytomes (tumeur de la glande surrénale) et le carcinome du pancréas. L'inactivation du gène *VHL* par hyperméthylation de son promoteur, délétion d'un allèle (perte d'hétérozygotie) ou mutation est impliquée dans 60 à 90% des ccRCC sporadiques (Herman et al., 1994 et Clifford et al., 1998). L'inactivation de *VHL* entraîne l'expression constitutive de HIF- α (voir partie I.C.1.b.), créant ainsi une situation de pseudo-hypoxie. HIF- α est impliquée dans la régulation de la transcription de nombreux gènes ayant un rôle dans des voies de signalisation importantes pour la tumorigenèse, incluant l'angiogenèse mais également l'invasion et le métabolisme (Igarashi et al., 2002 et Raval et al., 2005). L'importance fonctionnelle de *VHL* comme suppresseur de tumeur, dans le ccRCC, a été établie en montrant que la réexpression de la protéine dans des xénogreffes de cellules de ccRCC invalidées pour *Vhl* chez la souris, inhibe la croissance tumorale (Iliopoulos et al., 1995).

Cependant, de nombreuses études ont montré que la perte de fonction de *VHL* participe à l'initiation du ccRCC de façon concomitante avec d'autres mutations, notamment dans des gènes codant pour des protéines impliquées dans la voie de signalisation PI3K-mTOR, dans un cas sur cinq. Ces mutations incluent des mutations perte de fonction dans des régulateurs négatifs de la voie, tels que *PTEN*, *TSC1* ou *TSC2* (Kucejova et al., 2011), ou des mutations gain de fonction incluant *PI3KCA*, *PI3KCB*, *PI3KCG*, *AKT1* à 3, *RHEB*, *MTOR*, *RPS6KA2*, *RPS6KA3*, *RPS6KA6* (Sato et al., 2013). D'autre part, Thomas et al. ont montré *in vitro* et *in vivo* que des cellules de ccRCC mutées pour *VHL* sont plus sensibles à un traitement dirigé contre mTOR, conduisant à l'arrêt de la croissance cellulaire et de la traduction de l'ARNm *hif-1 α* par rapport aux cellules contrôles (Thomas et al., 2006).

D'autres mutations de gènes impliqués dans la régulation de la structure de la chromatine ou de la modification des histones participent à l'initiation du ccRCC. Parmi eux on trouve *UTX/KDM6A* et

JARID1C/KDM5C codant pour des déméthylases de lysine de l'histone H3 et *SETD2* codant pour une méthylase de lysine de l'histone H3 (Dalgliesh et al., 2010). Une étude a montré que la mutation de *PBMR1*, qui code pour un complexe de remodelage de la chromatine, a été observée dans 41% des cas de ccRCC (Varela et al., 2011). La diminution de l'expression de *PBMR1* n'est pas corrélée avec la mutation de *VHL* mais est associée avec une diminution de l'espérance de vie (Pawłowski et al., 2013). *BAP1* code également pour une protéine impliquée dans le remodelage de la chromatine et sa mutation est associée à 15% des ccRCC, dans une étude montrant son association avec les tumeurs de haut grade et un faible pronostic (Peña-Llopis et al., 2012).

Sato et al. ont quant à eux montré que l'inactivation bi-allélique de *TCEB1* (codant pour l'élongine C appartenant au complexe ubiquitine-ligase E3), en l'absence de mutation de *VHL*, entraîne le développement de ccRCC. De façon similaire à ce qui est observé avec la mutation de *VHL*, la mutation de *TCEB1* empêche la dégradation de HIF- α et entraîne son activation constitutive (Sato et al., 2013).

2) Les voies de signalisation impliquées dans le ccRCC

La tumorigenèse du ccRCC est majoritairement due à la mutation de *VHL* et l'activation constitutive de HIF, indépendamment de l'hypoxie. Cependant, la dérégulation de voies de signalisation contribue également au développement du ccRCC, indépendamment de l'hypoxie, avec ou non un effet sur l'activation de HIF.

AKT et mTOR constituent deux protéines clef des processus oncogéniques, notamment via leur rôle sur la prolifération, la survie et l'angiogenèse. La fixation autocrine du VEGF et du PDGF sur leurs récepteurs tyrosine kinase, au niveau des cellules de ccRCC, entraîne l'activation de PI3K qui permet la production de PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). PIP3 recrute la kinase cytoplasmique AKT, au niveau de la membrane, où elle est activée par phosphorylation sur deux sites indépendants par PDK1 (Phosphoinositide dependent kinase-1) et mTOR (TORC2). L'activation de AKT inhibe l'apoptose en phosphorylant et inactivant des protéines pro-apoptotiques, telle que la pro-caspase 9 (Cardone et al., 1998). AKT inhibe également GSK3- β (Glycogen synthase kinase-3 beta), qui est impliquée dans la phosphorylation et la dégradation de protéines qui promeuvent le cycle cellulaire, comme la cycline D1 (Diehl et al., 1998) ou encore la prolifération cellulaire telle que NOTCH (Mckenzie et al., 2006). La signalisation du VEGF et du PDGF via AKT permet également d'activer mTOR, qui est donc localisée en amont et en aval de l'activation d'AKT. La protéine mTOR se décompose en deux complexes distincts : TORC1 (sensible à la rapamycine) qui régule positivement la synthèse de protéines et le cycle cellulaire ; et TORC2 (insensible à la rapamycine), qui régule la polarité et la croissance cellulaire en remodelant le cytosquelette d'actine (Wullschleger et al., 2006).

De plus, la signalisation de facteurs de croissance via la voie PI3K/AKT/mTOR est impliquée dans la régulation de HIF, via l'activation par phosphorylation de protéines ribosomales (voir partie I.C.1.c.) (Semenza, 2003 et Toschi et al., 2008). Plusieurs études ont ainsi montré l'implication de la voie PI3K/AKT/mTOR dans la croissance tumorale du ccRCC, notamment via l'activation du récepteur Notch1 (Xu et al., 2012 et Liu et al., 2013).

La voie Wnt/ β -caténine est également impliquée dans le développement du ccRCC. Wnt est une famille de glycoprotéines qui régule la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire. Le dernier effecteur de la voie de signalisation Wnt est le co-activateur transcriptionnel β -caténine. Dans les cellules normales quiescentes, la β -caténine est inhibée par phosphorylation sur deux résidus sérine et thréonine, par un complexe protéique constitué de GSK3- β , CK1 (Casein kinase 1), APC (Adenomatosis polyposis coli protein) et de l'axine, conduisant à sa dégradation par le protéasome. Wnt régule positivement la β -caténine en inhibant sa phosphorylation et donc sa dégradation. La β -caténine stabilisée entre dans le noyau, où elle se lie avec LEF-TCF (Lymphoid enhancer-binding factor 1-T cell specific transcription factor) et active la transcription de gène cibles, comme l'oncogène MYC ou le gène codant pour la cycline D1 (Clevers, 2006). Wnt est également impliquée dans la croissance cellulaire et tumorale, via l'activation de mTOR, en inhibant GSK3- β (Inoki et al., 2006). Plusieurs études ont ainsi démontré que la voie Wnt est activée dans le ccRCC, notamment avec la délétion homozygote du gène *CXXC4* codant pour IDAX, un inhibiteur de cette voie (Kojima et al., 2009) ; ou encore, l'hyperméthylation de promoteurs de gènes codant pour des antagonistes de Wnt tels que *WIF-1* (Wnt inhibitory factor-1) (Kawakami et al., 2009), *SFRP-1* (Secreted frizzled-related protein-1) (Awakura et al., 2008) et *DKK2* (Dickkopf-2) (Hirata et al., 2009). Le rein est également une source abondante de HGF (Hepatocyte growth factor). Des anomalies d'expression du HGF ainsi que de son récepteur c-MET sont souvent associées au carcinome du rein papillaire. La fixation de HGF sur c-MET induit sa phosphorylation et l'activation des voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT. La phosphorylation de MET induit également la phosphorylation de la β -caténine sur un résidu tyrosine (différente de la phosphorylation observée sur les résidus sérine et thréonine dans la voie Wnt), entraînant sa dissociation de la E-cadhérine, sa translocation au noyau et l'activation de la transcription de gènes cibles. Peruzzi et al. ont ainsi démontré le rôle de la voie HGF/ β -caténine dans le ccRCC. En effet, cette étude montre que la β -caténine est dégradée par l'activité E3 ubiquitine-ligase de VHL et que la mutation de *VHL* permet la signalisation de la β -caténine via le HFG (Peruzzi et al., 2006).

3) L'angiogenèse et les traitements anti-angiogéniques dans le ccRCC

Les ccRCC non métastatiques, c'est-à-dire restant localisés au niveau du rein, sont souvent traités par néphrectomie totale ou partielle. Les patients présentant quant à eux un ccRCC localement avancé ou métastatique peuvent être traités par des thérapies permettant de cibler les voies de signalisation impliquées dans le développement tumoral. La compréhension de plus en plus grande des mécanismes moléculaires sous-jacents au ccRCC a permis d'introduire cliniquement des agents ciblant la voie VHL/HIF. Avant 2005, les immunothérapies ciblant des cytokines, et plus particulièrement l'IL-2 (Interleukine 2) ou l'IFN α (Interféron α), étaient les seuls traitements disponibles pour traiter les ccRCC métastatiques et présentaient une faible efficacité. Ces dernières années, de nombreuses thérapies ciblant la voie de signalisation du VEGF ou de mTOR ont été développées et utilisées en parallèle, avec cependant de nombreux autres essais en cours. Ces traitements qui bloquent l'angiogenèse dépendante de la voie HIF, sont efficaces dans les ccRCC métastatiques et conduisent à la régression des vaisseaux tumoraux, associée à la nécrose de la tumeur. Parmi les drogues disponibles pour traiter le ccRCC, on trouve des inhibiteurs de kinases : le Sunitinib, le Sorafenib et le Pazopanib. Le Sunitinib est capable d'inhiber l'activité de plus de quatre-vingts kinases différentes, dont certaines sont impliquées dans la croissance tumorale, le processus métastatique et l'angiogenèse (Faivre et al., 2006). Parmi elles, on trouve un large éventail de récepteurs, incluant les récepteurs au VEGF, les récepteurs au PDGF, FLT3 (Fms-like tyrosine kinase 3) et KIT (récepteur de cellules souches). Le Sorafenib cible un spectre plus large de kinases, mais son activité inhibitrice est plus faible que celle du Sunitinib. Le Pazopanib est un autre inhibiteur de l'angiogenèse, autorisé depuis 2010 pour le traitement des ccRCC avancés ou métastatiques (Sternberg et al., 2010). En plus de ces petites molécules, des anticorps monoclonaux dirigés contre le VEGF ont été développés. Le Bevacizumab se lie spécifiquement au VEGF circulant avec une haute affinité, neutralisant toutes les isoformes du VEGF et empêchant la liaison du ligand à son récepteur et donc la transduction du signal. De façon importante, toutes les thérapies ciblant le VEGF, agissent de façon prépondérante sur les cellules endothéliales qui entourent la tumeur plutôt que sur la tumeur elle-même. Ces thérapies inhibent donc principalement l'angiogenèse et possèdent une activité anti-tumorale en bloquant l'apport en oxygène et nutriments aux cellules tumorales.

Contrairement aux thérapies visant le VEGF, les inhibiteurs de mTOR sont connus pour agir directement sur les cellules tumorales. Les traitements ciblant mTOR ont été mis en place à partir de 2007. Le Temsirolimus est un inhibiteur puissant de la voie PI3K/AKT/mTOR qui est souvent utilisé comme thérapie de première ligne, chez des patients ayant un ccRCC métastatique avec un mauvais pronostic. C'est un analogue de la rapamycine qui forme un complexe avec la protéine FK-506 et empêche l'activation de mTORC1, inhibant son activité kinase par un mécanisme allostérique. *In*

vitro, le Temozolimus diminue le niveau d'expression de HIF- α et du VEGF. L'Everolimus, un autre analogue de la rapamycine, est utilisé depuis 2009 pour le traitement du ccRCC. Les patients avec un ccRCC métastatique qui ne répondent pas au Sunitinib et au Sorafenib, sont traités avec de l'Everolimus comme thérapie de seconde ligne. (Figure 23) Cependant, tout comme le Temozolimus, l'Everolimus inhibe l'activation de mTORC1. Ainsi, ces deux analogues de la rapamycine initient un rétrocontrôle négatif conduisant à une augmentation paradoxale de l'activité de mTORC2 et d'AKT.

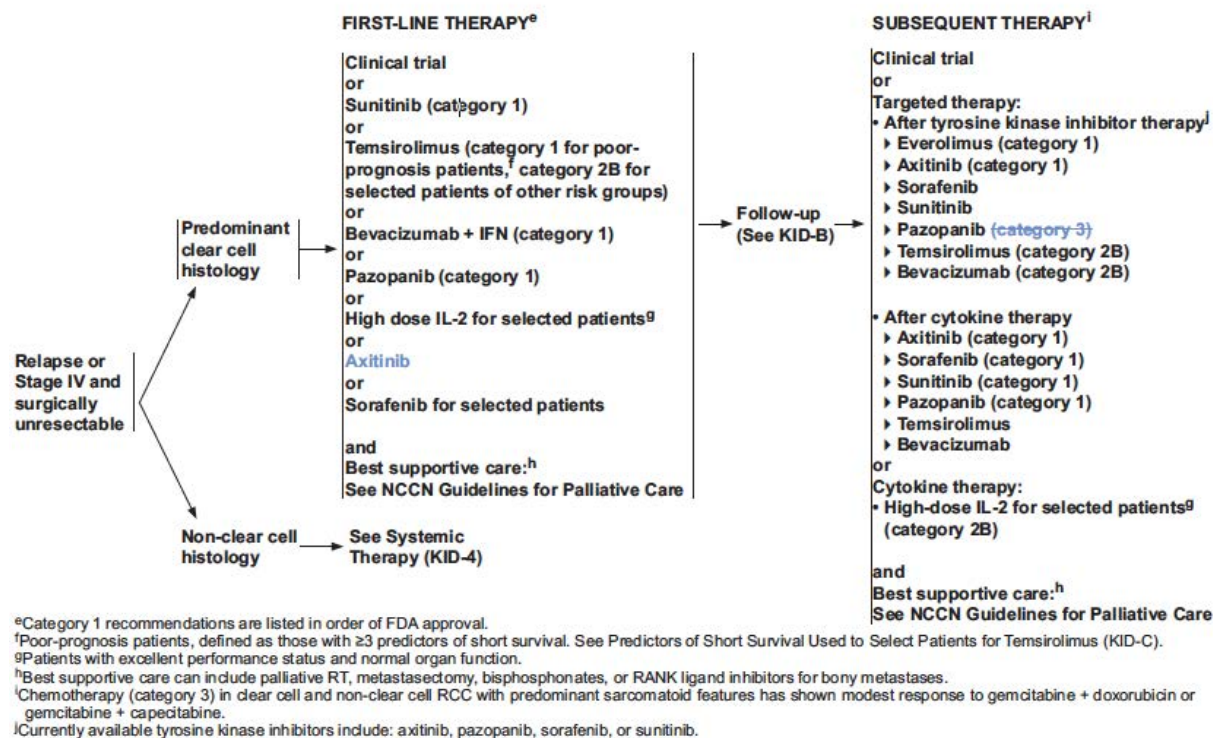


Figure 23 : Schéma récapitulatif des différents traitements utilisés dans le cas du ccRCC. Ensemble des thérapies de première et seconde ligne utilisées chez les patients ayant un ccRCC. (Motzer et al., 2015)

La résistance des cellules tumorales à la plupart des drogues cytotoxiques dans le ccRCC, a provoqué l'utilisation de nouveaux agents ciblant l'angiogenèse, dont certains d'entre eux ont été approuvés pour des utilisations thérapeutiques ou des essais précliniques et cliniques. Cependant, l'efficacité limitée des agents anti-angiogéniques récemment utilisés, nécessite de mieux comprendre la complexité de la vascularisation dans le ccRCC. En effet, bien que la majorité des patients avec un ccRCC métastatique bénéficient des thérapies ciblant la voie de signalisation VEGF/VEGFR et/ou mTOR, un pourcentage significatif de patients ne présentent aucune réponse ou une réponse partielle à ces traitements, alors que d'autres deviennent résistants. Ces résultats mitigés soulignent donc la nécessité de développer des thérapies alternatives. En outre, Varna et al. ont très récemment identifié la présence de cellules souches dans les zones périnécrotiques du ccRCC et ont montré une

augmentation du nombre de ces cellules après un traitement au Sunitinib, chez des patients répondant au Sunitinib mais également à partir de xénogreffes de ccRCC humain. De plus, cette étude montre que l'hypoxie augmente le nombre et la tumorigénicité des cellules souches, dans le modèle de xénogreffe, avant traitement au Sunitinib (Varna et al., 2015). Cette étude suggère donc que l'hypoxie constitue une voie essentielle pour l'échappement des tumeurs aux différents traitements existants.

Notre équipe s'intéresse au rôle de l'hypoxie et des protéines matricielles au cours de l'angiogenèse, notamment dans des contextes pathologiques. Ainsi nous avons pu identifier la lysyl oxydase like-2 comme un nouvel acteur de l'angiogenèse, induite par l'hypoxie dans les cellules endothéliales.

IV. Les lysyl oxydases

A- La famille des lysyl oxydases

1) La structure des lysyl oxydases

La famille des lysyl oxydases est constituée de cinq membres : LOX (Lysyl oxydase) et quatre protéines LOX-like (LOXL1 à 4). Ce sont des amines oxydases dépendantes du cuivre qui catalysent la déamination oxydative du groupe ϵ -amine de lysines et d'hydroxylysines, générant des résidus aldéhyde hautement réactifs qui initient le pontage covalente intra- et intermoléculaire des chaînes de collagène et d'élastine, stabilisant ainsi le dépôt de ces protéines dans la MEC (Lucero and Kagan, 2006). Le domaine catalytique situé en C-terminal des LOXs est hautement conservé entre chaque membre, incluant un site de liaison au cuivre, un cofacteur lysyl tyrosylquinone (LTQ) et un domaine « cytokine receptor-like » (CRL). Le cuivre et le cofacteur LTQ sont importants pour l'activité lysyl oxydase. Cependant, le cuivre n'est pas directement impliqué dans l'activité catalytique des LOXs, mais est requis pour le maintien de la conformation de la protéine et du cofacteur LTQ (Payne et al., 2007 et Lopez and Greenaway, 2010). Le cofacteur LTQ, formé par la liaison covalente entre les résidus Lys314 et Tyr349, fonctionne par transmission d'électrons.

Bien que les membres de la famille LOX possèdent plus de 50% d'homologie dans leur séquence, ils peuvent être divisés en deux sous-groupes basés sur la structure de leur domaine N-terminal. LOX et LOXL1 possèdent un pro-peptide (avec un domaine riche en proline pour LOXL1) (voir partie suivante) alors que LOXL2, LOXL3 et LOXL4 contiennent quatre domaines « Scavenger Receptor Cystein-Rich » (SRCR). (Figure 24) Les domaines SRCR sont chacun constitués de 90 à 115 acides aminés hautement conservés. Ils sont divisés en deux groupes : le groupe A qui contient les domaines SRCR codés par deux exons et qui possèdent six résidus cystéine et le groupe B avec des domaines codés par un seul exon et qui contiennent huit résidus cystéine. Ainsi, les LOXL2 à 4 possèdent quatre domaines du groupe A. La fonction biologique des domaines SRCR reste encore inconnue. Cependant, ces domaines sont souvent contenus dans des protéines produites par des cellules du système immunitaire et sont plus particulièrement localisés dans des protéines sécrétées ou liées à la membrane plasmique. Ces domaines sont impliqués dans l'adhésion et la signalisation cellulaire via la régulation d'interactions protéines-protéines. (Sarrias et al., 2004 et Martínez et al., 2011) Récemment, une étude a montré une interaction physique entre les domaines SRCR de LOXL2 et MARCKSL1 (Myristoylated alanine-rich C kinase substrate-like 1). MARCKSL1 est une protéine impliquée dans la régulation de l'homéostasie cellulaire et son interaction avec LOXL2 entraîne une diminution de l'apoptose dans le cancer du sein (Kim et al., 2014). Cependant, aucune autre étude n'a été décrite à ce jour dans la littérature concernant les domaines SRCR de LOXL3 et LOXL4.

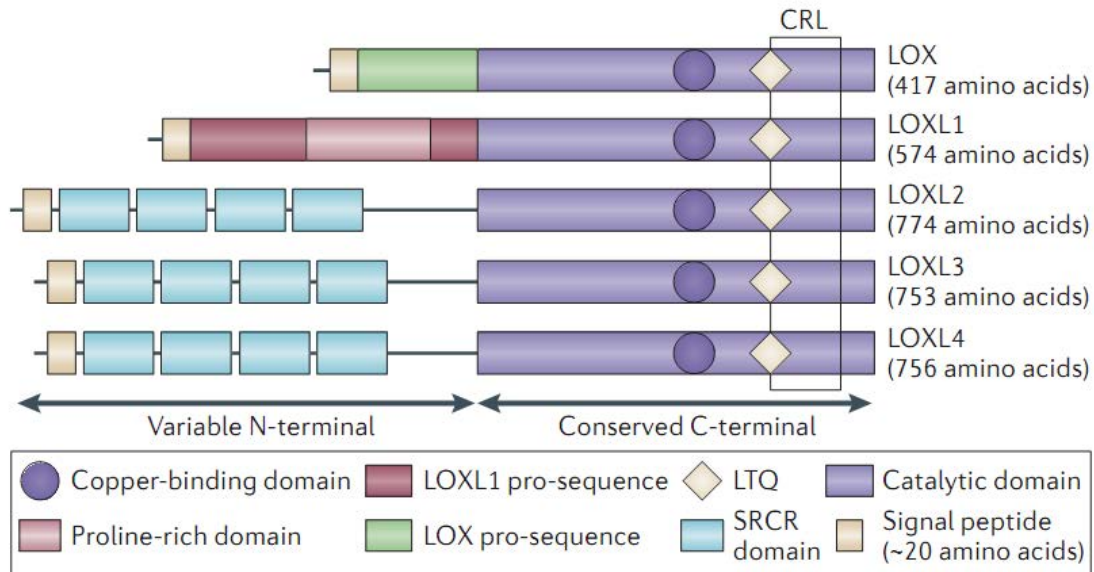


Figure 24 : Structure des membres de la famille des lysyl oxydases. La famille des lysyl oxydases comprend cinq membres : LOX, LOXL1, LOXL2, LOXL3 et LOXL4. (Barker et al., 2012)

Les collagènes et l'élastine constituent des substrats physiologiques de la famille des LOXs (voir partie IV.A.2.b). Ainsi, les LOXs promeuvent le pontage de ces molécules, conduisant à une augmentation de la force de tension et de l'intégrité structurale de la MEC, essentielles à la fonction du tissu conjonctif, au développement embryonnaire et au remodelage du tissu chez l'adulte (Perryman and Eler, 2014).

La présence de divers domaines protéiques chez les différents membres de la famille des lysyl oxydases suggère leur implication dans de multiples fonctions biologiques, au-delà de leur rôle dans la stabilisation de la MEC. En effet, de nombreuses études ont montré l'implication des lysyl oxydases dans le développement, l'adhésion, la migration et l'invasion cellulaire, mais aussi dans l'EMT et la tumorigenèse (voir parties IV.A.3., IV.A.4., IV.B.2. et IV.B.3.).

2) L'activité catalytique des lysyl oxydases

a. L'activation des LOXs

LOX est synthétisée sous forme d'une pro-enzyme de 50 kDa. Le clivage protéolytique du pro-peptide de LOX, après sa sécrétion, entre les résidus Gly162 et Asp163 par BMP-1 (Bone morphogenetic protein-1), est essentiel à l'exposition de son activité oxydase et génère une protéine mature de 32 kDa (Cronshaw et al., 1995 et Panchenko et al., 1996). Une étude a également montré que d'autres protéases clivent la pro-LOX aux mêmes sites, mais avec une efficacité plus faible, incluant mTLD (mammalian Tolloid) et mTLL 1 et 2 (mammalian Tolloid like-1 et 2) (Uzel et al., 2001). BMP-1, mTLD et mTLL 1 et 2 appartiennent à la famille des Tolloids. BMP-1 et mTLD sont codées par le même gène

et sont donc issues de l'épissage alternatif de leur ARNm, tandis que mTLL-1 et 2 sont codées par deux gènes différents. Ces protéines sont des métalloprotéases extracellulaires impliquées dans l'assemblage de la matrice, mais également dans l'activation de facteurs de croissance et la libération de facteurs anti-angiogéniques. (Vadon-Le Goff et al., 2015) De plus, l'activation de LOX semble être un processus finement régulé. En effet, Fogelgren et al. ont montré que LOX peut interagir avec la fibronectine et que la suppression de cette dernière dans des fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) diminue fortement l'activation protéolytique de LOX (Fogelgren et al., 2005). Ces résultats suggèrent ainsi que la fibronectine pourrait créer un microenvironnement spécifique favorisant la régulation de l'activité catalytique de LOX.

LOXL1 est synthétisée comme une pro-enzyme de 56 kDa. Son clivage protéolytique *in vitro* par BMP-1 produit des fragments de 52, 42 et 37 kDa, enzymatiquement actifs. Cependant, LOXL1 est retrouvée *in vivo* pratiquement exclusivement sous sa forme entière (Borel et al., 2001). De plus, Liu et al. ont montré que LOXL1 est attachée au site d'élastogénèse, pour exercer son activité oxydase, via l'interaction entre son pro-peptide et la fibuline 5 (protéine associée à la MEC) (Liu et al., 2004). En outre, la liaison de LOXL1 à la fibuline 5 pourrait également avoir un rôle régulateur sur son activité oxydase. Une autre étude a également montré que les pro-domaines de LOX et LOXL1 interagissent avec la tropoélastine (Thomassin et al., 2005). Ainsi, le pro-peptide de LOX et LOXL1 pourraient permettre la régulation de leur distribution spatiale, leur spécificité de substrat et de leur activité oxydase, via leur interaction avec les constituants de la MEC.

Concernant LOXL2, LOXL3 et LOXL4, aucune étude n'a à ce jour démontré la participation d'une enzyme protéolytique à l'activation de leur activité catalytique, bien que ces enzymes soient catalytiquement actives.

b. Les substrats des LOXs

Les collagènes et l'élastine sont les substrats principaux de LOX (Lucero and Kagan, 2006). Cependant, elle peut également oxyder des protéines globulaires basiques dont le point isoélectrique est supérieur ou égal à 8 (Kagan et al., 1984). Parmi ces protéines, on trouve les histones H1 et H2 (Kagan et al., 1984 et Giampuzzi et al., 2003) ainsi que le bFGF (Li et al., 2003). Palamakumbura et Trackman ont montré que la cadavérine (1,5-diaminopentane) est également un substrat de LOX (Palamakumbura and Trackman, 2002). De plus, cette étude propose une méthode permettant le dosage de l'activité catalytique des lysyl oxydases, utilisée au laboratoire (Thèse de Cathy Pichol-Thievend, 2012).

LOXL1 peut oxyder l'élastine, le collagène de type I et la cadavérine (Borel et al., 2001 et Kim and Kim, 2012). LOXL2 catalyse la déamination oxydative du collagène de type I, mais aussi de la

spermine et de la cadavérine (Vadasz et al., 2005 et Rodriguez et al., 2010). LOXL2 synthétisée à partir d'*Escherichia coli* peut oxyder l'élastine et les collagènes de type I, III et IV (Kim et al., 2011). Enfin, une étude plus récente a montré que LOXL2 déamine la lysine 4 de l'histone H3 (Herranz et al., 2012).

Les substrats de LOXL3 et LOXL4 ont été identifiés après leur surexpression et leur purification à partir d'*Escherichia coli*. Ainsi, LOXL3 catalyse la déamination oxydative de l'élastine et des collagènes I, II, III, IV, VI, VIII et X (Lee and Kim, 2006), alors que LOXL4 catalyse le benzylamine (Kim et al., 2003).

c. La réaction enzymatique des LOXs

Les collagènes et l'élastine possèdent une structure différente, mais contiennent tous les deux des pontages covalents de lysine et d'hydroxylysine, dont la formation est catalysée par les lysyl oxydases. Les lysyl oxydases déaminent le groupe ϵ -amine de lysines et d'hydroxylysines dans les collagènes et exclusivement de lysine pour l'élastine, afin de former des aldéhydes, α -aminoadipic- δ -semialdéhydes (AAS) également appelés allysines ou hydroxyallysines (Lucero and Kagan, 2006). (Figure 25)

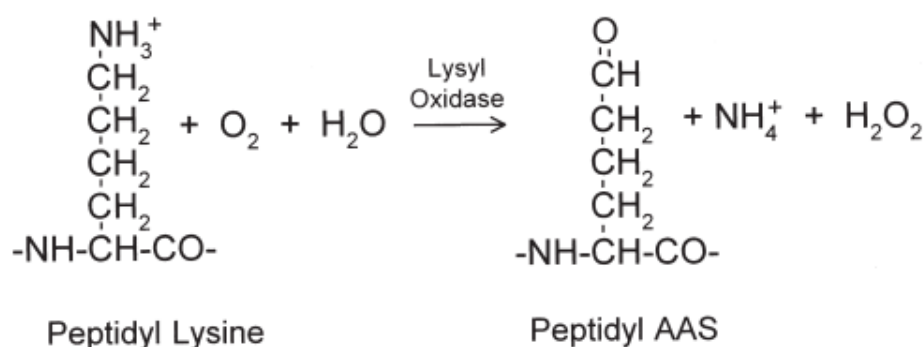


Figure 25 : Stœchiométrie de la réaction catalysée par les lysyl oxydases. Les lysyl oxydases déaminent les résidus lysines (et hydroxylysines) des collagènes et de l'élastine pour former des aldéhydes (AAS) capables de se condenser avec d'autres AAS ou des résidus lysines (et hydroxylysines), pour former des pontages covalents non réductibles. (Lucero and Kagan, 2006)

La déamination oxydative de résidus lysine ou hydroxylysine du collagène est suivie par des réactions de condensations spontanées qui conduisent à la formation de pontages bi-, tri- et tétra-fonctionnels. Les aldéhydes dérivés de lysine et d'hydroxylysine peuvent réagir avec des aldéhydes se situant sur les chaînes polypeptidiques adjacentes pour former un aldol, ou avec des résidus lysine et hydroxylysine non modifiés, formant un pontage bi-fonctionnel comme avec la lysiononleucine et l'hydroxylysinononleucine. Les produits de condensation des aldols peuvent également réagir avec un résidu histidine pour former un histidine aldol, qui peut lui-même réagir avec d'autres résidus lysine pour former un pontage tétra-fonctionnel appelé histidinohydroxymerodesmosine (Reiser et al.,

1992). Les hydroxylysines peuvent également former deux types de pontages tri-fonctionnels : le 3-hydroxypyridinium et le lysyl pyridinium (Reiser et al., 1992 et Bailey et al., 1998). (Figure 26)

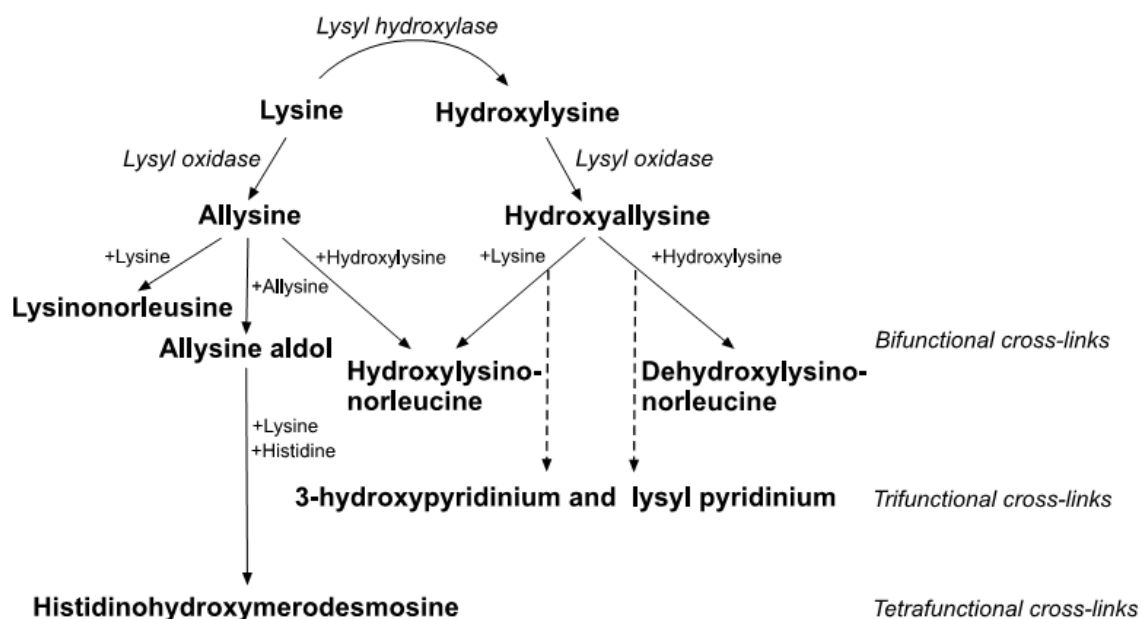


Figure 26 : La réaction de déamination par les lysyl oxydases sur les collagènes. La réaction de déamination engagée par les lysyl oxydases conduit à des réactions de condensation et la formation de pontages bi-, tri- ou tétra-fonctionnels dans les collagènes. (Source :URL: <http://herkules oulu.fi/isbn9514267397/>)

La tropoélastine, le précurseur de l'élastine, diffère du collagène du fait de l'absence de résidus hydroxylysine et histidine dans sa structure. Seuls des pontages dérivés de lysine sont donc observés dans l'élastine mature (Rosenbloom et al., 1993). De plus, certains produits de condensation, comme les desmosines et isodesmosines, sont spécifiques de l'élastine (Reiser et al., 1992 et Rosenbloom et al., 1993). Ces pontages se forment cependant de façon similaire à ceux retrouvés dans le collagène et peuvent être bi- (lysinonorleucine), tri- (merodesmosine) ou tétra-fonctionnels (desmosine et isodesmosine) (Reiser et al., 1992 et Rosenbloom et al., 1993). (Figure 27)

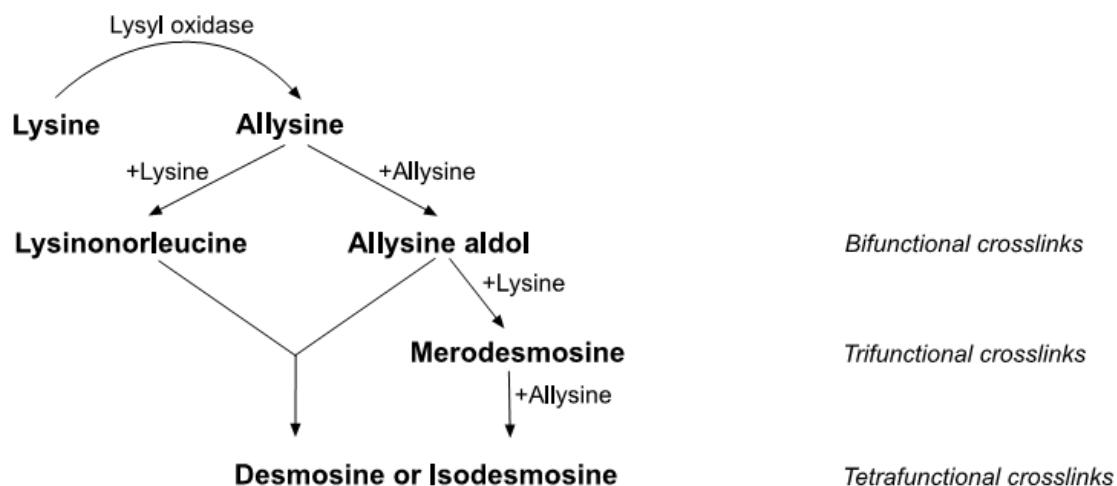


Figure 27 : La réaction de déamination par les lysyl oxydases sur l'élastine. La réaction de déamination engagée par les lysyl oxydases conduit à des réactions de condensation et la formation de pontages bi-, tri- ou tétra- fonctionnels de l'élastine. (Source :URL: <http://herkules oulu.fi/isbn9514267397/>)

d. L'inhibition de l'activité catalytique

L'administration de β -aminopropionitrile (β -APN) chez le rat au cours du développement conduit au lathyrisme (pathologie causée par une ingestion chronique de pois de senteur (*Lathyrus odoratus*) qui contient du β -APN) qui se caractérise par une augmentation de la fragilité des tissus conjonctifs et une augmentation de la solubilité des collagènes, dues à une diminution des pontages covalents (Julian et al., 1979). Le β -APN a été identifié par Narayanan et al., et constitue un inhibiteur spécifique de l'activité catalytique des LOXs (Narayanan et al., 1972). Le β -APN est un inhibiteur irréversible qui se fixe au niveau du site catalytique des LOXs, entrant en compétition avec les possibles substrats, ce qui empêche les lysyl oxydases d'être catalytiquement actives (Tang et al., 1983). Le β -APN a été utilisé dans de nombreuses études afin d'inhiber spécifiquement l'activité catalytique de LOX, LOXL1, LOXL3 et LOXL4 (Kim et al., 2003 ; Jung et al., 2003 ; Vadasz et al., 2005 ; Lee and Kim, 2006 et Kim and Kim, 2012). Concernant LOXL2, des études contradictoires ont été publiées ces dernières années sur l'effet inhibiteur du β -APN. En effet, une étude a montré que le β -APN était efficace pour inhiber l'activité lysyl oxydase de LOXL2 (Jung et al., 2003) alors que d'autres ont montré au contraire que cet inhibiteur n'avait aucun effet sur l'activité catalytique (Vadasz et al., 2005 et Kim et al., 2011). Néanmoins, une étude plus solide a montré que le β -APN avait un effet inhibiteur sur l'activité catalytique de LOXL2, de façon dose dépendante (Rodriguez et al., 2010). Enfin, les travaux de thèse d'une étudiante de notre équipe a permis de confirmer plus récemment que l'activité de LOXL2 est inhibée par le β -APN (Thèse de Cathy Pichol-Thievend, 2012).

3) Le rôle physiologique des lysyl oxydases

Les souris *Lox*^{-/-} meurent de façon périnatale dû notamment à un anévrisme aortique causé par : des défauts de structure de la lame élastique, une fragmentation des fibres élastiques et du collagène, une discontinuité au niveau de la couche de cellules musculaires lisses, une paroi anormalement fine de l'endothélium avec une diminution de la lumière et une altération morphologique des cellules endothéliales (Maki et al., 2002 et Hornstra et al., 2003). Ces deux études ont également reporté des anomalies au niveau du diaphragme, causées par des défauts d'organisation du collagène dans le tendon central, conduisant à sa rupture. Ces défauts d'organisation de l'élastine et du collagène sont corrélés avec une diminution du pontage de ces molécules chez les souris *Lox*^{-/-}, montrant ainsi l'importance de l'activité catalytique de LOX au cours du développement (Hornstra et al., 2003). Mäki et al. ont également montré que les souris *Lox*^{-/-} présentent des anomalies de développement au niveau des voies aériennes, également dues à des défauts d'organisation des fibres élastiques et du collagène (Mäki et al., 2005). LOX joue donc un rôle essentiel dans le développement et la fonction des systèmes cardiovasculaire et respiratoire. De plus, l'incapacité des autres lysyl oxydases à compenser l'absence de LOX suggère une distribution spatio-temporelle différentielle au cours du développement ou des fonctions différentes *in vivo*.

Les souris invalidées pour *Loxl1* sont viables et fertiles mais présentent un dépôt anormal des fibres élastiques au niveau des voies utérines chez les femelles en post-partum et un prolapsus des viscères du pelvis. On observe également un élargissement des voies aériennes, une peau lâche et des anomalies vasculaires avec une accumulation concomitante de la tropoélastine, causée par une diminution du pontage de l'élastine (Liu et al., 2004). De plus, ces souris ne présentent pas de défaut d'organisation des collagènes. Enfin, dans cette étude, Liu et al. ont montré que LOX ne compense pas le phénotype de LOXL1 et que les souris *Lox*^{-/-} et *Loxl1*^{-/-} présentent des phénotypes qui ne se recoupent pas, suggérant une différence fonctionnelle de ces deux enzymes *in vivo*. Ainsi, l'ensemble de ces travaux suggèrent que chaque membre de la famille des lysyl oxydases possède des fonctions qui lui sont propres.

Les souris invalidées pour *Loxl2* seront abordées dans la partie IV.B.2.

Les souris invalidées pour *loxl3* et *loxl4* n'ont quant à elles pas été décrites à ce jour dans la littérature.

4) Le rôle pathologique des lysyl oxydases

Une diminution de l'activité lysyl oxydase due à une diminution de la disponibilité en cuivre a été détectée dans deux maladies génétiques récessives liées à l'X : la maladie de Menkès (maladie multi-systémique caractérisée par une neurodégénérescence progressive et des anomalies au niveau du

tissu conjonctif) et le syndrome des cornes occipitales (forme atténuée de la maladie de Menkès) (Horn and Tümer, 2002). A contrario, la maladie de Wilson (maladie génétique autosomique récessive), qui se caractérise par l'accumulation de cuivre dans les hépatocytes, est associée à une augmentation de l'expression de LOX et LOXL2 ainsi que de leur activité lysyl oxydase, conduisant à une augmentation du dépôt de collagène autour des hépatocytes et par conséquent au développement d'une fibrose hépatique (Vadasz et al., 2005).

Le rôle des lysyl oxydases dans les cancers a émergé à partir d'articles ayant décrit *LOX* comme un gène suppresseur de tumeurs. Kenyon et al. ont en effet montré que la surexpression de *LOX* dans des fibroblastes de rat transformés par H-RAS supprime l'expression de cette dernière, aboutissant à une réversion de la transformation (Kenyon et al., 1991). Plusieurs études ont également rapporté une diminution de l'expression de l'ARNm *lox* ou de la protéine, notamment dans les carcinomes épidermoïdes de la tête et du cou (Rost et al., 2003) et les cancers gastriques (Kaneda et al., 2004). Cependant, seulement deux de ces études ont démontré que *LOX* avait un rôle de suppresseur de tumeur dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, Bouez et al. ont montré que la diminution de l'expression de *LOX* dans les kératinocytes entraîne leur invasion dans le derme, dans un modèle de peau *in vitro* (Bouez, 2006). Kaneda et al. ont quant à eux démontré que la transfection de *LOX* dans des cellules tumorales gastriques entraîne une diminution de leur prolifération, ainsi qu'une diminution de la tumorigenèse chez des souris nude (Kaneda et al., 2004). Concernant les autres lysyl oxydases, la surexpression de *LOXL1* et *LOXL4*, de façon indépendante, dans des lignées cellulaires de cancer de la vessie, inhibe la tumorigenèse via un effet antagoniste sur RAS, qui active la voie de signalisation ERK (Wu et al., 2007). L'expression de l'ARNm *lox1* est également diminuée dans le ccRCC (Tsuchiya et al., 2005).

Même si *LOX* a d'abord été décrit comme un gène suppresseur de tumeur, l'augmentation de l'expression de l'ARNm et/ou de la protéine a été démontrée dans de nombreux cancers (Payne et al., 2007). Ainsi, cette enzyme a plus largement été rapportée comme un facteur de mauvais pronostic, associé au processus métastatique dans les cancers du sein (Erlor et al., 2006), de la tête et du cou (Erlor et al., 2006), de l'œsophage (Sakai et al., 2009), du colon (Baker et al., 2011) et du poumon (Gao et al., 2010 et Wilgus et al., 2011). Le rôle de *LOX* dans la croissance tumorale et le processus métastatique a notamment été démontré en utilisant des shRNA, du β -APN ou encore un anticorps bloquant spécifiquement la fonction de *LOX in vivo*, dans des modèles de xénogreffes ou des modèles syngéniques (Erlor et al., 2006 ; Erlor et al., 2009 et Cox et al., 2015). Dans le ccRCC, l'expression de *LOX* est corrélée avec la progression tumorale (Stassar et al., 2001). De plus, *LOX* est nécessaire et suffisante pour réprimer la E-cadhérine, induire l'EMT et par conséquent la dissémination métastatique dans ce cancer (Schietke et al., 2010).

Concernant les autres lysyl oxydases, une expression élevée de LOXL4 a été rapportée dans le cancer de la tête et du cou (Scola and Görögh, 2010) et dans les adénocarcinomes colorectaux (Kim et al, 2009).

Les tumeurs se caractérisent par un dépôt anormal de MEC conduisant à la fibrose du tissu et à une augmentation de la rigidité par rapport aux tissus normaux, influençant ainsi l'invasion des cellules tumorales et par conséquent, le processus métastatique (voir partie II.B.1.a.). L'augmentation de la rigidité peut en partie être attribuée à une augmentation de l'activité des lysyl oxydases (Akiri et al., 2003). En effet, l'augmentation du pontage du collagène dans le stroma mammaire chez la souris, par l'activité de LOX, conduit à une augmentation de la rigidité de la MEC et promeut l'invasion et la progression des cellules tumorales, ainsi qu'une augmentation des adhésions focales (Levental et al., 2009). A contrario, l'inhibition de LOX réduit la fibrose du tissu et la progression tumorale, dans un modèle de tumeur du sein chez la souris, via l'inhibition de la signalisation au niveau de points d'adhésion focaux ou via la modulation de la rigidité du tissu, réduisant les adhésions focales et l'invasion tumorale (Levental et al., 2009). Ces résultats ont été également observés dans le cancer du colon, où l'augmentation de la rigidité, induite par LOX, stimule les intégrines qui activent SRC, conduisant à une augmentation de la prolifération et de l'invasion cellulaire, à la fois *in vitro* et *in vivo* (Baker et al., 2011).

La régulation de l'expression et de l'activité de la famille des LOXs est indispensable au maintien de l'homéostasie du tissu conjonctif. Ceci se traduit par la régulation de leur transcription et de leur distribution spatio-temporelle mais également par la modulation de leur activité enzymatique. Ainsi, l'expression aberrante des lysyl oxydases et/ou la dérégulation de leur activité catalytique est impliquée dans de nombreux cancers.

B. La lysyl oxydase like-2 (LOXL2)

1) Expression tissulaire et cellulaire de LOXL2

Chez l'homme, l'ARNm *lox12* est fortement exprimé dans le placenta, l'utérus, le pancréas et la prostate (Jourdan-Le Saux et al., 1999). Chez la souris, cette expression est retrouvée dans la peau, les poumons, le thymus ainsi que dans les testicules et les ovaires (Jourdan-Le Saux et al., 2000), alors que l'expression de la protéine est observée dans le cœur, les poumons et dans une moindre mesure, dans les reins et le foie (Martin et al., 2015). Au niveau cellulaire, l'expression de LOXL2 est augmentée dans les fibroblastes humains en sénescence par rapport aux fibroblastes normaux (Pascal et al., 2005). Une autre étude a montré une diminution de l'expression de l'ARNm *lox12*, au cours de la différenciation des myoblastes en ostéoblastes, contrairement à tous les autres membres de la famille des lysyl oxydases, dont l'expression est augmentée (Kaku et al., 2007). L'expression de

LOXL2 a été décrite dans plusieurs autres types cellulaires dont les kératinocytes et les chondrocytes (Fujimoto and Tajima, 2009 et Iftikhar et al., 2011) (voir partie suivante). Au niveau vasculaire, LOXL2 est exprimée par les cellules endothéliales (Lelièvre et al., 2008). De plus, l'hypoxie induit l'expression de l'ARNm *lox2* et/ou de la protéines via son activation transcriptionnelle par HIF- α dans les cellules endothéliales (Manalo et al., 2005) et les cellules épithéliales (Higgins et al., 2007 ; Schietke et al., 2010 et Wong et al., 2011). Notre équipe a quant à elle montré par une analyse protéomique que LOXL2 est sécrétée et s'accumule dans la MEC des cellules endothéliales, en réponse à l'hypoxie (Bignon et al., 2011).

2) Le rôle physiologique de LOXL2

Une étude très récente a montré que les souris invalidées pour *Lox2* sont viables et fertiles dans 60% des cas. Les 40% des cas restants sont létaux de façon périnatale (Martin et al., 2015). Ces souris présentent des malformations cardiaques et/ou une distension des vaisseaux hépatiques. De plus, aucune différence concernant l'expression des autres membres de la famille des lysyl oxydases n'a été détectée dans les différents tissus analysés, suggérant l'absence d'un effet compensateur entre les différentes protéines. A contrario, la surexpression de LOXL2 chez les souris entraîne une stérilité des mâles, due à une dérégulation de la spermatogenèse, causée par une malformation des testicules, accompagnée d'une inflammation importante et de fibrose (Martin et al., 2015).

Fujimoto et Tajima ont montré que l'expression de l'ARNm *lox2* est fortement réduite dans les kératinocytes différenciés, contrairement à *lox* dont l'expression est augmentée (Fujimoto and Tajima, 2009). De plus, LOXL2 inhibe la différenciation des kératinocytes via la fonction de ses quatre domaines SRCR, indépendamment de son activité catalytique (Lugassy et al., 2012). D'autre part, LOXL2 est requise pour la différenciation des chondrocytes via la régulation négative de Snail et Sox9, deux facteurs de transcription impliqués dans la répression de la différenciation des chondrocytes (Iftikhar et al., 2011).

Notre équipe a montré que LOXL2 joue un rôle dans l'angiogenèse au cours du développement. En effet, l'induction de LOXL2 par l'hypoxie conduit à son accumulation dans la MEC endothéliale. LOXL2 est impliquée dans la prolifération et la migration cellulaires et est nécessaire pour la formation de capillaires *in vitro* et *in vivo* chez le poisson zèbre, via son rôle sur le l'assemblage du collagène de type IV à la membrane basale dans le microenvironnement vasculaire. Cependant, ces effets sur l'endothélium dépendent partiellement de l'activité catalytique de LOXL2, suggérant de nouvelles fonctions de LOXL2, sur le remodelage de la MEC (Bignon et al., 2011). Ainsi, l'étude du rôle des différents domaines SRCR de LOXL2 au cours de l'angiogenèse fait l'objet d'une thèse en cours au laboratoire (Thèse de Claudia Umaña Diaz, 2015).

Enfin, nous avons vu précédemment que LOXL2 joue un rôle dans l'élastogénèse, via son activité catalytique. Lelièvre et al. ont démontré que la VE-statine/EGFL7 (Epidermal growth factor like-7) est un régulateur négatif de l'élastogénèse (Lelièvre et al., 2008). En effet, dans cette étude, la présence de VE-statine/EGFL7 empêche la conversion de la tropoélastine soluble en élastine mature et insoluble, via sa fixation sur le domaine catalytique de LOXL2. VE-statine/EGFL7 est une protéine exclusivement exprimée et sécrétée par les cellules endothéliales, qui module la migration des cellules musculaires lisses (Soncin et al., 2003). Cette protéine est fortement exprimée par les cellules endothéliales au cours du développement, puis son expression diminue chez l'adulte et devient seulement détectable dans un sous-ensemble de vaisseaux (Soncin et al., 2003 et Fitch et al., 2004).

3) Le rôle de LOXL2 dans les cancers

Tout comme pour les autres membres de la famille des lysyl oxydases, plusieurs études ont suggéré que *LOXL2* jouait un rôle de gène suppresseur de tumeur. En effet, *LOXL2* se situe dans une région du chromosome 8 fréquemment délétée dans le cancer de la prostate. De plus, la diminution de l'expression de *LOXL2* a été décrite dans plusieurs cas indépendants de cancers de la prostate chez l'homme (Schmidt et al., 2007). Plus récemment, une étude a montré la diminution de l'expression de l'ARNm *lox2* et de la protéine dans le cancer du poumon à non petites cellules par rapport au tissu normal (Zhan et al., 2011). De plus, une forte corrélation entre la faible expression de *LOXL2* et la faible différenciation des tumeurs, ainsi qu'un stade pathologique avancé ont été observés dans cette étude.

D'autres études, plus nombreuses, ont montré la surexpression de l'ARNm *lox2* et/ou de la protéine dans des cancers humains tels que le sein (Kirschmann et al., 2002 ; Akiri et al., 2003 et Barker et al., 2011), l'œsophage (Fong et al., 2007), le pancréas (Rückert et al., 2009), la tête et le cou (Chung et al., 2006 et Peinado et al., 2008), la prostate (Kirschmann et al., 2002), le mélanome (Kirschmann et al., 2002 et Peinado et al., 2005), l'estomac (Peng et al., 2009) et le rein (Barry-Hamilton et al., 2010 ; Schietke et al., 2010 et Hase et al., 2014), par rapport aux tissus normaux. D'autre part, l'augmentation de l'expression de *LOXL2* est associée avec des cancers plus agressifs, notamment dans le colon, le sein ou encore dans les cancers gastriques (Fong et al., 2007 ; Peinado et al., 2008 ; Peng et al., 2009 et Barry-Hamilton et al., 2010). Enfin, l'expression de *LOXL2* est souvent corrélée au grade de la tumeur ainsi qu'à un mauvais pronostic et une diminution de l'espérance de vie chez les patients (Fong et al., 2007 ; Peng et al., 2009 ; Barry-Hamilton et al., 2010 ; Rückert et al., 2009 et Barker et al., 2011).

Beaucoup de ces études se sont intéressées au rôle intracellulaire de *LOXL2* dans les tumeurs. Hollosi et al. ont montré que l'expression de *LOXL2* dans des cellules tumorales non invasives du sein

promeut à la fois, des changements morphologiques vers un phénotype mésenchymateux mais également leur capacité à migrer (Holloosi et al., 2009). La surexpression de LOXL2 dans des cellules rénales de chien change leur phénotype, d'une morphologie épithéliale vers une morphologie en fuseau de type fibroblaste, avec une distribution altérée des filaments intermédiaires de vimentine et la perte d'expression de la E-cadhérine (Peinado et al., 2005). Peinado et al. ont également montré que LOXL2 participe à l'EMT qui correspond à un processus promouvant la dissémination métastatique, en facilitant l'invasion des cellules tumorales à travers la MEC stromale interstitielle dans le microenvironnement et dans le système vasculaire par intravasation. En effet, LOXL2 interagit avec et stabilise le facteur de transcription Snail, empêchant sa dégradation par GSK3 β et conduisant à la diminution de l'expression de la E-cadhérine au niveau transcriptionnel, permettant ainsi l'induction de l'EMT (Peinado et al., 2005 et Peinado et al., 2008). Plus récemment, une étude a démontré que l'augmentation de l'expression de LOXL2 en réponse à l'hypoxie est nécessaire et suffisante pour réprimer la E-cadhérine et induire l'EMT dans le ccRCC (Schietke et al., 2010). LOXL2 peut également réprimer la transcription de la E-cadhérine et induire l'EMT en interagissant avec le facteur de transcription E47 (Canesin et al., 2014). LOXL2 intracellulaire est également impliquée dans la régulation de l'expression des gènes *CLDN1* (Claudin 1) et *LGL2* (Lethal giant larvae homologue 2), codant respectivement pour des constituants des jonctions serrées et des complexes de polarité cellulaire (Moreno-Bueno et al., 2011). En effet, LOXL2 permet de maintenir un phénotype mésenchymateux sur des cellules tumorales du sein, en régulant négativement la transcription de ces deux gènes, conduisant à la désorganisation de la polarité cellulaire et des jonctions serrées, indépendamment de l'activité catalytique de LOXL2, de la stabilité de Snail et de l'altération de l'expression de la E-cadhérine, suggérant l'existence de plusieurs mécanismes dans la régulation de l'EMT. Dans cette étude, Moreno-Bueno et al. n'ont néanmoins pas déterminé si la régulation transcriptionnelle de ces gènes par LOXL2 se faisait via une interaction directe de l'enzyme sur leurs promoteurs ou si LOXL2 s'associait à un ou plusieurs facteurs de transcription. Cependant, Herranz et al. ont démontré plus récemment que LOXL2 est associée à la chromatine, contribuant à son implication dans la déamination la lysine 4 de l'histone H3, dépendamment de son activité catalytique, et conduisant à la répression de *CDH1* codant pour la E-cadhérine (Herranz et al., 2012). Cette étude suggère ainsi que le rôle répresseur de LOXL2 pourrait être régulé via son interaction avec d'autres facteurs de l'EMT et/ou des régulateurs transcriptionnels. Enfin, une étude récente dans le ccRCC montre que LOXL2 est impliquée dans la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales en régulant l'expression et la fonction des intégrines $\alpha 5$ et $\beta 1$ (Hase et al., 2014). En effet, LOXL2 régule ces intégrines en inhibant leur dégradation par le protéasome, via un mécanisme qui reste encore à déterminer.

En plus de son rôle intracellulaire, plusieurs études se sont intéressées au rôle extracellulaire de LOXL2, notamment par son rôle sur le pontage du collagène et sur son possible effet sur la rigidité du microenvironnement, importante dans le comportement cellulaire et donc la progression tumorale. Ainsi, Barry-Hamilton et al. ont montré que l'inhibition de LOXL2 sécrétée *in vivo*, avec un anticorps spécifique, conduit à la diminution du nombre de fibroblastes activés, de cellules endothéliales et de la production de cytokines et de facteurs de croissance, comme le TGF β (Barry-Hamilton et al., 2010). Dans cette même étude, la surexpression de LOXL2 est quant à elle associée avec un stroma desmoplasique. L'ensemble de ces résultats suggère ainsi que LOXL2 participe à la formation et au maintien d'un microenvironnement tumoral. Akiri et al. ont quant à eux démontré que l'expression stable de LOXL2, dans une lignée de cellules tumorales du sein faiblement invasives et non métastatiques, entraîne simultanément l'acquisition de capacités invasives pour ces cellules et la formation de foci fibrotiques au sein de la tumeur, dans un modèle de xénogreffe, indiquant une association entre ces deux processus (Akiri et al., 2003). De plus, LOXL2 sécrétée régule positivement l'invasion et l'adhésion de cellules tumorales gastriques *in vitro* et promeut le processus métastatique *in vivo*, via l'activation de la voie de signalisation FAK-SRC (Peng et al., 2009). Barker et al. ont quant à eux montré que LOXL2 sécrétée promeut l'invasion de cellules tumorales mammaires, en induisant l'expression de TIMP-1 et de MMP-9 (Barker et al., 2011). En outre, Wong et al. ont montré que LOXL2 est impliquée dans la formation d'une niche métastatique. En effet, LOXL2 sécrétée dans les tumeurs s'accumule au niveau de sites pré-métastatiques et entraîne le pontage du collagène de type I, permettant le recrutement de cellules myéloïdes afin de former une niche métastatique et ainsi favoriser l'invasion des cellules tumorales dans le tissu cible, dans les cancer du sein et du foie (Wong et al., 2011 et Wong et al., 2014). Enfin, l'utilisation d'un anticorps spécifique dirigé contre LOXL2 provoque une diminution de la formation de capillaires *in vitro* et de l'angiogenèse *in vivo* dans les cancer du sein et de l'ovaire de façon dépendante de l'activité catalytique de l'enzyme, suggérant l'implication de LOXL2 dans la régulation de l'angiogenèse tumorale (Barry-Hamilton et al., 2010 et Zaffryar-Eilot et al., 2013).

D'après l'ensemble des données de la littérature, LOXL2 aurait donc un rôle sur le comportement des cellules tumorales (migration, prolifération,...), des cellules endothéliales (angiogenèse), sur l'activation des fibroblastes, mais aussi sur les interactions cellules-MEC et la rigidité matricielle, montrant ainsi le rôle de LOXL2 dans des contextes fonctionnels multiples.

CHAPITRE II : OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'équipe dirigée par Stéphane Germain s'intéresse au rôle de l'hypoxie et des protéines matricielles au cours de l'angiogenèse, dans des contextes physiologiques mais également pathologiques, telles que les maladies cardiovasculaires et les tumeurs. L'hypoxie constitue un stimulus majeur de l'angiogenèse, conduisant à un remodelage important de la MEC. De plus, l'hypoxie induit l'expression de nombreux gènes codant notamment pour des facteurs de croissance et des protéines impliquées dans la dégradation ou dans la modification de la structure de la MEC. Cependant, les données de la littérature concernant le rôle des protéines induites par l'hypoxie et impliquées dans le remodelage de la MEC restent encore trop limitées.

Ainsi, afin d'identifier de nouveaux acteurs de l'angiogenèse induits par l'hypoxie, notre équipe a réalisé des analyses transcriptomiques et protéomiques de MEC de cellules endothéliales. Ces travaux réalisés avant le début de mon travail de thèse ont permis d'identifier notamment deux protéines : LOXL2 et TG2.

Le rôle de TG2 au cours de l'angiogenèse a fait l'objet d'une thèse au sein de notre laboratoire (Nathan Beckouche, 2009-2013). Ce travail a permis de démontrer que TG2 limite la régulation de l'angiogenèse dépendante du VEGF165. En effet, la fixation de TG2 aux HSPGs, contrecarre l'interaction du VEGF165 avec ces HSPGs, conduisant à une diminution de la signalisation du VEGF et plus particulièrement de la phosphorylation de SRC et AKT, entraînant une diminution de la migration des cellules endothéliales et de la morphogénèse endothéliale *in vivo* et *in vitro*.

Le rôle de LOXL2 au cours de l'angiogenèse a quant à lui fait l'objet de trois thèses. Une première thèse a permis de montrer que LOXL2 joue un rôle dans l'angiogenèse développementale, avec un rôle seulement partiel de son activité catalytique (Cathy Pichol-Thievend, 2008-2012). En effet, LOXL2 promeut la prolifération et la migration des cellules endothéliales et est nécessaire pour la formation de capillaires *in vitro* et *in vivo* chez le poisson zèbre, via son rôle sur l'assemblage du collagène de type IV dans la membrane basale vasculaire. Une seconde thèse actuellement en cours a pour but d'étudier le rôle des différents domaines SRCR de LOXL2 dans les mêmes modèles *in vivo* et *in vitro* (Claudia Umaña Diaz, 2012-présent). Cette étude analyse également les éventuelles interactions entre LOXL2 et les différents composants matriciels dont le collagène de type IV.

Dans la littérature, des études sur le rôle de LOXL2 dans les cancers ont montré qu'elle régule l'angiogenèse tumorale et participe également à la formation et au maintien d'un microenvironnement tumoral, de façon dépendante de son activité catalytique (Barry-Hamilton et al., 2010 et Zaffryar-Eilot et al., 2013). De plus, plusieurs de ces études ont montré que LOXL2 est surexprimée dans le ccRCC, qui est un cancer très vascularisé et métastatique par voie hématogène, par rapport aux tissus normaux (Barry-Hamilton et al., 2010 et Hase et al., 2014).

L'objectif de mon travail de thèse a été de déterminer le rôle autonome cellulaire (cellules endothéliales) et non autonome cellulaire (cellules tumorales) de LOXL2 au cours de l'angiogenèse tumorale et plus particulièrement dans le ccRCC. Pour cela, j'ai analysé les sites d'expression de LOXL2 dans des tumeurs humaines de ccRCC. J'ai également développé au laboratoire deux modèles d'angiogenèse en 3D : 1/ *in vivo*, avec des implants de matrice tumorale cellularisés avec des cellules endothéliales ou des cellules tumorales chez la souris et 2/ *in vitro*, avec la formation de tubes endothéliaux à partir de sphéroïdes de cellules endothéliales.

Les résultats obtenus au cours de ma thèse font l'objet d'un article actuellement en préparation.

De plus, j'ai également participé à l'élaboration de l'article de Nathan Beckouche (cf. article annexe) reposant sur l'étude de TG2. J'ai ainsi pendant ma thèse travaillé sur deux protéines accumulées dans la matrice extracellulaire hypoxique et ayant une activité opposée sur l'angiogenèse, processus reposant sur la régulation fine entre facteurs pro- et anti-angiogéniques.

CHAPITRE III : RESULTATS

Mes travaux de thèse sont présentés sous forme d'article en cours de préparation. De ce fait, ce chapitre est constitué de la première page de l'article, de son résumé et du matériel et méthodes, sous forme de manuscrit en anglais, proche de la soumission. Les résultats sont rédigés en français mais contiennent les figures (principales et supplémentaires) et les légendes adaptées à un article à soumettre. De plus, certaines figures non référencées comme « article », sont présentées en compléments de travail dans le manuscrit de thèse.

Contribution of the tumor and endothelial LOXL2 to tumor angiogenesis

Virginie Lelarge^{1,2,3,4,5}, Laurent Bidault^{1,2,3,4}, Cathy Pichol-Thievend^{1,2,3,4}, Claudia Umana-Diaz^{1,2,3,4,5}, Alain Barret^{1,2,3,4}, Corinne Ardidie-Robouant^{1,2,3,4}, Matthieu Lesage^{1,2,3,4}, Irmine Ferreira^{6,7,8}, Jérôme Verine^{6,7,8}, Anne Janin^{6,7,8}, Laurent Muller^{1,2,3,4}, Catherine Monnot^{1,2,3,4*†}, Stéphane Germain^{1,2,3,4,8*}

¹ Collège de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Paris F-75005, France.

² CNRS, UMR7241, Paris F-75005, France.

³ INSERM, U1050, Paris F-75005, France.

⁴ Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer.

⁵ Université Pierre et Marie Curie (ED394), Paris F-75005, France.

⁶ Université Paris Diderot, Sorbonne Paris Cité, Laboratoire de Pathologie, UMR-S 1165, Paris F-75010, France.

⁷ INSERM, U1165, Paris F-75010, France.

⁸ AP-HP-Hôpital Saint-Louis, Service de Pathologie, Paris F-75010, France.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. E-mail: catherine.monnot@college-de-france.fr

Article in preparation.

Abstract

Angiogenesis is a major process involved in tumor microenvironment remodeling and tumor progression. LOXL2 belongs to lysyl oxidase family of secreted enzymes involved in extracellular matrix crosslinking, which plays a role in developmental and tumor angiogenesis. Deciphering the contribution of LOXL2 secreted by stromal and tumor cells to tumor angiogenesis is now a major challenge to determine new therapeutic targets.

In this study, we investigated the role of LOXL2 secreted by both endothelial and tumor cells in clear cell renal cell carcinoma, which is a highly vascularized and metastatic cancer.

We demonstrated that LOXL2 was expressed and secreted by both stromal and tumor cells. These data may suggest a specific role of LOXL2 depending on its cellular origin. We demonstrated that LOXL2 overexpressing endothelial cells promoted tumor angiogenesis *in vitro* using a 3D angiogenesis model and *in vivo* using cellularized Matrigel/fibrin implants assay. Moreover, we showed that the catalytic activity of endothelial LOXL2 increased tumor microenvironment stiffness. In addition, we demonstrated that LOXL2 overexpressing tumor cells stimulated angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. Conditioned medium of these tumor cells increased endothelial cell migration and proliferation. LOXL2 catalytic activity was involved in this process. Furthermore, we demonstrated that conditioned medium of LOXL2 overexpressing tumor cells increased PIGF, TIMP-1 and CREB expression in endothelial cells.

In conclusion, the dual action of LOXL2 from both compartments highlights its major contribution in remodeling the 3D microenvironment in tumor angiogenesis.

Material and Methods

Animal procedures

CD1 mice (Charles River, L'arbresle, France) were maintained and experiments performed in accordance with the guidelines of the institutional animal care and use of Collège de France and of Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (C 75-05-12) and the ethical guidelines for animal care of the European Community Council (directive 2010/63/UE). Experiments were approved by the local ethical committee (institutional animal care and use of Collège de France).

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were prepared and grown as previously described (Bignon et al., 2011). Experiments were performed between passages 1 and 5. Normal dermal human fibroblasts (NHDF) were purchased from Promocell (Heidelberg, Germany).

Cancer associated fibroblasts (CAF) were extracted from human ccRCC xenografts in nude mice performed as previously described (Varna et al., 2015). CAFs were isolated according to a protocol performed by Dr Danijela Vignjevic. RCC-4 cells were a gift from Patrick H. Maxwell's Laboratory (Cambridge Institute for Medical Research, University of Cambridge, Cambridge CB2 0XY, UK).

Expression vector, lentivirus and shRNA tools

cDNA encoding human LOXL2 was cloned in pLenti6/V5-DEST using the Gateway LR Clonase™ II (Invitrogen, Grand Island, NY, USA). Plasmids coding for shRNA were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Lentivirus production was performed using either ViralPower lentiviral expression system (Invitrogen) or Mission lentiviral Packaging Mix (Sigma-Aldrich). Endothelial cells isolated from one umbilical cord were split in two and infected before the first passage with control or LOXL2 targeting lentivirus. Infections were repeated on HUVECs from 3 different cords. Cells were selected with either blasticidin (2 µg/mL) or puromycin (1 µg/mL).

RCC-4 cells were infected with control or LOXL2 targeting lentivirus. Three independent infections were repeated. Cells were selected with either blasticidin (5 µg/mL) or puromycin (1 µg/mL).

Antibody and reagents

Anti-LOXL2 antibodies were from Abnova (Heidelberg, Germany) and Cell Signaling Technology (Boston, MA, USA) ; Anti-Palladin antibody was from Proteintech (Chicago, IL, USA) ; Anti-CD34, -FAP, -FSP-1, - α -SMA, -TIMP-1 antibodies were from Abcam (Cambridge, MA, USA) ; Anti-Vimentin antibody was from Sigma-Aldrich ; Anti-CD31, -CREB and -PIGF antibodies were from BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)

Fibrinogen and thrombin were from Corning (Corning, NY, USA), horseradish peroxidase was from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA, USA) and BD Biosciences, β -APN (β -aminopropionitrile) was from Sigma Aldrich and growth factor-reduced Matrigel™ was from BD Biosciences.

***in situ* Hybridization, immunohistochemistry and immunofluorescence**

In situ hybridization was performed as previously described (Bignon et al., 2011). A 1717 bp cDNA fragment (nucleotide 738-2455) was used to generate a ³⁵S-RNA antisense human *lox12* probe. A sense probe was used as a negative control. Adjacent slides were used for HE and IHC analyses.

For immunohistochemistry, paraffin blocks of human ccRCC were obtained from the Pathology Department of Saint-Louis and Tenon Hospitals, Paris, France. Immunostaining with anti-LOXL2 antibody was performed by routine methods using a biotinylated secondary antibody and the TSA-peroxydase complex (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) with diaminobenzidine (Dako, Glostrup, Denmark) used as the chromogen for detection. Slices were analysed with a Leica DMRB microscope.

For immunofluorescence, Matrigel/fibrin implants containing HUVECs were embedded in Tissue-Tek medium (Sakura, Alphen aan den Rijn, The Netherlands) on dry ice. Human capillaries and mural cells were identified with anti-human CD34 and anti- α -SMA antibodies. Whole Matrigel/fibrin implants containing RCC-4 cells were stained with anti-mouse CD31 and anti- α -SMA antibodies according to a previously described protocol (Laib et al., 2009). Images were acquired by a Leica SP5 microscope using a 20x objective, a 25x water objective or a 63x oil objective.

For immunofluorescence, confluent HUVECs, RCC-4 cells or CAFs were seeded on coverslips, grown for 4 days and were fixed with 4% PFA (Paraformaldehyde). Coverslips were mounted in Mowiol containing DAPI as nuclear stains. Images were acquired by a Leica DMIRB microscope.

Protein extraction and immunoblotting

Confluent HUVECs, CAFs or RCC-4 cells grown for 4 days. For secretion medium, proteins from overnight serum-free medium were TCA-precipitated before treatment with Laemmli buffer. Supernatants and pellets were both treated with Laemmli buffer. ECM or cell lysate samples were prepared as previously described (Bignon et al., 2011). Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes. Detection was performed using horseradish peroxidase secondary antibodies, using ECL (Enhance chemiluminescent) (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) as a substrate. Quantification was done with an ImageQuant LAS 4000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) and QuantityOne 4.6 software (Bio-rad, Hercules, CA, USA).

Cell migration assay

For the collective migration assay, monolayers of confluent HUVECs or RCC-4 cells were scratched with a pipette tip and stimulated with RCC-4 cells conditioned medium for HUVECs or 2% serum medium for RCC-4 cells. Empty areas were measured using MetaMorph 7.7 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Values at 16 hours for HUVECs and 24h hours for RCC-4 cells were subtracted from values at time 0. Scratch assay was performed in presence of 500 μ M β -APN, when indicated.

Matrigel/fibrin implant and 3D-sprouting assays

For *in vitro* 3D-sprouting assay, spheroids of 400 HUVECs were generated as previously described (Cazes et al., 2006) before inclusion in a growth-factor reduced Matrigel (7.5 mg/mL)/fibrin (5 mg/mL) gel containing or not purified human recombinant LOXL2 (0.5 μ M). NHDF were seeded on top of the gel and incubated in complete medium containing 5 ng/mL VEGFA (165) and 5 ng/mL bFGF or in RCC-4 cells conditioned medium. Endothelial capillaries were allowed to grow for 6 to 7 days. Assay was performed in presence of 500 μ M β -APN, when indicated. Cumulative tube length and tube number per spheroid were measured using MetaMorph 7.7 software.

For *in vivo* 3D-sprouting assay, gels of growth-factor reduced Matrigel (7.5 mg/mL)/fibrin (2.5 mg/mL) containing both 250 ng/mL VEGF-A (165) and bFGF were mixed with either spheroids of HUVECs (1000 spheroids of 100 cells) or RCC-4 cells in suspension (100000 cells). Implants were then injected subcutaneously on both side of CD1 mice as previously described (Laib et al., 2009). Three

weeks later, implants were excised and hemoglobin concentration was measured (Smadja et al., 2008) or implants were used for qualitative analysis by immunofluorescence.

Proliferation assay

HUVECs or RCC-4 cells were plated in 96-well plates and cultured in 0.5% serum medium for HUVECs and in serum-free medium for RCC-4 cells during 24 hours, before stimulation with RCC-4 conditioned medium for HUVECs or complete medium for RCC-4 cells for 48 hours. Total DNA content was quantified using CyQUANT Cell Proliferation Assay Kit (Invitrogen). Assay was performed in presence of 500 μM β -APN, when indicated.

Rheology

Rheological measurements were performed with a MCR302 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria). All experiments were realized at 20°C and data acquisition was done with Rheocompass software (Anton Paar GmbH). For *in situ* polymerization, rheological measurements were made with a cone (25mm)/plate geometry. A deformation $\gamma = 0.1\%$ was applied with a frequency of 1Hz. For *ex situ* polymerization, rheological measurements were made with a plate sanded mobile of 25 mm. A deformation $\gamma = 0.1\%$ was applied with a range of frequencies between 0.1 to 100 Hz with a constant normal force of 0, 0.04 and 0.1N.

Statistics

Statistical analyses of data were performed with the Student's t-test, unless otherwise stated and considered significant when the p value was <0.05 (GraphPad Prism 4, GraphPad Software). Error bars represent the standard error of the mean.

I. Expression de LOXL2 dans le ccRCC humain

A- Expression tissulaire de LOXL2

Le carcinome du rein à cellules claires (ccRCC) est un cancer très vascularisé et métastatique par voie hémotogène. Comme mentionné dans l'introduction, notre laboratoire possède une grande expertise de l'analyse moléculaire de divers acteurs impliqués dans ce type de cancer, notamment via l'identification d'ANGPTL4 comme un marqueur de diagnostic du ccRCC (Verine et al., 2010). De plus, plusieurs études ont montré que LOXL2 est surexprimée dans le ccRCC, par rapport aux tissus normaux (Schietke et al., 2010 ; Barry-Hamilton et al., 2010 et Hase et al., 2014). Cependant, ces études n'ont identifié qu'une expression globale de l'ARNm dans ces tumeurs ou encore qu'une expression stromale de la protéine. En outre, des études ont montré que LOXL2 régule l'angiogenèse tumorale et participe également à la formation et au maintien d'un microenvironnement tumoral, de façon dépendante de son activité catalytique (Barry-Hamilton et al., 2010 et Zaffryar-Eilot et al., 2013).

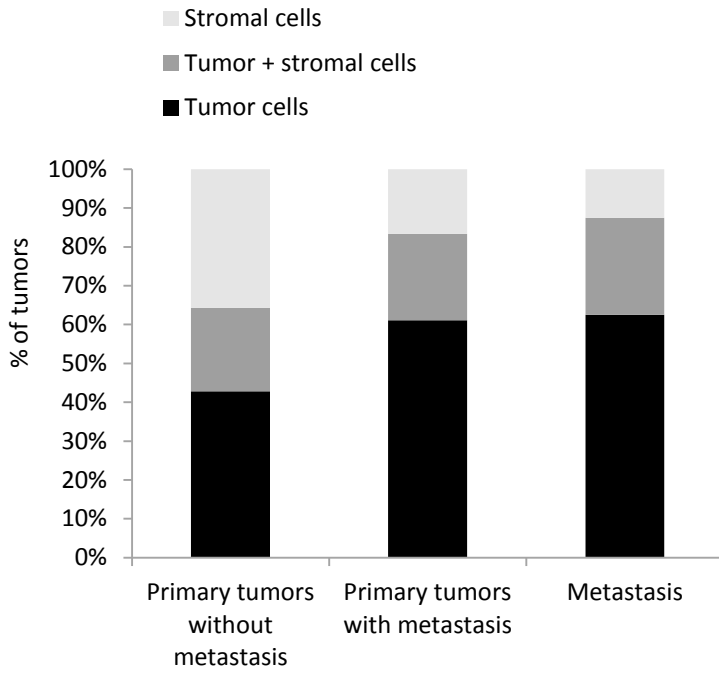
Dans le cadre de ma thèse, j'ai analysé l'expression de l'ARNm *lox12* dans des tumeurs humaines de ccRCC par hybridation *in situ*. Cette analyse, réalisée de façon conjointe avec le Dr Jérôme Verine (Hôpital Saint-Louis, Paris), montre qu'il existe une expression différentielle de l'ARNm *lox12* entre les tumeurs primaires avec ou sans métastases associées. En effet, l'expression de *lox12* dans les tumeurs primaires sans métastases associées est observée de manière équivalente entre les cellules stromales et tumorales, tandis que cette expression est majoritairement observée dans les cellules tumorales pour les tumeurs primaires avec des métastases associées et les métastases (article, figure 1A). L'observation de cette tendance est cependant à pondérer par le nombre d'échantillons analysés.

L'expression de l'ARNm *lox12* exprimé à la fois par les cellules stromales et tumorales est illustré dans la figure 1B (article, figure 1B). Enfin, l'expression de la protéine est corrélée à l'expression de l'ARNm, à la fois dans les cellules stromales et tumorales (article, figure 1B).

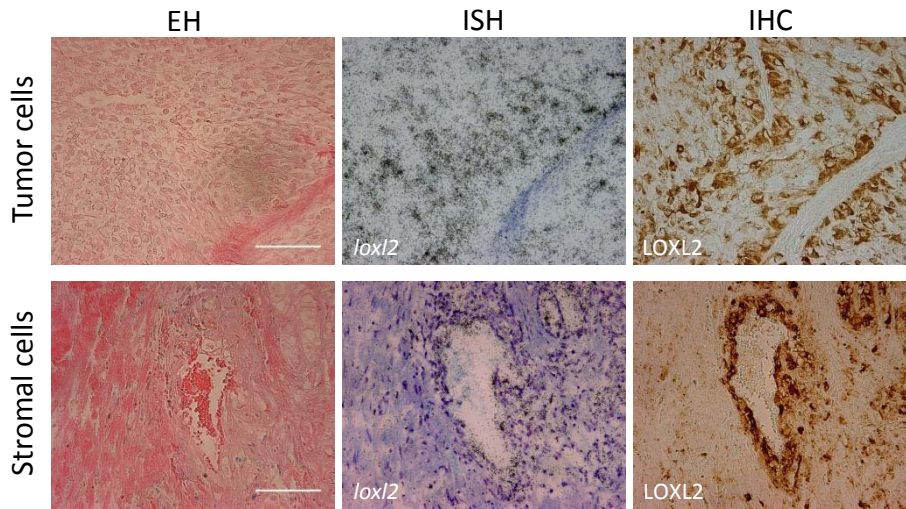
Ces résultats suggèrent que LOXL2 pourrait avoir un rôle spécifique en fonction de son origine cellulaire dans les tumeurs. De plus, j'ai pu démontrer que LOXL2 est exprimée par les cellules stromales et tumorales dans le ccRCC humain.

Figure 1

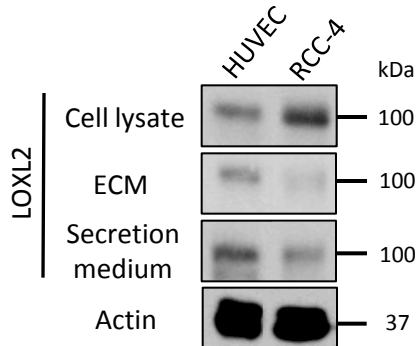
A



B



C



D

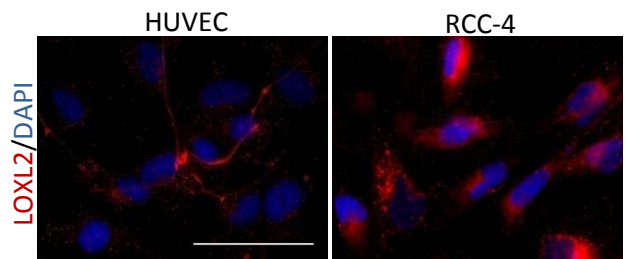


Figure legends

Figure 1. LOXL2 expression in human ccRCC.

(A) Expression of *lox12* mRNA. *In situ* hybridization of *lox12* antisense probe is performed on primary ccRCC tumors from patients without any known metastasis (n=14) or from patients bearing metastasis (n=18) and ccRCC-associated metastasis (n=16). Depending on patient, *lox12* mRNA is detected only in tumor cells or in both cell types (tumor + stromal cells) or only in stromal cells. **(B)** *lox12* mRNA and LOXL2 protein in tumor (upper panels) and stromal (lower panels) cells. Eosin-Hematoxylin (EH) staining, *in situ* hybridization of *lox12* antisense probe (ISH) and immunohistochemistry of LOXL2 (IHC) are performed on adjacent slides. Scale bar, 100 μ m. **(C and D)** LOXL2 protein in endothelial (HUVECs) and tumor (RCC-4) cells. Samples of cell lysate, ECM and secretion medium from HUVECs or RCC-4 cells were immunoblotted for LOXL2. Same samples of cell lysates were immunoblotted for actin as control **(C)**. LOXL2 expression was analyzed by immunofluorescence on HUVECs or RCC-4 cells. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar, 50 μ m **(D)**.

B- Expression cellulaire de LOXL2

Nous nous sommes alors intéressés à l'expression de LOXL2 à la fois dans les cellules stromales (à l'exception des cellules inflammatoires) et tumorales *in vitro*. Nous avons montré que les cellules endothéliales (HUVECs pour Human umbilical vein endothelial cells), les fibroblastes associés au cancer (CAFs) issus de xénogreffes de ccRCC, ainsi que les cellules tumorales de ccRCC (RCC-4) expriment LOXL2, par analyses en western blot et immunofluorescence (article, figure 1C et 1D et figure supplémentaire 1C).

Les CAFs ont été isolés à partir de xénogreffes de tumeurs humaines de ccRCC (collaboration avec le laboratoire d'Anne Janin - Hôpital St Louis, avec la participation d'Irmine Ferreira) mais possèdent cependant une origine majoritairement murine (Figure 28).

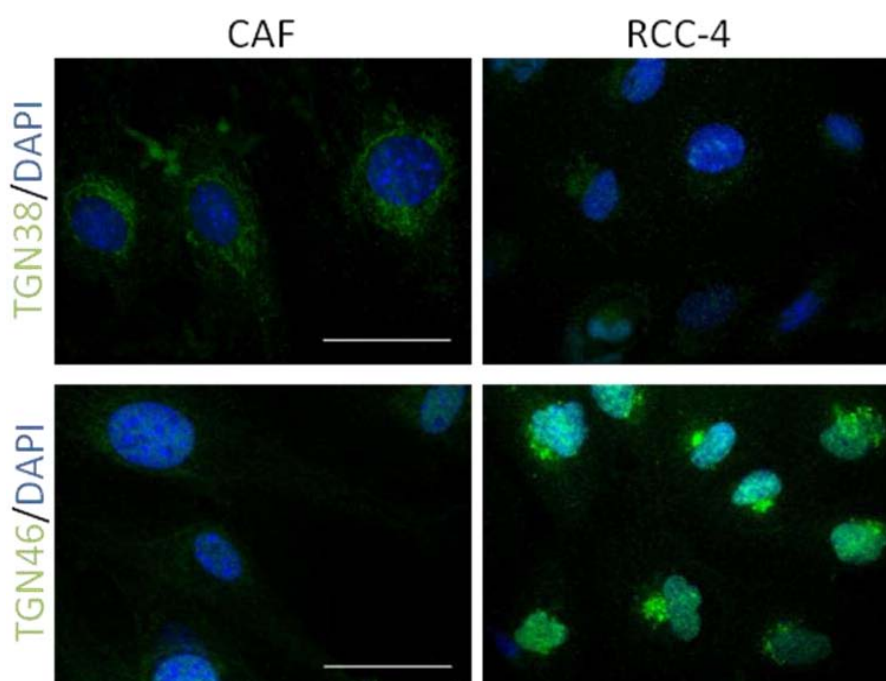


Figure 28 : Caractérisation de l'origine des CAFs. Immunofluorescence sur CAF (gauche) et RCC-4 (droite). Haut : Marquage TGN38 (Trans golgi network 38). Cet anticorps permet de reconnaître spécifiquement les cellules d'origine murine, tels que les CAFs. Bas : Marquage TGN46 (Trans golgi network 46). Cet anticorps permet de reconnaître spécifiquement les cellules d'origine humaine, comme les RCC-4.

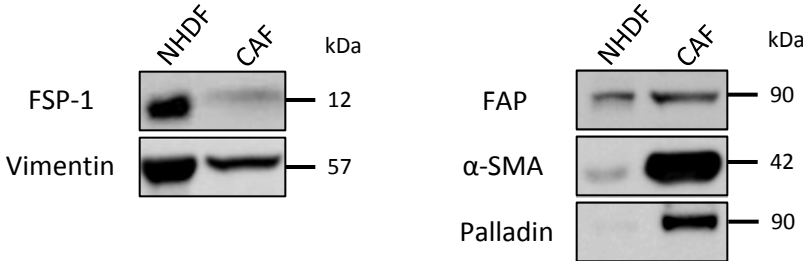
Ces CAFs ont ensuite été caractérisés en analysant par immunofluorescence et western blot, l'expression de marqueurs spécifiques de CAFs, comme l' α -SMA, FAP et la palladine (spécifique des CAFs de ccRCC) (Gupta et al., 2011), et de marqueurs de fibroblastes tels que FSP-1 et la vimentine, (figure supplémentaire 1A et 1B). Ce profil d'expression a été comparé à celui de fibroblastes normaux (NHDFs pour Normal human dermal fibroblasts). Si les résultats préliminaires obtenus après l'isolement de CAFs provenant de plusieurs xénogreffes de ccRCC étaient très encourageants, les

difficultés rencontrées au cours de l'infection de ces cellules avec les lentivirus permettant la modulation du niveau d'expression de LOXL2 ainsi que pour obtenir ces xéno greffes de façon régulière, ne nous ont pas permis de développer mon projet de thèse autour de cet axe.

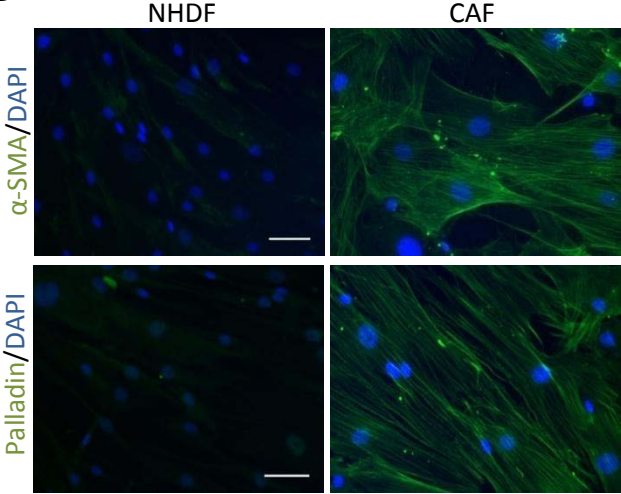
L'ensemble de ces résultats montrent donc que la protéine LOXL2, exprimée par les cellules tumorales et les cellules stromales (endothéliales et CAFs), est sécrétée dans le microenvironnement tumoral des ccRCC. D'après l'ensemble de ces résultats et des données bibliographiques, mon travail de thèse a donc consisté à déterminer le rôle de LOXL2 sécrétée par les cellules endothéliales et tumorales sur l'angiogenèse, dans le ccRCC.

Supplemental figure 1

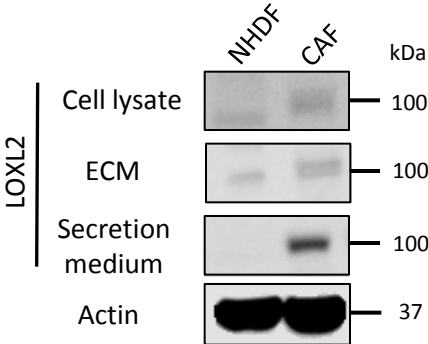
A



B



C



Supplemental figure legends

Supplemental Figure 1. LOXL2 expression in CAFs from ccRCC.

(A) Characterization of CAFs from ccRCC. Equal amounts of cell lysates from NHDF or CAF were immunoblotted for fibroblast markers, FSP-1 or vimentin (left panels) or CAF markers, FAP, alpha-SMA or palladin (right panels). (B) Alpha-SMA or palladin expression was analyzed by immunofluorescence on NHDF or CAF. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar, 50 μ m. (C) Samples of cell lysate, ECM and secretion medium from NHDF or CAF were immunoblotted for LOXL2. Same samples of cell lysates were immunoblotted for actin as control.

II. Rôle de LOXL2 au cours de l'angiogenèse tumorale

A- Rôle de LOXL2 microenvironnementale

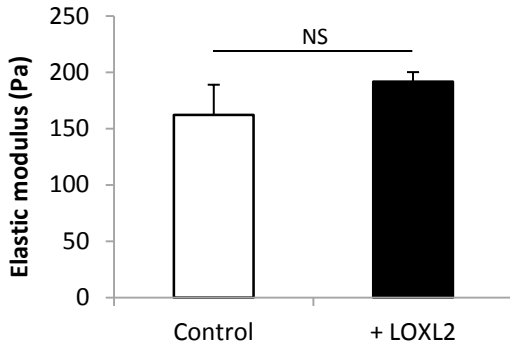
Dans l'ensemble de nos expérimentations *in vitro* et *in vivo*, nous avons utilisé comme hydrogel le Matrigel/fibrine, qui possède une composition en constituants matriciels et protéines associées proche de celle des microenvironnements tumoraux (voir chapitre II B 3). Ainsi nous avons montré que l'ajout de LOXL2 recombinante, purifiée au laboratoire, dans les gels de Matrigel/fibrine ne modifie pas leurs propriétés mécaniques et plus particulièrement leur rigidité, par des mesures de rhéologie, réalisées avec la participation du Dr Laurent Bidault (article, figure 2A), suggérant l'absence de substrat connu pour LOXL2 dans ces hydrogels.

Afin d'étudier le rôle de LOXL2 au cours de l'angiogenèse *in vitro*, nous avons utilisé un modèle de formation de tubes endothéliaux en trois dimensions. Dans ce modèle, déjà développé au laboratoire en gel de collagène de type I (Cazes et al., 2006), des sphéroïdes sont formés à partir de cellules HUVECs puis inclus en gels de Matrigel/fibrine et cultivés en milieu complet (changé tous les deux jours). L'ensemencement de NHDFs au dessus des gels permet la formation de tubes endothéliaux émergeant du sphéroïde et présentant une lumière (article, figure 2B). Ainsi, l'ajout de protéine recombinante dans ce modèle entraîne une augmentation de la longueur cumulée et du nombre de tubes par sphéroïde par rapport à la condition contrôle (article, figure 2C).

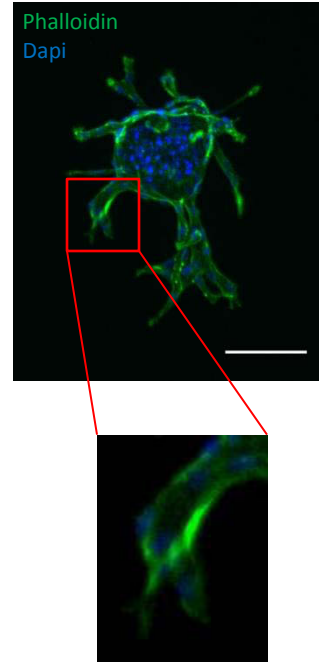
Ces résultats suggèrent que LOXL2 sécrétée dans le microenvironnement tumoral promeut l'angiogenèse dans le microenvironnement vasculaire. Ainsi, nous nous sommes intéressés à la contribution relative de LOXL2 sécrétée par les cellules endothéliales et tumorales.

Figure 2

A



B



C

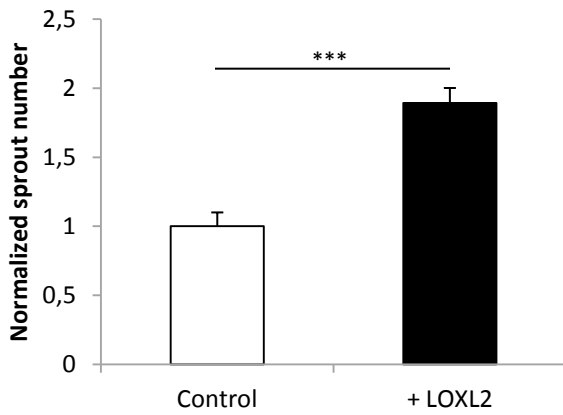
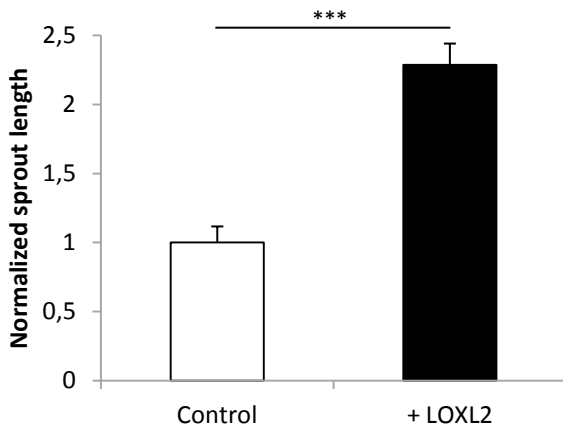
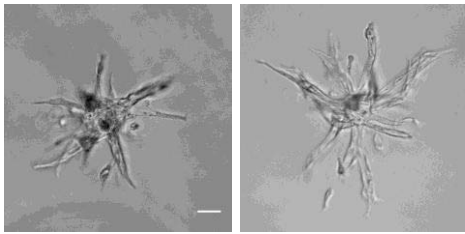


Figure legends

Figure 2. Role of microenvironmental LOXL2 on tumor angiogenesis.

(A) Mechanical properties of Matrigel/fibrin gel containing no LOXL2 (Control) or recombinant human protein (+LOXL2). Graph represents mean values \pm SEM of elastic modulus (storage modulus G') determined by rheology (n=3). (B) 3D sprouts from HUVEC spheroids present a lumen. Capillaries were stained with Phalloidin. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar, 100 μ m. (C) 3D sprouts from HUVEC spheroids in Matrigel/fibrin gels containing no LOXL2 (Control) or recombinant human protein (+LOXL2). Scale bar, 50 μ m. Cumulated length and sprout number per spheroid were normalized over control condition. Graphs represent mean values \pm SEM (n=3). ***P < 0.0001. NS, no significant difference.

B- Rôle de LOXL2 sécrétée par les cellules endothéliales

Afin de déterminer les mécanismes par lesquels LOXL2 sécrétée par les cellules endothéliales régule l'angiogenèse tumorale, j'ai travaillé dans des contextes de niveau d'expression variable de LOXL2 : soit en gain d'expression, dans des HUVECs que j'ai infectées par un lentivirus permettant la surexpression de LOXL2 ; soit en perte d'expression, dans des HUVECs infectées par un lentivirus contenant un shRNA dirigé contre la protéine (shLOXL2), déjà utilisées dans l'équipe (Bignon et al., 2011). L'analyse de ces cellules (LOXL2 et shLOXL2), par immunofluorescence et western blot, a permis de démontrer qu'elles présentent bien soit une augmentation de l'expression, soit une perte d'expression de LOXL2, par rapport aux cellules contrôles (Contrôle et shContrôle) (article, figure supplémentaire 2A, 2B et 2C et Bignon et al., 2011).

L'utilisation du modèle *in vitro* en trois dimensions a permis de montrer une augmentation de la tubulogenèse partant des sphéroïdes d'HUVECs surexprimant LOXL2 par rapport aux cellules contrôles (article, figure 3A). Ces résultats ont été confirmés avec les cellules HUVEC-shLOXL2 présentant une diminution de la somme de la longueur et du nombre de tubes, par rapport aux cellules HUVEC-shContrôle (article, figure supplémentaire 2D) et montrent donc que LOXL2 endothéliale participe à l'angiogenèse tumorale *in vitro*.

Au cours de ma thèse, nous avons également utilisé un modèle d'angiogenèse *in vivo* utilisant des implants cellularisés (Alajati et al., 2008 et Laib et al., 2009). Dans ce modèle, les sphéroïdes d'HUVECs surexprimant ou non LOXL2 sont inclus dans des gels de Matrigel/fibrine, avant d'être injectés en sous-cutané chez des souris CD1 de sept semaines. Après trois semaines, la vascularisation des implants est évaluée de façon quantitative par un dosage d'hémoglobine mais également de façon qualitative par des analyses immunohistochimiques. Ainsi, nous avons démontré que la présence de sphéroïdes de cellules HUVEC-LOXL2 dans les implants entraîne une augmentation de la vascularisation par rapport aux sphéroïdes de cellules HUVEC-Contrôle (article, figure 3B), suggérant que LOXL2 endothéliale participe à l'angiogenèse tumorale *in vivo*. De plus, l'analyse de ces implants en immunohistochimie montre que les capillaires générés à partir de ces sphéroïdes sont matures et présentent une couverture de cellules murales. Aucune différence entre les capillaires de cellules HUVEC-Contrôle et HUVEC-LOXL2 n'a été observée (article, figure 3C).

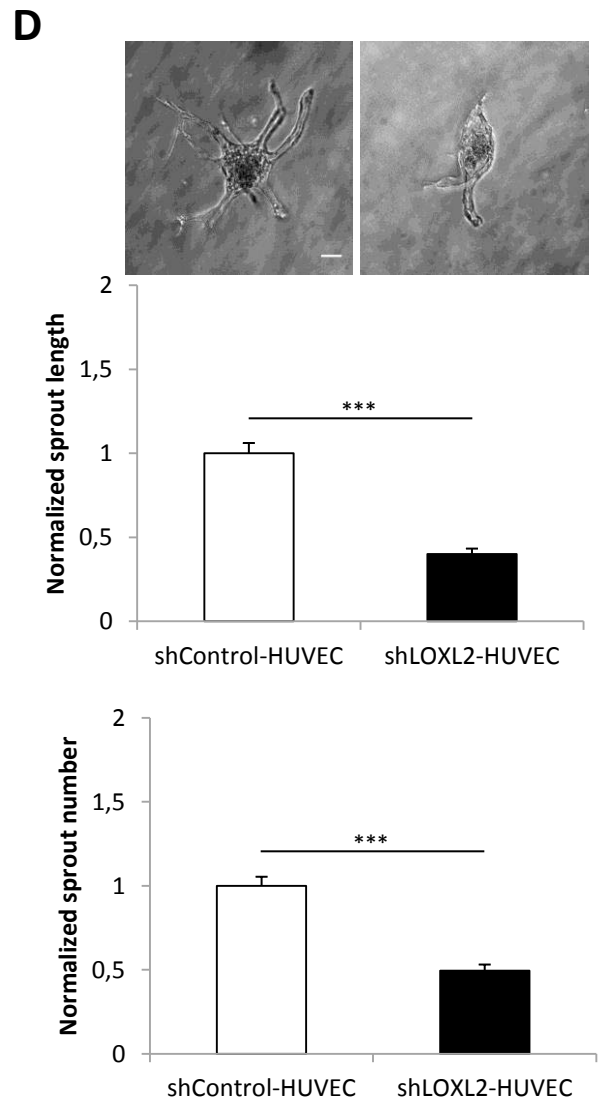
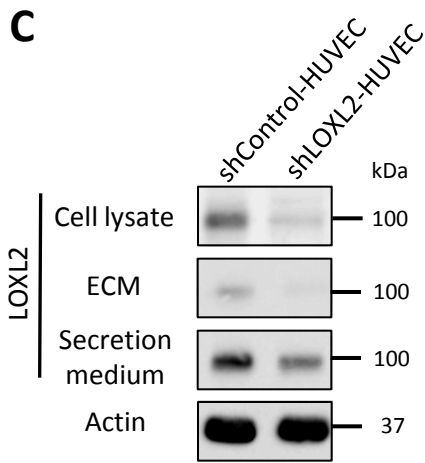
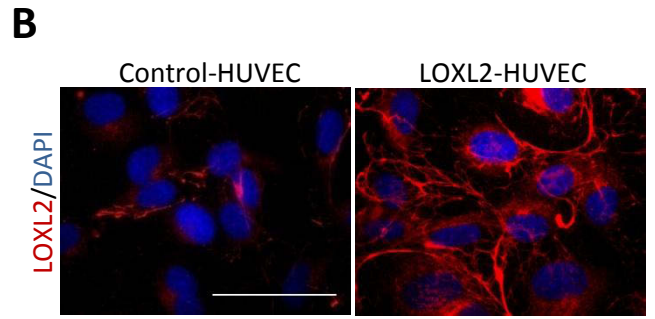
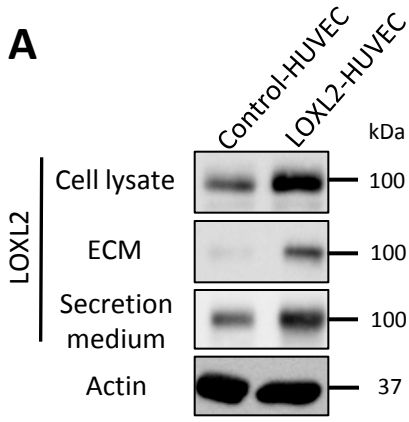
L'étude des propriétés mécaniques des gels de Matrigel/fibrine en présence ou non de cellules endothéliales HUVEC-LOXL2 ou HUVEC-Contrôle a permis de mettre en évidence : 1/une augmentation de la rigidité des gels en présence d'HUVECs par rapport à l'absence de cellules ; 2/ une augmentation de la rigidité en présence de cellules endothéliales surexprimant LOXL2 par rapport aux cellules contrôles (article, figure 3D). Ces résultats montrent que les cellules endothéliales participent au remodelage du microenvironnement tumoral et que LOXL2 sécrétée par

les cellules endothéliales est impliquée dans ce remodelage, notamment en augmentant la rigidité matricielle, vraisemblablement par l'intermédiaire de son activité catalytique.

J'ai donc démontré par des approches *in vitro* et *in vivo* que LOXL2 endothéliale promeut l'angiogenèse tumorale ainsi que le remodelage du microenvironnement tumoral. De plus, ces résultats suggèrent que le remodelage du microenvironnement vasculaire induit par LOXL2 endothéliale favoriserait l'angiogenèse tumorale, via l'augmentation de la rigidité matricielle et donc la présence d'un substrat de LOXL2 sécrété par les cellules endothéliales. Ce point sera repris dans la discussion.

La partie suivante de mon travail de thèse a été de déterminer, par l'utilisation de ces approches, le rôle de LOXL2 sécrétée par les cellules tumorales (RCC-4) de ccRCC dans l'angiogenèse.

Supplemental figure 2



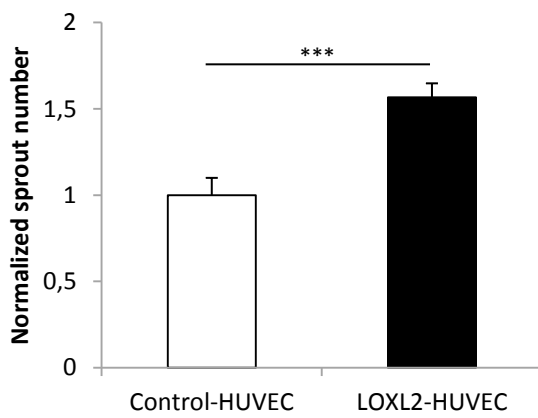
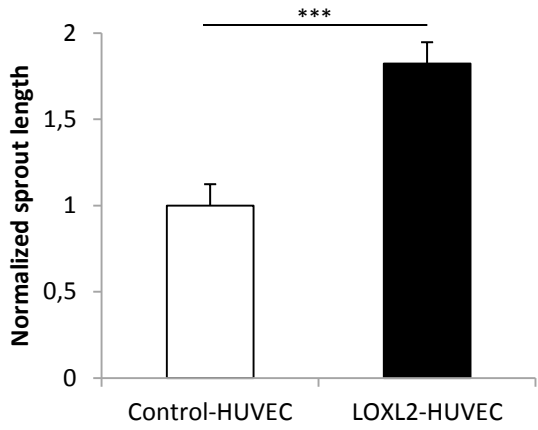
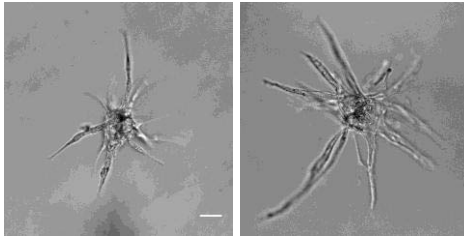
Supplemental figure legends

Supplemental Figure 2. Modulation of LOXL2 expression in HUVECs.

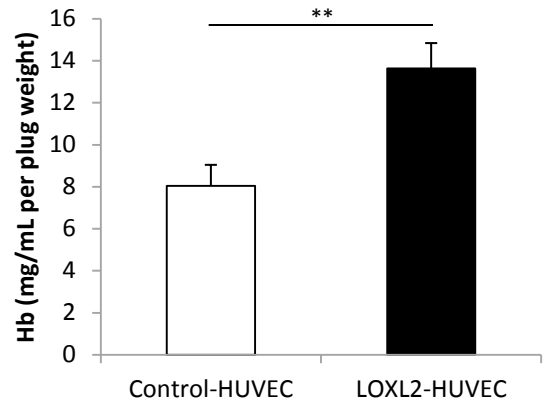
(A) LOXL2-overexpression in HUVECs. Equal amounts of cell lysate, ECM and secretion medium from Control-HUVEC or HUVECs overexpressing LOXL2 (LOXL2-HUVEC) were immunoblotted for LOXL2. Same samples of cell lysates were immunoblotted for actin as control. (B) LOXL2 expression was analyzed by immunofluorescence on Control-HUVEC or LOXL2-HUVEC. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar, 50 μ m. (C) LOXL2-silencing in HUVECs. Equal amounts of cell lysate, ECM and secretion medium from control HUVEC (shControl-HUVEC) or LOXL2-silenced HUVECs (shLOXL2-HUVEC) were immunoblotted for LOXL2. Same samples of cell lysates were immunoblotted for actin as control. (D) 3D sprouts from spheroids of shControl-HUVEC or shLOXL2-HUVEC in Matrigel/fibrin gels. Scale bar, 50 μ m. Cumulated length and sprout number per spheroid were normalized over control condition. Graphs represent mean values \pm SEM. ***P < 0.0001.

Figure 3

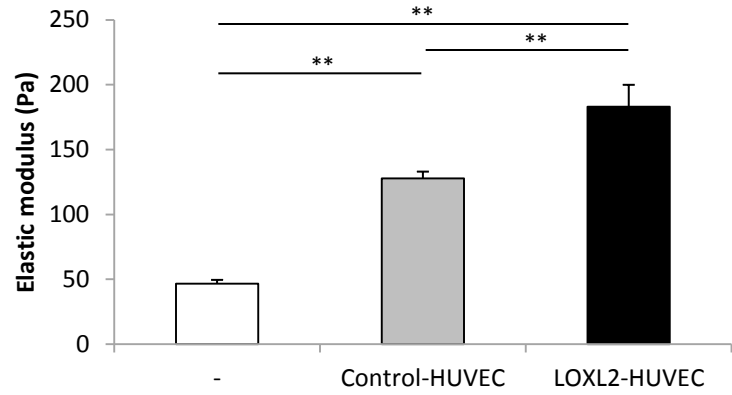
A



B



D



C

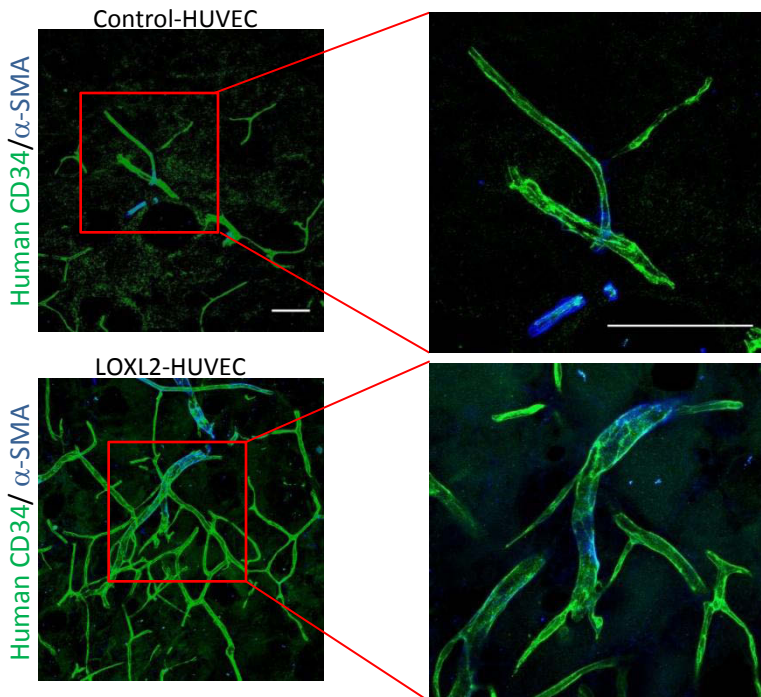


Figure legends

Figure 3. Role of endothelial LOXL2 on tumor angiogenesis.

(A) 3D sprouts from spheroids of Control-HUVEC or HUVECs overexpressing LOXL2 (LOXL2-HUVEC) in Matrigel/fibrin gels. Scale bar, 50 μm . Cumulated length and sprout number per spheroid were normalized over control condition. Graphs represent mean values \pm SEM (n=3). ***P < 0.0001. (B) Hemoglobin content (Hb) of Matrigel/fibrin implants containing spheroids of Control-HUVEC (n=16) or LOXL2-HUVEC (n=15). Graph represents mean values \pm SEM. **P < 0.005. (C) Capillaries formed *in vivo* from spheroids of Control-HUVEC or LOXL2 HUVEC are mature. Human capillaries were stained with CD34 and mural cells with alpha-SMA. Scale bar, 100 μm . (D) Mechanical properties of Matrigel/fibrin gel containing no cell (-) or Control-HUVEC or LOXL2-HUVEC. Graph represents mean values \pm SEM of elastic modulus (storage modulus G') determined by rheology (n=4). **P < 0.005.

C- Rôle de LOXL2 sécrétée par les cellules tumorales

Afin de déterminer les mécanismes par lesquels LOXL2 tumorale régule l'angiogenèse, j'ai utilisé des cellules tumorales issues de ccRCC appelées RCC-4. Les RCC-4 sont une lignée de cellules mutées de façon ponctuelle pour *VHL* (c.194C>G ; p.Ser65Trp) entraînant une perte de fonction de la protéine et son incapacité à se lier à HIF-1 α , qui n'est alors plus dégradé (Perier et al., 2011). L'analyse de l'expression de HIF-1 α par immunoblot montre donc que les RCC-4 mutées pour *VHL* expriment HIF-1 α de façon constitutive, tandis que la réexpression de *VHL* à l'aide d'un lentivirus dans les RCC-4 conduit à l'absence d'expression de HIF-1 α en normoxie alors qu'en hypoxie le facteur de transcription est exprimé (Figure 29). La différence d'expression de HIF-1 α , entre normoxie et hypoxie, dans les RCC-4 mutées pour *VHL* sera abordée dans la partie discussion.

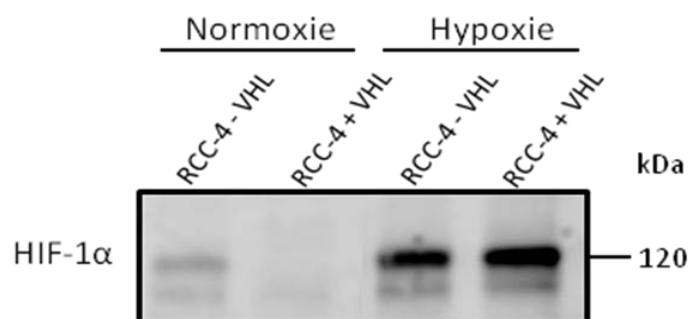


Figure 29 : Caractérisation de l'expression de HIF-1 α par les RCC-4. Western blot pour l'expression de HIF-1 α sur le lysat cellulaire de RCC-4. Les cellules RCC-4 mutées pour *VHL* (RCC-4 - *VHL*) expriment constitutivement HIF-1 α contrairement aux cellules RCC-4 réexprimant *VHL* (RCC-4 + *VHL*), où HIF-1 α n'est présente qu'en hypoxie.

L'inclusion de sphéroïdes de RCC-4 exprimant ou non *VHL* dans des gels de Matrigel/fibrine m'a permis d'observer que l'expression restaurée de *VHL* diminue les capacités prolifératives et migratoires des cellules tumorales en trois dimensions (Figure 30 - haut). En outre, l'ajout de NHDFs au dessus des gels permet d'augmenter la prolifération et la migration des cellules tumorales mutées ou non pour *VHL* (Figure 30 - bas).

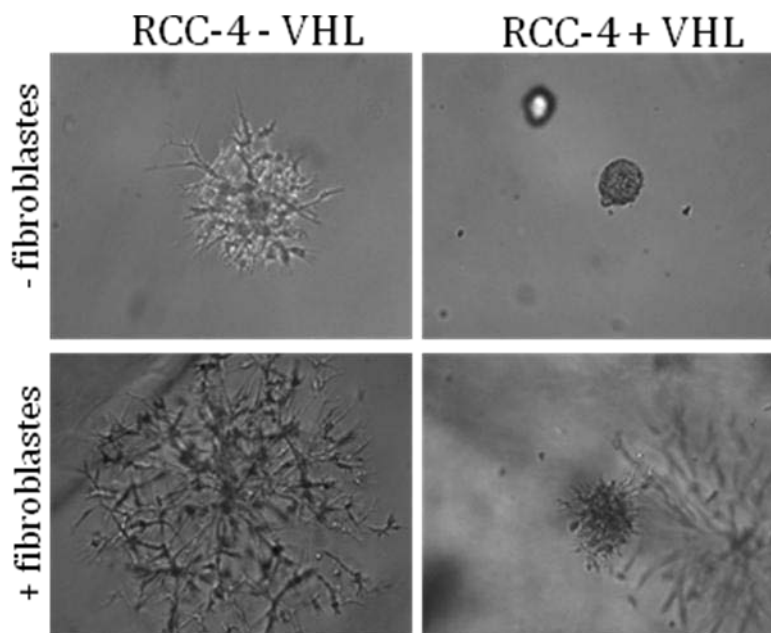


Figure 30 : Effet de la mutation de *VHL* sur la prolifération et la migration des RCC-4. Sphéroïdes de RCC-4 mutées ou non pour *VHL* dans des gels de Matrigel/fibrine en 3D. Haut : Les RCC-4 mutées pour *VHL* (RCC-4 – *VHL*) prolifèrent et migrent plus que les cellules où l’expression de *VHL* est restaurée (RCC-4 + *VHL*). Bas : L’ajout de fibroblastes entraîne une augmentation des capacités prolifératives et migratoires des RCC-4 mutées ou non pour *VHL*.

LOXL2 étant une cible de HIF dans le ccRCC (Schietke et al., 2010), nous avons observé une augmentation de l’expression de LOXL2 dans le lysat cellulaire et le milieu de sécrétion des RCC-4 mutées pour *VHL* par rapport aux RCC-4 réexprimant *VHL*, en normoxie (Figure 31). De plus, l’expression de LOXL2 est augmentée dans les cellules où l’expression de *VHL* est restaurée en hypoxie par rapport à la normoxie (Figure 31).

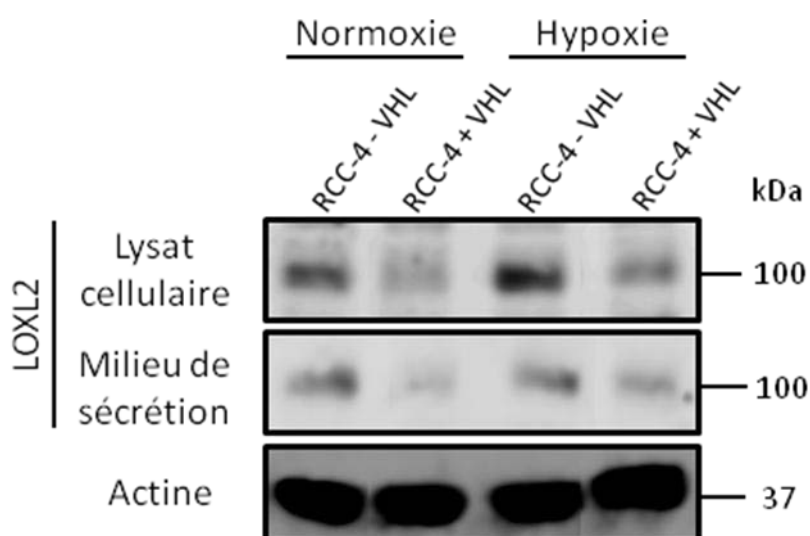


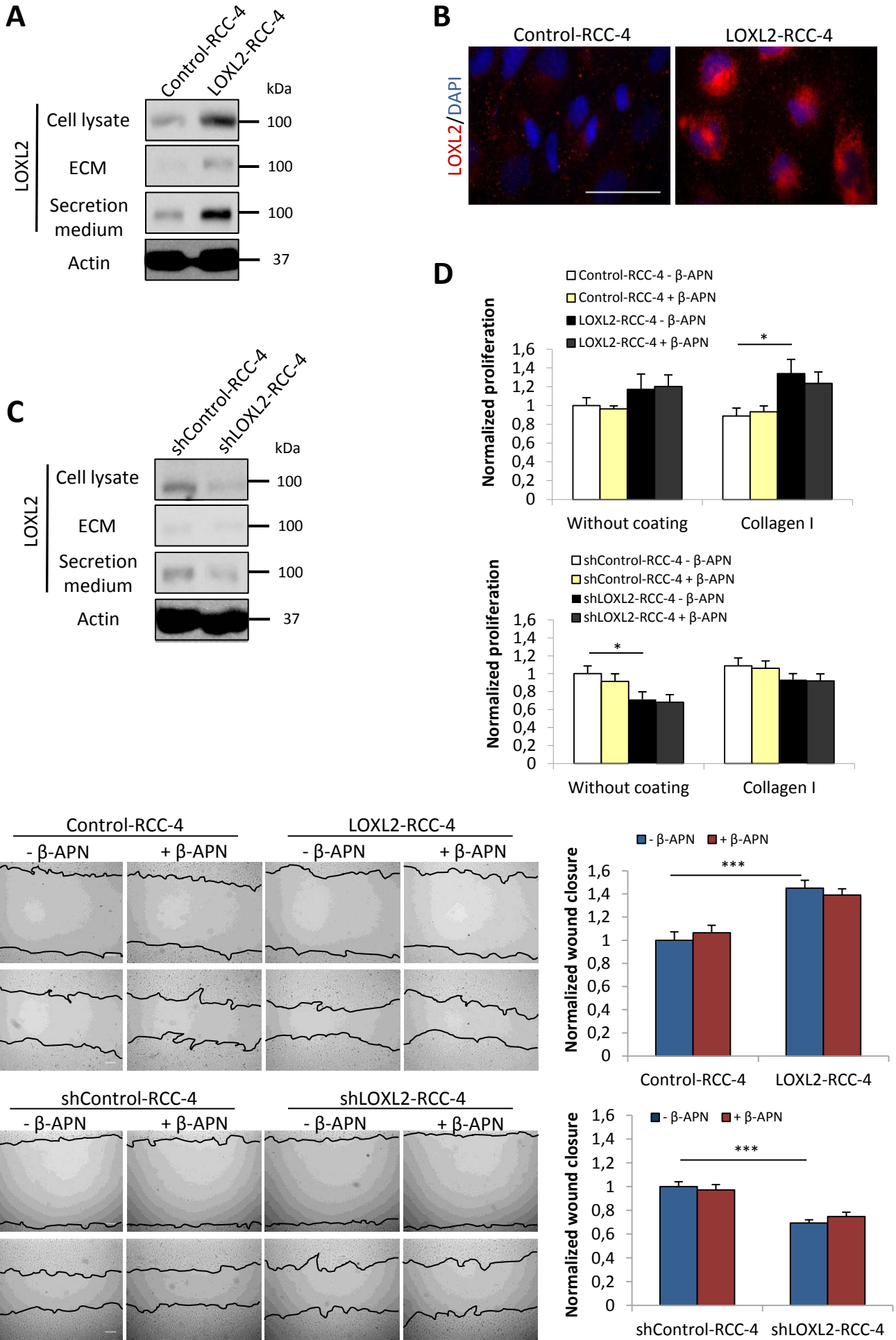
Figure 31 : Caractérisation de l’expression de LOXL2 par les RCC-4. Western blot pour l’expression de LOXL2 sur le lysat cellulaire et le milieu de sécrétion de RCC-4. Les cellules RCC-4 mutées pour *VHL* (RCC-4 – *VHL*) expriment LOXL2 en normoxie, contrairement aux cellules RCC-4 réexprimant *VHL* (RCC-4 + *VHL*), où LOXL2 n’est présente qu’en hypoxie.

J'ai alors utilisé pour la suite de mon travail de thèse, des cellules tumorales mutées pour *VHL*. J'ai travaillé dans des contextes de niveau d'expression variable de LOXL2 : soit en gain d'expression, dans des RCC-4 que j'ai infectées par un lentivirus permettant la surexpression de LOXL2 ; soit en perte d'expression, dans des RCC-4 infectées par un lentivirus contenant un shRNA dirigé contre la protéine (shLOXL2). L'analyse de ces cellules (LOXL2 et shLOXL2), par western blot et immunofluorescence, a permis de démontrer qu'elles présentent bien soit une augmentation de l'expression, soit une perte d'expression de LOXL2, par rapport aux cellules contrôles (Contrôle et shContrôle) (article, figure supplémentaire 3A, 3B et 3C).

En outre, de nombreux travaux ont montré que LOXL2 est impliquée dans la régulation de la prolifération et de la migration des cellules tumorales de nombreux types de cancers et notamment dans des lignées issues de carcinome du rein à cellules claires (Hase et al., 2014). J'ai alors étudié l'effet de l'expression de LOXL2 sur la migration collective et la prolifération des RCC-4, avec ou sans ajout d'une matrice de collagène de type I. Ainsi, nous avons constaté une augmentation des capacités migratoires et prolifératives des RCC-4-LOXL2 par rapport aux cellules contrôles, en présence d'une matrice de collagène de type I (article, figure supplémentaire 3D et 3E). A contrario, les RCC-4-shLOXL2 présentent une diminution de leur migration et de leur prolifération par rapport aux RCC-4-shContrôle, en l'absence d'ajout de matrice (article, figure supplémentaire 3D et 3E). De façon intéressante, le gain d'expression de LOXL2 augmente les capacités prolifératives des cellules tumorales sur le collagène de type I, suggérant une augmentation des mécanismes impliquant des interactions cellules-matrice dans ce contexte, alors que la perte d'expression de LOXL2 a un effet sur le plastique seul, vraisemblablement dû à une apoptose des cellules dans un contexte appauvri en points d'interactions spécifiques. De plus, l'ajout de β -APN (un inhibiteur de l'activité catalytique des lysyl oxydases), dans les deux cas, ne modifie pas la migration et la prolifération des RCC-4, montrant que l'effet de LOXL2 est indépendant de son activité catalytique (article, figure supplémentaire 3D et 3E).

Nous avons alors utilisé le modèle d'angiogenèse *in vitro* en trois dimensions. Les sphéroïdes d'HUVECs, insérés dans les gels de Matrigel/fibrine et co-cultivés en présence de NHDFs au-dessus du gel, ont été cultivés en présence de milieu conditionné de RCC-4-Contrôle ou de RCC-4-LOXL2, et non plus en présence de milieu complet comme précédemment. Nous avons montré une augmentation de la tubulogenèse des HUVECs en présence du milieu conditionné de RCC-4 surexprimant LOXL2 par rapport aux cellules contrôles (article, figure 4A). Ces résultats ont été confirmés en présence de milieu conditionné de RCC-4-shLOXL2, par une diminution de la somme de la longueur et du nombre de tubes, par rapport au milieu conditionné des RCC-4-shContrôle (article, figure supplémentaire 4A). De plus, nous avons montré que l'effet de LOXL2 tumorale sur l'angiogenèse dépend de son

Supplemental figure 3



Supplemental figure legends

Supplemental Figure 3. Modulation of LOXL2 expression in RCC-4.

(A) LOXL2-overexpression in RCC-4. Equal amounts of cell lysate, ECM and secretion medium from control RCC-4 (Control-RCC-4) or RCC-4 overexpressing LOXL2 (LOXL2-RCC-4) were immunoblotted for LOXL2. Same samples of cell lysates were immunoblotted for actin as control. (B) LOXL2 expression was analyzed by immunofluorescence on control-RCC-4 or LOXL2-RCC-4. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar, 50 μ m. (C) LOXL2-silencing in RCC-4. Equal amounts of cell lysate, ECM and secretion medium from control RCC-4 (shControl-RCC-4) or LOXL2-silenced RCC-4 (shControl-RCC-4) were immunoblotted for LOXL2. Same samples of cell lysates were immunoblotted for actin as control. (D) Cell proliferation of Control-RCC-4 or LOXL2-RCC-4 (upper panel) and of shControl-RCC-4 or shLOXL2-RCC-4 (lower panel). Cells were seeded on plastic (without coating) or on type I collagen coating (collagen I) in absence (- β -APN) or presence of β -APN (+ β -APN). Proliferation rates were normalized over control conditions (Control-RCC-4 and shControl-RCC-4, respectively, seeded on plastic in absence of β -APN). Graphs represent mean values \pm SEM. * $P < 0.05$. (E) Migration of Control-RCC-4 or LOXL2-RCC-4 (upper panel) and of shControl-RCC-4 or shLOXL2-RCC-4 (lower panel) in absence (- β -APN) or presence of β -APN (+ β -APN). Collective migration was assessed by scratch assay. Scale bar, 200 μ m. Migration rates were normalized over control conditions (Control-RCC-4 and shControl-RCC-4, respectively, in absence of β -APN). Graphs represent mean values \pm SEM. *** $P < 0.0001$.

activité catalytique (article, figure supplémentaire 4A). Ces résultats suggèrent donc que LOXL2 sécrétée par les cellules tumorales participe à l'angiogenèse *in vitro* dans le microenvironnement vasculaire, de façon dépendante de son activité catalytique. Ces résultats concernant l'implication de l'activité catalytique de LOXL2 tumorale sont cependant à confirmer dans le contexte de surexpression.

Nous avons également utilisé le modèle d'angiogenèse *in vivo*, en substituant les sphéroïdes endothéliaux par des cellules tumorales en suspension dans les gels. Ainsi, nous avons démontré que la présence de cellules RCC-4-LOXL2 en suspension augmente la vascularisation des implants par rapport aux RCC-4-Contrôle (article, figure 4B), suggérant que LOXL2 tumorale participe à l'angiogenèse *in vivo* dans le microenvironnement vasculaire. De plus, l'analyse de ces implants en immunohistochimie montre un recrutement des cellules endothéliales murines par les cellules tumorales pour former des capillaires continus. Aucune différence d'aspect des vaisseaux n'a été observée entre les implants contenant des cellules tumorales RCC-4-Contrôle ou RCC-4-LOXL2.

L'étude des propriétés mécaniques des gels de Matrigel/fibrine en présence ou non de cellules tumorales RCC-4-Contrôle ou RCC-4-LOXL2 a montré que la présence de ces cellules ou la surexpression de LOXL2 ne modifie pas la rigidité des gels (article, figure 4C). Ces résultats montrent donc que les cellules tumorales ne participent pas directement au remodelage du microenvironnement tumoral. De plus, l'activité catalytique de LOXL2 tumorale n'a pas d'effet sur le remodelage de ces gels.

J'ai donc démontré par des approches *in vitro* et *in vivo* que LOXL2 sécrétée par les cellules tumorales promeut l'angiogenèse et que cet effet semble dépendant de l'activité catalytique de LOXL2. De plus, ces résultats suggèrent que l'effet de l'activité catalytique de LOXL2 tumorale sur l'angiogenèse serait régulé plus localement, par un substrat sécrété par les cellules endothéliales. Ce point sera repris dans la discussion.

La deuxième partie de mon travail de thèse a donc été de déterminer les mécanismes cellulaires et moléculaires par lesquels LOXL2 endothéliale et tumorale promeuvent l'angiogenèse.

Figure 4

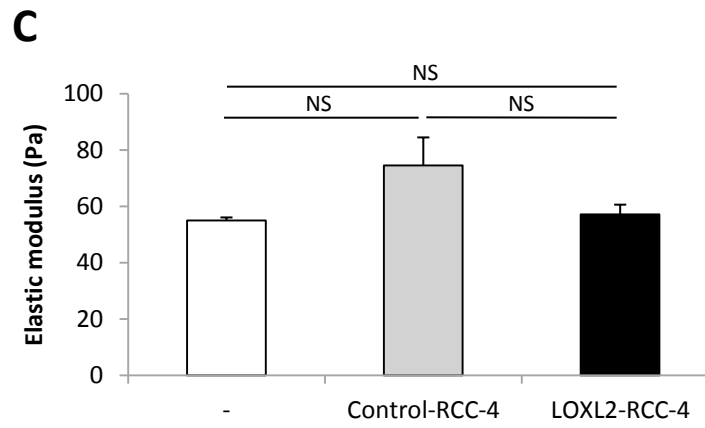
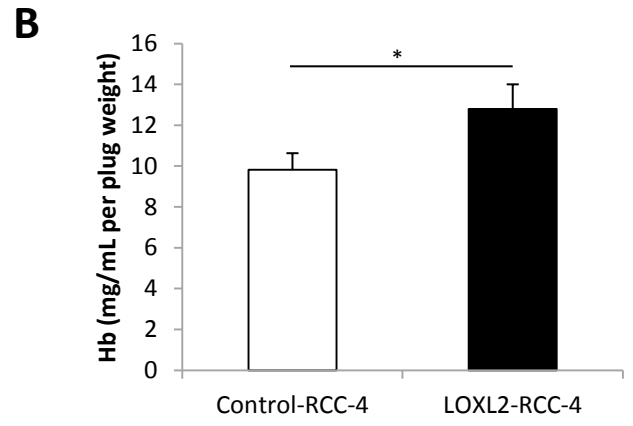
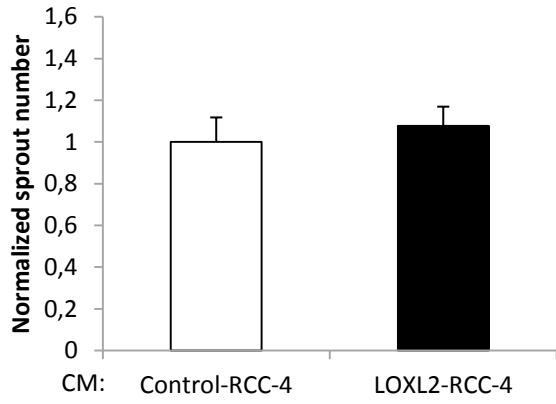
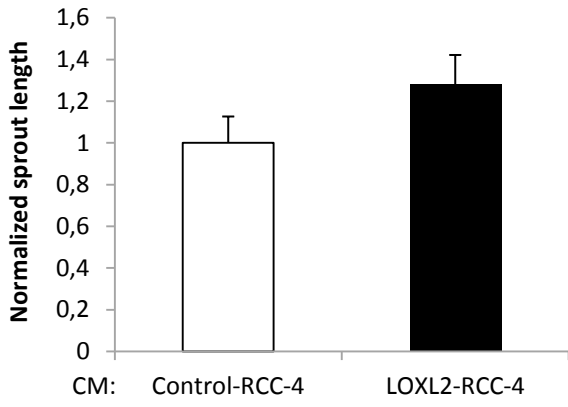
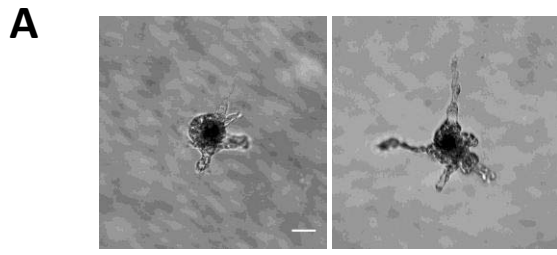


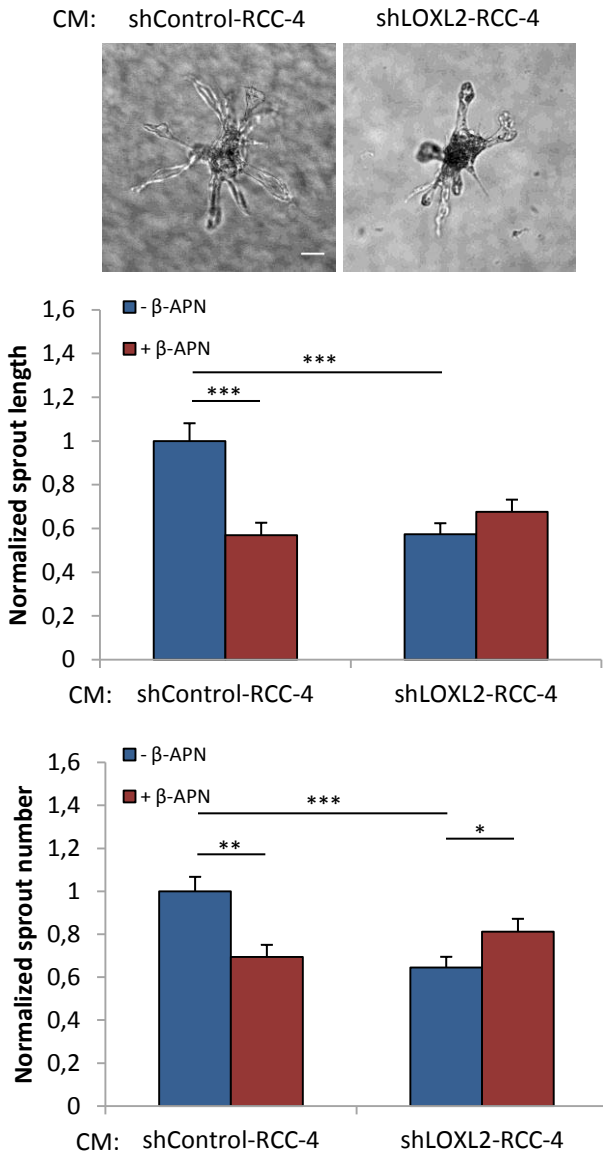
Figure legends

Figure 4. Role of tumor LOXL2 on tumor angiogenesis.

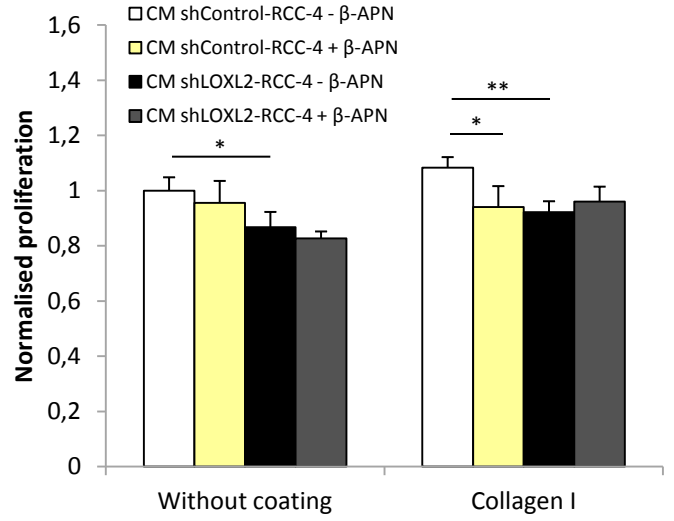
(A) 3D sprouts from HUVECs spheroids stimulated by conditioned medium (CM) of Control-RCC-4 or LOXL2-RCC-4 in Matrigel/fibrin gels. Scale bar, 50 μm . Cumulated length and sprout number per spheroid were normalized over control condition. Graphs represent mean values \pm SEM. (B) Hemoglobin content (Hb) of Matrigel/fibrin implants containing Control-RCC-4 (n=24) or LOXL2-RCC-4 (n=23). Graph represents mean values \pm SEM. *P < 0.05. (C) Mechanical properties of Matrigel/fibrin gel containing no cell (-) or Control-RCC-4 or LOXL2-RCC-4. Graph represents mean values \pm SEM of elastic modulus (storage modulus G') determined by rheology (n=4). NS, no significant difference.

Supplemental figure 4

A



B



Supplemental figure legends

Supplemental Figure 4. Role of tumor LOXL2 silencing on endothelial cells behavior.

(A) 3D sprouts from HUVECs spheroids stimulated by conditioned medium (CM) of shControl-RCC-4 or shLOXL2-RCC-4 in absence ($-\beta$ -APN) or presence of β -APN ($+\beta$ -APN). Scale bar, 50 μ m. Cumulated length and sprout number per spheroid were normalized over control condition (HUVECs stimulated by conditioned medium of shControl-RCC-4 in absence of β -APN). Graphs represent mean values \pm SEM. ***P < 0.0001; **P < 0.005 and *P < 0.05. **(B)** Cell proliferation of HUVECs stimulated by conditioned medium (CM) of shControl-RCC-4 or shLOXL2-RCC-4, in absence ($-\beta$ -APN) or presence of β -APN ($+\beta$ -APN). HUVECs were seeded on plastic (without coating) or on type I collagen coating (collagen I). Proliferation rates were normalized over control condition (HUVECs seeded on plastic and stimulated by conditioned medium of shControl-RCC-4 in absence of β -APN). Graph represents mean values \pm SEM. *P < 0.05; **P < 0.005.

III. Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au cours de l'angiogenèse du ccRCC régulée par LOXL2

A- Rôle de LOXL2 sécrétée par les cellules tumorales de ccRCC sur la migration et la prolifération des cellules endothéliales

Dans une précédente étude, notre laboratoire a montré que LOXL2 endothéliale régule la prolifération et la migration des cellules endothéliales, avec une participation partielle de son activité catalytique (Bignon et al., 2011). Je me suis alors concentrée sur l'effet de LOXL2 sécrétée par les cellules tumorales sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales.

Afin d'étudier le rôle de LOXL2 tumorale sur la prolifération des cellules endothéliales, nous avons utilisé un modèle en deux dimensions, avec ou sans matrice de collagène de type I (substrat connu de LOXL2). Ainsi, les cellules endothéliales prolifèrent plus en présence de milieu conditionné de RCC-4-LOXL2, par rapport à celui des RCC-4-Contrôle, avec ou sans matrice de collagène de type I (article, figure 5A). De plus, nous avons montré que l'effet de LOXL2 tumorale sur la prolifération des cellules endothéliales dépend de l'activité catalytique de la protéine, en présence d'une matrice de collagène de type I (article, figure 5A). A contrario, les cellules endothéliales prolifèrent moins en présence de milieu conditionné de RCC-4-shLOXL2, par rapport à celui des RCC-4-shContrôle, avec ou sans matrice de collagène de type I (article, figure supplémentaire 4B).

Nous avons également analysé le rôle de LOXL2 tumorale sur la migration collective des cellules endothéliales, en présence de milieu conditionné de cellules RCC-4 surexprimant ou non LOXL2. Ce modèle a permis de montrer une augmentation de la migration des cellules endothéliales en présence de milieu conditionné de RCC-4-LOXL2, par rapport à celui des RCC-4-Contrôle, indépendamment de l'activité catalytique de la protéine (article, figure 5B).

Ainsi, LOXL2 sécrétée par les cellules endothéliales et tumorales stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales, permettant ainsi de promouvoir l'angiogenèse dans le microenvironnement tumoral. De plus, LOXL2 sécrétée par les cellules tumorales module les capacités prolifératives des cellules endothéliales, de façon dépendante de son activité catalytique.

Nous avons donc voulu déterminer quelle(s) voie(s) de signalisation étai(en)t régulée(s), dans les cellules endothéliales, par la sécrétion de LOXL2 endothéliale et tumorale.

Figure legends

Figure 5. Role of tumor LOXL2 on endothelial cell proliferation and migration.

(A) Cell proliferation of HUVEC stimulated by conditioned medium (CM) of Control-RCC-4 or LOXL2-RCC-4, in absence ($-\beta$ -APN) or presence of β -APN ($+\beta$ -APN). HUVECs were seeded on plastic (without coating) or on type I collagen coating (collagen I). Proliferation rates were normalized over control condition (HUVECs seeded on plastic and stimulated by conditioned medium of Control-RCC-4 in absence of β -APN). Graph represents mean values \pm SEM. * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$. **(B)** Migration of HUVEC stimulated by conditioned medium (CM) of Control-RCC-4 or LOXL2-RCC-4, in absence ($-\beta$ -APN) or presence of β -APN ($+\beta$ -APN). Collective migration was assessed by scratch assay. Scale bar, 200 μ m. Migration rates were normalized over control condition (HUVEC stimulated by conditioned medium of Control-RCC-4 in absence of β -APN). Graph represents mean values \pm SEM. * $P < 0.05$. **(C)** Equal amounts of cell lysate and secretion medium from HUVECs stimulated by CM of Control-RCC-4 or LOXL2-RCC-4 and/or secretion medium from Control-HUVEC or LOXL2-HUVEC were immunoblotted for PIGF, TIMP-1 and CREB. Same samples of cell lysates were immunoblotted for actin as control.

B- Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'angiogenèse du ccRCC induite par LOXL2

Afin d'identifier d'éventuels facteurs pro- ou anti-angiogéniques impliqués dans l'angiogenèse du ccRCC modulée par LOXL2 endothéliale, nous avons utilisé un Angiogenesis antibody array® (R&D systems, MN, USA) sur le milieu de sécrétion de cellules HUVEC-shContrôle et HUVEC-shLOXL2. Ainsi, nous avons identifié le PIGF, un facteur de croissance pro-angiogénique de la famille du VEGF, dont l'expression est diminuée dans le milieu de sécrétion des HUVEC-shLOXL2 par rapport à celui des cellules contrôles. Nous avons également identifié TIMP-1, un inhibiteur des MMPs qui est aussi notamment impliqué dans l'invasion tumorale sous le contrôle de LOXL2 (Barker et al., 2011). Ainsi, l'expression de TIMP-1 est augmentée dans le milieu de sécrétion des HUVEC-shLOXL2 par rapport à celui des HUVEC-shContrôle. (Figure 32)

Les résultats de cet array ont alors été confirmés par western blot sur le milieu de sécrétion des HUVEC-Contrôle et des HUVEC-LOXL2. En effet, l'expression du PIGF est augmentée et celle de TIMP-1 diminuée, pour les HUVEC-LOXL2 par rapport aux HUVEC-Contrôle (article, figure 5C), suggérant que LOXL2 endothéliale régule l'expression de ces deux protéines.

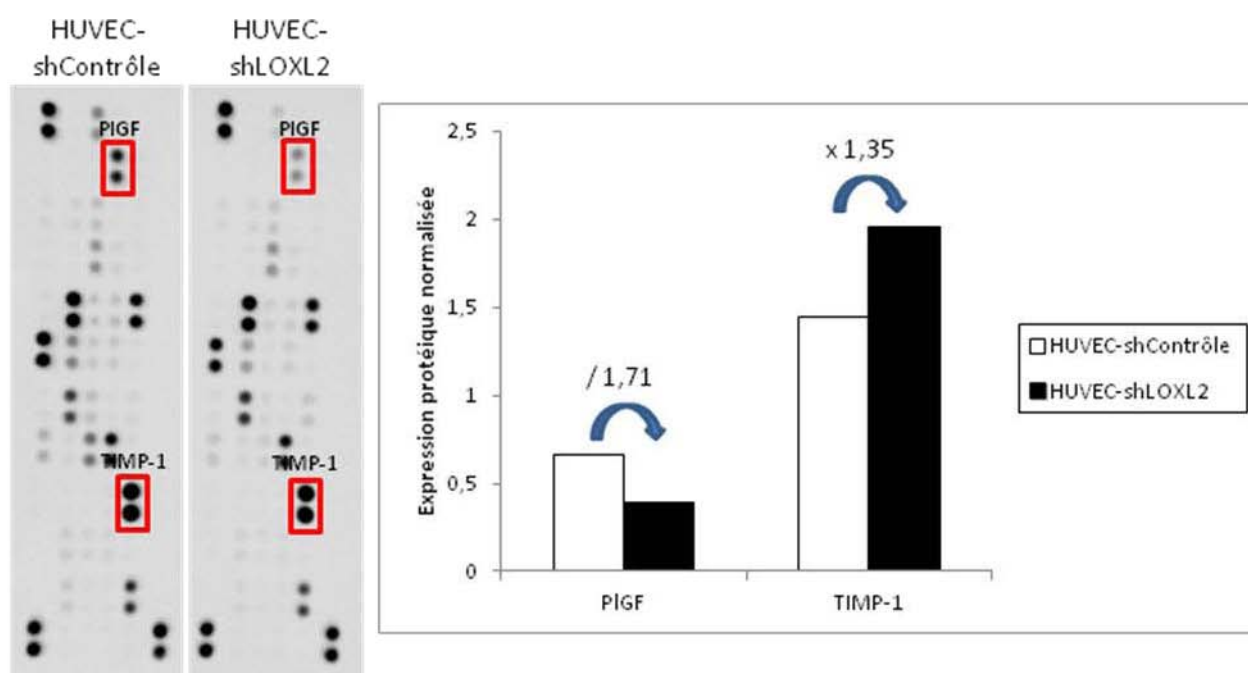


Figure 32 : Contribution de LOXL2 endothéliale sur l'expression de facteurs angiogéniques. Angiogenesis antibody array sur le milieu de sécrétion de cellules HUVEC-shContrôle et HUVEC-shLOXL2. La diminution de l'expression de LOXL2 endothéliale entraîne la diminution de l'expression du PIGF et une augmentation de l'expression de TIMP-1.

En plus de la modulation de l'expression de TIMP-1, Barker et al. ont montré que LOXL2 module l'expression de MMP-9 dans le cancer du sein (Barker et al., 2011). De plus, MMP-9 mais aussi MMP-2 jouent un rôle dans la croissance et la progression tumorale, notamment via la régulation de

l'angiogenèse (Itoh et al., 1998 ; Coussens et al., 2000 et Bergers et al., 2000). Ainsi, nous allons analyser l'expression de ces MMPs dans le milieu de sécrétion des HUVECs surexprimant ou non LOXL2, mais également dans le milieu de sécrétion des HUVECs mises en présence de milieu conditionné de RCC-4 surexprimant ou non LOXL2 et enfin dans le milieu de sécrétion des RCC-4 surexprimant ou non LOXL2, par zymographie.

Nous nous sommes également intéressés aux voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans l'angiogenèse du ccRCC modulée par LOXL2 tumorale. Nous avons dans un premier temps utilisé un Angiogenesis antibody array[®] afin de déterminer d'éventuelles différences d'expression de facteurs pro- ou anti-angiogéniques entre les cellules RCC-4-contrôle et les RCC-4-LOXL2. Cependant, ce test n'a pas permis de pouvoir distinguer des différences d'expression entre ces deux types cellulaires. Nous avons alors utilisé un Human phosphokinase array[®] (R&D systems, MN, USA) dans le but de déterminer d'éventuelles différences d'expression de protéines phosphorylées entre les HUVECs mises en présence de milieu conditionné de RCC-4-Contrôle ou de RCC-4-LOXL2. Ainsi, nous avons identifié CREB (cAMP response element bonding protein), un facteur de transcription ayant de nombreux gènes cibles, dont l'expression est augmentée au niveau du lysat cellulaire d'HUVECs mises en présence de milieu conditionné de RCC-4-LOXL2 par rapport à celui des cellules contrôles. (Figure 33)

Les résultats de cet array ont alors été confirmés par western blot sur le lysat cellulaire d'HUVECs mises en présence de milieu conditionné de RCC-4-Contrôle ou de RCC-4-LOXL2. En effet, l'expression de CREB est augmentée dans les HUVECs incubées avec du milieu conditionné de RCC-4-LOXL2 par rapport aux cellules contrôles (article, figure 5C), suggérant que LOXL2 tumorale régule l'expression de CREB.

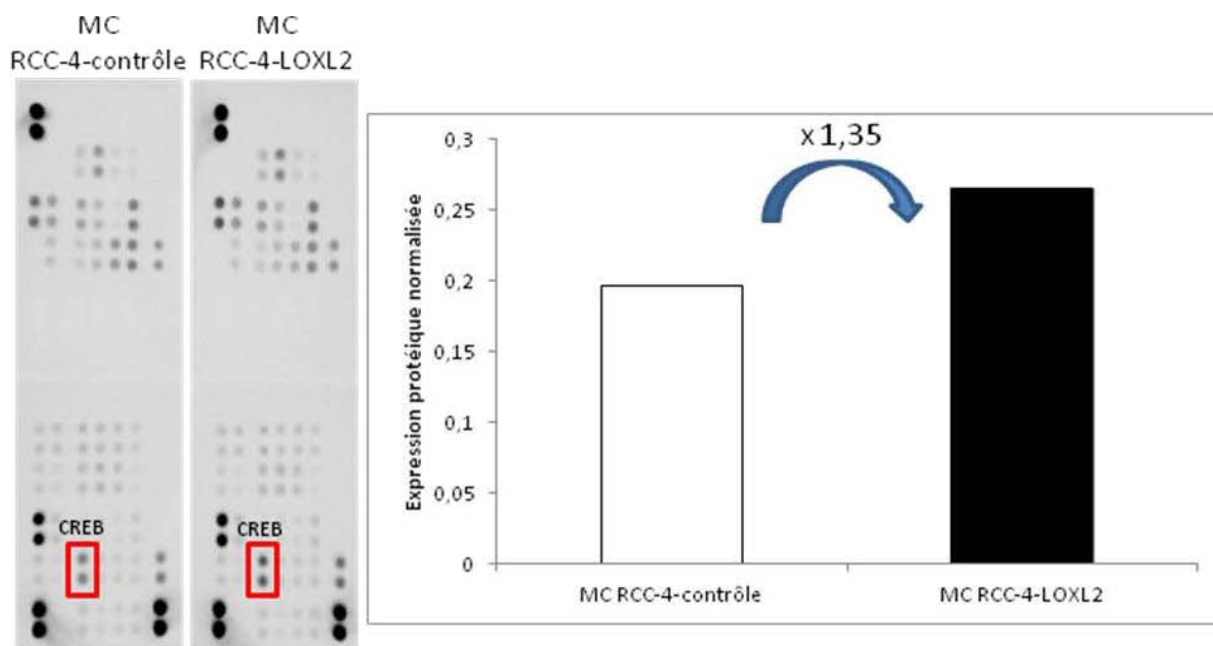


Figure 33 : Contribution de LOXL2 tumorale sur l'expression de CREB par les cellules endothéliales. Phosphokinase antibody array sur le lysat cellulaire d'HUVECs en présence de milieu conditionné de cellules RCC-4-contrôle ou de RCC-4-LOXL2. L'expression de CREB est augmentée dans les cellules endothéliales en présence du milieu conditionné de RCC-4-LOXL2 par rapport à celui des cellules contrôles.

Nous avons également analysé l'expression du PIGF et de TIMP-1 par western blot, dans le milieu de sécrétion des HUVECs mises en présence de milieu conditionné de RCC-4-Contrôle ou de RCC-4-LOXL2. Ainsi, nous avons montré que l'expression du PIGF et de TIMP-1 est augmentée lorsque les HUVECs sont incubées avec du milieu conditionné de RCC-4-LOXL2 par rapport aux cellules contrôles (article, figure 5C), suggérant que LOXL2 tumorale régule également l'expression de ces deux protéines. Afin de déterminer si ces différences d'expression étaient bien dues à l'expression des cellules endothéliales et non à celle des cellules tumorales, nous avons analysé l'expression de ces deux protéines dans le milieu de sécrétion des RCC-4 surexprimant ou non LOXL2. Ainsi, nous avons démontré que les RCC-4 n'expriment pas de PIGF et que le niveau d'expression de TIMP-1 n'est pas modulé entre les RCC-4-Contrôle et les RCC-4-LOXL2 (résultats non montrés).

L'ensemble des résultats de cette étude montrent que LOXL2 sécrétée à la fois par les cellules endothéliales et les cellules tumorales promeut l'angiogenèse dans le carcinome du rein à cellules claires, en modulant la migration et la prolifération des cellules endothéliales. De plus, nous avons montré que l'activité catalytique de LOXL2 tumorale participe à la régulation de l'angiogenèse, via la régulation de la rigidité du microenvironnement vasculaire. Enfin, nous avons pu mettre en évidence l'implication de plusieurs voies de signalisation, jouant un rôle à différentes étapes du processus angiogénique, dont l'activation est modulée par l'expression de LOXL2 endothéliale et tumorale (article, figure 6).

Figure 6

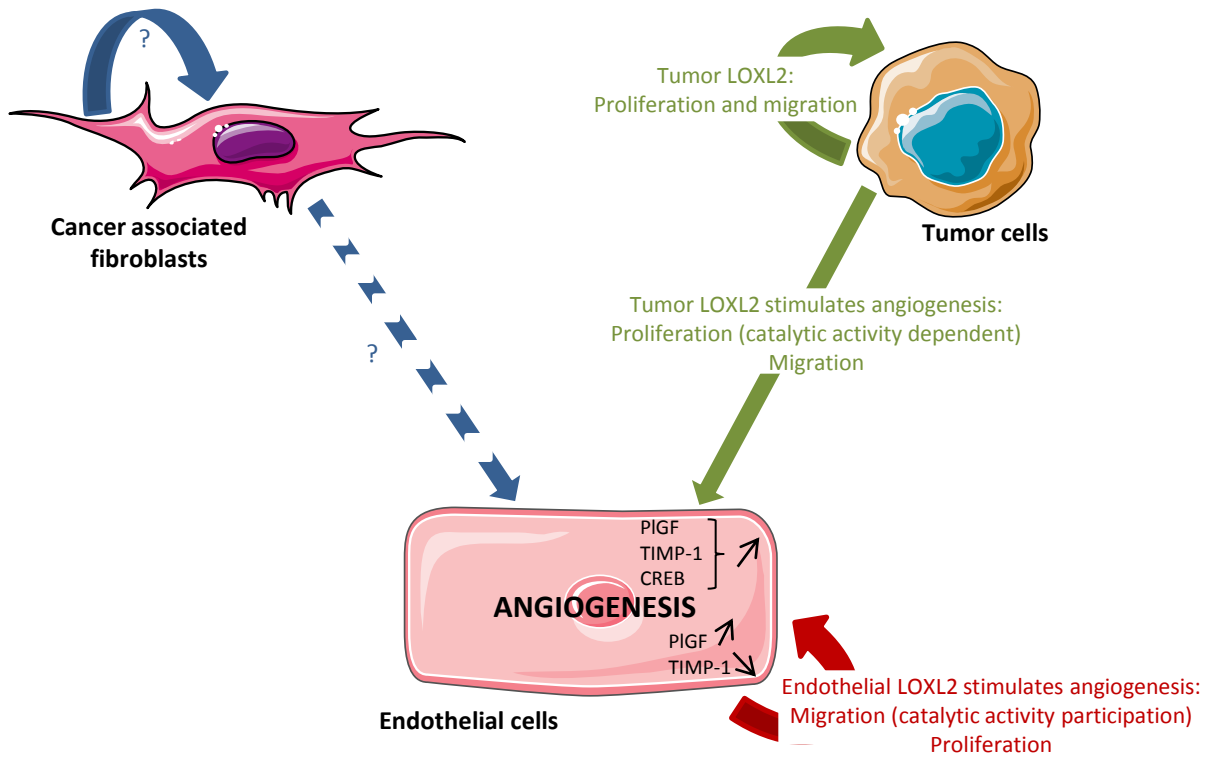


Figure legends

Figure 6. Regulation of angiogenesis by tumor and stromal LOXL2.

RCC-4 cells (tumor cells) express and secrete LOXL2. Tumor LOXL2 expression increases RCC-4 cell proliferation and migration. In addition, RCC-4 secretion medium containing LOXL2 increases endothelial cell proliferation, migration and sprouting. Stromal cells (cancer associated fibroblasts and endothelial cells) express and secrete LOXL2. Endothelial LOXL2 accumulates in the ECM and increases cell proliferation, migration and sprouting. LOXL2 therefore displays both cell autonomous and non-cell autonomous role on tumor angiogenesis.

CHAPITRE IV : DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Expression tissulaire et cellulaire de LOXL2

Quelques études ont montré que LOXL2 est surexprimée dans le carcinome du rein à cellules claires, par rapport aux tissus normaux. Cependant, ces études n'ont identifié qu'une expression globale de l'ARNm *lox12* (Schietke et al., 2010 et Hase et al., 2014), ou encore une expression exclusivement stromale de la protéine dans le ccRCC (Barry-Hamilton et al., 2010). Dans cette étude, nous avons montré que LOXL2 est exprimée dans le carcinome du rein à cellules claires humain, à la fois dans les cellules stromales et tumorales, par hybridation *in situ*. De plus, l'utilisation de cette technique nous a permis : 1/de définir plus en détail, les sites d'expression de l'ARNm *lox12*, qui n'avaient encore jamais été étudiés entre les tumeurs primaires avec ou sans métastases associées ; 2/de montrer que l'expression de la protéine est corrélée à l'expression de l'ARNm *lox12* ; 3/ de montrer que la protéine est exprimée dans le corps cellulaire et éventuellement dans le microenvironnement tumoral. L'ensemble de ces résultats suggère que LOXL2 extracellulaire présente dans les compartiments tumoral et stromal est un acteur à la fois de la progression tumorale et de l'angiogenèse.

Il serait maintenant intéressant de pouvoir déterminer si l'expression différentielle de l'ARNm *lox12* que nous avons observé dans le ccRCC, entre tumeurs primaires avec ou sans métastases associées, est la même dans d'autres types de tumeurs et notamment de le cancer du sein dont l'expression de LOXL2 a très souvent été rapportée et étudiée (Kirschmann et al., 2002 ; Akiri et al., 2003 ; Hollosi et al., 2009 ; Barry-Hamilton et al., 2010 ; Brekhman et al., 2010 ; Barker et al., 2011 ; Moreno-Bueno et al., 2011 ; Wong et al., 2011 ; Ahn et al., 2013 ; Chang et al., 2013 et Kim et al., 2014).

L'étude de l'expression cellulaire de LOXL2 *in vitro* à la fois dans les cellules stromales (à l'exception des cellules inflammatoires) et tumorales, nous a permis de mettre en évidence l'expression de la protéine dans des cultures primaires de cellules endothéliales (HUVECs), et de fibroblastes associés au cancer issus de xénogreffes de ccRCC, ainsi que dans une lignée de cellules tumorales de ccRCC (RCC-4). L'analyse de l'expression de LOXL2 a permis de montrer que la protéine est non seulement exprimée mais aussi sécrétée par les trois types cellulaires. En effet, LOXL2 est retrouvée dans le milieu de sécrétion de ces cellules alors qu'elle ne s'accumule que dans la MEC endothéliale. Cette répartition suggère une accumulation de LOXL2 dans le microenvironnement vasculaire, issue du compartiment stromal comme tumoral.

Concernant les cellules endothéliales, plusieurs études ont décrit l'expression de LOXL2 au niveau vasculaire. En effet, Lelièvre et al. ont montré que l'ARNm *lox12* est exprimé par les cellules endothéliales en normoxie (HUVECs) (Lelièvre et al., 2008). Malalo et al. ont quant à eux montré que l'hypoxie induit l'expression de l'ARNm *lox12* et/ou de la protéines via son activation

transcriptionnelle par HIF- α dans les cellules endothéliales (Manalo et al., 2005). Enfin, notre équipe a montré par une analyse protéomique que LOXL2 est sécrétée et s'accumule dans la MEC des cellules endothéliales, en réponse à l'hypoxie (Bignon et al., 2011).

Il existe peu de données dans la littérature concernant un lien possible entre l'expression de LOXL2 et les CAFs. Cependant, Barry-Hamilton et al. ont montré que le traitement de xénogreffes de tumeurs du sein chez la souris, avec un anticorps bloquant dirigé contre LOXL2, entraîne une diminution du nombre de fibroblastes activés (Barry-Hamilton et al., 2010). Barker et al. ont quant à eux montré que LOXL2 sécrétée par des cellules tumorales murines de sein augmente le nombre de fibroblastes activés (Barker et al., 2013). Une autre étude a montré que LOXL2 sécrétée par les CAFs promeut la migration et l'invasion des cellules tumorales et est associée avec une diminution de l'espérance de vie, dans le cancer de l'estomac (Kasashima et al., 2014). Très récemment, Torres et al. ont montré que l'expression de LOXL2 dans les CAFs est associée avec un faible pronostic chez les patients avec un cancer du colon (Torres et al., 2015). Notre travail est le premier à décrire l'expression de LOXL2 dans des CAFs issues de xénogreffes de ccRCC. Malgré des résultats concluants, la limitation à l'accès de ces xénogreffes ne nous a pas permis de développer mon projet autour de cet axe. Ces résultats alliés à l'ensemble des données de la littérature montrent donc l'importance que pourrait avoir la sécrétion de LOXL2 par les CAFs dans la croissance tumorale. Il serait donc intéressant de déterminer le rôle de LOXL2 sur le comportement de ces CAFs, mais aussi de déterminer le rôle de LOXL2 sécrétée par ces CAFs sur le comportement des cellules tumorales de ccRCC, mais surtout de déterminer la contribution de LOXL2 exprimée par les CAFs sur l'angiogenèse du ccRCC.

Enfin, concernant les cellules tumorales, Schietke et al. ainsi que Hase et al. ont montré que l'ARNm *lox12* est exprimé dans plusieurs lignées cellulaires issues de ccRCC dont les RCC-4 (Schietke et al., 2010 et Hase et al., 2014). De plus, dans leur étude Schietke et al. ont montré que l'ARNm *lox12* est surexprimé en normoxie dans les cellules RCC-4 mutées pour *VHL* par rapport aux RCC-4 où l'expression de *VHL* a été restaurée, suggérant que la voie *VHL*/HIF régule l'expression de LOXL2. Dans notre étude, nous avons montré que LOXL2 est surexprimée dans les RCC-4 mutées par rapport aux cellules réexprimant *VHL*, en normoxie. Cependant, l'expression de la protéine dans les RCC-4 mutées pour *VHL* est plus importante en hypoxie qu'en normoxie, suggérant que d'autres voies sont impliquées dans la régulation de l'expression de LOXL2.

La caractérisation de l'expression de HIF-1 α dans les RCC-4 mutées ou non pour *VHL* montre bien une expression constitutive de la protéine quelque soit la concentration en oxygène dans les RCC-4 mutées, comme décrit dans la littérature (Perier et al., 2011). Cependant, notre western blot révèle

que l'expression de HIF-1 α dans ces cellules est plus élevée en hypoxie qu'en normoxie, suggérant que HIF-1 α pourrait être régulé en normoxie par d'autres facteurs que VHL.

II. LOXL2 dans l'angiogenèse tumorale

Plusieurs études ont montré que LOXL2 joue un rôle au cours de l'angiogenèse dans des contextes physiologiques et pathologiques. Ainsi, notre équipe a démontré que LOXL2 joue un rôle dans l'angiogenèse au cours du développement. En effet, l'induction de LOXL2 par l'hypoxie conduit à son accumulation dans la MEC endothéliale. LOXL2 est impliquée dans la prolifération et la migration cellulaires et est nécessaire pour la formation de capillaires *in vitro* et *in vivo* chez le poisson zèbre, via son rôle sur l'assemblage du collagène de type IV à la membrane basale dans le microenvironnement vasculaire. Cependant, ces effets sur l'endothélium sont partiellement dépendants de l'activité catalytique de LOXL2 (notamment sur la migration des cellules endothéliales), suggérant de nouvelles fonctions de LOXL2 sur le remodelage de la MEC (Bignon et al., 2011). Une autre équipe a montré quant à elle que l'inhibition de LOXL2 avec un anticorps permettant une inhibition allostérique non compétitive, entraîne une diminution de l'angiogenèse *in vitro* ainsi que du nombre de cellules endothéliales *in vivo* dans un modèle de xénogreffes de cancer du sein (Barry-Hamilton et al., 2010). Enfin, Zaffryar-Eilot et al. ont montré que l'inhibition de LOXL2 (avec le même anticorps que celui décrit précédemment) conduit à une diminution de l'angiogenèse *in vitro* mais aussi *in vivo* dans un modèle d'implants de Matrigel cellularisés ou non avec des cellules tumorales ovariennes ou encore dans un modèle d'injection de cellules tumorales ovariennes ou pulmonaires chez la souris (Zaffryar-Eilot et al., 2013). Ces deux études suggèrent ainsi que LOXL2 sécrétée dans le microenvironnement tumoral participe à l'angiogenèse de façon dépendante de son activité catalytique.

Notre étude montre que LOXL2 sécrétée à la fois par les cellules endothéliales et tumorales dans le microenvironnement promeut l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*, dans le ccRCC. Il est à ce jour difficile de déterminer si la contribution double de LOXL2 d'origine endothéliale et tumoral, et à plus large échelle, d'origine stromale et tumorale, aboutit à un effet additionnel ou synergique sur l'angiogenèse tumoral. Mes résultats sur les échantillons humains suggèrent que l'expression de LOXL2 par le compartiment tumoral accentue l'agressivité, en association avec la dissémination métastatique, du ccRCC, alors que LOXL2 d'origine endothéliale seule n'aurait pas un rôle aussi délétère. Cependant, seule la connaissance précise des mécanismes d'action communs, complémentaires ou différents de LOXL2 d'origine endothéliale ou tumorale permettra de mieux appréhender l'effet éventuellement démultiplicateur de LOXL2 sur l'angiogenèse tumorale. Enfin, il est aussi fondamental de prendre en considération les autres acteurs cellulaires du compartiment stromal, dont les CAFs, qui constituent aussi, comme je l'ai démontré, une source importante de LOXL2 sécrétée dans le microenvironnement tumoral, ainsi que les cellules immunitaires.

De plus, nous avons montré que l'activité catalytique de LOXL2 endothéliale et tumorale participe au processus angiogénique. En effet, nous avons démontré pour la première fois que l'activité catalytique de LOXL2 sécrétée par les cellules tumorales joue un rôle important dans l'angiogenèse du ccRCC, en modulant la prolifération des cellules endothéliales. Cependant, nous avons également montré, par rhéologie, que l'ajout de la protéine recombinante dans des gels de Matrigel/fibrine ainsi que la surexpression de LOXL2 dans les cellules tumorales n'entraînent pas de modification des paramètres physiques du microenvironnement, suggérant l'absence de substrat connu pour LOXL2 dans ce type d'hydrogel. Ainsi, l'effet de l'activité catalytique de LOXL2 tumorale serait dû à un effet local de la protéine sur les cellules endothéliales, via un substrat non connu de LOXL2, restant à déterminer, sécrété par les cellules endothéliales. Cette hypothèse corroborerait alors les résultats observés par Barry-Hamilton et al. ainsi que Zaffryar-Eilot et al. concernant l'importance de l'activité catalytique de LOXL2 sécrétée dans le microenvironnement dans l'angiogenèse tumorale. De plus, nous avons montré que l'activité catalytique de LOXL2 endothéliale module partiellement l'angiogenèse (via notamment un effet sur la migration des cellules endothéliales, Bignon et al., 2011) dans ces gels de Matrigel/fibrine, en augmentant la rigidité matricielle, appuyant ainsi notre hypothèse d'un substrat non connu de LOXL2, sécrété par les cellules endothéliales. Enfin, nous avons montré que l'effet de l'activité catalytique de LOXL2 tumorale sur la prolifération des cellules endothéliales n'est observé qu'en présence d'une matrice de collagène de type I, un substrat connu de LOXL2, montrant donc la robustesse de nos résultats. L'absence d'effet de LOXL2 en l'absence de matrice de collagène de type I pourrait être dû au fait que les cellules endothéliales n'aient pas eu le temps de sécréter suffisamment de constituants matriciels et donc de remodeler une matrice extracellulaire suffisante au cours des deux jours de stimulation.

L'effet partiel de l'activité catalytique de LOXL2 endothéliale sur la migration des cellules endothéliales, suggère donc de nouvelles fonctions de LOXL2 sur le remodelage matriciel. Ainsi, ces résultats montrent l'importance de chaque domaine constituant LOXL2 et leur implication dans l'angiogenèse tumorale. Il serait alors intéressant de déterminer quel substrat de LOXL2 participe à ce processus mais aussi le rôle possible des domaines SRCR de la protéine.

En outre, si le rôle de LOXL2 sur les capacités prolifératives et migratoires des cellules tumorales de ccRCC a déjà été démontré *in vitro* sur d'autres lignées cellulaires (Hase et al., 2014), nous avons montré que LOXL2 augmente la prolifération et la migration des RCC-4.

De plus, nous avons étudié pour la première fois le rôle de l'activité catalytique de la protéine au cours de ces processus dans les cellules tumorales de ccRCC et démontré que ces mécanismes cellulaires sont indépendants de l'activité catalytique.

III. Les mécanismes moléculaires mis en jeu au cours de l'angiogenèse du ccRCC régulée par LOXL2

Nous avons montré que l'expression du PIGF est augmentée dans le milieu de sécrétion des HUVEC-LOXL2 par rapport aux HUVEC-Contrôle, par western blot. Nous avons également démontré que l'expression du PIGF est augmenté lorsque les cellules endothéliales sont traitées avec du milieu conditionné de RCC-4-LOXL2 par rapport aux cellules contrôles. L'étude de l'effet du PIGF sur les cellules endothéliales et plus particulièrement les HUVECs, montre que ce facteur de croissance augmente *in vitro* leur prolifération et leur migration (Ziche et al., 1997 et Dull et al., 2001). De plus, une autre étude menée *in vitro* a montré que le PIGF augmente la tubulogenèse de façon dépendante de la concentration, dans un modèle d'angiogenèse en trois dimensions (Harrington et al., 2008). Ainsi, LOXL2 sécrétée par les cellules endothéliales ou tumorales dans le microenvironnement semble promouvoir l'angiogenèse tumorale de façon indirecte, notamment via l'induction de l'expression du PIGF par les cellules endothéliales.

Si l'expression du PIGF est observée dans le stroma de nombreux types de tumeurs, sa sécrétion par les cellules tumorales n'est pas toujours observée, contrairement à celle du VEGF. C'est le cas par exemple dans le carcinome du rein, où le PIGF est exprimé par les cellules stromales mais pas par les cellules tumorales (Takahashi et al., 1999). Ainsi, nous avons pu constater que la lignée cellulaire de ccRCC que nous avons utilisée (RCC-4) ne sécrète pas de PIGF (résultats non montrés).

Enfin, une étude a montré que la stimulation de cellules endothéliales microvasculaires du poumon avec du PIGF entraîne une augmentation de l'expression de HIF-1 α (Patel et al., 2010). De plus, LOXL2 est une cible de HIF dans les cellules endothéliales (Manalo et al., 2005). Ainsi, l'expression du PIGF induite par LOXL2, permettrait d'induire l'expression de HIF-1 α (indépendamment de l'oxygène) dans les cellules endothéliales, qui conduirait à son tour à l'expression de LOXL2, contribuant ainsi à la mise en place d'une boucle de rétrocontrôle positive. Il serait alors intéressant de déterminer quelles sont les différentes voies de signalisation induites par le PIGF au cours de l'angiogenèse dans le ccRCC et notamment l'activation des voies ERK et AKT, déjà décrites comme ayant un rôle dans l'expression de HIF-1 α , indépendamment de l'oxygène, après la fixation de facteurs de croissance sur leur récepteur (Semenza, 2003).

Barker et al. ont montré que LOXL2 régule positivement l'expression de TIMP-1, impliqué dans l'invasion tumorale dans le cancer du sein (Barker et al., 2013). Une autre étude a également montré une corrélation positive entre l'expression de TIMP-1 et celle de LOXL2 dans le cancer colorectal (Offenberg et al., 2008). Contrairement à ces résultats, nous n'avons observé aucune différence de

sécrétion de TIMP-1 par les RCC-4 surexprimant ou non LOXL2, suggérant que cette expression pourrait varier en fonction du type de cancer étudié mais aussi en fonction du type cellulaire étudié au sein d'une même tumeur.

Ainsi, nous avons observé une diminution de la sécrétion de TIMP-1 par les HUVEC-LOXL2 par rapport aux HUVEC-Contrôle. A contrario, le traitement des cellules endothéliales avec du milieu conditionné de RCC-4-LOXL2 augmente l'expression de TIMP-1 par rapport aux RCC-4-Contrôle. En outre, dans la première partie de nos résultats, nous avons montré que LOXL2 pourrait avoir un rôle spécifique en fonction de son origine cellulaire dans les tumeurs. En effet, nous avons démontré que l'ARNm *lox12* est exprimé à la fois par les cellules stromales et tumorales dans les tumeurs primaires sans métastases associées alors que cette expression est majoritairement retrouvée dans les cellules tumorales au niveau des tumeurs primaires avec des métastases associées. Ainsi, l'ensemble de ces résultats associés aux données de la littérature suggèrent que l'expression de LOXL2 dans les cellules endothéliales aurait un rôle répresseur sur l'expression de TIMP-1 (via un mécanisme restant à déterminer), permettant ainsi l'expression des MMPs, favorisant alors le processus angiogénique et la croissance tumorale. A contrario, à des stades plus avancés de la tumeur l'expression de TIMP-1 par les cellules tumorales favoriserait l'invasion, tout en régulant le processus angiogénique, dans les cellules endothéliales ne surexprimant pas LOXL2. De plus, deux études ont montré que l'expression de TIMP-1 est augmentée dans le ccRCC par rapport au tissu sain (Lein et al., 2000 et Kallakury et al., 2001). Dans leur étude, Kallakury et al. ont notamment montré une corrélation positive entre le grade de la tumeur et l'expression de TIMP-1 dans les cellules tumorales, corroborant ainsi notre hypothèse.

Enfin, nous avons montré une augmentation de l'expression de CREB dans le lysat cellulaire des cellules endothéliales mises en présence de milieu conditionné de RCC-4-LOXL2 par rapport à celui des RCC-4-Contrôle. CREB est un facteur de transcription ayant de nombreux gènes cibles dont le PIGF. En effet, une étude a montré que l'expression du PIGF est régulée par la voie PKA/AMPC (Adenosine monophosphate cyclique) et que le promoteur du gène codant pour le PIGF possède un site de fixation pour CREB (Depoix et al., 2011). Ainsi, ces résultats associés à ceux de notre étude suggèrent que LOXL2 tumorale induirait, de façon directe ou indirecte par un mécanisme encore inconnu, la voie de signalisation PKA/AMPC, conduisant à la phosphorylation de CREB (Ser133) et l'induction de la transcription du PIGF. Le PIGF alors sécrété par les cellules endothéliales permettrait d'induire l'angiogenèse tumorale de façon autocrine. De plus, une étude très récente a montré que l'inhibition de la phosphorylation de CREB sur la sérine 133 dans les cellules tumorales inhibe la croissance tumorale et le processus métastatique dans le ccRCC (Wang et al., 2015).

En conclusion, nos résultats ont permis de mettre en évidence la contribution de LOXL2 sécrétée à la fois par les cellules endothéliales et tumorales au cours de l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro*, dans le ccRCC. En effet, LOXL2 endothéliale et tumorale promeuvent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Si l'effet de LOXL2 tumorale sur la migration est indépendant de l'activité catalytique de la protéine, cette dernière est importante pour leur prolifération. L'activité catalytique de LOXL2 endothéliale joue quant à elle un rôle partiel dans l'angiogenèse (notamment sur la migration des cellules endothéliales, Bignon et al., 2011) alors qu'elle ne joue aucun rôle dans leur prolifération. De plus, l'expression de LOXL2 à la fois par les cellules endothéliales et tumorales régule l'expression de nombreuses voies de signalisation impliquées dans le processus angiogénique. Ces données démontrent donc que LOXL2 est une cible thérapeutique ouvrant de nouvelles perspectives contre l'angiogenèse dans le ccRCC, en complément des thérapies de première et seconde lignes utilisées à ce jour.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abramsson, A., Kurup, S., Busse, M., Yamada, S., Lindblom, P., Schallmeiner, E., Stenzel, D., Sauvaget, D., Ledin, J., Ringvall, M., et al.** (2007). Defective N-sulfation of heparan sulfate proteoglycans limits PDGF-BB binding and pericyte recruitment in vascular development. *Genes Dev.* **21**, 316–331.
- Adams, R.H., and Alitalo, K.** (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 464–478.
- Adini, A., Kornaga, T., Firoozbakht, F., and Benjamin, L.E.** (2002). Placental growth factor is a survival factor for tumor endothelial cells and macrophages. *Cancer Res.* **62**, 2749–2752.
- Ahn, S.G., Dong, S.M., Oshima, A., Kim, W.H., Lee, H.M., Lee, S.A., Kwon, S., Lee, J., Lee, J.M., Jeong, J., et al.** (2013). LOXL2 expression is associated with invasiveness and negatively influences survival in breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **141**, 89–99.
- Akiri, G., Sabo, E., Dafni, H., Vadasz, Z., Kartvelishvily, Y., Gan, N., Kessler, O., Cohen, T., Resnick, M., Neeman, M., et al.** (2003). Lysyl oxidase-related protein-1 promotes tumor fibrosis and tumor progression in vivo. *Cancer Res.* **63**, 1657–1666.
- Alajati, A., Laib, A.M., Weber, H., Boos, A.M., Bartol, A., Ikenberg, K., Korff, T., Zentgraf, H., Obodozie, C., Graeser, R., et al.** (2008). Spheroid-based engineering of a human vasculature in mice. *Nat. Methods* **5**, 439–445.
- Alves, T.R., da Fonseca, A.C., Nunes, S.S., da Silva, A.O., Dubois, L.G., Faria, J., Kahn, S.A., Viana, N.B., Marcondes, J., Legrand, C., et al.** (2011). Tenascin-C in the extracellular matrix promotes the selection of highly proliferative and tubulogenesis-defective endothelial cells. *Exp. Cell. Res.* **317**, 2073–2085.
- De Arcangelis, A., Neuville, P., Boukamel, R., Lefebvre, O., Keding, M., and Simon-Assmann, P.** (1996). Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J. Cell Biol.* **133**, 417–430.
- Arikawa-Hirasawa, E., Watanabe, H., Takami, H., Hassell, J.R., and Yamada, Y.** (1999). Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.* **23**, 354–358.
- Arora, P.D., Narani, N., and McCulloch, C.A.G.** (1999). The Compliance of Collagen Gels Regulates Transforming Growth Factor- β Induction of α -Smooth Muscle Actin in Fibroblasts. *Am. J. Pathol.* **154**, 871–882.
- Astrof, S., Crowley, D., George, E.L., Fukuda, T., Sekiguchi, K., Hanahan, D., and Hynes, R.O.** (2004). Direct Test of Potential Roles of EIIIA and EIIB Alternatively Spliced Segments of Fibronectin in Physiological and Tumor Angiogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8662–8670.
- Autiero, M., Waltenberger, J., Communi, D., Kranz, A., Moons, L., Lambrechts, D., Kroll, J., Plaisance, S., De Mol, M., Bono, F., et al.** (2003). Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat. Med.* **9**, 936–943.
- Avery, N.C., and Bailey, A.J.** (2006). The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathol. Biol.* **54**, 387–395.
- Aviezer, D., Hecht, D., Safran, M., Eisinger, M., David, G., and Yayon, A.** (1994). Perlecan, basal lamina proteoglycan, promotes basic fibroblast growth factor-receptor binding, mitogenesis, and angiogenesis. *Cell* **79**, 1005–1013.

- Avraamides, C.J., Garmy-Susini, B., and Varner, J.A.** (2008). Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 604–617.
- Awakura, Y., Nakamura, E., Ito, N., Kamoto, T., and Ogawa, O.** (2008). Methylation-associated silencing of SFRP1 in renal cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **20**, 1257-1263.
- Bader, B.L., Smyth, N., Nedbal, S., Miosge, N., Baranowsky, A., Mokkapat, S., Murshed, M., and Nischt, R.** (2005). Compound Genetic Ablation of Nidogen 1 and 2 Causes Basement Membrane Defects and Perinatal Lethality in Mice. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6846–6856.
- Bailey, A.J., Sims, T.J., and Light, N.** (1984). Cross-linking in type IV collagen. *Biochem J* **218**, 713–723.
- Bailey, A.J., Paul, R.G., and Knott, L.** (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mech. Ageing Dev.* **106**, 1–56.
- Bais, C., Wu, X., Yao, J., Yang, S., Crawford, Y., McCutcheon, K., Tan, C., Kolumam, G., Vernes, J.-M., Eastham-Anderson, J., et al.** (2010). PlGF Blockade Does Not Inhibit Angiogenesis during Primary Tumor Growth. *Cell* **141**, 166–177.
- Baker, A.-M., Cox, T.R., Bird, D., Lang, G., Murray, G.I., Sun, X.-F., Southall, S.M., Wilson, J.R., and Erler, J.T.** (2011). The Role of Lysyl Oxidase in SRC-Dependent Proliferation and Metastasis of Colorectal Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **103**, 407–424.
- Barker, H.E., Chang, J., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Nicolau, M., Evans, H.R., Gartland, A., and Erler, J.T.** (2011). LOXL2-Mediated Matrix Remodeling in Metastasis and Mammary Gland Involution. *Cancer Res.* **71**, 1561–1572.
- Barker, H.E., Cox, T.R., and Erler, J.T.** (2012). The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 540–552.
- Barker, H.E., Bird, D., Lang, G., and Erler, J.T.** (2013). Tumor-Secreted LOXL2 Activates Fibroblasts through FAK Signaling. *Mol. Cancer Res.* **11**, 1425–1436.
- Barry-Hamilton, V., Spangler, R., Marshall, D., McCauley, S., Rodriguez, H.M., Oyasu, M., Mikels, A., Vaysberg, M., Ghermazien, H., Wai, C., et al.** (2010). Allosteric inhibition of lysyl oxidase-like-2 impedes the development of a pathologic microenvironment. *Nat. Med.* **16**, 1009–1017.
- Beckouche, N., Bignon, M., Lelarge, V., Mathivet, T., Pichol-Thievend, C., Berndt, S., Hardouin, J., Garand, M., Ardidie-Robouant, C., Barret, A., et al.** (2015). The interaction of heparan sulfate proteoglycans with endothelial transglutaminase-2 limits VEGF165-induced angiogenesis. *Sci Signal* **8**, ra70–ra70.
- Benedito, R., and Hellström, M.** (2013). Notch as a hub for signaling in angiogenesis. *Exp. Cell Res.* **319**, 1281–1288.
- Benedito, R., Roca, C., Sørensen, I., Adams, S., Gossler, A., Fruttiger, M., and Adams, R.H.** (2009). The Notch Ligands Dll4 and Jagged1 Have Opposing Effects on Angiogenesis. *Cell* **137**, 1124–1135.
- Benjamin, L.E., Hemo, I., and Keshet, E.** (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* **125**, 1591–1598.

- Benjamin, L.E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., and Keshet, E.** (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J. Clin. Invest.* **103**, 159–165.
- Benton, G., Arnaoutova, I., George, J., Kleinman, H.K., and Koblinski, J.** (2014). Matrigel: From discovery and ECM mimicry to assays and models for cancer research. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **79–80**, 3–18.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., et al.** (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* **2**, 737–744.
- Bertout, J.A., Patel, S.A., and Simon, M.C.** (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 967–975.
- Bhaskar, V., Zhang, D., Fox, M., Seto, P., Wong, M.H., Wales, P.E., Powers, D., Chao, D.T., DuBridge, R.B., and Ramakrishnan, V.** (2007). A function blocking anti-mouse integrin $\alpha 5\beta 1$ antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth in vivo. *J. Transl. Med.* **5**, 61.
- Bignon, M., Pichol-Thievend, C., Hardouin, J., Malbouyres, M., Brechot, N., Nasciutti, L., Barret, A., Teillon, J., Guillon, E., Etienne, E., et al.** (2011). Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood* **118**, 3979–3989.
- Bingle, L., Lewis, C.E., Corke, K.P., Reed, M.W.R., and Brown, N.J.** (2006). Macrophages promote angiogenesis in human breast tumour spheroids in vivo. *Br. J. Cancer* **94**, 101–107.
- Bix, G., Fu, J., Gonzalez, E.M., Macro, L., Barker, A., Campbell, S., Zutter, M.M., Santoro, S.A., Kim, J.K., Hook, M., et al.** (2004). Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through $\alpha 2 \beta 1$ integrin. *J. Cell Biol.* **166**, 97–109.
- Borel, A., Eichenberger, D., Farjanel, J., Kessler, E., Gleyzal, C., Hulmes, D.J.S., Sommer, P., and Font, B.** (2001). Lysyl Oxidase-like Protein from Bovine Aorta: ISOLATION AND MATURATION TO AN ACTIVE FORM BY BONE MORPHOGENETIC PROTEIN-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 48944–48949.
- Bouez, C., Reynaud, C., Noblesse, E., Thépot, A., Gleyzal, C., Kanitakis, J., Perrier, E., Damour, O., and Sommer, P.** (2006). The Lysyl Oxidase LOX Is Absent in Basal and Squamous Cell Carcinomas and Its Knockdown Induces an Invading Phenotype in a Skin Equivalent Model. *Clin. Cancer Res.* **12**, 1463–1469.
- Bouleti, C., Mathivet, T., Coqueran, B., Serfaty, J.-M., Lesage, M., Berland, E., Ardidie-Robouant, C., Kauffenstein, G., Henrion, D., Lapergue, B., et al.** (2013). Protective effects of angiotensin-like 4 on cerebrovascular and functional damages in ischaemic stroke. *Eur. Heart J.* **34**, 3657–3668.
- Bréchet, N., Gomez, E., Bignon, M., Khallou-Laschet, J., Dussiot, M., Cazes, A., Alanio-Bréchet, C., Durand, M., Philippe, J., Silvestre, J.-S., et al.** (2008). Modulation of Macrophage Activation State Protects Tissue from Necrosis during Critical Limb Ischemia in Thrombospondin-1-Deficient Mice. *PLoS ONE* **3**, e3950.
- Brekhman, V., Lugassie, J., Zaffryar-Eilot, S., Sabo, E., Kessler, O., Smith, V., Golding, H., and Neufeld, G.** (2010). Receptor activity modifying protein-3 mediates the protumorigenic activity of lysyl oxidase-like protein-2. *FASEB J.* **25**, 55–65.

- Brock, A., Krause, S., and Ingber, D.E.** (2015). Control of cancer formation by intrinsic genetic noise and microenvironmental cues. *Nat. Rev. Cancer* **15**, 499–509.
- Burri, P.H., Hlushchuk, R., and Djonov, V.** (2004). Intussusceptive angiogenesis: Its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev. Dyn.* **231**, 474–488.
- Caley, M.P., Martins, V.L.C., and O'Toole, E.A.** (2015). Metalloproteinases and Wound Healing. *Adv. Wound Care* **4**, 225–234.
- Calvo, F., Ege, N., Grande-Garcia, A., Hooper, S., Jenkins, R.P., Chaudhry, S.I., Harrington, K., Williamson, P., Moeendarbary, E., Charras, G., et al.** (2013). Mechano-transduction and YAP-dependent matrix remodelling is required for the generation and maintenance of cancer associated fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **15**, 637–646.
- Canesin, G., Cuevas, E.P., Santos, V., López-Menéndez, C., Moreno-Bueno, G., Huang, Y., Csiszar, K., Portillo, F., Peinado, H., Lyden, D., et al.** (2014). Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) and E47 EMT factor: novel partners in E-cadherin repression and early metastasis colonization. *Oncogene* **34**, 951–964.
- Cardone, M.H., Roy, N., Stennicke, H.R., Salvesen, G.S., Franke, T.F., Stanbridge, E., Frisch, S., and Reed, J.C.** (1998). Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science* **282**, 1318–1321.
- Carlson, T.R., Hu, H., Braren, R., Kim, Y.H., and Wang, R.A.** (2008). Cell-autonomous requirement for $\alpha 1$ integrin in endothelial cell adhesion, migration and survival during angiogenesis in mice. *Development* **135**, 2193–2202.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K.** (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* **407**, 249–257.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K.** (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298–307.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al.** (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* **380**, 435–439.
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compennolle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., et al.** (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* **7**, 575–583.
- Castellani, P., Borsi, L., Carnemolla, B., Birò, A., Dorcaratto, A., Viale, G.L., Neri, D., and Zardi, L.** (2002). Differentiation between High- and Low-Grade Astrocytoma Using a Human Recombinant Antibody to the Extra Domain-B of Fibronectin. *Am. J. Pathol.* **161**, 1695–1700.
- Cazes, A., Galaup, A., Chomel, C., Bignon, M., Brechot, N., Le Jan, S., Weber, H., Corvol, P., Muller, L., Germain, S., et al.** (2006). Extracellular Matrix-Bound Angiopoietin-Like 4 Inhibits Endothelial Cell Adhesion, Migration, and Sprouting and Alters Actin Cytoskeleton. *Circ. Res.* **99**, 1207–1215.
- Chang, J., Nicolau, M.M., Cox, T.R., Wetterskog, D., Martens, J.W., E Barker, H., and Erler, J.T.** (2013). LOXL2 induces aberrant acinar morphogenesis via ErbB2 signaling. *Breast Cancer Res.* **15**, R67.

- Chomel, C., Cazes, A., Faye, C., Bignon, M., Gomez, E., Ardidie-Robouant, C., Barret, A., Ricard-Blum, S., Muller, L., Germain, S., et al.** (2009). Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity. *FASEB J.* **23**, 940–949.
- Chowdhury, R., Hardy, A., and Schofield, C.J.** (2008). The human oxygen sensing machinery and its manipulation. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 1308–1319.
- Chung, C.H., Parker, J.S., Ely, K., Carter, J., Yi, Y., Murphy, B.A., Ang, K.K., El-Naggar, A.K., Zanation, A.M., Cmelak, A.J., et al.** (2006). Gene Expression Profiles Identify Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Activation of Nuclear Factor- κ B Signaling as Characteristics of a High-risk Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Res.* **66**, 8210–8218.
- Claffey, K.P., Abrams, K., Shih, S.-C., Brown, L.F., Mullen, A., and Keough, M.** (2001). Fibroblast Growth Factor 2 Activation of Stromal Cell Vascular Endothelial Growth Factor Expression and Angiogenesis. *Lab. Invest.* **81**, 61–75.
- Clevers, H.** (2006). Wnt/ β -Catenin Signaling in Development and Disease. *Cell* **127**, 469–480.
- Clifford, S.C., Prowse, A.H., Affara, N.A., Buys, C.H.C.M., and Maher, E.R.** (1998). Inactivation of the von Hippel–Lindau (VHL) tumour suppressor gene and allelic losses at chromosome arm 3p in primary renal cell carcinoma: Evidence for a VHL-independent pathway in clear cell renal tumourigenesis. *Genes. Chromosomes Cancer* **22**, 200–209.
- Colorado, P.C., Torre, A., Kamphaus, G., Maeshima, Y., Hopfer, H., Takahashi, K., Volk, R., Zamborsky, E.D., Herman, S., Sarkar, P.K., et al.** (2000). Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res.* **60**, 2520–2526.
- Colvin, J.S., Bohne, B.A., Harding, G.W., McEwen, D.G., and Ornitz, D.M.** (1996). Skeletal overgrowth and deafness in mice lacking fibroblast growth factor receptor 3. *Nat. Genet.* **12**, 390–397.
- Conklin, M.W., Eickhoff, J.C., Riching, K.M., Pehlke, C.A., Eliceiri, K.W., Provenzano, P.P., Friedl, A., and Keely, P.J.** (2011). Aligned Collagen Is a Prognostic Signature for Survival in Human Breast Carcinoma. *Am. J. Pathol.* **178**, 1221–1232.
- Costell, M., Gustafsson, E., Aszódi, A., Mörgelin, M., Bloch, W., Hunziker, E., Addicks, K., Timpl, R., and Fässler, R.** (1999). Perlecan Maintains the Integrity of Cartilage and Some Basement Membranes. *J. Cell Biol.* **147**, 1109–1122.
- Coussens, L.M., Tinkle, C.L., Hanahan, D., and Werb, Z.** (2000). MMP-9 Supplied by Bone Marrow-Derived Cells Contributes to Skin Carcinogenesis. *Cell* **103**, 481–490.
- Cox, T.R., Rumney, R.M.H., Schoof, E.M., Perryman, L., Høye, A.M., Agrawal, A., Bird, D., Latif, N.A., Forrest, H., Evans, H.R., et al.** (2015). The hypoxic cancer secretome induces pre-metastatic bone lesions through lysyl oxidase. *Nature* **522**, 106–110.
- St Croix, B.S., Rago, C., Velculescu, V., Traverso, G., Romans, K.E., Montgomery, E., Lal, A., Riggins, G.J., Lengauer, C., Vogelstein, B., et al.** (2000). Genes Expressed in Human Tumor Endothelium. *Science* **289**, 1197–1202.
- Cronshaw, A.D., Fothergill-Gilmore, L.A., and Hulmes, D.J.** (1995). The proteolytic processing site of the precursor of lysyl oxidase. *Biochem. J.* **306**, 279–284.

- Cross, M.J., Dixelius, J., Matsumoto, T., and Claesson-Welsh, L.** (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 488–494.
- Dalgliesh, G.L., Furge, K., Greenman, C., Chen, L., Bignell, G., Butler, A., Davies, H., Edkins, S., Hardy, C., Latimer, C., et al.** (2010). Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* **463**, 360–363.
- DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., and Coussens, L.M.** (2009). CD4+ T Cells Regulate Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas by Enhancing Protumor Properties of Macrophages. *Cancer Cell* **16**, 91–102.
- Deng, C.X., Wynshaw-Boris, A., Shen, M.M., Daugherty, C., Ornitz, D.M., and Leder, P.** (1994). Murine FGFR-1 is required for early postimplantation growth and axial organization. *Genes Dev.* **8**, 3045–3057.
- Depoix, C., Tee, M.K., and Taylor, R.N.** (2011). Molecular Regulation of Human Placental Growth Factor (PlGF) Gene Expression in Placental Villi and Trophoblast Cells is Mediated via the Protein Kinase A Pathway. *Reprod. Sci.* **18**, 219–228.
- Deveza, L., Choi, J., and Yang, F.** (2012). Therapeutic Angiogenesis for Treating Cardiovascular Diseases. *Theranostics* **2**, 801–814.
- Diehl, J.A., Cheng, M., Roussel, M.F., and Sherr, C.J.** (1998). Glycogen synthase kinase-3 β regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. *Genes Dev.* **12**, 3499–3511.
- Ding, H., Inoue, S., Ljubimov, A.V., Patil, R., Portilla-Arias, J., Hu, J., Konda, B., Wawrowsky, K.A., Fujita, M., Karabalin, N., et al.** (2010). Inhibition of brain tumor growth by intravenous poly(-L-malic acid) nanobioconjugate with pH-dependent drug release. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 18143–18148.
- Diop-Frimpong, B., Chauhan, V.P., Krane, S., Boucher, Y., and Jain, R.K.** (2011). Losartan inhibits collagen I synthesis and improves the distribution and efficacy of nanotherapeutics in tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 2909–2914.
- Djonov, V., Baum, O., and Burri, P.H.** (2003). Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis. *Cell Tissue Res.* **314**, 107–117.
- Dono, R., Texido, G., Dussel, R., Ehmke, H., and Zeller, R.** (1998). Impaired cerebral cortex development and blood pressure regulation in FGF-2-deficient mice. *EMBO J.* **17**, 4213–4225.
- Dull, R.O., Yuan, J., Chang, Y.S., Tarbell, J., Jain, R.K., and Munn, L.L.** (2001). Kinetics of Placenta Growth Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Synergy in Endothelial Hydraulic Conductivity and Proliferation. *Microvasc. Res.* **61**, 203–210.
- Egeblad, M., and Werb, Z.** (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 161–174.
- Eilken, H.M., and Adams, R.H.** (2010). Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **22**, 617–625.
- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Nicolau, M., Dornhöfer, N., Kong, C., Le, Q.-T., Chi, J.-T.A., Jeffrey, S.S., and Giaccia, A.J.** (2006). Lysyl oxidase is essential for hypoxia-induced metastasis. *Nature* **440**, 1222–1226.

- Erler, J.T., Bennewith, K.L., Cox, T.R., Lang, G., Bird, D., Koong, A., Le, Q.-T., and Giaccia, A.J.** (2009). Hypoxia-Induced Lysyl Oxidase Is a Critical Mediator of Bone Marrow Cell Recruitment to Form the Premetastatic Niche. *Cancer Cell* **15**, 35–44.
- Estrach, S., Cailleteau, L., Franco, C.A., Gerhardt, H., Stefani, C., Lemichez, E., Gagnoux-Palacios, L., Meneguzzi, G., and Mettouchi, A.** (2011). Laminin-Binding Integrins Induce Dll4 Expression and Notch Signaling in Endothelial Cells. *Circ. Res.* **109**, 172–182.
- Evans, C.E., Branco-Price, C., and Johnson, R.S.** (2012). HIF-mediated endothelial response during cancer progression. *Int. J. Hematol.* **95**, 471–477.
- Faivre, S., Delbado, C., Vera, K., Robert, C., Lozahic, S., Lassau, N., Bello, C., Deprimo, S., Brega, N., Massimini, G., Armand, J.P., Scigalla, P., and Raymond, E.** (2006). Safety, Pharmacokinetic, and Antitumor Activity of SU11248, a Novel Oral Multitarget Tyrosine Kinase Inhibitor, in Patients With Cancer. *J. Clin. Oncol.* **24**, 25–35.
- De Falco, S.** (2012). The discovery of placenta growth factor and its biological activity. *Exp. Mol. Med.* **44**, 1–9.
- Favier, J., Germain, S., Emmerich, J., Corvol, P., and Gasc, J.-M.** (2005). Critical overexpression of thrombospondin 1 in chronic leg ischaemia. *J. Pathol.* **207**, 358–366.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O’Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W.** (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* **380**, 439–442.
- Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.-P., and Novotny, W.** (2004). Case history: Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* **3**, 391–400.
- Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B.R., and Delaissé, J.-M.** (2000). Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett.* **486**, 247–251.
- Ffrench-Constant, C., and Hynes, R.O.** (1989). Alternative splicing of fibronectin is temporally and spatially regulated in the chicken embryo. *Development* **106**, 375–388.
- Fischer, C., Jonckx, B., Mazzone, M., Zacchigna, S., Loges, S., Pattarini, L., Chorianopoulos, E., Liesenborghs, L., Koch, M., De Mol, M., et al.** (2007). Anti-PlGF Inhibits Growth of VEGF(R)-Inhibitor-Resistant Tumors without Affecting Healthy Vessels. *Cell* **131**, 463–475.
- Fitch, M.J., Campagnolo, L., Kuhnert, F., and Stuhlmann, H.** (2004). Eglf7, a novel epidermal growth factor-domain gene expressed in endothelial cells. *Dev. Dyn.* **230**, 316–324.
- Flamme, I., Frölich, T., and Risau, W.** (1997). Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* **173**, 206–210.
- Fogelgren, B., Polgár, N., Szauter, K.M., Újfaludi, Z., Laczkó, R., Fong, K.S.K., and Csiszar, K.** (2005). Cellular Fibronectin Binds to Lysyl Oxidase with High Affinity and Is Critical for Its Proteolytic Activation. *J. Biol. Chem.* **280**, 24690–24697.
- Folkman, J.** (2000). Cancer Medicine (eds Holland, J. F. et al.), p 132–152.
- Fong, G.-H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L.** (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature* **376**, 66–70.

- Fong, G.-H., Zhang, L., Bryce, D.-M., and Peng, J.** (1999). Increased hemangioblast commitment, not vascular disorganization, is the primary defect in *flt-1* knock-out mice. *Development* **126**, 3015–3025.
- Fong, S.F.T., Dietzsch, E., Fong, K.S.K., Hollosi, P., Asuncion, L., He, Q., Parker, M.I., and Csiszar, K.** (2007). Lysyl oxidase-like 2 expression is increased in colon and esophageal tumors and associated with less differentiated colon tumors. *Genes. Chromosomes Cancer* **46**, 644–655.
- Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M.** (2009). Polarization of Tumor-Associated Neutrophil (TAN) Phenotype by TGF- β : “N1” versus “N2” TAN. *Cancer Cell* **16**, 183–194.
- Frieser, M., Nöckel, H., Pausch, F., Röder, C., Hahn, A., Deutzmann, R., and Sorokin, L.M.** (1997). Cloning of the mouse laminin $\alpha 4$ cDNA. Expression in a subset of endothelium. *Eur. J. Biochem.* **246**, 727–735.
- Fujimoto, E., and Tajima, S.** (2009). Reciprocal regulation of LOX and LOXL2 expression during cell adhesion and terminal differentiation in epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* **55**, 91–98.
- Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y.D., Ellis, L.M., and Semenza, G.L.** (2002). Insulin-like Growth Factor 1 Induces Hypoxia-inducible Factor 1-mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression, Which is Dependent on MAP Kinase and Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling in Colon Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* **277**, 38205–38211.
- Fukumura, D., Xavier, R., Sugiura, T., Chen, Y., Park, E.-C., Lu, N., Selig, M., Nielsen, G., Taksir, T., Jain, R.K., et al.** (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell* **94**, 715–725.
- Funahashi, Y., Shawber, C.J., Vorontchikhina, M., Sharma, A., Outtz, H.H., and Kitajewski, J.** (2010). Notch regulates the angiogenic response via induction of VEGFR-1. *J. Angiogenesis Res.* **2**, 3.
- Fuster, M.M., and Wang, L.** (2010). Endothelial Heparan Sulfate in Angiogenesis. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **93**, 179–212.
- Gaengel, K., Genove, G., Armulik, A., and Betsholtz, C.** (2009). Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **29**, 630–638.
- Gaggioli, C., Hooper, S., Hidalgo-Carcedo, C., Grosse, R., Marshall, J.F., Harrington, K., and Sahai, E.** (2007). Fibroblast-led collective invasion of carcinoma cells with differing roles for RhoGTPases in leading and following cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1392–1400.
- Galaup, A., Cazes, A., Le Jan, S., Philippe, J., Connault, E., Le Coz, E., Mekid, H., Mir, L.M., Opolon, P., Corvol, P., et al.** (2006). Angiopoietin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 18721–18726.
- Galaup, A., Gomez, E., Souktani, R., Durand, M., Cazes, A., Monnot, C., Teillon, J., Le Jan, S., Bouletti, C., Briois, G., et al.** (2012). Protection against myocardial infarction and no-reflow through preservation of vascular integrity by angiopoietin-like 4. *Circulation* **125**, 140–149.
- Gao, Y., Xiao, Q., Ma, H., Li, L., Liu, J., Feng, Y., Fang, Z., Wu, J., Han, X., Zhang, J., et al.** (2010). LKB1 inhibits lung cancer progression through lysyl oxidase and extracellular matrix remodeling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 18892–18897.
- Garcia, A., and Kandel, J.J.** (2012). Notch: A key regulator of tumor angiogenesis and metastasis. *Histol. Histopathol.* **27**, 151–156.

- Gardner, H., Kreidberg, J., Koteliansky, V., and Jaenisch, R.** (1996). Deletion of integrin $\alpha 1$ by homologous recombination permits normal murine development but gives rise to a specific deficit in cell adhesion. *Dev. Biol.* **175**, 301–313.
- George, E.L., Georges-Labouesse, E.N., Patel-King, R.S., Rayburn, H., and Hynes, R.O.** (1993). Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin. *Development* **119**, 1079–1091.
- George, E.L., Baldwin, H.S., and Hynes, R.O.** (1997). Fibronectins are essential for heart and blood vessel morphogenesis but are dispensable for initial specification of precursor cells. *Blood* **90**, 3073–3081.
- Georges, P.C., and Janmey, P.A.** (2005). Cell type-specific response to growth on soft materials. *J. Appl. Physiol.* **98**, 1547–1553.
- Georges-Labouesse, E., Messaddeq, N., Yehia, G., Cadalbert, L., Dierich, A., and Le Meur, M.** (1996). Absence of integrin $\alpha 6$ leads to epidermolysis bullosa and neonatal death in mice. *Nat. Genet.* **13**, 370–373.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., et al.** (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* **161**, 1163–1177.
- Germain, S., Monnot, C., Muller, L., and Eichmann, A.** (2010). Hypoxia-driven angiogenesis: role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr. Opin. Hematol.* **17**, 245–251.
- Giampuzzi, M., Oleggini, R., and Di Donato, A.** (2003). Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics* **1647**, 245–251.
- Goetz, J.G., Minguet, S., Navarro-Lérida, I., Lazcano, J.J., Samaniego, R., Calvo, E., Tello, M., Osteso-Ibáñez, T., Pellinen, T., Echarri, A., et al.** (2011). Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal Caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis. *Cell* **146**, 148–163.
- Gould, D.B., Phalan, F.C., Breedveld, G.J., van Mil, S.E., Smith, R.S., Schimenti, J.C., Aguglia, U., van der Knaap, M.S., Heutink, P., and John, S.W.M.** (2005). Mutations in Col4a1 Cause Perinatal Cerebral Hemorrhage and Porencephaly. *Science* **308**, 1167–1171.
- Gould, D.B., Phalan, F.C., van Mil, S.E., Sundberg, J.P., Vahedi, K., Massin, P., Bousser, M.G., Heutink, P., Miner, J.H., Tournier-Lasserre, E., et al.** (2006). Role of COL4A1 in small-vessel disease and hemorrhagic stroke. *N. Engl. J. Med.* **354**, 1489–1496.
- Gupta, V., Bassi, D.E., Simons, J.D., Devarajan, K., Al-Saleem, T., Uzzo, R.G., and Cukierman, E.** (2011). Elevated Expression of Stromal Palladin Predicts Poor Clinical Outcome in Renal Cell Carcinoma. *PLoS ONE* **6**, e21494.
- Hanahan, D., and Coussens, L.M.** (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A.** (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674.

- Hanemaaijer, R., Koolwijk, P., le Clercq, L., de Vree, W.J., and van Hinsbergh, V.W.** (1993). Regulation of matrix metalloproteinase expression in human vein and microvascular endothelial cells. Effects of tumour necrosis factor alpha, interleukin 1 and phorbol ester. *Biochem. J.* **296**, 803–809.
- Hara, S., Hamada, J., Kobayashi, C., Kondo, Y., and Imura, N.** (2001). Expression and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-3 α in Human Kidney: Suppression of HIF-Mediated Gene Expression by HIF-3 α . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **287**, 808–813.
- Harrington, L.S., Sainson, R.C.A., Williams, C.K., Taylor, J.M., Shi, W., Li, J.-L., and Harris, A.L.** (2008). Regulation of multiple angiogenic pathways by Dll4 and Notch in human umbilical vein endothelial cells. *Microvasc. Res.* **75**, 144–154.
- Hase, H., Jingushi, K., Ueda, Y., Kitae, K., Egawa, H., Ohshio, I., Kawakami, R., Kashiwagi, Y., Tsukada, Y., Kobayashi, T., et al.** (2014). LOXL2 Status Correlates with Tumor Stage and Regulates Integrin Levels to Promote Tumor Progression in ccRCC. *Mol. Cancer Res.* **12**, 1807–1817.
- Hashimoto, G., Inoki, I., Fujii, Y., Aoki, T., Ikeda, E., and Okada, Y.** (2002). Matrix Metalloproteinases Cleave Connective Tissue Growth Factor and Reactivate Angiogenic Activity of Vascular Endothelial Growth Factor 165. *J. Biol. Chem.* **277**, 36288–36295.
- Hellström, M., Lindahl, P., Abramsson, A., Betsholtz, C., et al.** (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Development* **126**, 3047–3055.
- Hellström, M., Phng, L.-K., Hofmann, J.J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.-K., Karlsson, L., Gaiano, N., et al.** (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature* **445**, 776–780.
- Herbert, S.P., and Stainier, D.Y.R.** (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 551–564.
- Herman, J.G., Latif, F., Weng, Y., Lerman, M.I., Zbar, B., Liu, S., Samid, D., Duan, D.S., Gnarr, J.R., and Linehan, W.M.** (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 9700–9704.
- Herranz, N., Dave, N., Millanes-Romero, A., Morey, L., Díaz, V.M., Lórenz-Fonfría, V., Gutierrez-Gallego, R., Jerónimo, C., Di Croce, L., García de Herreros, A., et al.** (2012). Lysyl Oxidase-like 2 Deaminates Lysine 4 in Histone H3. *Mol. Cell* **46**, 369–376.
- Hida, K., Hida, Y., Amin, D.N., Flint, A.F., Panigrahy, D., Morton, C.C., and Klagsbrun, M.** (2004). Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res.* **64**, 8249–8255.
- Higgins, D.F., Kimura, K., Bernhardt, W.M., Shrimanker, N., Akai, Y., Hohenstein, B., Saito, Y., Johnson, R.S., Kretzler, M., Cohen, C.D., et al.** (2007). Hypoxia promotes fibrogenesis in vivo via HIF-1 stimulation of epithelial-to-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **117**, 3810–3820.
- Hinz, B., Mastrangelo, D., Iselin, C.E., Chaponnier, C., and Gabbiani, G.** (2001). Mechanical Tension Controls Granulation Tissue Contractile Activity and Myofibroblast Differentiation. *Am. J. Pathol.* **159**, 1009–1020.

- Hirata, H., Hinoda, Y., Nakajima, K., Kawamoto, K., Kikuno, N., Kawakami, K., Yamamura, S., Ueno, K., Majid, S., Saini, S., et al.** (2009). Wnt Antagonist Gene DKK2 Is Epigenetically Silenced and Inhibits Renal Cancer Progression through Apoptotic and Cell Cycle Pathways. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5678–5687.
- Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P., and Jain, R.K.** (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 4607–4612.
- Hollosi, P., Yakushiji, J.K., Fong, K.S.K., Csiszar, K., and Fong, S.F.T.** (2009). Lysyl oxidase-like 2 promotes migration in noninvasive breast cancer cells but not in normal breast epithelial cells. *Int. J. Cancer* **125**, 318–327.
- Holtkotter, O., Nieswandt, B., Smyth, N., Muller, W., Hafner, M., Schulte, V., Krieg, T., and Eckes, B.** (2002). Integrin 2-Deficient Mice Develop Normally, Are Fertile, but Display Partially Defective Platelet Interaction with Collagen. *J. Biol. Chem.* **277**, 10789–10794.
- Horn, N., and Tümer, Z.** (2002). Menkes Disease and the Occipital Horn Syndrome. Connective Tissue and Its Heritable Disorders, P.M. Royce, and B. Steinmann, eds. (John Wiley & Sons, Inc.), pp. 651–685.
- Hornstra, I.K., Birge, S., Starcher, B., Bailey, A.J., Mecham, R.P., and Shapiro, S.D.** (2003). Lysyl Oxidase Is Required for Vascular and Diaphragmatic Development in Mice. *J. Biol. Chem.* **278**, 14387–14393.
- Hu, C.-J., Wang, L.-Y., Chodosh, L.A., Keith, B., and Simon, M.C.** (2003). Differential Roles of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in Hypoxic Gene Regulation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 9361–9374.
- Huang, S., Van Arsdall, M., Tedjarati, S., McCarty, M., Wu, W., Langley, R., and Fidler, I.J.** (2002). Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 1134–1142.
- Huang, X., Griffiths, M., Wu, J., Farese, R.V., and Sheppard, D.** (2000). Normal development, wound healing, and adenovirus susceptibility in $\beta 5$ -deficient mice. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 755–759.
- Hughes, C.S., Postovit, L.M., and Lajoie, G.A.** (2010). Matrigel: A complex protein mixture required for optimal growth of cell culture. *Proteomics* **10**, 1886–1890.
- Hynes, R.O.** (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673–687.
- Hynes, R.O.** (2007). Cell–matrix adhesion in vascular development. *J. Thromb. Haemost.* **5**, 32–40.
- Iftikhar, M., Hurtado, P., Bais, M.V., Wigner, N., Stephens, D.N., Gerstenfeld, L.C., and Trackman, P.C.** (2011). Lysyl Oxidase-like-2 (LOXL2) Is a Major Isoform in Chondrocytes and Is Critically Required for Differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, 909–918.
- Igarashi, H., Esumi, M., Ishida, H., and Okada, K.** (2002). Vascular endothelial growth factor overexpression is correlated with von Hippel-Lindau tumor suppressor gene inactivation in patients with sporadic renal cell carcinoma. *Cancer* **95**, 47–53.
- Iliopoulos, O., Kibel, A., Gray, S., and Kaelin, W.G. Jr.** (1995). Tumour suppression by the human von Hippel-Lindau gene product. *Nat. Med.* **1**, 822–826.

- Inoki, K., Ouyang, H., Zhu, T., Lindvall, C., Wang, Y., Zhang, X., Yang, Q., Bennett, C., Harada, Y., Stankunas, K., et al.** (2006). TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth. *Cell* **126**, 955–968.
- Iozzo, R.V.** (2005). Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 646–656.
- Iruela-Arispe, M.L., Luque, A., and Lee, N.** (2004). Thrombospondin modules and angiogenesis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**, 1070–1078.
- Isenberg, J.S., Martin-Manso, G., Maxhimer, J.B., and Roberts, D.D.** (2009). Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 182–194.
- Itoh, T., Tanioka, M., Yoshida, H., Yoshioka, T., Nishimoto, H., and Itohara, S.** (1998). Reduced Angiogenesis and Tumor Progression in Gelatinase A-deficient Mice. *Cancer Res.* **58**, 1048–1051.
- Jain, R.K.** (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nat. Med.* **7**, 987–989.
- Jain, R.K.** (2003). Molecular regulation of vessel maturation. *Nat. Med.* **9**, 685–693.
- Jain, R.K.** (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **307**, 58–62.
- Jain, R.K., and Carmeliet, P.** (2012). SnapShot: Tumor Angiogenesis. *Cell* **149**, 1408–1408.
- Le Jan, S., Amy, C., Cazes, A., Monnot, C., Lamandé, N., Favier, J., Philippe, J., Sibony, M., Gasc, J.-M., Corvol, P., et al.** (2003). Angiopoietin-like 4 is a proangiogenic factor produced during ischemia and in conventional renal cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **162**, 1521–1528.
- Jourdan-Le Saux, C., Tronecker, H., Bogic, L., Bryant-Greenwood, G.D., Boyd, C.D., and Csiszar, K.** (1999). The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues. *J. Biol. Chem.* **274**, 12939–12944.
- Jourdan-Le Saux, C., Le Saux, O., Gleyzal, C., Sommer, P., and Csiszar, K.** (2000). The mouse lysyl oxidase-like 2 gene (mLOXL2) maps to chromosome 14 and is highly expressed in skin, lung and thymus. *Matrix Biol.* **19**, 179–183.
- Julian, M., Pieraggi, M.T., and Bouissou, H.** (1979). Chronic lathyrism. Effect of beta aminopropionitrile on the aortic wall in the adult rat. *Pharmacol. Res. Commun.* **11**, 501–508.
- Jung, S.T., Kim, M.S., Seo, J.Y., Kim, H.C., and Kim, Y.** (2003). Purification of enzymatically active human lysyl oxidase and lysyl oxidase-like protein from Escherichia coli inclusion bodies. *Protein Expr. Purif.* **31**, 240–246.
- Kagan, H.M., Williams, M.A., Williamson, P.R., and Anderson, J.M.** (1984). Influence of sequence and charge on the specificity of lysyl oxidase toward protein and synthetic peptide substrates. *J. Biol. Chem.* **259**, 11203–11207.
- Kaku, M., Mochida, Y., Atsawasuwan, P., Parisuthiman, D., and Yamauchi, M.** (2007). Post-translational modifications of collagen upon BMP induced Osteoblast Differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **359**, 463–468.

- Kallakury, B.V.S., Karikehalli, S., Haholu, A., Sheehan, C.E., Azumi, N., and Ross, J.S.** (2001). Increased Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases 1 and 2 Correlate with Poor Prognostic Variables in Renal Cell Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **7**, 3113–3119.
- Kalluri, R.** (2003). Angiogenesis: Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 422–433.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M.** (2006). Fibroblasts in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 392–401.
- Kamphaus, G.D., Colorado, P.C., Panka, D.J., Hopfer, H., Ramchandran, R., Torre, A., Maeshima, Y., Mier, J.W., Sukhatme, V.P., and Kalluri, R.** (2000). Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J. Biol. Chem.* **275**, 1209–1215.
- Kaneda, A., Wakazono, K., Tsukamoto, T., Watanabe, N., Yagi, Y., Tatematsu, M., Kaminishi, M., Sugimura, T., and Ushijima, T.** (2004). Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res.* **64**, 6410–6415.
- Kano, M.R., Morishita, Y., Iwata, C., Iwasaka, S., Watabe, T., Ouchi, Y., Miyazono, K., and Miyazawa, K.** (2005). VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of endogenous PDGF-B–PDGFR β signaling. *J. Cell Sci.* **118**, 3759–3768.
- Kaplan, R.N., Riba, R.D., Zacharoulis, S., Bramley, A.H., Vincent, L., Costa, C., MacDonald, D.D., Jin, D.K., Shido, K., Kerns, S.A., et al.** (2005). VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature* **438**, 820–827.
- Kasashima, H., Yashiro, M., Kinoshita, H., Fukuoka, T., Morisaki, T., Masuda, G., Sakurai, K., Kubo, N., Ohira, M., and Hirakawa, K.** (2014). Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) from stromal fibroblasts stimulates the progression of gastric cancer. *Cancer Lett.* **354**, 438–446.
- Kaupilla, S., Stenbäck, F., Risteli, J., Jukkola, A., and Risteli, L.** (1998). Aberrant type I and type III collagen gene expression in human breast cancer in vivo. *J. Pathol.* **186**, 262–268.
- Kawakami, K., Hirata, H., Yamamura, S., Kikuno, N., Saini, S., Majid, S., Tanaka, Y., Kawamoto, K., Enokida, H., Nakagawa, M., et al.** (2009). Functional Significance of Wnt Inhibitory Factor-1 Gene in Kidney Cancer. *Cancer Res.* **69**, 8603–8610.
- Kenyon, K., Contente, S., Trackman, P.C., Tang, J., Kagan, H.M., and Friedman, R.M.** (1991). Lysyl oxidase and rrg messenger RNA. *Science* **253**, 802.
- Kim, Y., Roh, S., Park, J.Y., Kim, Y., Cho, D.H., and Kim, J.C.** (2009). Differential expression of the LOX family genes in human colorectal adenocarcinomas. *Oncol. Rep.* **22**, 799–804.
- Kim, S., and Kim, Y.** (2012). Variations in LOXL1 associated with exfoliation glaucoma do not affect amine oxidase activity. *Mol. Vis.* **18**, 265–270.
- Kim, B.-R., Dong, S.M., Seo, S.H., Lee, J.-H., Lee, J.M., Lee, S.-H., and Rho, S.B.** (2014). Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) controls tumor-associated cell proliferation through the interaction with MARCKSL1. *Cell. Signal.* **26**, 1765–1773.
- Kim, M.S., Kim, S.-S., Jung, S.T., Park, J.-Y., Yoo, H.-W., Ko, J., Csiszar, K., Choi, S.-Y., and Kim, Y.** (2003). Expression and Purification of Enzymatically Active Forms of the Human Lysyl Oxidase-like Protein 4. *J. Biol. Chem.* **278**, 52071–52074.

- Kim, S., Bell, K., Mousa, S.A., and Varner, J.A.** (2000). Regulation of angiogenesis in vivo by ligation of integrin $\alpha 5\beta 1$ with the central cell-binding domain of fibronectin. *Am. J. Pathol.* **156**, 1345–1362.
- Kim, S., Takahashi, H., Lin, W.-W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J.-L., and Karin, M.** (2009). Carcinoma Produced Factors Activate Myeloid Cells via TLR2 to Stimulate Metastasis. *Nature* **457**, 102–106.
- Kim, Y.-M., Kim, E.-C., and Kim, Y.** (2011). The human lysyl oxidase-like 2 protein functions as an amine oxidase toward collagen and elastin. *Mol. Biol. Rep.* **38**, 145–149.
- Kirschmann, D.A., Seftor, E.A., Fong, S.F.T., Nieva, D.R.C., Sullivan, C.M., Edwards, E.M., Sommer, P., Csiszar, K., and Hendrix, M.J.C.** (2002). A Molecular Role for Lysyl Oxidase in Breast Cancer Invasion. *Cancer Res.* **62**, 4478–4483.
- Kojima, T., Shimazui, T., Hinotsu, S., Joraku, A., Oikawa, T., Kawai, K., Horie, R., Suzuki, H., Nagashima, R., Yoshikawa, K., et al.** (2009). Decreased expression of CXXC4 promotes a malignant phenotype in renal cell carcinoma by activating Wnt signaling. *Oncogene* **28**, 297–305.
- Kostourou, V., and Papalazarou, V.** (2014). Non-collagenous ECM proteins in blood vessel morphogenesis and cancer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* **1840**, 2403–2413.
- Krady, M.M., Zeng, J., Yu, J., MacLauchlan, S., Skokos, E.A., Tian, W., Bornstein, P., Sessa, W.C., and Kyriakides, T.R.** (2008). Thrombospondin-2 Modulates Extracellular Matrix Remodeling during Physiological Angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **173**, 879–891.
- Kramer, J.M.** (2005). Basement membranes. *WormBook* **1**, 1-15.
- Kruegel, J., and Miosge, N.** (2010). Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell. Mol. Life Sci.* **67**, 2879–2895.
- Kucejova, B., Pena-Llopis, S., Yamasaki, T., Sivanand, S., Tran, T.A.T., Alexander, S., Wolff, N.C., Lotan, Y., Xie, X.-J., Kabbani, W., et al.** (2011). Interplay Between pVHL and mTORC1 Pathways in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma. *Mol. Cancer Res.* **9**, 1255–1265.
- Ladomery, M.R., Harper, S.J., and Bates, D.O.** (2007). Alternative splicing in angiogenesis: The vascular endothelial growth factor paradigm. *Cancer Lett.* **249**, 133–142.
- Laib, A.M., Bartol, A., Alajati, A., Korff, T., Weber, H., and Augustin, H.G.** (2009). Spheroid-based human endothelial cell microvessel formation in vivo. *Nat. Protoc.* **4**, 1202–1215.
- Lando, D., Peet, D.J., Gorman, J.J., Whelan, D.A., Whitelaw, M.L., and Bruick, R.K.** (2002). FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor. *Genes Dev.* **16**, 1466–1471.
- Laughner, E., Taghavi, P., Chiles, K., Mahon, P.C., and Semenza, G.L.** (2001). HER2 (neu) Signaling Increases the Rate of Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF-1 α) Synthesis: Novel Mechanism for HIF-1-Mediated Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 3995–4004.
- Lederle, W., Hartenstein, B., Meides, A., Kunzelmann, H., Werb, Z., Angel, P., and Mueller, M.M.** (2010). MMP13 as a stromal mediator in controlling persistent angiogenesis in skin carcinoma. *Carcinogenesis* **31**, 1175–1184.
- Lee, J.-E., and Kim, Y.** (2006). A Tissue-specific Variant of the Human Lysyl Oxidase-like Protein 3 (LOXL3) Functions as an Amine Oxidase with Substrate Specificity. *J. Biol. Chem.* **281**, 37282–37290.

- Lee, S., Jilani, S.M., Nikolova, G.V., Carpizo, D., and Iruela-Arispe, M.L.** (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. *J. Cell Biol.* **169**, 681–691.
- Lee, S.H., Schloss, D.J., and Swain, J.L.** (2000). Maintenance of Vascular Integrity in the Embryo Requires Signaling through the Fibroblast Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* **275**, 33679–33687.
- Lee, T.-H., Seng, S., Li, H., Kennel, S.J., Avraham, H.K., and Avraham, S.** (2006). Integrin Regulation by Vascular Endothelial Growth Factor in Human Brain Microvascular Endothelial Cells: Role Of alpha6beta1 Integrin In Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **281**, 40450–40460.
- Leek, R.D., Lewis, C.E., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J., and Harris, A.L.** (1996). Association of Macrophage Infiltration with Angiogenesis and Prognosis in Invasive Breast Carcinoma. *Cancer Res.* **56**, 4625–4629.
- Lei, L., Liu, D., Huang, Y., Jovin, I., Shai, S.-Y., Kyriakides, T., Ross, R.S., and Giordano, F.J.** (2008). Endothelial Expression of 1 Integrin Is Required for Embryonic Vascular Patterning and Postnatal Vascular Remodeling. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 794–802.
- Lein, M., Jung, K., Laube, C., Hübner, T., Winkelmann, B., Stephan, C., Hauptmann, S., Rudolph, B., Schnorr, D., and Loening, S.A.** (2000). Matrix-metalloproteinases and their inhibitors in plasma and tumor tissue of patients with renal cell carcinoma. *Int. J. Cancer* **85**, 801–804.
- Lelièvre, E., Hinek, A., Lupu, F., Buquet, C., Soncin, F., and Mattot, V.** (2008). VE-statin/egfl7 regulates vascular elastogenesis by interacting with lysyl oxidases. *EMBO J.* **27**, 1658–1670.
- Lenard, A., Ellertsdottir, E., Herwig, L., Krudewig, A., Sauteur, L., Belting, H.-G., and Affolter, M.** (2013). In Vivo Analysis Reveals a Highly Stereotypic Morphogenetic Pathway of Vascular Anastomosis. *Dev. Cell* **25**, 492–506.
- Leslie, J.D., Ariza-McNaughton, L., Bermange, A.L., McAdow, R., Johnson, S.L., and Lewis, J.** (2007). Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Development* **134**, 839–844.
- Leveen, P., Pekny, M., Gebre-Medhin, S., Swolin, B., Larsson, E., and Betsholtz, C.** (1994). Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* **8**, 1875–1887.
- Levental, K.R., Yu, H., Kass, L., Lakins, J.N., Egeblad, M., Erler, J.T., Fong, S.F.T., Csiszar, K., Giaccia, A., Weninger, W., et al.** (2009). Matrix Crosslinking Forces Tumor Progression by Enhancing Integrin. *Signaling. Cell* **139**, 891–906.
- Li, B., Sharpe, E.E., Maupin, A.B., Teleron, A.A., Pyle, A.L., Carmeliet, P., and Young, P.P.** (2006). VEGF and PlGF promote adult vasculogenesis by enhancing EPC recruitment and vessel formation at the site of tumor neovascularization. *FASEB J.* **20**, 1495–1497.
- Li, W., Nugent, M.A., Zhao, Y., Chau, A.N., Li, S.J., Chou, I.-N., Liu, G., and Kagan, H.M.** (2003). Lysyl oxidase oxidizes basic fibroblast growth factor and inactivates its mitogenic potential. *J. Cell. Biochem.* **88**, 152–164.
- Lindhahl, P., Johansson, B.R., Levéen, P., and Betsholtz, C.** (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science* **277**, 242–245.

- Liu, J., Liao, S., Diop-Frimpong, B., Chen, W., Goel, S., Naxerova, K., Ancukiewicz, M., Boucher, Y., Jain, R.K., and Xu, L.** (2012). TGF- β blockade improves the distribution and efficacy of therapeutics in breast carcinoma by normalizing the tumor stroma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 16618–16623.
- Liu, S., Ma, X., Ai, Q., Huang, Q., Shi, T., Zhu, M., Wang, B., and Zhang, X.** (2013). NOTCH1 functions as an oncogene by regulating the PTEN/PI3K/AKT pathway in clear cell renal cell carcinoma. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **31**, 938–948.
- Liu, X., Wu, H., Byrne, M., Krane, S., and Jaenisch, R.** (1997). Type III collagen is crucial for collagen I fibrillogenesis and for normal cardiovascular development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 1852–1856.
- Liu, X., Zhao, Y., Gao, J., Pawlyk, B., Starcher, B., Spencer, J.A., Yanagisawa, H., Zuo, J., and Li, T.** (2004). Elastic fiber homeostasis requires lysyl oxidase-like 1 protein. *Nat. Genet.* **36**, 178–182.
- Lobov, I.B., Renard, R.A., Papadopoulos, N., Gale, N.W., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J.** (2007). Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3219–3224.
- Loges, S., Schmidt, T., and Carmeliet, P.** (2009). “Antimyceloangiogenic” Therapy for Cancer by Inhibiting PlGF. *Clin. Cancer Res.* **15**, 3648–3653.
- Löhler, J., Timpl, R., and Jaenisch, R.** (1984). Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. *Cell* **38**, 597–607.
- Lopez, K.M., and Greenaway, F.T.** (2010). Identification of the copper-binding ligands of lysyl oxidase. *J. Neural Transm.* **118**, 1101–1109.
- Lopez, J.I., Kang, I., You, W.-K., McDonald, D.M., and Weaver, V.M.** (2011). In situ force mapping of mammary gland transformation. *Integr. Biol.* **3**, 910–921.
- Lorn, J., Tani, T., Laitinen, L., Kangas, L., Lehto, V.-P., and Virtanen, I.** (1995). Tenascin and fibronectin isoforms in human renal cell carcinomas, renal cell carcinoma cell lines and xenografts in nude mice. *Int. J. Cancer* **63**, 442–449.
- Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z.** (2012). The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* **196**, 395–406.
- Lucero, H.A., and Kagan, H.M.** (2006). Lysyl oxidase: an oxidative enzyme and effector of cell function. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **63**, 2304–2316.
- Lugassy, J., Zaffryar-Eilot, S., Soueid, S., Mordoviz, A., Smith, V., Kessler, O., and Neufeld, G.** (2012). The Enzymatic Activity of Lysyl Oxidase-like-2 (LOXL2) Is Not Required for LOXL2-induced Inhibition of Keratinocyte Differentiation. *J. Biol. Chem.* **287**, 3541–3549.
- Maeshima, Y., Colorado, P.C., Torre, A., Holthaus, K.A., Grunkemeyer, J.A., Ericksen, M.B., Hopfer, H., Xiao, Y., Stillman, I.E., and Kalluri, R.** (2000). Distinct Antitumor Properties of a Type IV Collagen Domain Derived from Basement Membrane. *J. Biol. Chem.* **275**, 21340–21348.
- Mahabeleshwar, G.H., Feng, W., Reddy, K., Plow, E.F., and Byzova, T.V.** (2007). Mechanisms of Integrin Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Cross-Activation in Angiogenesis. *Circ. Res.* **101**, 570–580.

- Mäki, J.M., Räsänen, J., Tikkanen, H., Sormunen, R., Mäkikallio, K., Kivirikko, K.I., and Soininen, R.** (2002). Inactivation of the Lysyl Oxidase Gene *Lox* Leads to Aortic Aneurysms, Cardiovascular Dysfunction, and Perinatal Death in Mice. *Circulation* **106**, 2503–2509.
- Mäki, J.M., Sormunen, R., Lippo, S., Kaarteenaho-Wiik, R., Soininen, R., and Myllyharju, J.** (2005). Lysyl oxidase is essential for normal development and function of the respiratory system and for the integrity of elastic and collagen fibers in various tissues. *Am. J. Pathol.* **167**, 927–936.
- Malik, R., Lelkes, P.I., and Cukierman, E.** (2015). Biomechanical and biochemical remodeling of stromal extracellular matrix in cancer. *Trends Biotechnol.* **33**, 230–236.
- Manalo, D.J., Rowan, A., Lavoie, T., Natarajan, L., Kelly, B.D., Ye, S.Q., Garcia, J.G.N., and Semenza, G.L.** (2005). Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood* **105**, 659–669.
- Mantovani, A., Bottazzi, B., Colotta, F., Sozzani, S., and Ruco, L.** (1992). The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today* **13**, 265–270.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A.** (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* **23**, 549–555.
- Mao, Y., Keller, E.T., Garfield, D.H., Shen, K., and Wang, J.** (2012). Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* **32**, 303–315.
- Martin, A., Salvador, F., Moreno-Bueno, G., Floristan, A., Ruiz-Herguido, C., Cuevas, E.P., Morales, S., Santos, V., Csiszar, K., Dubus, P., et al.** (2015). Lysyl oxidase-like 2 represses Notch1 expression in the skin to promote squamous cell carcinoma progression. *EMBO J.* **34**, 1090–1109.
- Martínez, V.G., Moestrup, S.K., Holmskov, U., Mollenhauer, J., and Lozano, F.** (2011). The Conserved Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily in Therapy and Diagnosis. *Pharmacol. Rev.* **63**, 967–1000.
- Marx, J.** (2004). Cell biology. How cells endure low oxygen. *Science* **303**, 1454–1456.
- Matsuo, I., and Kimura-Yoshida, C.** (2013). Extracellular modulation of Fibroblast Growth Factor signaling through heparan sulfate proteoglycans in mammalian development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **23**, 399–407.
- McDonald, D.M., and Baluk, P.** (2005). Imaging of angiogenesis in inflamed airways and tumors: newly formed blood vessels are not alike and may be wildly abnormal: Parker B. Francis lecture. *Chest* **128**, 602S–608S.
- Mckenzie, G., Ward, G., Stallwood, Y., Briend, E., Papadia, S., Lennard, A., Turner, M., Champion, B., and Hardingham, G.E.** (2006). Cellular Notch responsiveness is defined by phosphoinositide 3-kinase-dependent signals. *BMC Cell Biol.* **7**, 10.
- Medici, D., and Olsen, B.R.** (2012). Rapamycin Inhibits Proliferation of Hemangioma Endothelial Cells by Reducing HIF-1-Dependent Expression of VEGF. *PLoS ONE* **7**, e42913.
- Miner, J.H., Cunningham, J., and Sanes, J.R.** (1998). Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin $\alpha 5$ chain. *J. Cell Biol.* **143**, 1713–1723.

- Miosge, N., Sasaki, T., and Timpl, R.** (2002). Evidence of nidogen-2 compensation for nidogen-1 deficiency in transgenic mice. *Matrix Biol.* **21**, 611–621.
- Mok, W., Boucher, Y., and Jain, R.K.** (2007). Matrix Metalloproteinases-1 and -8 Improve the Distribution and Efficacy of an Oncolytic Virus. *Cancer Res.* **67**, 10664–10668.
- Mokkapati, S., Baranowsky, A., Mirancea, N., Smyth, N., Breitzkreutz, D., and Nischt, R.** (2008). Basement Membranes in Skin Are Differently Affected by Lack of Nidogen 1 and 2. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 2259–2267.
- Mongiat, M., Sweeney, S.M., Antonio, J.D.S., Fu, J., and Iozzo, R.V.** (2003). Endorepellin, a Novel Inhibitor of Angiogenesis Derived from the C Terminus of Perlecan. *J. Biol. Chem.* **278**, 4238–4249.
- Moreno-Bueno, G., Salvador, F., Martín, A., Floristán, A., Cuevas, E.P., Santos, V., Montes, A., Morales, S., Castilla, M.A., Rojo-Sebastián, A., et al.** (2011). Lysyl oxidase-like 2 (LOXL2), a new regulator of cell polarity required for metastatic dissemination of basal-like breast carcinomas: LOXL2 in metastatic basal-like breast carcinomas. *EMBO Mol. Med.* **3**, 528–544.
- Motzer, R.J., Jonasch, E., Agarwal, N., Beard, C., Bhayani, S., Bolger, G.B., Chang, S.S., Choueiri, T.K., Costello, B.A., Derweesh, I.H. et al.** (2015). Kidney cancer, version 3.2015. *J. Natl. Compr. Canc. Netw.* **13**, 151-159.
- Mouw, J.K., Ou, G., and Weaver, V.M.** (2014). Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 771–785.
- Murakami, M., and Simons, M.** (2008). Fibroblast growth factor regulation of neovascularization. *Curr. Opin. Hematol.* **15**, 215–220.
- Murdoch, C., Giannoudis, A., and Lewis, C.E.** (2004). Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood* **104**, 2224–2234.
- Murshed, M., Smyth, N., Miosge, N., Karolat, J., Krieg, T., Paulsson, M., and Nischt, R.** (2000). The Absence of Nidogen 1 Does Not Affect Murine Basement Membrane Formation. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 7007–7012.
- Narayanan, A.S., Siegel, R.C., and Martin, G.R.** (1972). On the inhibition of lysyl oxidase by β -aminopropionitrile. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **46**, 745–751.
- Netti, P.A., Berk, D.A., Swartz, M.A., Grodzinsky, A.J., and Jain, R.K.** (2000). Role of extracellular matrix assembly in interstitial transport in solid tumors. *Cancer Res.* **60**, 2497–2503.
- van der Neut, R., Krimpenfort, P., Calafat, J., Niessen, C.M., and Sonnenberg, A.** (1996). Epithelial detachment due to absence of hemidesmosomes in integrin β 4 null mice. *Nat. Genet.* **13**, 366–369.
- Nyberg, P., Salo, T., and Kalluri, R.** (2008). Tumor microenvironment and angiogenesis. *Front. Biosci.* **13**, 6537-6553.
- van Obberghen-Schilling, E., Tucker, R.P., Saupe, F., Gasser, I., Cseh, B., and Orend, G.** (2011). Fibronectin and tenascin-C: accomplices in vascular morphogenesis during development and tumor growth. *Int. J. Dev. Biol.* **55**, 511–525.
- Offenberg, H., Brünner, N., Mansilla, F., Ørntoft Torben, F., and Birkenkamp-Demtroder, K.** (2008). TIMP-1 expression in human colorectal cancer is associated with TGF-B1, LOXL2, INHBA1, TNF-AIP6 and TIMP-2 transcript profiles. *Mol. Oncol.* **2**, 233–240.

- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A.** (2005). Stromal Fibroblasts Present in Invasive Human Breast Carcinomas Promote Tumor Growth and Angiogenesis through Elevated SDF-1/CXCL12 Secretion. *Cell* **121**, 335–348.
- D’Ovidio, M.C., Mastracchio, A., Marzullo, A., Ciabatta, M., Pini, B., Uccini, S., Zardi, L., and Ruco, L.P.** (1998). Intratumoral microvessel density and expression of ED-A/ED-B sequences of fibronectin in breast carcinoma. *Eur. J. Cancer* **34**, 1081–1085.
- Palamakumbura, A.H., and Trackman, P.C.** (2002). A Fluorometric Assay for Detection of Lysyl Oxidase Enzyme Activity in Biological Samples. *Anal. Biochem.* **300**, 245–251.
- Panchenko, M.V., Stetler-Stevenson, W.G., Trubetskoy, O.V., Gacheru, S.N., and Kagan, H.M.** (1996). Metalloproteinase Activity Secreted by Fibrogenic Cells in the Processing of Prolysyl Oxidase POTENTIAL ROLE OF PROCOLLAGEN C-PROTEINASE. *J. Biol. Chem.* **271**, 7113–7119.
- Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A., and Ferrara, N.** (1994). Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J. Biol. Chem.* **269**, 25646–25654.
- Park, S.H., Kim, B.-R., Lee, J.H., Park, S.T., Lee, S.-H., Dong, S.M., and Rho, S.B.** (2014). GABARBP down-regulates HIF-1 α expression through the VEGFR-2 and PI3K/mTOR/4E-BP1 pathways. *Cell. Signal.* **26**, 1506–1513.
- Pascal, T., Debacq-Chainiaux, F., Chrétien, A., Bastin, C., Dabée, A.-F., Bertholet, V., Remacle, J., and Toussaint, O.** (2005). Comparison of replicative senescence and stress-induced premature senescence combining differential display and low-density DNA arrays. *FEBS Lett.* **579**, 3651–3659.
- Patel, N., Sundaram, N., Yang, M., Madigan, C., Kalra, V.K., and Malik, P.** (2010). Placenta Growth Factor (PlGF), a Novel Inducer of Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) in Sickle Cell Disease (SCD). *J. Biol. Chem.* **285**, 16713–16722.
- Pawłowski, R., Mühl, S.M., Sulser, T., Krek, W., Moch, H., and Schraml, P.** (2013). Loss of PBRM1 expression is associated with renal cell carcinoma progression. *Int. J. Cancer* **132**, E11–E17.
- Payne, S.L., Hendrix, M.J.C., and Kirschmann, D.A.** (2007). Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer—A prospect. *J. Cell. Biochem.* **101**, 1338–1354.
- Pedrosa, A.-R., Trindade, A., Fernandes, A.-C., Carvalho, C., Gigante, J., Tavares, A.T., Diéguez-Hurtado, R., Yagita, H., Adams, R.H., and Duarte, A.** (2015). Endothelial Jagged1 Antagonizes Dll4 Regulation of Endothelial Branching and Promotes Vascular Maturation Downstream of Dll4/Notch1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **35**, 1134–1146.
- Peinado, H., Olmeda, D., Csiszar, K., Fong, K.S., Vega, S., Nieto, M.A., Cano, A., and Portillo, F.** (2005). A molecular role for lysyl oxidase-like 2 enzyme in snail regulation and tumor progression. *EMBO J.* **24**, 3446–3458.
- Peinado, H., Moreno-Bueno, G., Hardisson, D., Perez-Gomez, E., Santos, V., Mendiola, M., de Diego, J.I., Nistal, M., Quintanilla, M., Portillo, F., et al.** (2008). Lysyl Oxidase-Like 2 as a New Poor Prognosis Marker of Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Res.* **68**, 4541–4550.
- Peña-Llopis, S., Vega-Rubín-de-Celis, S., Liao, A., Leng, N., Pavía-Jiménez, A., Wang, S., Yamasaki, T., Zhrebker, L., Sivanand, S., Spence, P., et al.** (2012). BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. *Nat. Genet.* **44**, 751–759.

- Peng, L., Ran, Y.-L., Hu, H., Yu, L., Liu, Q., Zhou, Z., Sun, Y.-M., Sun, L.-C., Pan, J., Sun, L.-X., et al.** (2009). Secreted LOXL2 is a novel therapeutic target that promotes gastric cancer metastasis via the Src/FAK pathway. *Carcinogenesis* **30**, 1660–1669.
- Peppiatt, C.M., Howarth, C., Mobbs, P., and Attwell, D.** (2006). Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* **443**, 700–704.
- Perier, A., Fregni, G., Wittnebel, S., Gad, S., Allard, M., Gervois, N., Escudier, B., Azzarone, B., and Caignard, A.** (2011). Mutations of the von Hippel–Lindau gene confer increased susceptibility to natural killer cells of clear-cell renal cell carcinoma. *Oncogene* **30**, 2622–2632.
- Perryman, L., and Erler, J.T.** (2014). Lysyl oxidase in cancer research. *Future Oncol.* **10**, 1709–1717.
- Peruzzi, B., Athauda, G., and Bottaro, D.P.** (2006). The von Hippel–Lindau tumor suppressor gene product represses oncogenic β -catenin signaling in renal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 14531–14536.
- Peters, J.H., and Hynes, R.O.** (1996). Fibronectin isoform distribution in the mouse. I. The alternatively spliced EIIIB, EIIIA, and V segments show widespread codistribution in the developing mouse embryo. *Cell Adhes. Commun.* **4**, 103–125.
- Peters, J.H., Chen, G.E., and Hynes, R.O.** (1996). Fibronectin isoform distribution in the mouse. II. Differential distribution of the alternatively spliced EIIIB, EIIIA, and V segments in the adult mouse. *Cell Adhes. Commun.* **4**, 127–148.
- Pöschl, E., Schlötzer-Schrehardt, U., Brachvogel, B., Saito, K., Ninomiya, Y., and Mayer, U.** (2004). Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* **131**, 1619–1628.
- Presta, M., Dell’Era, P., Mitola, S., Moroni, E., Ronca, R., and Rusnati, M.** (2005). Fibroblast growth factor/fibroblast growth factor receptor system in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 159–178.
- Provenzano, P.P., Eliceiri, K.W., Campbell, J.M., Inman, D.R., White, J.G., and Keely, P.J.** (2006). Collagen reorganization at the tumor-stromal interface facilitates local invasion. *BMC Med.* **4**, 38.
- Provenzano, P.P., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Trier, S.M., and Keely, P.J.** (2008). Contact Guidance Mediated Three-Dimensional Cell Migration is Regulated by Rho/ROCK-Dependent Matrix Reorganization. *Biophys. J.* **95**, 5374–5384.
- Qiang, B., Lim, S.Y., Lekas, M., Kuliszewski, M.A., Wolff, R., Osherov, A.B., Rudenko, D., Leong-Poi, H., Noyan, H., Husain, M., et al.** (2014). Perlecan Heparan Sulfate Proteoglycan Is a Critical Determinant of Angiogenesis in Response to Mouse Hind-Limb Ischemia. *Can. J. Cardiol.* **30**, 1444–1451.
- Räsänen, K., and Vaheri, A.** (2010). Activation of fibroblasts in cancer stroma. *Exp. Cell Res.* **316**, 2713–2722.
- Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G.B., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.-L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., and Ratcliffe, P.J.** (2005). Contrasting Properties of Hypoxia-Inducible Factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-Associated Renal Cell Carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5675–5686.
- Reiser, K., McCormick, R.J., and Rucker, R.B.** (1992). Enzymatic and nonenzymatic cross-linking of collagen and elastin. *FASEB J.* **6**, 2439–2449.

- Reynolds, A.R., Reynolds, L.E., Nagel, T.E., Lively, J.C., Robinson, S.D., Hicklin, D.J., Bodary, S.C., and Hodivala-Dilke, K.M.** (2004). Elevated Flk1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) Signaling Mediates Enhanced Angiogenesis in β 3-Integrin-Deficient Mice. *Cancer Res.* **64**, 8643–8650.
- Reynolds, L.E., Wyder, L., Lively, J.C., Taverna, D., Robinson, S.D., Huang, X., Sheppard, D., Hynes, R.O., and Hodivala-Dilke, K.M.** (2002). Enhanced pathological angiogenesis in mice lacking β 3 integrin or β 3 and β 5 integrins. *Nat. Med.* **8**, 27–34.
- Richardson, T.P., Peters, M.C., Ennett, A.B., and Mooney, D.J.** (2001). Polymeric system for dual growth factor delivery. *Nat. Biotechnol.* **19**, 1029–1034.
- Rodriguez, H.M., Vaysberg, M., Mikels, A., McCauley, S., Velayo, A.C., Garcia, C., and Smith, V.** (2010). Modulation of Lysyl Oxidase-like 2 Enzymatic Activity by an Allosteric Antibody Inhibitor. *J. Biol. Chem.* **285**, 20964–20974.
- Rojiani, M.V., Ghoshal-Gupta, S., Kutiyawalla, A., Mathur, S., and Rojiani, A.M.** (2015). TIMP-1 overexpression in lung carcinoma enhances tumor kinetics and angiogenesis in brain metastasis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **74**, 293–304.
- Rosenbloom, J., Abrams, W.R., and Mecham, R.** (1993). Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J.* **7**, 1208–1218.
- Rost, T., Pyritz, V., Rathcke, I.O., Görögh, T., Dünne, A.A., and Werner, J.A.** (2003). Reduction of LOX- and LOXL2-mRNA expression in head and neck squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* **23**, 1565–1573.
- Rückert, F., Joensson, P., Saeger, H.-D., Grützmann, R., and Pilarsky, C.** (2009). Functional analysis of LOXL2 in pancreatic carcinoma. *Int. J. Colorectal Dis.* **25**, 303–311.
- Ruhrberg, C., Gerhardt, H., Golding, M., Watson, R., Ioannidou, S., Fujisawa, H., Betsholtz, C., and Shima, D.T.** (2002). Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* **16**, 2684–2698.
- Ryan, H.E., Lo, J., and Johnson, R.S.** (1998). HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *EMBO J.* **17**, 3005–3015.
- Sakai, M., Kato, H., Sano, A., Tanaka, N., Inose, T., Kimura, H., Sohda, M., Nakajima, M., and Kuwano, H.** (2009). Expression of Lysyl Oxidase Is Correlated with Lymph Node Metastasis and Poor Prognosis in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **16**, 2494–2501.
- Salmivirta, K., Talts, J.F., Olsson, M., Sasaki, T., Timpl, R., and Ekblom, P.** (2002). Binding of Mouse Nidogen-2 to Basement Membrane Components and Cells and Its Expression in Embryonic and Adult Tissues Suggest Complementary Functions of the Two Nidogens. *Exp. Cell Res.* **279**, 188–201.
- Salmon, H., Franciszkiewicz, K., Damotte, D., Dieu-Nosjean, M.-C., Validire, P., Trautmann, A., Mami-Chouaib, F., and Donnadieu, E.** (2012). Matrix architecture defines the preferential localization and migration of T cells into the stroma of human lung tumors. *J. Clin. Invest.* **122**, 899–910.
- Sarrias, M.R., Gronlund, J., Padilla, O., Madsen, J., Holmskov, U., and Lozano, F.** (2004). The Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR) Domain: An Ancient and Highly Conserved Protein Module of the Innate Immune System. *Crit. Rev. Immunol.* **24**, 1–37.

- Sasaki, T., Larsson, H., Kreuger, J., Salmivirta, M., Claesson-Welsh, L., Lindahl, U., Hohenester, E., and Timpl, R.** (1999). Structural basis and potential role of heparin/heparan sulfate binding to the angiogenesis inhibitor endostatin. *EMBO J.* **18**, 6240–6248.
- Sato, Y., Yoshizato, T., Shiraishi, Y., Maekawa, S., Okuno, Y., Kamura, T., Shimamura, T., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Suzuki, H., et al.** (2013). Integrated molecular analysis of clear-cell renal cell carcinoma. *Nat. Genet.* **45**, 860–867.
- Schietke, R., Warnecke, C., Wacker, I., Schodel, J., Mole, D.R., Campean, V., Amann, K., Goppelt-Struebe, M., Behrens, J., Eckardt, K.-U., et al.** (2010). The Lysyl Oxidases LOX and LOXL2 Are Necessary and Sufficient to Repress E-cadherin in Hypoxia: INSIGHTS INTO CELLULAR TRANSFORMATION PROCESSES MEDIATED BY HIF-1. *J. Biol. Chem.* **285**, 6658–6669.
- Schmidt, H., Semjonow, A., Csiszar, K., Korsching, E., Brandt, B., and Eltze, E.** (2007). [Mapping of a deletion interval on 8p21-22 in prostate cancer by gene dosage PCR]. *Ges. Für Pathol.* **91**, 302–307.
- Schymeinsky, J., Nedbal, S., Miosge, N., Pöschl, E., Rao, C., Beier, D.R., Skarnes, W.C., Timpl, R., and Bader, B.L.** (2002). Gene Structure and Functional Analysis of the Mouse Nidogen-2 Gene: Nidogen-2 Is Not Essential for Basement Membrane Formation in Mice. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6820–6830.
- Scola, N., and Görögh, T.** (2010). LOXL4 as a Selective Molecular Marker in Primary and Metastatic Head/Neck Carcinoma. *Anticancer Res.* **30**, 4567–4571.
- Seaman, S., Stevens, J., Yang, M.Y., Logsdon, D., Graff-Cherry, C., and St Croix, B.S.** (2007). Genes that distinguish physiological and pathological angiogenesis. *Cancer Cell* **11**, 539–554.
- Seghezzi, G., Patel, S., Ren, C.J., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E.S., Shapiro, R.L., Galloway, A.C., Rifkin, D.B., and Mignatti, P.** (1998). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *J. Cell Biol.* **141**, 1659–1673.
- Selvaraj, S.K., Giri, R.K., Perelman, N., Johnson, C., Malik, P., and Kalra, V.K.** (2003). Mechanism of monocyte activation and expression of proinflammatory cytochemokines by placenta growth factor. *Blood* **102**, 1515–1524.
- Semenza, G.L.** (2000). HIF-1 and human disease: one highly involved factor. *Genes Dev.* **14**, 1983–1991.
- Semenza, G.L.** (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 721–732.
- Semenza, G.L.** (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* **29**, 625–634.
- Senger, D.R., Claffey, K.P., Benes, J.E., Perruzzi, C.A., Sergiou, A.P., and Detmar, M.** (1997). Angiogenesis promoted by vascular endothelial growth factor: regulation through $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ integrins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 13612–13617.
- Senger, D.R., Perruzzi, C.A., Streit, M., Kotliansky, V.E., de Fougères, A.R., and Detmar, M.** (2002). The $\alpha 1\beta 1$ and $\alpha 2\beta 1$ Integrins Provide Critical Support for Vascular Endothelial Growth Factor Signaling, Endothelial Cell Migration, and Tumor Angiogenesis. *Am. J. Pathol.* **160**, 195–204.
- Serini, G., Bochaton-Piallat, M.-L., Ropraz, P., Geinoz, A., Borsi, L., Zardi, L., and Gabbiani, G.** (1998). The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor- $\beta 1$. *J. Cell Biol.* **142**, 873–881.

- Serres, E., Debarbieux, F., Stanchi, F., Maggiorella, L., Grall, D., Turchi, L., Burel-Vandenbos, F., Figarella-Branger, D., Virolle, T., Rougon, G., et al.** (2014). Fibronectin expression in glioblastomas promotes cell cohesion, collective invasion of basement membrane in vitro and orthotopic tumor growth in mice. *Oncogene* **33**, 3451–3462.
- Sharma, B., Handler, M., Eichstetter, I., Whitelock, J.M., Nugent, M.A., and Iozzo, R.V.** (1998). Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo. *J. Clin. Invest.* **102**, 1599-608.
- Sigurbjörnsdóttir, S., Mathew, R., and Leptin, M.** (2014). Molecular mechanisms of de novo lumen formation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 665–676.
- Skuli, N., Liu, L., Runge, A., Wang, T., Yuan, L., Patel, S., Iruela-Arispe, L., Simon, M.C., and Keith, B.** (2009). Endothelial deletion of hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) alters vascular function and tumor angiogenesis. *Blood* **114**, 469–477.
- Soncin, F., Mattot, V., Lionneton, F., Spruyt, N., Lepretre, F., Begue, A., and Stehelin, D.** (2003). VE-statin, an endothelial repressor of smooth muscle cell migration. *EMBO J.* **22**, 5700–5711.
- Soriano, P.** (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* **8**, 1888–1896.
- Sorokin, L.** (2010). The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, 712–723.
- Sorokin, L.M., Pausch, F., Frieser, M., Kröger, S., Ohage, E., and Deutzmann, R.** (1997). Developmental Regulation of the Laminin $\alpha 5$ Chain Suggests a Role in Epithelial and Endothelial Cell Maturation. *Dev. Biol.* **189**, 285–300.
- Stassar, M., Devitt, G., Brosius, M., Rinnab, L., Prang, J., Schradin, T., Simon, J., Petersen, S., Kopp-Schneider, A., and Zöller, M.** (2001). Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br. J. Cancer* **85**, 1372-1382.
- Stenzel, D., Lundkvist, A., Sauvaget, D., Busse, M., Graupera, M., van der Flier, A., Wijelath, E.S., Murray, J., Sobel, M., Costell, M., et al.** (2011a). Integrin-dependent and -independent functions of astrocytic fibronectin in retinal angiogenesis. *Development* **138**, 4451–4463.
- Stenzel, D., Franco, C.A., Estrach, S., Mettouchi, A., Sauvaget, D., Rosewell, I., Schertel, A., Armer, H., Domogatskaya, A., Rodin, S., et al.** (2011b). Endothelial basement membrane limits tip cell formation by inducing DLL4/Notch signalling in vivo. *EMBO Rep.* **12**, 1135–1143.
- Sternberg, C.N., Davis, I.D., Mardiak, J., Szczylik, C., Lee, E., Wagstaff, J., Barrios, C.H., Salman, P., Gladkov, O.A., Kavina, A., et al.** (2010). Pazopanib in Locally Advanced or Metastatic Renal Cell Carcinoma: Results of a Randomized Phase III Trial. *J. Clin. Oncol.* **28**, 1061–1068.
- Strilić, B., Kučera, T., Eglinger, J., Hughes, M.R., McNagny, K.M., Tsukita, S., Dejana, E., Ferrara, N., and Lammert, E.** (2009). The Molecular Basis of Vascular Lumen Formation in the Developing Mouse Aorta. *Dev. Cell* **17**, 505–515.
- Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Bréant, C., Duarte, A., and Eichmann, A.** (2007). The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 3225–3230.

- Sun, J., Hopkins, B.D., Tsujikawa, K., Perruzzi, C., Adini, I., Swerlick, R., Bornstein, P., Lawler, J., and Benjamin, L.E. (2009). Thrombospondin-1 modulates VEGF-A-mediated Akt signaling and capillary survival in the developing retina. *AJP Heart Circ. Physiol.* **296**, H1344–H1351.
- Suzuki, N., Yokoyama, F., and Nomizu, M. (2005). Functional Sites in the Laminin Alpha Chains. *Connect. Tissue Res.* **46**, 142–152.
- Takahashi, A., Sasaki, H., Kim, S.J., Tobisu, K., Kakizoe, T., Tsukamoto, T., Kumamoto, Y., Sugimura, T., and Terada, M. (1994). Markedly Increased Amounts of Messenger RNAs for Vascular Endothelial Growth Factor and Placenta Growth Factor in Renal Cell Carcinoma Associated with Angiogenesis. *Cancer Res.* **54**, 4233–4237.
- Takahashi, A., Sasaki, H., Jin Kim, S., Kakizoe, T., Miyao, N., Sugimura, T., Terada, M., and Tsukamoto, T. (1999). Identification of Receptor Genes in Renal Cell Carcinoma Associated with Angiogenesis by Differential Hybridization Technique. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **257**, 855–859.
- Talks, K.L., Turley, H., Gatter, K.C., Maxwell, P.H., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Harris, A.L. (2000). The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages. *Am. J. Pathol.* **157**, 411–421.
- Tan, K., and Lawler, J. (2009). The interaction of Thrombospondins with extracellular matrix proteins. *J. Cell Commun. Signal.* **3**, 177–187.
- Tang, S.-S., Trackman, P.C., and Kagan, H.M. (1983). Reaction of aortic lysyl oxidase with beta-aminopropionitrile. *J. Biol. Chem.* **258**, 4331–4338.
- Tanjore, H., Zeisberg, E.M., Gerami-Naini, B., and Kalluri, R. (2008). β 1 integrin expression on endothelial cells is required for angiogenesis but not for vasculogenesis. *Dev. Dyn.* **237**, 75–82.
- Taverna, S., Gherzi, G., Ginestra, A., Rigogliuso, S., Pecorella, S., Alaimo, G., Saladino, F., Dolo, V., Dell’Era, P., Pavan, A., et al. (2003). Shedding of Membrane Vesicles Mediates Fibroblast Growth Factor-2 Release from Cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 51911–51919.
- Thomas, G.V., Tran, C., Mellinghoff, I.K., Welsbie, D.S., Chan, E., Fueger, B., Czernin, J., and Sawyers, C.L. (2006). Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. *Nat. Med.* **12**, 122–127.
- Thomassin, L., Werneck, C.C., Broekelmann, T.J., Gleyzal, C., Hornstra, I.K., Mecham, R.P., and Sommer, P. (2005). The Pro-regions of Lysyl Oxidase and Lysyl Oxidase-like 1 Are Required for Deposition onto Elastic Fibers. *J. Biol. Chem.* **280**, 42848–42855.
- Thyboll, J., Kortessmaa, J., Cao, R., Soininen, R., Wang, L., Iivanainen, A., Sorokin, L., Risling, M., Cao, Y., and Tryggvason, K. (2002). Deletion of the Laminin 4 Chain Leads to Impaired Microvessel Maturation. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1194–1202.
- Torres, S., Garcia-Palmero, I., Herrera, M., Barolome, R.A., Pena, C., Fernandez-Acenero, M.J., Padilla, G., Pelaez-Garcia, A., Lopez-Lucendo, M., Rodriguez-Merlo, R., et al. (2015). Loxl2 Is Highly Expressed in Cancer-Associated Fibroblasts and Associates to Poor Colon Cancer Survival. *Clin. Cancer Res.* clincanres.3096.2014.
- Toschi, A., Lee, E., Gadir, N., Ohh, M., and Foster, D.A. (2008). Differential Dependence of Hypoxia-inducible Factors 1 and 2 on mTORC1 and mTORC2. *J. Biol. Chem.* **283**, 34495–34499.

- Tsuchiya, M., Okuda, H., Takaki, Y., Baba, M., Hirai, S., Ohno, S., and Shuin, T.** (2005). Renal cell carcinoma- and pheochromocytoma-specific altered gene expression profiles in VHL mutant clones. *Oncol. Rep.* **13**, 1033-41.
- Tsunoda, S., Nakamura, T., Sakurai, H., and Saiki, I.** (2007). Fibroblast growth factor-2-induced host stroma reaction during initial tumor growth promotes progression of mouse melanoma via vascular endothelial growth factor A-dependent neovascularization. *Cancer Sci.* **98**, 541–548.
- Uzel, M.I., Scott, I.C., Babakhanlou-Chase, H., Palamakumbura, A.H., Pappano, W.N., Hong, H.-H., Greenspan, D.S., and Trackman, P.C.** (2001). Multiple Bone Morphogenetic Protein 1-related Mammalian Metalloproteinases Process Pro-lysyl Oxidase at the Correct Physiological Site and Control Lysyl Oxidase Activation in Mouse Embryo Fibroblast Cultures. *J. Biol. Chem.* **276**, 22537–22543.
- Vadasz, Z., Kessler, O., Akiri, G., Gengrinovitch, S., Kagan, H.M., Baruch, Y., Izhak, O.B., and Neufeld, G.** (2005). Abnormal deposition of collagen around hepatocytes in Wilson’s disease is associated with hepatocyte specific expression of lysyl oxidase and lysyl oxidase like protein-2. *J. Hepatol.* **43**, 499–507.
- Vadon-Le Goff, S., Hulmes, D.J.S., and Moali, C.** (2015). BMP-1/tolloid-like proteinases synchronize matrix assembly with growth factor activation to promote morphogenesis and tissue remodeling. *Matrix Biol.* **44-46**, 14-23.
- Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C.K., Stephens, P., Davies, H., Jones, D., Lin, M.-L., Teague, J., et al.** (2011). Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. *Nature* **469**, 539–542.
- Varna, M., Gapihan, G., Feugeas, J.-P., Ratajczak, P., Tan, S., Ferreira, I., Leboeuf, C., Setterblad, N., Duval, A., Verine, J., et al.** (2015). Stem Cells Increase in Numbers in Perinecrotic Areas in Human Renal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **21**, 916–924.
- Van de Veire, S., Stalmans, I., Heindryckx, F., Oura, H., Tijeras-Raballand, A., Schmidt, T., Loges, S., Albrecht, I., Jonckx, B., Vinckier, S., et al.** (2010). Further Pharmacological and Genetic Evidence for the Efficacy of PIGF Inhibition in Cancer and Eye Disease. *Cell* **141**, 178–190.
- Verine, J., Lehmann-Che, J., Soliman, H., Feugeas, J.-P., Vidal, J.-S., Mongiat-Artus, P., Belhadj, S., Philippe, J., Lesage, M., Wittmer, E., et al.** (2010). Determination of Angptl4 mRNA as a Diagnostic Marker of Primary and Metastatic Clear Cell Renal-Cell Carcinoma. *PLoS ONE* **5**, e10421.
- Vu, T.H., Shipley, J.M., Bergers, G., Berger, J.E., Helms, J.A., Hanahan, D., Shapiro, S.D., Senior, R.M., and Werb, Z.** (1998). MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell* **93**, 411–422.
- Vuorio, E., and de Crombrughe, B.** (1990). The family of collagen genes. *Annu. Rev. Biochem.* **59**, 837-872.
- Wang, V., Davis, D.A., Haque, M., Huang, L.E., and Yarchoan, R.** (2005). Differential Gene Up-Regulation by Hypoxia-Inducible Factor-1 α and Hypoxia-Inducible Factor-2 α in HEK293T Cells. *Cancer Res.* **65**, 3299–3306.

- Wang, W., Wyckoff, J.B., Frohlich, V.C., Oleynikov, Y., Hüttelmaier, S., Zavadil, J., Cermak, L., Bottinger, E.P., Singer, R.H., White, J.G., et al. (2002). Single cell behavior in metastatic primary mammary tumors correlated with gene expression patterns revealed by molecular profiling. *Cancer Res.* **62**, 6278–6288.
- Wang, X., Ren, Y., Zhuang, H., Meng, X., Huang, S., Li, Y., Hehir, M., and Wang, P. (2015). Decrease of phosphorylated proto-oncogene CREB at Ser 133 site inhibits growth and metastatic activity of renal cell cancer. *Expert Opin. Ther. Targets* **19**, 985–995.
- Wang, Y., Kaiser, M.S., Larson, J.D., Nasevicius, A., Clark, K.J., Wadman, S.A., Roberg-Perez, S.E., Ekker, S.C., Hackett, P.B., McGrail, M., et al. (2010). Moesin1 and Ve-cadherin are required in endothelial cells during in vivo tubulogenesis. *Development* **137**, 3119–3128.
- Weis, S.M., Lindquist, J.N., Barnes, L.A., Lutu-Fuga, K.M., Cui, J., Wood, M.R., and Cheresh, D.A. (2007). Cooperation between VEGF and β 3 integrin during cardiac vascular development. *Blood* **109**, 1962–1970.
- Wijelath, E.S., Rahman, S., Namekata, M., Murray, J., Nishimura, T., Mostafavi-Pour, Z., Patel, Y., Suda, Y., Humphries, M.J., and Sobel, M. (2006). Heparin-II Domain of Fibronectin Is a Vascular Endothelial Growth Factor-Binding Domain: Enhancement of VEGF Biological Activity by a Singular Growth Factor/Matrix Protein Synergism. *Circ. Res.* **99**, 853–860.
- Wilgus, M.-L., Borczuk, A.C., Stoopler, M., Ginsburg, M., Gorenstein, L., Sonett, J.R., and Powell, C.A. (2011). Lysyl oxidase: A lung adenocarcinoma biomarker of invasion and survival. *Cancer* **117**, 2186–2191.
- Wong, C.C.-L., Gilkes, D.M., Zhang, H., Chen, J., Wei, H., Chaturvedi, P., Fraley, S.I., Wong, C.-M., Khoo, U.-S., Ng, I.O.-L., et al. (2011). Hypoxia-inducible factor 1 is a master regulator of breast cancer metastatic niche formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 16369–16374.
- Wong, C.C.-L., Tse, A.P.-W., Huang, Y.-P., Zhu, Y.-T., Chiu, D.K.-C., Lai, R.K.-H., Au, S.L.-K., Kai, A.K.-L., Lee, J.M.-F., Wei, L.L., et al. (2014). Lysyl oxidase-like 2 is critical to tumor microenvironment and metastatic niche formation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **60**, 1645–1658.
- Wu, G., Guo, Z., Chang, X., Kim, M.S., Nagpal, J.K., Liu, J., Maki, J.M., Kivirikko, K.I., Ethier, S.P., Trink, B., et al. (2007). LOXL1 and LOXL4 Are Epigenetically Silenced and Can Inhibit Ras/Extracellular Signal-Regulated Kinase Signaling Pathway in Human Bladder Cancer. *Cancer Res.* **67**, 4123–4129.
- Wullschleger, S., Loewith, R., and Hall, M.N. (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* **124**, 471–484.
- Xing, F., Saidou, J., and Watabe, K. (2010). Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* **15**, 166-179.
- Xu, L., Cochran, D.M., Tong, R.T., Winkler, F., Kashiwagi, S., Jain, R.K., Fukumura, D. (2006). Placenta Growth Factor Overexpression Inhibits Tumor Growth, Angiogenesis, and Metastasis by Depleting Vascular Endothelial Growth Factor Homodimers in Orthotopic Mouse Models. *Cancer Res.* **66**, 3971–3977.
- Xu, K., Sacharidou, A., Fu, S., Chong, D.C., Skaug, B., Chen, Z.J., Davis, G.E., and Cleaver, O. (2011). Blood vessel tubulogenesis requires Rasip1 regulation of GTPase signaling. *Dev. Cell* **20**, 526–539.
- Xu, L., Zhu, Y., Xu, J., Wu, K., Li, J., Xu, W., Liu, H., Wang, S., Yin, H., Chen, L., et al. (2012). Notch1 activation promotes renal cell carcinoma growth via PI3K/Akt signaling. *Cancer Sci.* **103**, 1253–1258.

- Xu, X., Weinstein, M., Li, C., Naski, M., Cohen, R.I., Ornitz, D.M., Leder, P., and Deng, C.** (1998). Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)-mediated reciprocal regulation loop between FGF8 and FGF10 is essential for limb induction. *Development* **125**, 753–765.
- Yang, J.T., Rayburn, H., and Hynes, R.O.** (1993). Embryonic mesodermal defects in alpha 5 integrin-deficient mice. *Development* **119**, 1093–1105.
- Yang, J.T., Rayburn, H., and Hynes, R.O.** (1995). Cell adhesion events mediated by alpha 4 integrins are essential in placental and cardiac development. *Development* **121**, 549–560.
- Yousif, L.F., Di Russo, J., and Sorokin, L.** (2013). Laminin isoforms in endothelial and perivascular basement membranes. *Cell Adhes. Migr.* **7**, 101–110.
- Zaffryar-Eilot, S., Marshall, D., Voloshin, T., Bar-Zion, A., Spangler, R., Kessler, O., Ghermazien, H., Brekhman, V., Suss-Toby, E., Adam, D., et al.** (2013). Lysyl oxidase-like-2 promotes tumour angiogenesis and is a potential therapeutic target in angiogenic tumours. *Carcinogenesis* **34**, 2370–2379.
- Zhan, P., Shen, X., Qian, Q., Zhu, J., Zhang, Y., Xie, H.-Y., Xu, C.-H., Hao, K., Hu, W., Xia, N., et al.** (2011). Down-regulation of lysyl oxidase-like 2 (LOXL2) is associated with disease progression in lung adenocarcinomas. *Med. Oncol.* **29**, 648–655.
- Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.-M., Simons, J.W., and Semenza, G.L.** (2000). Modulation of Hypoxia-inducible Factor 1 α Expression by the Epidermal Growth Factor/Phosphatidylinositol 3-Kinase/PTEN/AKT/FRAP Pathway in Human Prostate Cancer Cells: Implications for Tumor Angiogenesis and Therapeutics. *Cancer Res.* **60**, 1541–1545.
- Zhou, X., Rowe, R.G., Hiraoka, N., George, J.P., Wirtz, D., Mosher, D.F., Virtanen, I., Chernousov, M.A., and Weiss, S.J.** (2008). Fibronectin fibrillogenesis regulates three-dimensional neovessel formation. *Genes Dev.* **22**, 1231–1243.
- Zhou, Z., Apte, S.S., Soininen, R., Cao, R., Baaklini, G.Y., Rauser, R.W., Wang, J., Cao, Y., and Tryggvason, K.** (2000). Impaired endochondral ossification and angiogenesis in mice deficient in membrane-type matrix metalloproteinase I. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**, 4052–4057.
- Zhou, Z., Doi, M., Wang, J., Cao, R., Liu, B., Chan, K.M., Kortessmaa, J., Sorokin, L., Cao, Y., and Tryggvason, K.** (2004). Deletion of laminin-8 results in increased tumor neovascularization and metastasis in mice. *Cancer Res.* **64**, 4059–4063.
- Ziche, M., Maglione, D., Ribatti, D., Morbidelli, L., Lago, C.T., Battisti, M., Paoletti, I., Barra, A., Tucci, M., Parise, G., et al.** (1997). Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* **76**, 517–531.
- Zovein, A.C., Luque, A., Turlo, K.A., Hofmann, J.J., Yee, K.M., Becker, M.S., Fassler, R., Mellman, I., Lane, T.F., and Iruela-Arispe, M.L.** (2010). β 1 integrin establishes endothelial cell polarity and arteriolar lumen formation via a Par3-dependent mechanism. *Dev. Cell* **18**, 39–51.

ANNEXE

The interaction of heparan sulfate proteoglycans with endothelial transglutaminase-2 limits VEGF₁₆₅-induced angiogenesis

Nathan Beckouche,^{1,2,3,4,5} Marine Bignon,^{1,2,3,4} Virginie Lelarge,^{1,2,3,4,5} Thomas Mathivet,^{1,2,3} Cathy Pichol-Thievend,^{1,2,3,4,5} Sarah Berndt,^{1,2,3,4} Julie Hardouin,⁶ Marion Garand,^{1,2,3} Corinne Ardidie-Robouant,^{1,2,3,4} Alain Barret,^{1,2,3,4} Gerry Melino,⁷ Hugues Lortat-Jacob,^{8,9,10} Laurent Muller,^{1,2,3,4} Catherine Monnot,^{1,2,3,4*†} Stephane Germain^{1,2,3,4,11*}

Sprouting angiogenesis is stimulated by vascular endothelial growth factor (VEGF₁₆₅) that is localized in the extracellular matrix (ECM) and binds to heparan sulfate (HS)-bearing proteins known as heparan sulfate proteoglycans (HSPGs). VEGF₁₆₅ presentation by HSPGs enhances VEGF receptor-2 (VEGFR2) signaling. We investigated the effect of TG2, which binds to HSPGs, on the interaction between VEGF₁₆₅ and HS and angiogenesis. Mice with *tg2* deficiency showed transiently enhanced retina vessel formation and increased vascularization of VEGF₁₆₅-containing Matrigel implants. In addition, endothelial cells in which TG2 was knocked down exhibited enhanced VEGF₁₆₅-induced sprouting and migration, which was associated with increased phosphorylation of VEGFR2 at Tyr⁹⁵¹ and its targets Src and Akt. TG2 knockdown did not affect the phosphorylation of VEGFR2 at Tyr¹¹⁷⁵ or cell proliferation in response to VEGF₁₆₅ and sprouting or signaling in response to VEGF₁₂₁. Decreased phosphorylation of VEGFR2 at Tyr⁹⁵¹ was due to ECM-localized TG2, which reduced the binding of VEGF₁₆₅ to endothelial ECM in a manner that required its ability to bind to HS but not its catalytic activity. Surface plasmon resonance assays demonstrated that TG2 impeded the interaction between VEGF₁₆₅ and HS. These results show that TG2 controls the formation of VEGF₁₆₅-HSPG complexes and suggest that this regulation could be pharmacologically targeted to modulate developmental and therapeutic angiogenesis.

INTRODUCTION

Sprouting angiogenesis is a coordinated process, which is stimulated by hypoxia and involves the migration and proliferation of endothelial cells and vascular morphogenesis. Hypoxia-inducible factors activate the transcription of genes encoding autocrine and paracrine growth factors like vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) as well as components of the extracellular matrix (ECM) like fibronectin and heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) (1). The interaction of VEGF-A with ECM is necessary for endothelial cell migration and formation of a proper functional vasculature (2, 3). The VEGF-A reservoir is shaped by the bioavailability of the pericellular HSPGs. Whereas human VEGF₁₂₁ (mouse VEGF₁₂₀) does not bind to HSPGs and diffuses freely, human VEGF₁₆₅ (mouse VEGF₁₆₄) binds to HSPGs at the cell surface and in the ECM. Developing retinal vessels undergo sprouting angiogenesis toward the hypoxic front. Whereas retina vessel network is normal in VEGF^{164/164} mice (mice that selectively express VEGF₁₆₄), VEGF^{120/120} mice (mice that selectively express VEGF₁₂₀) exhibit a reduced vascular bed from postnatal day 5 (P5) to P9 (4). VEGF₁₆₄ in the hypoxic ECM therefore controls angiogenic sprouting. VEGF receptor-2

(VEGFR2) is the major effector of VEGF-A signaling in both physiological and pathological vessel development. VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ signal through VEGFR2, but the ability of VEGF₁₆₅ to interact with HSPGs enhances its angiogenic response by potentiating VEGFR2 signaling (5, 6). The activation of VEGFR2 pathways depends on the phosphorylation of specific tyrosine residues in the intracellular domain of the VEGFR2. Phosphorylation at Tyr⁹⁵¹ facilitates activation of the tyrosine kinase Src and subsequent endothelial cell migration (7). In contrast, phosphorylation of Tyr¹¹⁷⁵ is essential for endothelial cell proliferation through activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) (8).

We previously reported that changes in the composition of endothelial ECM proteins during hypoxia create a new microenvironment that governs molecular mechanisms involved in tuning angiogenic sprouting (9–11). Transglutaminase-2 (TG2) is mainly located in the cytoplasm, but it is secreted by endothelial cells and localizes to the ECM under hypoxic conditions (12). TG2 is a Ca²⁺-dependent enzyme that catalyzes the formation of γ -glutamyl isopeptide bonds by transamidation of specific glutamine residues. TG2 has a catalytic triad containing Cys, His, and Asp residues (13). TG2 stabilizes the ECM through its cross-linking activity and interacts with various components at the endothelial cell surface or in the ECM such as β_1 integrin (14), fibronectin (14), endostatin (12), and HSPGs (15). The role of TG2 in angiogenesis is under debate because it can both stimulate (16, 17) and inhibit (18) angiogenesis, suggesting context dependence. The angiogenic mechanisms involving TG2 are poorly understood and are reported to depend on its catalytic activity (16–19). However, the role of the TG2-HSPG interaction in angiogenesis has to be considered because it may alter the local bioavailability of growth factors such as VEGF.

We hypothesized that endothelial TG2 might regulate capillary sprouting by modulating the interaction between VEGF₁₆₅ and HSPGs. Using in vivo, ex vivo, and in vitro three-dimensional (3D) approaches, we demonstrated

¹Collège de France, Center for Interdisciplinary Research in Biology, Paris F-75005, France. ²CNRS, UMR 7241, Paris F-75005, France. ³INSERM U1050, Paris F-75005, France. ⁴Equipe Labellisée Ligue Contre le Cancer. ⁵Université Pierre et Marie Curie (ED 394), Paris F-75005, France. ⁶Université de Rouen Laboratoire Polymères Biopolymères Surfaces, UMR CNRS 6270, Mont-Saint-Aignan F-76821, France. ⁷MRC Toxicology Unit, University of Leicester, Leicester LE1 9HN, UK. ⁸Université Grenoble Alpes, Institut de Biologie Structurale (IBS), Grenoble F-38000, France. ⁹CNRS, IBS, Grenoble F-38000, France. ¹⁰Commissariat à l'Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives, Direction des Sciences du Vivant, IBS, Grenoble F-38000, France. ¹¹Department of Pathology, Saint-Louis Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris F-75010, France.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. E-mail: catherine.monnot@college-de-france.fr

that TG2 limited VEGF₁₆₅-induced angiogenesis by impeding the binding of VEGF₁₆₅ to HSPGs, thus attenuating VEGF₁₆₅ signaling through VEGFR2 and endothelial cell migration. Therefore, the effect of endothelial TG2 on vessel sprouting depends on its ability to interact with HSPGs in the microenvironment, thus shaping VEGF₁₆₅ bioavailability.

RESULTS

Mice with a deficiency in TG2 show enhanced retinal angiogenesis

Mice with a global knockout of TG2 are viable and fertile and do not show a phenotype unless challenged (20). We investigated the postnatal vascularization of the mouse retina and found that the radial expansion of the vascular plexus from the optic nerve was greater in retinas of *tg2*^{-/-} pups than in those of *tg2*^{+/+} littermates at day 5 (Fig. 1, A and B). The vascular plexus in the retinas of *tg2*^{-/-} pups nearly reached the periphery of the retina at P5, whereas the primitive capillary plexus from wild-type pups was still growing until P7. At P7, the vascular networks in pups of either genotype were indistinguishable (fig. S1A). TG2 deficiency therefore transiently accelerated developmental angiogenesis. Because retinal vascularization is mainly regulated by VEGF-A (2), these data suggested that TG2 could modulate VEGF-A-induced angiogenesis.

Silencing TG2 enhances VEGF₁₆₅-induced angiogenesis in vivo and in vitro 3D models

We investigated the vascularization of Matrigel implants containing one of the two major isoforms of VEGF-A, either VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅, in *tg2*-null mice (Fig. 1C). Hemoglobin content of VEGF₁₆₅-containing implants was significantly higher in *tg2*^{-/-} than in *tg2*^{+/+} control mice. In contrast, VEGF₁₂₁-containing implants did not differ in hemoglobin content. These data suggested that knocking out TG2 specifically enhanced VEGF₁₆₅-induced angiogenesis.

We detected TG2 in the endothelium and vascular smooth muscle cells of aortas from *tg2*^{+/+} mice but not from *tg2*^{-/-} littermates (fig. S1B). Capillary sprouting in response to VEGF₁₂₁ was similar in *tg2*^{-/-} and *tg2*^{+/+} aortic rings, whereas *tg2*^{-/-} aortic rings displayed a significantly enhanced response to VEGF₁₆₅ when compared to *tg2*^{+/+} aortic rings (Fig. 1, D to F). TG2 deficiency therefore enhanced VEGF₁₆₅-induced capillary sprouting.

Because we assessed the role of the endothelial ECM in the sprouting angiogenesis,

we focused on these cells. However, TG2 is an abundant and widely distributed protein, and the in vivo analyses have been performed in mice with a global knockout of TG2. Thus, we could not exclude a role for other cell types, such as vascular smooth muscle cells, in mediating the enhancement in angiogenesis. To decipher the role of endothelial TG2 on

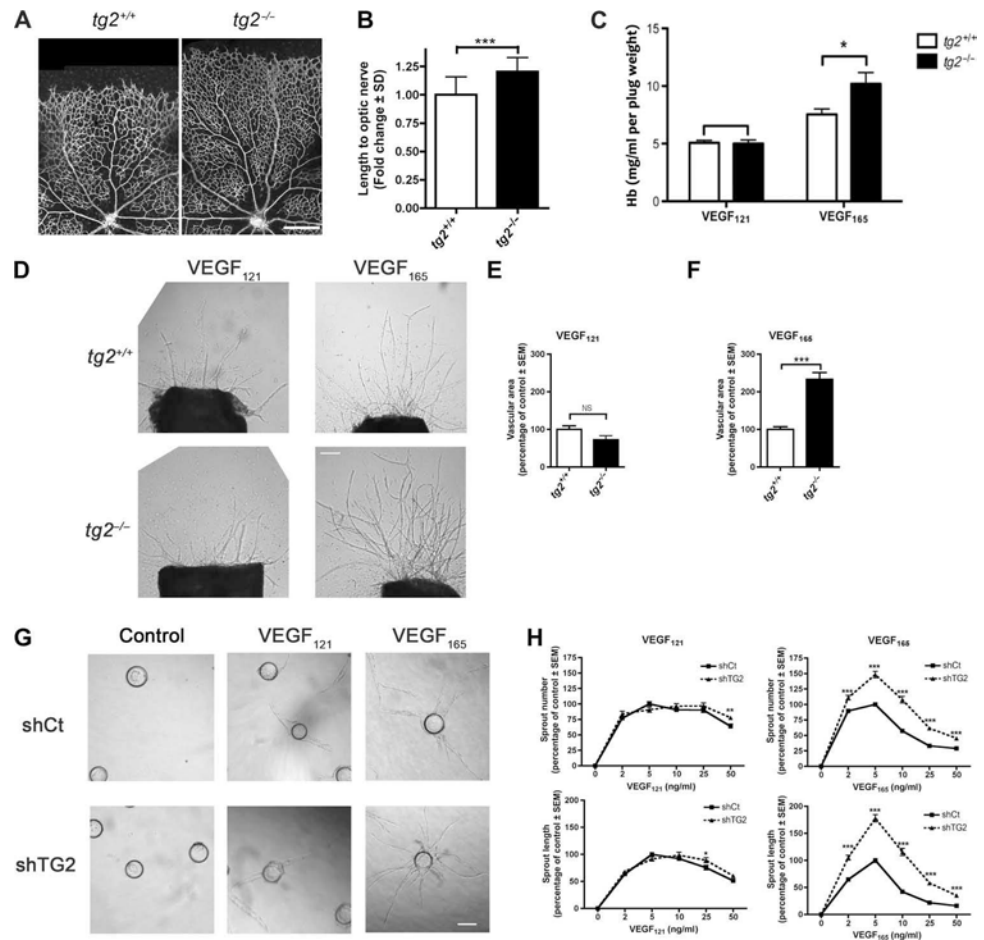


Fig. 1. TG2 deficiency enhances VEGF₁₆₅-induced angiogenesis in vivo and in vitro. (A) Retina stained with isolectin-B4 from P5 *tg2*^{+/+} or *tg2*^{-/-} littermates. These confocal images are representative of 44 *tg2*^{+/+} and 52 *tg2*^{-/-} retinas analyzed in four independent experiments. Scale bar, 60 μ m. (B) Distance between the optic nerve and the vascular front was quantified in *tg2*^{+/+} or *tg2*^{-/-} retinas. Graphs represent mean values normalized to *tg2*^{+/+} values \pm SD ($n = 4$ independent experiments, 44 to 52 retinas analyzed; Mann-Whitney U test). (C) Hemoglobin content (Hb) was determined for VEGF₁₂₁- or VEGF₁₆₅-containing Matrigel implants in *tg2*^{+/+} or *tg2*^{-/-} mice. Graphs represent mean values \pm SD ($n = 3$ independent experiments, eight plugs analyzed for each experimental group; Welch's t test). (D) *tg2*^{+/+} and *tg2*^{-/-} aortic rings treated with VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅. These images are representative of 17 *tg2*^{+/+} and 24 *tg2*^{-/-} rings analyzed in three independent experiments. Scale bar, 200 μ m. (E and F) Vessel areas were calculated as percentages of the values in *tg2*^{+/+} aortic rings. Graphs represent mean values \pm SEM ($n = 3$ independent experiments, 17 to 24 rings analyzed; Mann-Whitney U test). (G) 3D sprouts from control (shCt) or TG2-silenced HUVECs (shTG2) in gels containing no VEGF (Control) or VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ (5 ng/ml). These images are representative of 9, 11, and 21 shCt-bearing and 10, 11, and 17 shTG2-bearing Cytodex beads, respectively, analyzed in three independent experiments. Scale bar, 150 μ m. (H) Quantification of sprout number and length per bead generated by shCt or shTG2 cells treated with VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅, calculated as percentages of the maximum values in shCt cells. Graphs represent mean values \pm SEM ($n = 3$ independent experiments, 68 to 142 sprouts analyzed; Student's t test). * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0001$. NS, no significant difference.

VEGF₁₆₅-induced angiogenesis, we used human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). HUVECs generate capillary-like structures containing a lumen when seeded on Cytodex beads, embedded in fibrin gels, and cocultured with normal human dermal fibroblasts (NHDFs) (21). First, we showed that in HUVECs cocultured with NHDFs, TG2 was located not only in cells but also in a fibrillar meshwork (fig. S2A), a feature of endothelial ECM (9, 12). Second, we used short hairpin RNA (shRNA) to eliminate TG2 both in HUVECs and in the ECM (fig. S2B). In agreement with previous studies (22), both VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ induced sprouting of HUVECs when compared to control conditions without VEGF (Fig. 1G). However, capillary formation was enhanced in TG2-silenced HUVECs compared to cells transfected with a control shRNA in response to VEGF₁₆₅ but not to VEGF₁₂₁. Moreover, silencing TG2 increased sprouting at any VEGF₁₆₅ concentration without affecting responses to VEGF₁₂₁ (Fig. 1H).

Silencing TG2 stimulates VEGF₁₆₅-induced endothelial cell migration

The increased angiogenic response to VEGF₁₆₅ in TG2-silenced HUVECs might result from changes in cell proliferation or migration. We assessed endothelial cell proliferation by quantifying the number of nuclei in each sprout formed by HUVECs in fibrin gels. The number of nuclei positively correlated with the concentration of VEGF₁₆₅ (fig. S3A). The number of nuclei per sprout length was similar for TG2-silenced or control HUVECs (Fig. 2, A and B). In contrast, the motility of HUVECs on fibronectin or type I collagen was significantly enhanced by TG2 silencing (Fig. 2C). We also assessed the migration of HUVECs in fibrin gels in the absence of cocultured NHDFs because in this context, endothelial cells migrate independently of morphogenetic processes (9, 21). We found that the migration of TG2-silenced HUVECs was significantly increased compared to that of control HUVECs (Fig. 2D). In the scratch assay, which simulates wound healing and is another assay for migration, TG2-silenced HUVECs completely filled the scratch in the presence of VEGF₁₆₅, whereas control cells covered half of the scratch (Fig. 2E). In contrast, control and TG2-silenced HUVECs displayed similar responses in the presence of VEGF₁₂₁, serum, or sphingosine 1-phosphate (S1P). Enhancement of capillary formation by TG2 silencing in response to VEGF₁₆₅ was therefore associated with increased migration of endothelial cells.

TG2 forms ternary complexes with fibronectin and β_1 integrin (14). Because these complexes modulate cell-ECM interactions, we assessed whether silencing TG2 also affected the role of β_1 integrin in the sprouting process. As expected, anti- β_1 integrin blocking antibody inhibited 3D sprouting in both TG2-silenced and control HUVECs (fig. S3B) to a similar extent, thereby showing that TG2 and β_1 integrin regulate angiogenesis through independent mechanisms. In addition, TG2 promotes the deposition of fibronectin, the assembly of which into a pericellular network of fibrils is required for endothelial sprouting (23, 24). Immunoblotting revealed that fibronectin abundance in total lysates was similar in TG2-silenced and control HUVECs (fig. S3C). Moreover, fibronectin deposition did not differ between TG2-silenced or control cells seeded on type I collagen or fibrin, ECM components used for the aortic ring and 3D sprouting assays, respectively (fig. S3D). Finally, fibronectin was detected along 3D capillaries sprouted from *tg2*^{-/-} and *tg2*^{+/+} aortic rings (fig. S3E). Together, these results demonstrated that silencing TG2 favored VEGF₁₆₅-induced angiogenesis by increasing cell migration without notably affecting fibronectin deposition or β_1 integrin-dependent sprouting.

Silencing TG2 increases VEGF₁₆₅ signaling downstream of VEGFR2 and phosphorylation of VEGFR at Tyr⁹⁵¹

We next investigated the effect of TG2 silencing on VEGF₁₆₅ signaling. ¹²⁵I-labeled VEGF bound to VEGFR2 with similar binding parameters in

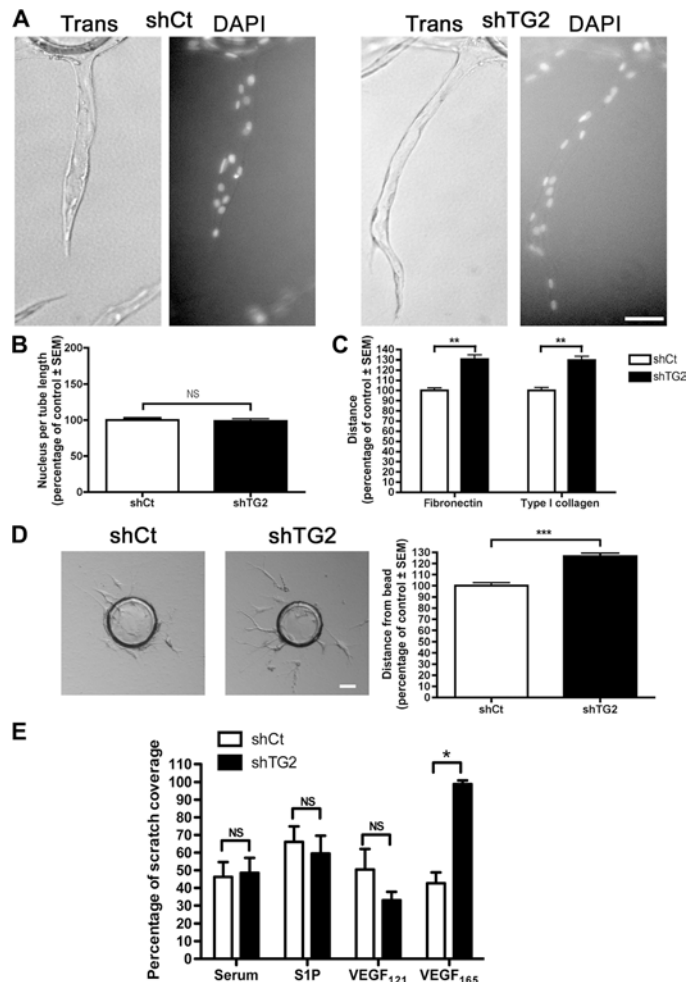


Fig. 2. Silencing TG2 increases 2D and 3D migration without affecting proliferation in sprouts. (A) Sprout from control (shCt) or TG2-silenced (shTG2) HUVECs in the presence of VEGF₁₆₅ (5 ng/ml). These images of transmission light microscopy (Trans) and nuclei staining [4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)] are representative of 101 and 78 sprouts for shCt and shTG2, respectively, analyzed in three independent experiments. The lumen was continuous from the bead to the tip of the capillary. Scale bar, 50 μ m. (B) Number of nuclei (4 to 40) per 100- to 500- μ m-long tube was calculated as percentages of values in shCt cells. Graphs represent mean values \pm SEM ($n = 3$ independent experiments, 78 to 101 sprouts analyzed; Mann-Whitney U test). (C) Individual 2D motility of shCt or shTG2 cells on fibronectin or type I collagen coatings was quantified and calculated as percentage of values in shCt cells. The graph represents mean values \pm SEM ($n = 2$ independent experiments, 32 to 58 cells analyzed; Student's t test). (D) 3D migration of shCt or shTG2 cells in fibrin gel in the presence of VEGF₁₆₅ was quantified and calculated as percentages of values in shCt cells. The graph represents mean values \pm SEM ($n = 3$ independent experiments, 128 to 146 cells analyzed; Mann-Whitney U test). Scale bar, 50 μ m. (E) Migration of control (shCt) or TG2-silenced (shTG2) HUVECs stimulated by serum or S1P or VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ was assessed with the scratch assay. The graph represents mean values normalized over maximal values \pm SEM ($n = 2$ independent experiments, 7 to 11 images analyzed; Mann-Whitney U test). * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0001$.

TG2-silenced and control HUVECs [dissociation constant (K_d) = 589 ± 59 pM and 675 ± 37 pM; maximum binding capacity (B_{max}) = 1.74 ± 0.38 and 1.54 ± 0.20 per cell, respectively; values derived from three independent experiments]. We assessed the activation of VEGFR2 by measuring the phosphorylation at Tyr⁹⁵¹ and Tyr¹¹⁷⁵ in VEGFR2 in response to VEGF. In TG2-silenced HUVECs, VEGF₁₆₅-induced phosphorylation of Tyr⁹⁵¹ in VEGFR2 and of its downstream targets Src and Akt was significantly increased at 2 min when compared to control cells (Fig. 3A). In contrast, VEGF₁₆₅-induced phosphorylation of VEGFR2 at Tyr¹¹⁷⁵ and of ERK1/2 was similar in TG2-silenced and control HUVECs. We also analyzed VEGF₁₆₅ signaling in primary cultures of lung endothelial cells from *tg2^{-/-}* and *tg2^{+/+}* mice (Fig. 3B). Cells from *tg2^{-/-}* mice had increased phosphorylation of VEGFR2 at Tyr⁹⁵¹, Src, and Akt, but no changes in the phosphorylation of VEGFR2 at Tyr¹¹⁷⁵ and ERK1/2. Because the phosphorylation of Tyr¹¹⁷⁵ depends on VEGFR2 trafficking (25), we analyzed the internalization of VEGFR2 in response to VEGF₁₆₅ (fig. S4). Colocalization of VEGFR2 with the endosomal marker EEA1 (early endosome antigen 1) was similar in TG2-silenced and control HUVECs. Moreover,

TG2 silencing did not affect responses to VEGF₁₂₁ because phosphorylation of VEGFR2 at Tyr⁹⁵¹ and Tyr¹¹⁷⁵, Src, Akt, and ERK1/2 was similar in TG2-silenced and control HUVECs (fig. S5).

To assess whether VEGF₁₆₅ signaling was regulated by cellular or ECM-associated TG2, ECM was generated by TG2-silenced or control HUVECs. Cells were removed without affecting ECM and replaced with fresh TG2-silenced or control HUVECs. As expected, TG2-silenced cells on ECM generated by TG2-silenced cells displayed a significant increase of VEGFR2 phosphorylation at Tyr⁹⁵¹ when compared to control cells on control ECM (Fig. 3C). Moreover, VEGFR2 phosphorylation at Tyr⁹⁵¹ was increased in control cells on ECM generated by TG2-silenced cells, but not in TG2-silenced cells on ECM generated by control cells. These data demonstrated that silencing TG2 localized in the endothelial ECM was sufficient to enhance phosphorylation of VEGFR2 at Tyr⁹⁵¹.

Extracellular TG2 prevents VEGF₁₆₅ binding to HS

Because extracellular TG2 interacts with HSPGs (15) and VEGF₁₆₅-HSPG complexes potentiate VEGF₁₆₅ signaling (5), TG2 might prevent the binding of VEGF₁₆₅ to HSPGs and therefore limit VEGF₁₆₅ signaling. We showed that addition of heparin in the medium increased the phosphorylation of VEGFR2 at Tyr⁹⁵¹ in control HUVECs in response to VEGF₁₆₅ to a similar extent to that observed in TG2-silenced cells (Fig. 3D). Variations in the amount or types of HSPGs could indirectly modify the interactions of TG2 with VEGF₁₆₅. However, HSPG content did not differ between TG2-silenced and control HUVECs (fig. S6, A and B). Although TG2 from control cells colocalized with perlecan, the major HSPG of the basement membrane, in a fibrillar meshwork, TG2 silencing did not appear to affect the deposition or arrangement meshwork of perlecan or the HS-bearing component in the ECM (fig. S6C). Finally, we investigated the ability of extracellular TG2 to prevent VEGF₁₆₅ binding to confluent monolayers or to the ECM of HUVECs (Fig. 4A). Immunoblot analysis revealed that preincubation with HS (heparin) or TG2, but not with hyaluronic acid, reduced the binding of VEGF₁₆₅ to endothelial cells or ECM generated by endothelial cells. These results indicated that the binding of VEGF₁₆₅ to the cell surface or the ECM of HUVECs depended on HS and was reduced by extracellular TG2. Preincubation with recombinant catalytically inactive TG2 (TG2^{C277S}) reduced the binding of VEGF₁₆₅ (Fig. 4B, left panel) to a similar extent to that detected for wild-type TG2 (Fig. 4B, right panel). Thus, extracellular TG2 limited HS-dependent VEGF₁₆₅ binding to endothelial ECM independently of its catalytic activity.

We analyzed the direct interactions of TG2 and VEGF₁₆₅ with HS using surface plasmon resonance (SPR). As expected, TG2 and VEGF₁₆₅, but not VEGF₁₂₁, interacted

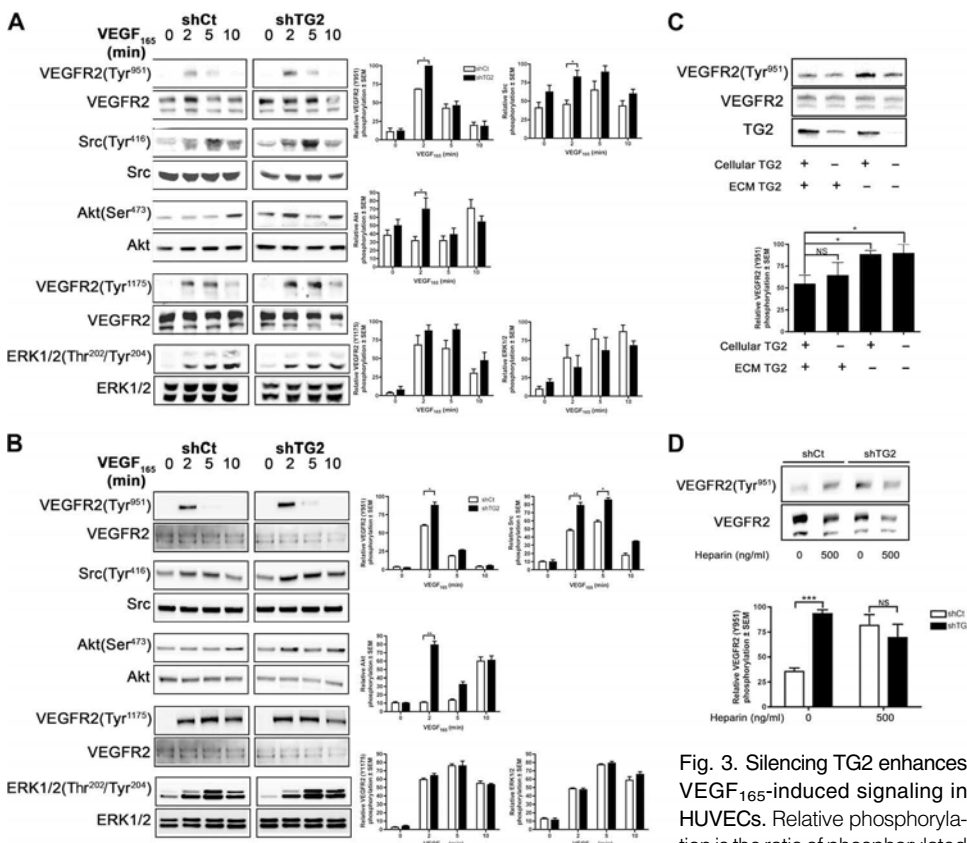


Fig. 3. Silencing TG2 enhances VEGF₁₆₅-induced signaling in HUVECs. Relative phosphorylation is the ratio of phosphorylated over total protein normalized as

percentage of the maximal ratio. Graphs represent mean values ± SEM. (A and B) Phosphorylation of VEGFR2, Src, Akt, and ERK1/2 was determined at the sites in control (shCt) or TG2-silenced (shTG2) HUVECs ($n = 4$ independent experiments; Welch's t test) (A) and in primary cultures of lung endothelial cells from *tg2^{+/+}* or *tg2^{-/-}* mice ($n = 3$ independent experiments; Welch's t test) (B). (C) Phosphorylation of VEGFR2 at Tyr⁹⁵¹ and TG2 content in shCt or shTG2 cells seeded on ECM generated by shCt or shTG2 cells. shCt cells provide cellular TG2 (+), and ECM generated by shCt cells provide ECM TG2 (+). shTG2 cells do not provide any cellular (-) or ECM TG2 (-) ($n = 5$; Student's t test). (D) Phosphorylation of VEGFR2 at Tyr⁹⁵¹ in the absence (0) or presence (500) of heparin in shCt or shTG2 cells ($n = 3$; Mann-Whitney U test). * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.0001$.

Downloaded from <http://stke.sciencemag.org/> on August 15, 2015

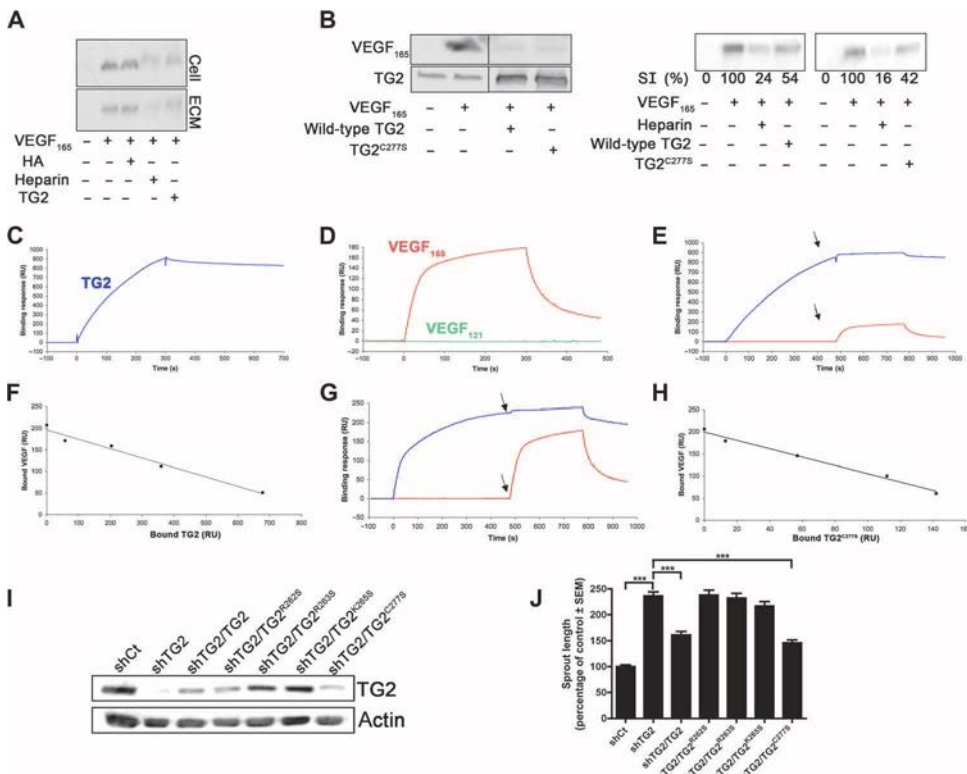


Fig. 4. TG2 limits VEGF₁₆₅-induced endothelial sprouting by binding to HS and independently of its catalytic activity. (A) Confluent monolayers of HUVECs (Cell) or ECM generated by cultured HUVECs were preincubated without (-) or with (+) hyaluronic acid (HA), heparin, or recombinant TG2 and further incubated with VEGF₁₆₅. Cell and ECM samples were immunoblotted for VEGF₁₆₅. The immunoblots are representative of four sets of cells analyzed in two independent experiments. (B) ECM from HUVECs was preincubated without (-) or with (+) recombinant TG2 or TG2^{C277S} and further incubated with VEGF₁₆₅. ECM samples were immunoblotted for VEGF₁₆₅ and TG2 (upper panel). Similar sets of experiments were performed with heparin preincubation, ECM samples were immunoblotted for VEGF₁₆₅, and percentage of signal intensity (SI) was measured (lower panel). The immunoblots are representative of two sets of cells analyzed in three independent experiments. (C and D) Recombinant TG2 (blue curve) (C) and human VEGF₁₆₅ (red curve) or VEGF₁₂₁ (green curve) (D) were injected separately over an HS-activated sensor chip. The response in resonance units (RU) was recorded as a function of time (seconds). (E) TG2 (blue curve) or running buffer (red curve) was injected over an HS-activated sensor chip, after which (arrows) VEGF₁₆₅ was injected. (F) Series of different TG2 concentrations was injected over an HS-activated sensor chip, after which VEGF₁₆₅ was injected as in (C). The amount of HS-bound TG2 was plotted against the amount of HS-bound VEGF₁₆₅. (G) Recombinant TG2^{C277S} (blue curve) or running buffer (red curve) was injected over an HS-activated sensor chip, after which (arrows) VEGF₁₆₅ was injected. (H) Series of TG2^{C277S} concentrations was injected over an HS-activated sensor chip, after which VEGF₁₆₅ was injected as in (C) to (H). The amount of bound TG2^{C277S} was plotted against the amount of bound VEGF₁₆₅. SPR curves in (C) to (H) are representative of three independent experiments. (I) Wild-type TG2 (TG2), HS-binding site mutants (TG2^{R262S}, TG2^{R263S}, and TG2^{K265S}), or catalytic site mutant (TG2^{C277S}) was reexpressed in TG2-silenced HUVECs (shTG2) using lentiviral infection. Total cell lysates were immunoblotted for TG2. Actin was used as a control. The immunoblots are representative of three independent experiments. (J) Sprout length from cells in VEGF₁₆₅-containing gels was calculated as the percentage of values in shCT cells. Graphs represent mean values ± SEM (*n* = 4 independent experiments, 75 to 101 sprouts analyzed; Student's *t* test). ****P* < 0.0001.

with HS (Fig. 4, C and D). TG2-HS complexes were very stable, whereas VEGF₁₆₅-HS complexes were unstable and rapidly dissociated, and preloading TG2 onto HS reduced the binding response of VEGF₁₆₅ (Fig. 4E)

in a dose-dependent manner (Fig. 4F). The amount of bound VEGF₁₆₅ decreased linearly as the amount of bound TG2 increased. SPR experiments were also performed with recombinant TG2^{C277S}. Although TG2^{C277S} interacted with HS with a lower binding response compared to wild-type TG2 (Fig. 4G), it prevented VEGF₁₆₅ binding to HS (Fig. 4H), in a similar manner as did wild-type TG2. Thus, TG2 impeded the binding of VEGF₁₆₅ to HS independently of its catalytic activity.

TG2 limits VEGF₁₆₅-induced angiogenesis through its binding to HS and independently of its catalytic activity

We assessed whether modulation of the VEGF₁₆₅-HSPG interaction by TG2 affected 3D sprouting. The HS-binding site of TG2 is composed of the cluster ²⁶²RRWK²⁶⁵ (26). Forms of TG2 with a mutation of one of these basic residues in this cluster (TG2^{R262S}, TG2^{R263S}, or TG2^{K265S}) or wild-type TG2 were expressed in TG2-silenced HUVECs and characterized by immunoblot (Fig. 4I) and by immunofluorescence in the ECM (fig. S7). Capillary formation in response to VEGF₁₆₅ in TG2-silenced cells was suppressed by reexpression of wild-type TG2, but not by that of any of the HS-binding mutants of TG2 (Fig. 4J). To determine whether the catalytic activity of TG2 was involved in VEGF₁₆₅-induced 3D sprouting, we reexpressed the TG2^{C277S} mutant in TG2-silenced HUVECs (Fig. 4I and fig. S7). In contrast to the HS-binding site mutants, reexpression of the catalytic mutant (shTG2/TG2^{C277S}) led to a significant decrease in capillary formation similar to that resulting from wild-type TG2 reexpression (Fig. 4J). These results showed that the interaction of TG2 with HS was necessary to decrease VEGF₁₆₅-induced capillary formation.

DISCUSSION

Here, we characterized the modulation of VEGF₁₆₅-driven angiogenesis by endothelial TG2, an ECM cross-linking enzyme. We showed that *tg2*-null mice transiently exhibit accelerated postnatal vascularization in the retina and enhanced vascularization in response to VEGF₁₆₅, but not to VEGF₁₂₁, as assessed by the Matrigel plug assay. The addition of a small amount of a synthetic HS mimetic or heparin increases the angiogenic activity of VEGF₁₆₅ in the Matrigel plug model (27). Our *in vivo* data suggested that the potentiation of the angiogenic response by HSPG-VEGF₁₆₅ complexes might be finely tuned by the interaction between TG2 and HSPGs. This hypothesis was supported

with HS (Fig. 4, C and D). TG2-HS complexes were very stable, whereas VEGF₁₆₅-HS complexes were unstable and rapidly dissociated, and preloading TG2 onto HS reduced the binding response of VEGF₁₆₅ (Fig. 4E)

plug model (27). Our *in vivo* data suggested that the potentiation of the angiogenic response by HSPG-VEGF₁₆₅ complexes might be finely tuned by the interaction between TG2 and HSPGs. This hypothesis was supported

by in vitro data showing that TG2 silencing promoted capillary formation and migration of endothelial cells in response to VEGF₁₆₅. In contrast, TG2 silencing did not affect migration in response to factors whose bioavailability is not governed by HSPGs, such as S1P and VEGF₁₂₁. The immunoblot profiles of HS-bearing molecules were similar for control and TG2-silenced HUVECs and were consistent with the presence of glypican-1, syndecan-1,2,3,4, and other HSPGs identified in HUVECs (28, 29). TG2 silencing did not affect the quantity or quality of perlecan or other HS-bearing ECM components. Instead, TG2 limited HS-dependent VEGF₁₆₅ binding to ECM independently of its catalytic activity, and TG2-HS complexes impeded VEGF₁₆₅ binding to HS. Although TG2 and VEGF₁₆₅ display high affinity for heparin (26, 30), TG2-HS complexes were stable, and VEGF₁₆₅ could not compete with TG2 for binding to HS. The VEGF₁₆₅-HSPG interaction shapes the VEGF reservoir into a gradient responsible for vascular growth (3) and directly promotes VEGF/VEGFR2 signaling (8) by increasing the phosphorylation of VEGFR2 at specific phosphorylation sites (5, 6). Furthermore, forms of TG2 with mutations in the ²⁶²RRWK²⁶⁵ cluster that cannot bind to HS (26) could not limit VEGF₁₆₅-induced sprouting, indicating that the ability of TG2 to interact with HS was required for angiogenic suppression. In contrast, a form of TG2 with a catalytic site mutation limited VEGF₁₆₅-induced sprouting as efficiently as did wild-type TG2, indicating that catalytic activity was not required for this process.

The involvement of HSPGs in VEGF signaling is complex because other components of the VEGF pathway interact with HSPGs, including the VEGFR2 co-receptor neuropilin (8, 26). Deficiency of HS induced by conditional inactivation of Ndst1 (*N*-deacetylase-*N*-sulfotransferase-1) in mice affects VEGF₁₆₅ and VEGF₁₂₁ signaling (31), whereas we found that TG2 binding to HSPGs affected migration in response to VEGF₁₆₅. During endothelial sprouting, regulation of VEGF₁₆₅ signaling by TG2 might then mainly occur in the tip cells where VEGFR2 drives migration rather than in the proliferative stalk cells. An interesting candidate for mediating such an effect is the adaptor protein TSA_D (T cell-specific adaptor), whose binding to VEGFR2 is facilitated by phosphorylation of VEGFR2 at Tyr⁹⁵¹ and which, in turn, promotes the activation of Src (7).

Here, we described a mechanism that highlights the importance of dynamic and local variations of the vascular microenvironment. In line with this study, we have previously reported that ANGPTL4 (angiopoietin-like 4) and the ECM cross-linking enzyme LOXL2 (lysyl oxidase-like 2 homolog 2) are induced by hypoxia in the vascular ECM and are required for proper capillary formation or integrity (10, 11, 32, 33). TG2 is therefore another member of the ECM that is involved in balancing the factors contributing to the establishment of a functional vascular network through ECM-endothelial cell crosstalk. Endogenous TG2 deposited in the ECM by endothelial cells impedes angiogenesis independently of its enzymatic activity. These data demonstrate the complexity of the context-dependent involvement of TG2 in angiogenesis. The role of HSPGs is context-dependent because altering their biosynthesis in endothelial cells reduces tumor angiogenesis without affecting developmental angiogenesis (34). A major issue is the identification of the source and distribution of TG2, which might change depending on the physiological or pathological angiogenic context. Further studies will be necessary to determine whether TG2 and VEGF₁₆₅ require similar types and sulfation of oligosaccharides to interact with HSPGs. Our data highlight the potential of targeting HS for modulating therapeutic angiogenesis.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and materials

Complementary DNAs encoding human wild-type and mutant TG2 were cloned in pLenti6/V5-DEST using the Gateway LR Clonase II (Life Tech-

nologies). shRNA-encoding plasmids and MISSION Lentiviral Packaging Mix were purchased from Sigma-Aldrich. Monoclonal anti-TG2 antibody was from NeoMarkers. Polyclonal and monoclonal anti-fibronectin, polyclonal anti-ERK1/2, and monoclonal anti-perlecan antibodies were from Millipore. Isolectin GS-IB4 was from Life Technologies. Polyclonal anti-VEGFR2, anti-Src, anti-Akt, anti-phospho-VEGFR2(Tyr⁹⁵¹/Tyr¹¹⁷⁵), anti-phospho-Src(Tyr⁴¹⁶), anti-phospho-Akt(Ser⁴⁷³), and monoclonal anti-phospho-ERK1/2(Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) antibodies were from Cell Signaling Technology. β_1 integrin blocking antibody, control immunoglobulin M, and growth factor-reduced Matrigel were from BD Biosciences. Polyclonal VEGF₁₆₅, actin, and EEA1 antibodies were from Abcam. Human VEGF₁₆₅ and VEGF₁₂₁ were from PeproTech. Anti-HS (10E4) and anti-HS neo-epitope generated by digesting HS with heparatinase (3G10) were from Amsbio. Heparin and hyaluronic acid were from Sigma-Aldrich. Human recombinant wild-type TG2 and catalytically inactive mutant TG2^{C277S} were from Zedira. Forms of TG2 with mutations in the heparin-binding sites (26) or lacking catalytic activity (35) were generated by single site-directed mutagenesis of Arg²⁶², Arg²⁶³, or Lys²⁶⁵ and at Cys²⁷⁷, respectively, to a Ser residue.

Cell cultures

Primary cultures of NHDFs were obtained from PromoCell, and HUVECs were prepared and cultured as previously described (9). HUVECs from the same cord were infected by lentiviral TG2-targeted shRNA (shTG2) or lentiviral scramble shRNA (shCt). For reexpression experiments, these cells were infected a second time, with virus encoding wild-type or mutant TG2. These constructs were silently mutated at the shRNA recognition site. Infections were repeated on HUVECs from different cords. Cells were selected with either blasticidin (2 μ g/ml) or puromycin (1 μ g/ml). Primary cultures of lung endothelial cells were obtained from *tg2*^{+/+} or *tg2*^{-/-} mice using Dynabeads magnetic separation (Life Technologies) as previously described (36). Experiments were performed between passages 1 and 5 for any primary culture. For both HUVECs and mouse lung endothelial cells, independent experiments were performed on distinct primary cultures.

Animal procedures

The *tg2*^{+/+} and *tg2*^{-/-} mice on a C57BL/6 genetic background were maintained, and experiments were performed in accordance with the guidelines of Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (C 75-05-12) and the ethical guidelines for animal care of the European Community Council (directive 2010/63/UE). Experiments were approved by the local ethical committee (Institutional Animal Care and Use Committee of College de France).

Analysis of retina vessel formation

For whole-mount staining, eyes from *tg2*^{+/+} and *tg2*^{-/-} littermates at P5 or P7 were isolated, fixed in 4% paraformaldehyde (PFA), and dissected. Retinas were then stained as previously described (37). Quantification of retinal vessels was performed using computer-assisted software.

Matrigel implant and 3D sprouting assays

Growth factor-depleted Matrigel implants containing either VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ (1000 ng/ml) were injected subcutaneously on both sides of *tg2*^{+/+} and *tg2*^{-/-} mice. Seventeen days later, implants were excised, and hemoglobin concentration was measured (38). Aortic ring assays were carried out as previously described (39). Briefly, thoracic aorta from 7- to 9-week-old *tg2*^{+/+} and *tg2*^{-/-} mice were dissected. Aortic rings were embedded in a type I collagen gel (1.5 mg/ml) and cultured for 7 days in serum-free medium containing VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ (50 ng/ml). Vascularized areas were measured using ImageJ software. For in vitro 3D sprouting assay, HUVECs were allowed to attach to Cytodex beads for 4 hours, 24 hours

before inclusion in a fibrin gel (2.5 mg/ml) containing VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ (5 ng/ml). Gels were incubated in endothelial basal medium with serum, ascorbic acid, hydrocortisone, heparin, and VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅. NHDFs were added on top of the gel. To block β_1 integrin, blocking or control antibody was added in the medium at 10 μ g/ml. Endothelial capillaries were allowed to grow for 5 to 7 days. Cumulative tube length and tube number per bead were measured using MetaMorph 7.7 software.

ECM preparation and VEGF₁₆₅ binding to ECM or cells

To determine the effect of TG2 deficiency in either ECM or cell lysate, confluent endothelial cells grown for 4 days were detached by a short incubation with 0.2% Triton X-100 at room temperature and extensive washing with phosphate-buffered saline (PBS). Cells were seeded for 24 hours on ECM generated by control or TG2-silenced cells and stimulated for 2 min with VEGF₁₆₅ (50 ng/ml). To measure VEGF₁₆₅ binding, confluent HUVECs were grown for 6 days. For ECM preparation, cells were briefly incubated twice with 0.5% deoxycholate at 4°C and extensively washed with PBS. Cell monolayers or ECM was then preincubated for 1 hour without or with hyaluronic acid or heparin (both at 50 μ g/ml) or recombinant wild-type TG2 or catalytic site mutant TG2^{C277S} (both at 40 μ g/ml) and further incubated for 15 min at 4°C with VEGF₁₆₅ (1.25 μ g/ml).

Quantification of sulfated glycosaminoglycans, immunofluorescence, and immunoblotting

Quantification of the sulfated proteoglycans and glycosaminoglycans was performed with the dye-binding method Blyscan Assay (Biocolor) on total papain-digested extract of confluent HUVECs grown for 5 days. For immunofluorescence, confluent HUVECs seeded on coverslip and grown for 5 days were fixed with cold methanol. Coverslips were mounted in Mowiol with DAPI. For immunofluorescence on aortic rings, samples were fixed with 4% PFA. For immunoblotting, ECM or cell lysate samples were prepared as previously described (9).

Analysis of signaling pathways

Cells were serum-starved for 5 hours and then stimulated with VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) for the indicated time. In case of heparin treatment, cells were serum-starved for 5 hours in the presence of heparin (500 ng/ml) and then stimulated for 2 min with VEGF₁₆₅ (50 ng/ml). Quantification was done with Quantity One 4.6 software.

VEGFR2 internalization assay

VEGFR2 internalization assay was performed as previously described (40). Briefly, control and TG2-silenced HUVECs were stained for VEGFR2 with an antibody that recognized an extracellular domain for 30 min at 4°C. Cells were then switched to 37°C for 5 min in the presence of VEGF₁₆₅ (50 ng/ml). Cells were fixed and stained for EEA1. Colocalization in the dual-positive endosomes was measured using the GDSC (Genome Damage and Stability Centre) ImageJ plugin.

Cell migration assays

Individual random 2D motility was studied by time-lapse videomicroscopy in coated 12-well plates, in serum-free medium containing VEGF₁₆₅ (10 ng/ml) and FGF2 (fibroblast growth factor 2) (10 ng/ml). Images were acquired every 5 min for 12 hours with a Leica DM IRBE microscope in a Life Imaging Services incubator. Cell motility was measured using MetaMorph 7.7 software (Molecular Devices). For 3D migration, HUVECs were incubated in complete medium with VEGF₁₆₅ (50 ng/ml) and allowed to migrate for 24 hours. Migration distances were measured using MetaMorph 7.7 software. For scratch assays, monolayers of confluent HUVECs were

scratched with a pipette tip and stimulated with factors [2.5% serum, 10 μ M S1P, or VEGF₁₂₁ or VEGF₁₆₅ (10 ng/ml)] in serum-free medium. Empty areas were measured using MetaMorph 7.7 software. Values at 16 hours were subtracted from values at time 0.

SPR binding assay

HS (Celsius) was biotinylated at the reducing end using Biotin-LC-Hydrazide (Pierce) and immobilized on top of streptavidin-coated CM4 Biacore sensor chip (GE Healthcare) as described previously (41). HS coated on sensor chips partially mimics the cell surface- or ECM-anchored HSPGs (26). Changes in the refractive index that result from protein interaction when the samples are flowed across the HS surface were monitored and quantified. For binding assays, TG2 (500 nM) or TG2^{C277S} (500 nM) and VEGF (50 nM), diluted into HBS-EP buffer [10 mM Hepes, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% surfactant P20 (pH 7.4)] were injected over both a reference and the HS surfaces for 5 min, after which running buffer was injected. For TG2 injection followed by VEGF₁₆₅ injection, TG2 (500 nM) or TG2^{C277S} (500 nM) or running buffer was injected over an HS-activated sensor chip from 0 to 480 s, after which VEGF₁₆₅ (50 nM) was injected for a further 300 s. Various concentrations (0, 50, 100, 200, and 500 nM) of TG2 or TG2^{C277S} were injected over an HS-activated sensor chip, after which VEGF₁₆₅ (50 nM) was injected as described above. The amount of HS-bound TG2 or TG2^{C277S} was recorded at 480 s and plotted against the amount of HS-bound VEGF₁₆₅ recorded at 780 s. The sensor chip surfaces were regenerated with a 1-min pulse of 0.1% SDS and a 4-min pulse of 2 M NaCl. All experiments were performed at a flow rate of 10 μ l/min.

Statistical analyses

Statistical analyses of data were performed with the Mann-Whitney *U* test, Student's *t* test, and Welch's *t* test according to variances, sample sizes, and distributions (GraphPad Prism 4, GraphPad Software). The statistical test is indicated for each data analysis.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

www.sciencesignaling.org/cgi/content/full/8/385/ra70/DC1

Fig. S1. Analysis of retinas and aortas from *tg2*^{+/+} and *tg2*^{-/-} mice.

Fig. S2. TG2 accumulation in ECM and TG2 silencing in endothelial cells.

Fig. S3. Proliferation, β_1 integrin-mediated sprouting, and fibronectin abundance and deposition in TG2-silenced endothelial cells.

Fig. S4. VEGFR2 internalization in response to VEGF₁₆₅.

Fig. S5. TG2 silencing does not affect VEGF₁₂₁-induced signaling.

Fig. S6. HS content and deposition.

Fig. S7. Reexpression of wild-type and mutant TG2 in TG2-silenced endothelial cells.

REFERENCES AND NOTES

1. S. Germain, C. Monnot, L. Muller, A. Eichmann, Hypoxia-driven angiogenesis: Role of tip cells and extracellular matrix scaffolding. *Curr. Opin. Hematol.* **17**, 245–251 (2010).
2. H. Gerhardt, M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, C. Betsholtz, VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* **161**, 1163–1177 (2003).
3. C. Ruhrberg, H. Gerhardt, M. Golding, R. Watson, S. Ioannidou, H. Fujisawa, C. Betsholtz, D. T. Shima, Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. *Genes Dev.* **16**, 2684–2698 (2002).
4. I. Stalmans, Y. S. Ng, R. Rohan, M. Fruttiger, A. Bouché, A. Yuce, H. Fujisawa, B. Hermans, M. Shani, S. Jansen, D. Hicklin, D. J. Anderson, T. Gardiner, H. P. Hammes, L. Moons, M. Dewerchin, D. Collen, P. Carmeliet, P. A. D'Amore, Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J. Clin. Invest.* **109**, 327–336 (2002).
5. F. Cecchi, D. Pajalunga, C. A. Fowler, A. Uren, D. C. Rabe, B. Peruzzi, N. J. Macdonald, D. K. Blackman, S. J. Stahl, R. A. Byrd, D. P. Bottaro, Targeted disruption of heparan sulfate interaction with hepatocyte and vascular endothelial growth factors blocks normal and oncogenic signaling. *Cancer Cell* **22**, 250–262 (2012).

6. L. Jakobsson, J. Kreuger, K. Holmborn, L. Lundin, I. Eriksson, L. Kjellén, L. Claesson-Welsh, Heparan sulfate in *trans* potentiates VEGFR-mediated angiogenesis. *Dev. Cell* **10**, 625–634 (2006).
7. Z. Sun, X. Li, S. Massena, S. Kutschera, N. Padhan, L. Gualandi, V. Sundvold-Gjerstad, K. Gustafsson, W. W. Choy, G. Zang, M. Quach, L. Jansson, M. Phillipson, M. R. Abid, A. Spurkland, L. Claesson-Welsh, VEGFR2 induces c-Src signaling and vascular permeability in vivo via the adaptor protein TSA. *J. Exp. Med.* **209**, 1363–1377 (2012).
8. S. Koch, S. Tugues, X. Li, L. Gualandi, L. Claesson-Welsh, Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem. J.* **437**, 169–183 (2011).
9. M. Bignon, C. Pichol-Thievend, J. Hardouin, M. Malbouyres, N. Bréchet, L. Nasciutti, A. Barret, J. Teillon, E. Etienne, M. Caron, R. Joubert-Caron, C. Monnot, F. Ruggiero, L. Muller, S. Germain, Lysyl oxidase-like protein-2 regulates sprouting angiogenesis and type IV collagen assembly in the endothelial basement membrane. *Blood* **118**, 3979–3989 (2011).
10. A. Cazes, A. Galaup, C. Chomel, M. Bignon, N. Bréchet, S. Le Jan, H. Weber, P. Corvol, L. Muller, S. Germain, C. Monnot, Extracellular matrix-bound angiopoietin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. *Circ. Res.* **99**, 1207–1215 (2006).
11. C. Chomel, A. Cazes, C. Faye, M. Bignon, E. Gomez, C. Ardié-Robouant, A. Barret, S. Ricard-Blum, L. Muller, S. Germain, C. Monnot, Interaction of the coiled-coil domain with glycosaminoglycans protects angiopoietin-like 4 from proteolysis and regulates its antiangiogenic activity. *FASEB J.* **23**, 940–949 (2009).
12. C. Faye, A. Inforzato, M. Bignon, D. J. Hartmann, L. Muller, L. Ballut, B. R. Olsen, A. J. Day, S. Ricard-Blum, Transglutaminase-2: A new endostatin partner in the extracellular matrix of endothelial cells. *Biochem. J.* **427**, 467–475 (2010).
13. S. Liu, R. A. Cerione, J. Clardy, Structural basis for the guanine nucleotide-binding activity of tissue transglutaminase and its regulation of transamidation activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2743–2747 (2002).
14. S. S. Akimov, D. Krylov, L. F. Fleischnan, A. M. Belkin, Tissue transglutaminase is an integrin-binding adhesion coreceptor for fibronectin. *J. Cell Biol.* **148**, 825–838 (2000).
15. A. Scarpellini, R. Germack, H. Lortat-Jacob, T. Muramatsu, E. Billett, T. Johnson, E. A. Verderio, Heparan sulfate proteoglycans are receptors for the cell-surface trafficking and biological activity of transglutaminase-2. *J. Biol. Chem.* **284**, 18411–18423 (2009).
16. Z. A. Haroon, J. M. Hettasch, T. S. Lai, M. W. Dewhirst, C. S. Greenberg, Tissue transglutaminase is expressed, active, and directly involved in rat dermal wound healing and angiogenesis. *FASEB J.* **13**, 1787–1795 (1999).
17. Z. Wang, M. Perez, S. C. C. C. Melino, T. S. Johnson, K. Lindfors, M. Griffin, A novel extracellular role for tissue transglutaminase in matrix-bound VEGF-mediated angiogenesis. *Cell Death Dis.* **4**, e808 (2013).
18. R. A. Jones, P. Kotsakis, T. S. Johnson, D. Y. Chau, S. Ali, G. Melino, M. Griffin, Matrix changes induced by transglutaminase 2 lead to inhibition of angiogenesis and tumor growth. *Cell Death Differ.* **13**, 1442–1453 (2006).
19. R. Dardik, A. Inbal, Complex formation between tissue transglutaminase II (tTG) and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2): Proposed mechanism for modulation of endothelial cell response to VEGF. *Exp. Cell Res.* **312**, 2973–2982 (2006).
20. V. De Laurenzi, G. Melino, Gene disruption of tissue transglutaminase. *Mol. Cell Biol.* **21**, 148–155 (2001).
21. M. N. Nakatsu, R. C. Sainson, J. N. Aoto, K. L. Taylor, M. Aitkenhead, S. Pérez-del-Pulgar, P. M. Carpenter, C. C. Hughes, Angiogenic sprouting and capillary lumen formation modeled by human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) in fibrin gels: The role of fibroblasts and Angiopoietin-1. *Microvasc. Res.* **66**, 102–112 (2003).
22. M. N. Nakatsu, R. C. Sainson, S. Pérez-del-Pulgar, J. N. Aoto, M. Aitkenhead, K. L. Taylor, P. M. Carpenter, C. C. Hughes, VEGF₁₂₁ and VEGF₁₆₅ regulate blood vessel diameter through vascular endothelial growth factor receptor 2 in an in vitro angiogenesis model. *Lab. Invest.* **83**, 1873–1885 (2003).
23. S. S. Akimov, A. M. Belkin, Cell-surface transglutaminase promotes fibronectin assembly via interaction with the gelatin-binding domain of fibronectin: A role in TGF β -dependent matrix deposition. *J. Cell Sci.* **114**, 2989–3000 (2001).
24. X. Zhou, R. G. Rowe, N. Hiraoka, J. P. George, D. Wirtz, D. F. Mosher, I. Virtanen, M. A. Chemousov, S. J. Weiss, Fibronectin fibrillogenesis regulates three-dimensional neovessel formation. *Genes Dev.* **22**, 1231–1243 (2008).
25. A. A. Lanahan, K. Hermans, F. Claes, J. S. Kerley-Hamilton, Z. W. Zhuang, F. J. Giordano, P. Carmeliet, M. Simons, VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis. *Dev. Cell* **18**, 713–724 (2010).
26. H. Lortat-Jacob, I. Burhan, A. Scarpellini, A. Thomas, A. Imbert, R. R. Vivès, T. Johnson, A. Gutierrez, E. A. Verderio, Transglutaminase-2 interaction with heparin: Identification of a heparin binding site that regulates cell adhesion to fibronectin-transglutaminase-2 matrix. *J. Biol. Chem.* **287**, 18005–18017 (2012).
27. V. Rouet, Y. Hamma-Kourbali, E. Petit, P. Panagopoulou, P. Katsoris, D. Baritault, J. P. Caruelle, J. Courty, A synthetic glycosaminoglycan mimetic binds vascular endothelial growth factor and modulates angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **280**, 32792–32800 (2005).
28. G. Mertens, J. J. Cassiman, H. Van den Berghe, J. Vermeylen, G. David, Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein characterization and antithrombin III binding properties. *J. Biol. Chem.* **267**, 20435–20443 (1992).
29. D. Qiao, K. Meyer, C. Mundhenke, S. A. Drew, A. Friedl, Heparan sulfate proteoglycans as regulators of fibroblast growth factor-2 signaling in brain endothelial cells. Specific role for glypican-1 in glioma angiogenesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 16045–16053 (2003).
30. C. Pisano, C. Alicino, L. Vesci, B. Casu, A. Naggi, G. Tori, D. Ribatti, M. Belleri, M. Rusnati, M. Presta, Undersulfated, low-molecular-weight glycol-split heparin as an antiangiogenic VEGF antagonist. *Glycobiology* **15**, 1C–6C (2005).
31. D. Xu, M. M. Fuster, R. Lawrence, J. D. Esko, Heparan sulfate regulates VEGF₁₆₅- and VEGF₁₂₁-mediated vascular hyperpermeability. *J. Biol. Chem.* **286**, 737–745 (2011).
32. C. Boulet, T. Mathivet, B. Coqueran, J. M. Serfaty, M. Lesage, E. Berland, C. Ardié-Robouant, G. Kauffenstein, D. Henrion, B. Lapergue, M. Mazighi, C. Duyckaerts, G. Thurston, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, G. D. Yancopoulos, C. Monnot, I. Margail, S. Germain, Protective effects of angiopoietin-like 4 on cerebrovascular and functional damages in ischaemic stroke. *Eur. Heart J.* **34**, 3657–3668 (2013).
33. A. Galaup, E. Gomez, R. Souktani, M. Durand, A. Cazes, C. Monnot, J. Teillon, S. Le Jan, C. Boulet, G. Briots, J. Philippe, S. Pons, V. Martin, R. Assaly, P. Bonnin, P. Ratajczak, A. Janin, G. Thurston, D. M. Valenzuela, A. J. Murphy, G. D. Yancopoulos, R. Tissier, A. Berdeaux, B. Ghaleh, S. Germain, Protection against myocardial infarction and no-reflow through preservation of vascular integrity by angiopoietin-like 4. *Circulation* **125**, 140–149 (2012).
34. M. M. Fuster, L. Wang, J. Castagnola, L. Sikora, K. Reddi, P. H. Lee, K. A. Radek, M. Schuksz, J. R. Bishop, R. L. Gallo, P. Sriramarao, J. D. Esko, Genetic alteration of endothelial heparan sulfate selectively inhibits tumor angiogenesis. *J. Cell Biol.* **177**, 539–549 (2007).
35. K. N. Lee, S. A. Arnold, P. J. Birckbichler, M. K. Patterson Jr., B. M. Fraji, Y. Takeuchi, H. A. Carter, Site-directed mutagenesis of human tissue transglutaminase: Cys-277 is essential for transglutaminase activity but not for GTPase activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1202**, 1–6 (1993).
36. A. W. Koch, T. Mathivet, B. Larrivé, R. K. Tong, J. Kowalski, L. Pibouin-Fragner, K. Bouvrée, S. Stawicki, K. Nicholes, N. Rathore, S. J. Scales, E. Luis, R. del Toro, C. Freitas, C. Bréant, A. Michaud, P. Corvol, J. L. Thomas, Y. Wu, F. Peale, R. J. Watts, M. Tessier-Lavigne, A. Bagri, A. Eichmann, Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B. *Dev. Cell* **20**, 33–46 (2011).
37. R. del Toro, C. Prahst, T. Mathivet, G. Siegfried, J. S. Kaminker, B. Larrivé, C. Bréant, A. Duarte, N. Takakura, A. Fukamizu, J. Penninger, A. Eichmann, Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* **116**, 4025–4033 (2010).
38. D. M. Smadja, I. Bièche, J. S. Silvestre, S. Germain, A. Cornet, I. Laurendeau, J. P. Duong-Van-Huyen, J. Emmerich, M. Vidaud, M. Aiach, P. Gaussem, Bone morphogenetic proteins 2 and 4 are selectively expressed by late outgrowth endothelial progenitor cells and promote neoangiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **28**, 2137–2143 (2008).
39. A. C. Aplin, E. Fogel, P. Zorzi, R. F. Nicosia, The aortic ring model of angiogenesis. *Methods Enzymol.* **443**, 119–136 (2007).
40. M. Gourlaouen, J. C. Weltil, N. S. Vasudev, A. R. Reynolds, Essential role for endocytosis in the growth factor-stimulated activation of ERK1/2 in endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **288**, 7467–7480 (2013).
41. S. Sarrazin, D. Bonnaffé, A. Lubineau, H. Lortat-Jacob, Heparan sulfate mimicry: A synthetic glycoconjugate that recognizes the heparin binding domain of interferon- γ inhibits the cytokine activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 37558–37564 (2005).

Acknowledgments: We thank members of animal facilities of the Center for Interdisciplinary Research in Biology, J.-C. Graziano and S. Tondeleir. **Funding:** This work has received support under the program Investissements d’Avenir launched by the French government and implemented by the Agence Nationale de la Recherche (ANR): ANR-10-LABX-54 MEMO LIFE and ANR-11-IDEX-0001-02 PSL* Research University, C.P.-T. and N.B. were supported by the Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche, Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer, Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, and Fédération Française de Cardiologie et Société Française de Cardiologie. V.L. was supported by Cancéropôle Île-de-France and Labex MemoLife. This work used the platforms of the Grenoble Instruct center [Integrated Structural Biology Grenoble; UMS 3518 CNRS–CEA (Commissariat à l’Énergie Atomique et aux Énergies Alternatives)–UJF (Université Joseph Fourier)–EMBL (European Molecular Biology Laboratory)] with support from French Infrastructure for Integrated Structural Biology (ANR-10-INSB-05-02) and Grenoble Alliance for Integrated Structural Cell Biology (ANR-10-LABX-49-01) within the Grenoble Partnership for Structural Biology. **Author contributions:** N.B. and M.B. designed and performed research and analyzed data; V.L., T.M., C.P.-T., S.B., J.H., M.G., C.A.-R., and A.B. performed experiments; H.L.-J. designed and performed SPR analyses; G.M. provided the *tg2^{-/-}* mouse strain; and C.M., L.M., and S.G. supervised the study and wrote the article. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests.

Submitted 16 October 2014

Accepted 25 June 2015

Final Publication 14 July 2015

10.1126/scisignal.aaa0963

Citation: N. Beckouche, M. Bignon, V. Lelarge, T. Mathivet, C. Pichol-Thievend, S. Berndt, J. Hardouin, M. Garand, C. Ardié-Robouant, A. Barret, G. Melino, H. Lortat-Jacob, L. Muller, C. Monnot, S. Germain, The interaction of heparan sulfate proteoglycans with endothelial transglutaminase-2 limits VEGF₁₆₅-induced angiogenesis. *Sci. Signal.* **8**, ra70 (2015).

Supplementary Materials for

The interaction of heparan sulfate proteoglycans with endothelial transglutaminase-2 limits VEGF₁₆₅-induced angiogenesis

Nathan Beckouche, Marine Bignon, Virginie Lelarge, Thomas Mathivet, Cathy Pichol-Thievend, Sarah Berndt, Julie Hardouin, Marion Garand, Corinne Ardidie-Robouant, Alain Barret, Gerry Melino, Hugues Lortat-Jacob, Laurent Muller, Catherine Monnot,* Stephane Germain

*Corresponding author. E-mail: catherine.monnot@college-de-france.fr

Published 14 July 2015, *Sci. Signal.* **8**, ra70 (2015)

DOI: 10.1126/scisignal.aaa0963

The PDF file includes:

- Fig. S1. Analysis of retinas and aortas from $tg2^{+/+}$ and $tg2^{-/-}$ mice.
- Fig. S2. TG2 accumulation in ECM and TG2 silencing in endothelial cells.
- Fig. S3. Proliferation, β_1 integrin-mediated sprouting, and fibronectin abundance and deposition in TG2-silenced endothelial cells.
- Fig. S4. VEGFR2 internalization in response to VEGF₁₆₅.
- Fig. S5. TG2 silencing does not affect VEGF₁₂₁-induced signaling.
- Fig. S6. HS content and deposition.
- Fig. S7. Reexpression of wild-type and mutant TG2 in TG2-silenced endothelial cells.

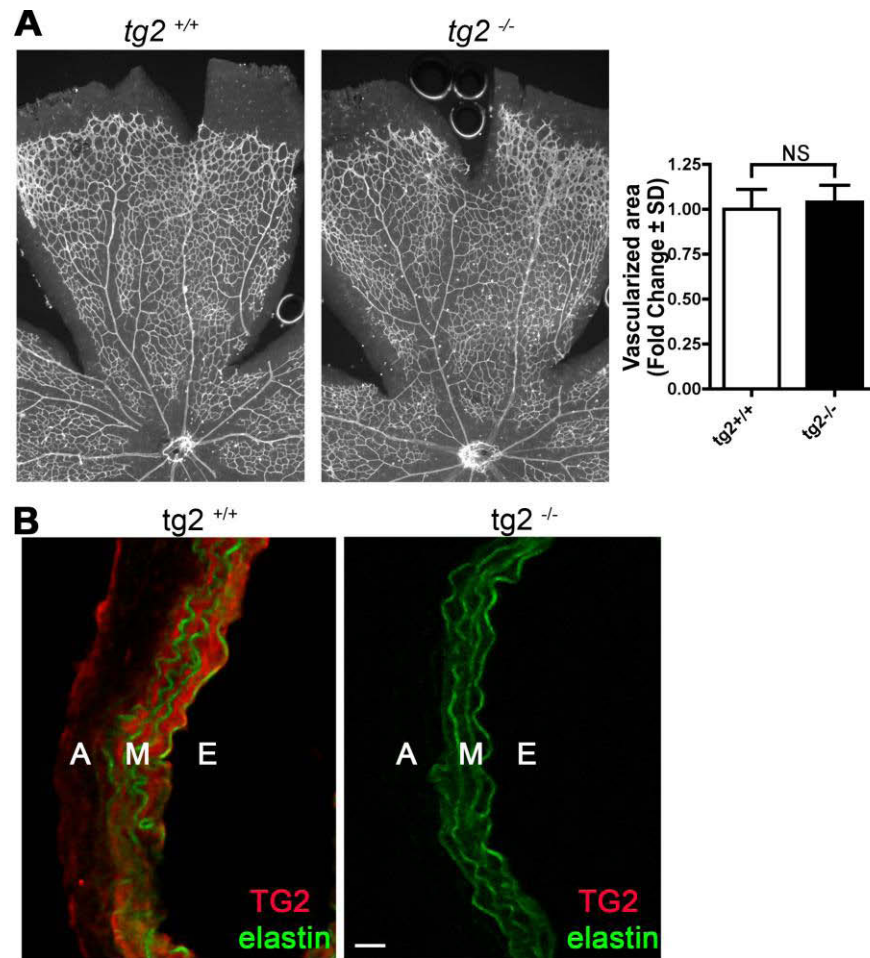


Fig. S1. Analysis of retinas and aortas from *tg2*^{+/+} and *tg2*^{-/-} mice. (A) Confocal images of retina stained with isolectin-B4 from P7 mice. The confocal images are representative of 22 *tg2*^{+/+}- and 20 *tg2*^{-/-}-retinas analyzed in 3 independent experiments. Vascular area was quantified for *tg2*^{+/+} or *tg2*^{-/-}. Graphs represent the mean values ± SD (N=3 independent experiments, 20 to 22 retinas analyzed, Mann-Whitney *U* test). NS: no significant difference. (B) TG2 expression in mouse aorta. TG2 was detected by immunofluorescence in aortic sections of 9-weeks *tg2*^{+/+} and *tg2*^{-/-} littermates. Elastic fibers were detected by autofluorescence (A: Adventitia; M: Media; E: Endothelium). The images are representative of 3 slices obtained from 2 *tg2*^{+/+}- or *tg2*^{-/-}-aortas. Scale bar, 25 μm.

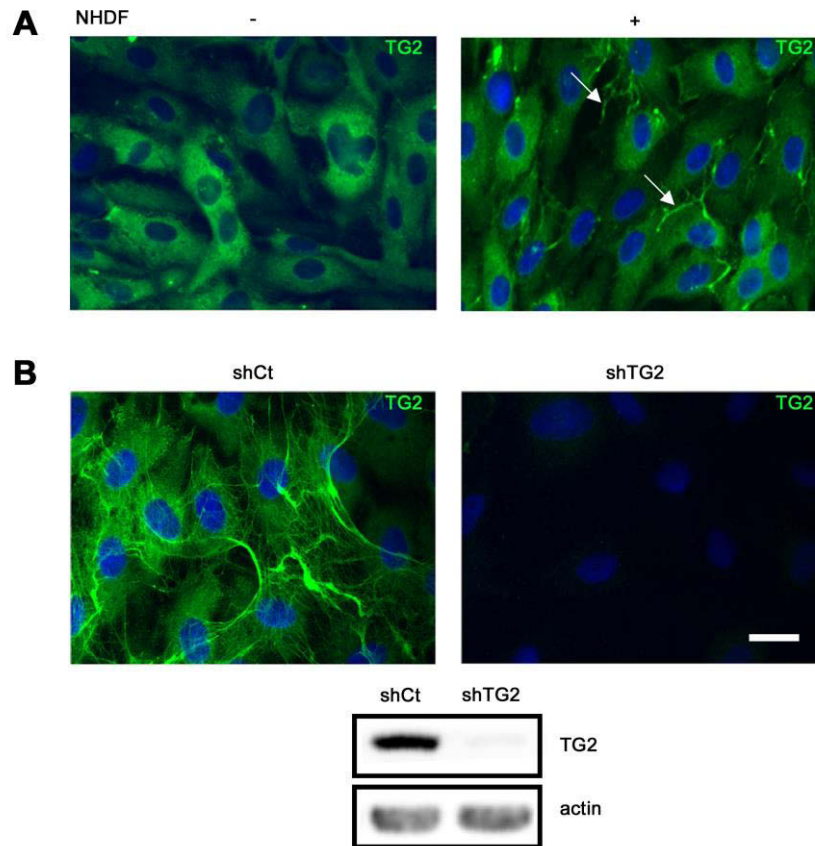


Fig. S2. TG2 accumulation in ECM and TG2 silencing in endothelial cells. (A) TG2 accumulation in ECM generated by HUVECs that were co-cultured with NHDFs. The confocal images are representative of 6 images obtained from 2 independent experiments. TG2 deposition in the ECM was analyzed by immunofluorescence of cells co-cultured without (-) or with (+) NHDFs for 3 days. Arrows indicate extracellular TG2 in the ECM. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar, 20 μ m. (B) TG2 abundance in control (shCt) or TG2-silenced (shTG2) HUVECs. TG2 silencing was analyzed by immunofluorescence (upper) and immunoblot (lower) of cell lysate of cells grown for 5 days. Actin was used as a loading control. The confocal images and immunoblots are representative of 20 or more technical replicates obtained from 10 or more independent experiments. Scale bar, 20 μ m.

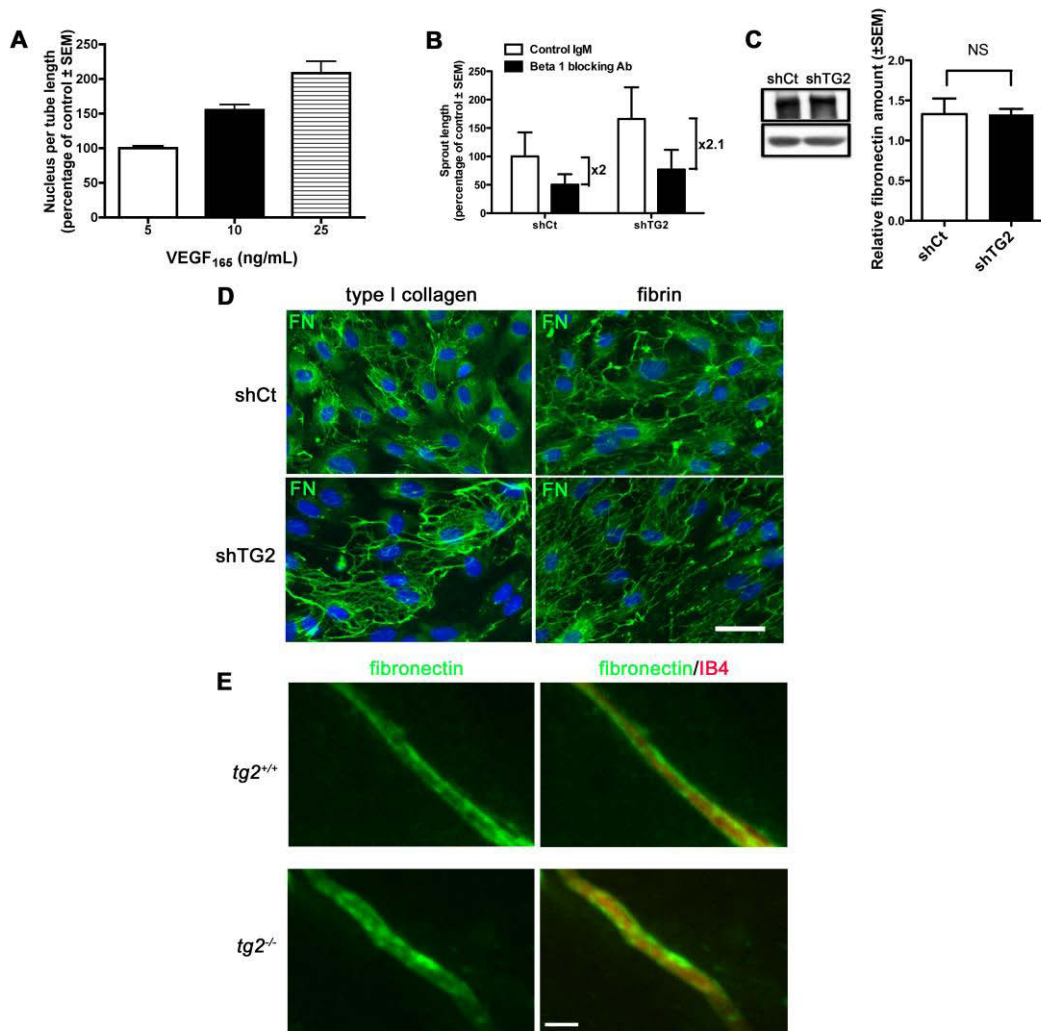


Fig. S3. Proliferation, $\beta 1$ integrin-mediated sprouting, and fibronectin abundance and deposition in TG2-silenced endothelial cells. (A) Number of nuclei was quantified in sprouts from HUVECs in fibrin gels containing increasing concentrations of VEGF₁₆₅ and calculated as percentage of values from 5 ng/mL VEGF₁₆₅. Graph represents the mean of values \pm SEM (N=2 independent experiments, 24 to 48 sprouts analyzed, Mann-Whitney *U* test). (B) $\beta 1$ integrin-dependent sprouting. Control (shCt) or TG2-silenced (shTG2) HUVECs seeded on Cytodex beads were cultured with either 10 μ g/mL control IgM (Control IgM) or 10 μ g/mL $\beta 1$ integrin blocking antibody (Beta1 blocking Ab). Mean of total length of sprouts per bead was normalized

to the mean of shCt treated with control IgM. Graph represents the mean of normalized values \pm SEM. The fold values (x2 and x2.1) represent the ratio between control IgM and β 1 blocking Ab conditions for shCt and shTG2, respectively (N=4 independent experiments, 71 to 97 sprouts analysed, Mann-Whitney *U* test). **(C)** Fibronectin protein was detected by immunoblot in total lysates of shCt and shTG2 HUVECs cultured for 4 days (top panel). Actin was used as a control (bottom panel). Immunoblot was representative of 3 independent experiments. Relative amount is the ratio of fibronectin on actin normalized to the maximal ratio. Graphs represent the mean of values \pm SEM (N=3 independent experiments, Mann-Whitney *U* test). NS: no significant difference. **(D)** Fibronectin deposition was analyzed by immunofluorescence on cells cultured in 2D. Nuclei were stained with DAPI. The confocal images are representative of 4 technical replicates obtained from 5 independent experiments. Scale bar, 20 μ m. **(E)** Fibronectin deposition was analyzed by immunofluorescence performed on aortic ring sprouts from *tg2*^{+/+} and *tg2*^{-/-} mice. Endothelial cells were stained with isolectin-B4. The images are representative of 2 to 4 technical replicates obtained from 5 *tg2*^{+/+}- or *tg2*^{-/-}-rings. Scale bar, 100 μ m.

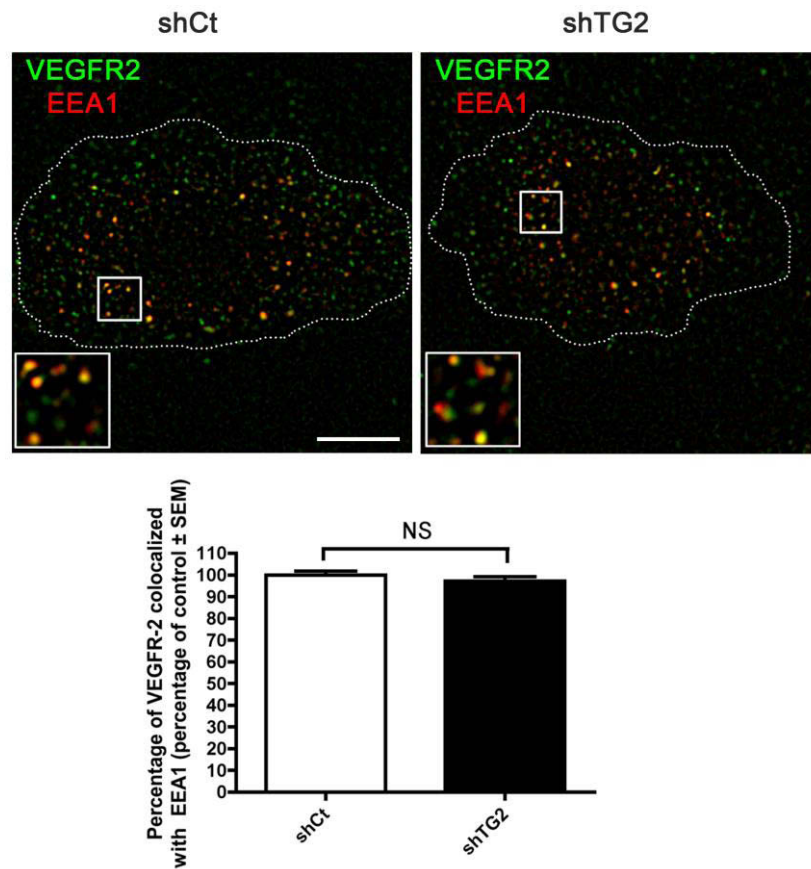


Fig. S4. VEGFR2 internalization in response to VEGF₁₆₅. Confocal images showing colocalization of VEGFR2 (green) and EEA1 (red) in endosomes in control (shCt) and TG2-silenced (shTG2) HUVECs after 5 minutes stimulation with 50 ng/ml VEGF₁₆₅ (N=3 independent experiments, 141 to 164 cells analyzed, Student's *t*-test). NS: no significant difference. Scale bar, 20 μ m.

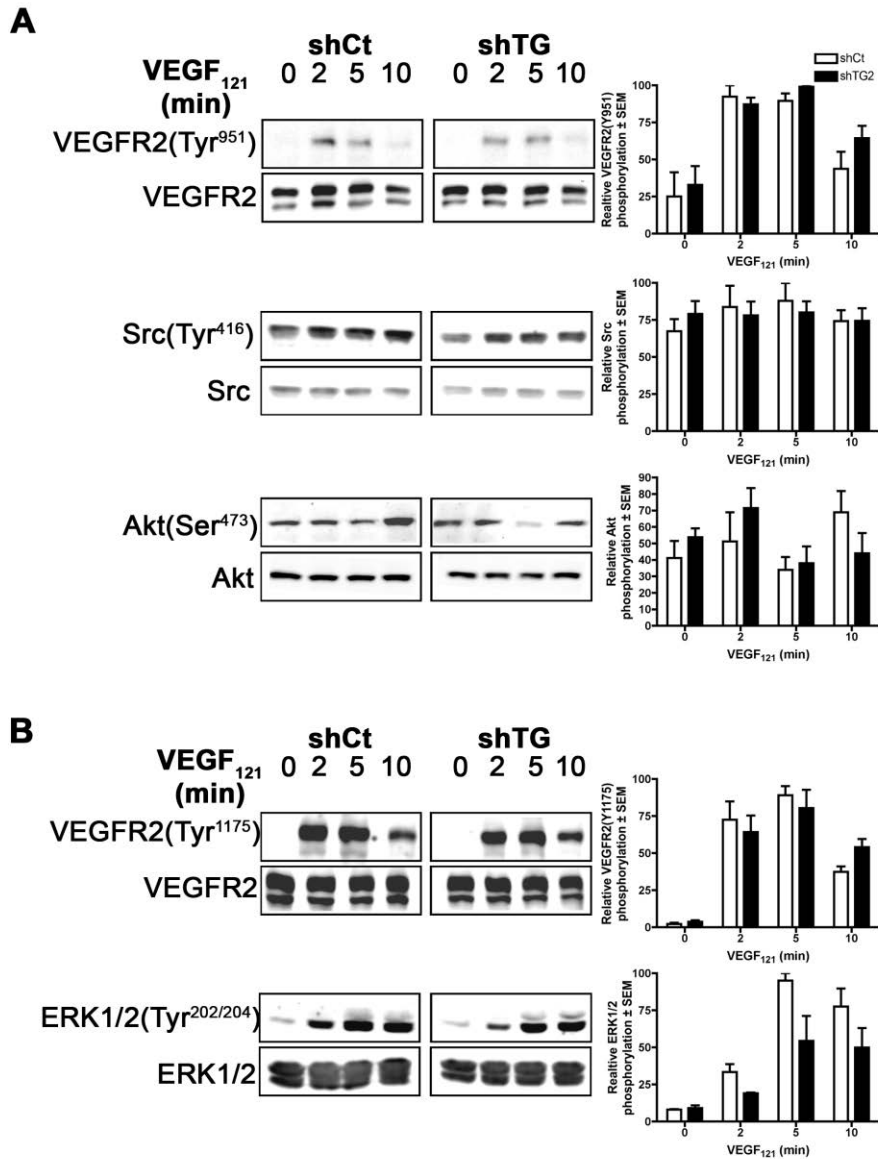


Fig. S5. TG2 silencing does not affect VEGF₁₂₁-induced signaling. Relative phosphorylation is the ratio of phosphorylated to total protein. Ratios were normalized by calculating them as percentages of the maximal ratio. Graphs represent the mean of values ± SEM. **(A)** Phosphorylation of VEGFR2 at Tyr⁹⁵¹, Src and Akt. **(B)** Phosphorylation of VEGFR2 at Tyr¹¹⁷⁵ and ERK1/2 (N=4 independent experiments, Welch's *t*-test).

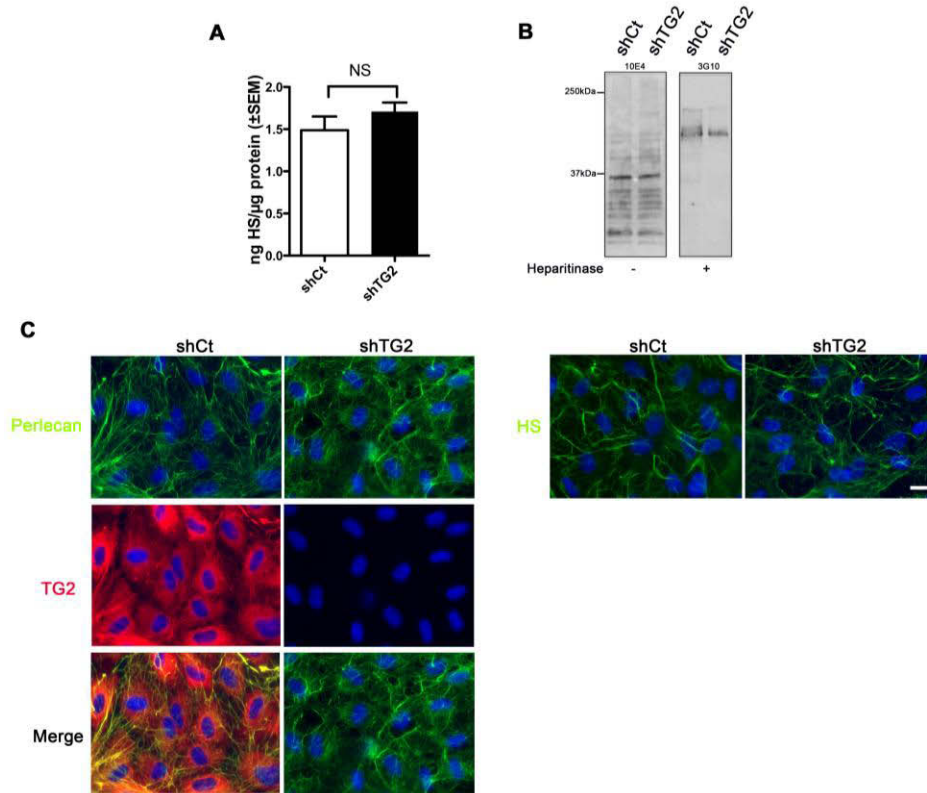


Fig. S6. HS content and deposition. (A) Quantification of total sulfated glycosaminoglycans in control (shCt) and TG2-silenced (shTG2) HUVECs (N=4 independent experiments, Mann-Whitney *U* test). NS: no significant difference. (B) Nontreated (-) and heparitinase digested (+) HSPGs from total cell lysates of control and TG2-silenced cells grown for 5 days and analyzed by immunoblotting with 10E4 and 3G10 antibodies. 10E4 recognizes an epitope including N-sulfated glucosamine residues present in many human HS chains. 3G10 recognizes human HS neo-epitope, namely desaturated hexuronate present at the non-reducing end of HSPGs after heparitinase digestion. Immunoblots are representative of 3 independent experiments. (C) Deposition of perlecan and TG2 (TG2) and colocalization (merge) or deposition of HS-bearing components (HS) were analyzed by immunofluorescence in control and TG2-silenced cells grown for 4 days. Nuclei were stained with DAPI. The confocal images are representative of 3 independent experiments. Scale bar, 20 μ m.

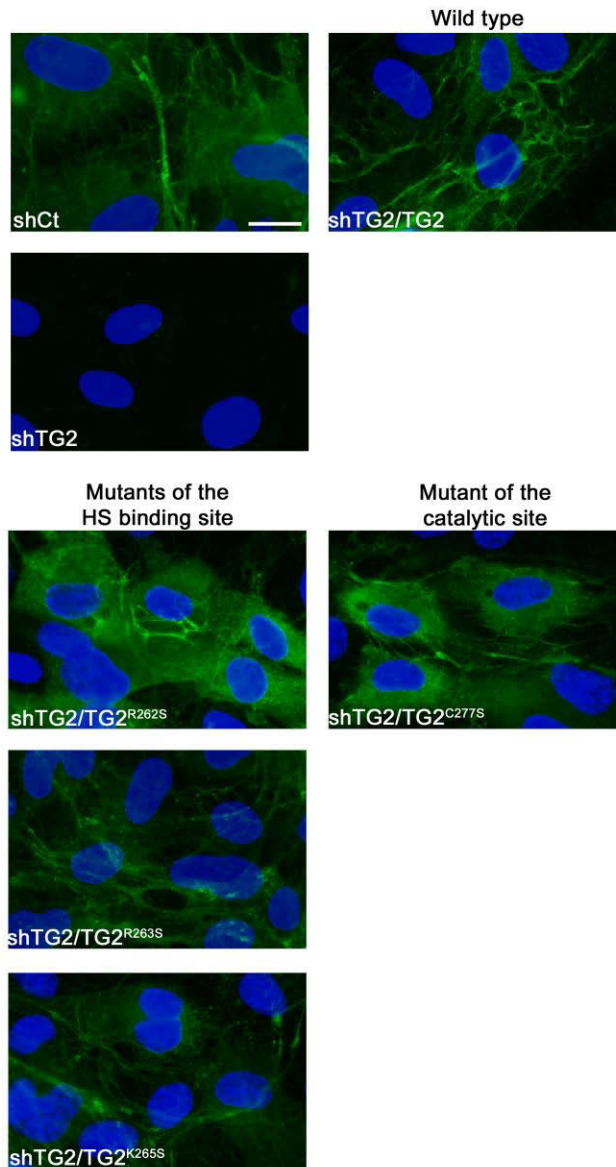


Fig. S7. Re-expression of wild-type and mutant TG2 in TG2-silenced endothelial cells.

Control (shCt) and TG2-silenced (shTG2) HUVECs were shown as controls. Re-expression of wild-type TG2 (TG2) or forms of TG2 with mutations in the heparan sulfate (HS) binding site (TG2^{R262S}, TG2^{R263S}, TG2^{K265S}) or the catalytic site (TG2^{C277S}) in shTG2 HUVECs was analyzed by immunofluorescence. Nuclei were stained with Dapi. The confocal images are representative of 3 independent experiments. Scale bar, 20 μ m.