



HAL
open science

Rôle de la thrombospondine 1 dans la progression et la dissémination du cancer du sein

Julie Tenet

► **To cite this version:**

Julie Tenet. Rôle de la thrombospondine 1 dans la progression et la dissémination du cancer du sein. Cancer. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2016. Français. NNT : 2016TOU30328 . tel-01701316

HAL Id: tel-01701316

<https://theses.hal.science/tel-01701316>

Submitted on 5 Feb 2018

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Melle TENET Julie

le vendredi 9 septembre 2016

Titre :

Rôle de la Thrombospondine 1 dans la progression et la dissémination du cancer du sein.

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Cancérologie

Unité de recherche :

Inserm 1037- CRCT Equipe 5

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr Florence Cabon

Jury :

Pr Jean-Pierre DELORD Président
Dr Fatima METCHA-GRIGORIOU Rapporteur
Dr Jean-Jacques FEIGE Rapporteur
Dr Patrick MELHEN Rapporteur

FAIS DE TA VIE UN REVE ET D'UN REVE UNE REALITE.

ANTOINE DE SAINT EXUPERY

REMERCIEMENT

Le travail de synthèse que nécessite la rédaction d'une thèse est long et difficile, mais à présent que je me retrouve face à mes remerciements, je me sens toute aussi perdue. Je suis convaincue que je n'aurais jamais pu réaliser cette thèse sans la présence et le soutien de nombreuses personnes. Je vais donc commencer par dire un grand Merci à toutes les personnes qui ont cru en moi et qui m'ont permis d'arriver au bout de cette thèse.

En premier lieu je souhaite exprimer ma gratitude à tous les membres du Jury, le Pr **Jean Pierre Delord**, le Dr **Fatima Mechta-Grigoriou**, le Dr **Jean-Jacques Feige** et le Dr **Patrick Melhen**, de s'être rendu disponible pour juger ce travail et pour leurs commentaires enrichissants.

Mes remerciements vont également aux membres de mon comité de thèse, **Valérie Lobjois** et **Claire Racaud**, pour leur gentillesse et leurs conseils scientifiques.

Je tiens à remercier, **Florence Cabon**, ma directrice de Thèse, pour la confiance qu'elle m'a accordée en acceptant d'encadrer ce travail doctoral, pour sa rigueur scientifique, sa pédagogie, mais surtout pour son fabuleux enthousiasme qui m'a permis même dans les moments les plus difficiles de ne jamais baisser les bras. L'idée de voler de ses propres ailes est un peu effrayante, mais à ses côtés, j'ai l'impression d'avoir grandi, d'avoir acquis une certaine confiance en moi.

Je souhaite également remercier l'équipe 5 du CRCT qui m'a accueilli, accompagné et beaucoup appris durant cette thèse. Plus particulièrement, **Hervé Prats**, mon chef d'équipe, pour avoir réussi l'exploit de me faire aimer la Biologie Moléculaire, mais aussi pour m'avoir transmis une partie de son savoir lors de discussions souvent épiques, **Coco** pour nos échanges littéraires et nos discussions, **Morgane** pour son sourire et sa douceur, **Christian** pour ses conseils avisés, ses blagues mémorables et sa gentillesse extrême, **Kathy** l'italienne au cœur d'or cachée derrière un caractère bien trempé, pour m'avoir soutenu et nourrit durant ces trois ans de délices sucrés. Merci à mon petit stagiaire **Raphaël** (pas si petit que ça en fait) qui a essuyé les plâtres de mes premiers pas en tant qu'encadrante avec beaucoup d'humour, **Raouia** pour toutes nos rigolades, nos réunions secrètes, nos goûts musicaux identiques mais surtout pour ton soutien, ta gentillesse, ta joie de vivre et ton rire que je n'oublierais jamais, j'ai vraiment découvert une amie et enfin **GuiGui**, sans toi ma thèse n'aurait pas eu la même saveur, dans les bons comme dans les moins bons moments, on a vraiment été une équipe de choc. Merci de m'avoir fait découvrir ton univers fantastique, tes expériences culinaires, tes morceaux de musique douteux et tes répliques dont je ne peux plus me passer mais aussi pour ton optimisme sans faille et ta discrétion.

Sans oublier les autres équipes de recherche du CRCT et de l'ITAV, merci pour les différents échanges et collaborations que nous avons pu avoir, plus particulièrement **Bernard**, **Valérie**, **Martine**, **Odile**, **Anaïck**,

Marine, Olivier et Thibault avec qui j'ai passé six mois formidables lors du début de mon projet en stage de Master 2, **Julie** et **Célia** mes cop's du master cancérologie, **Julia, Manon** pour leur gentillesse, **Dorian** mon « voisin de labo » pour nos discussions matinales très animées et nos moments de complicité, **Sabrina** et **Aurore** mes médecins préférées qui m'ont donné le courage de sauter le pas vers mon prochain défi.

Mes remerciements vont également à la TEAM Selexel, pour avoir toujours été là pour moi même si je n'en faisais pas partie « officiellement », **Hillary** et son français impeccable, pour sa gentillesse et son oreille attentive, **Elie** pour m'avoir fait découvrir et commencer à aimer l'immunologie, **Maud** la reine de l'in vivo, qui a eu beaucoup de patience et de pédagogie pour m'apprendre à manipuler les petites souris et plus particulièrement, **Stéphanie** pour tous nos repas du midi défouloirs et nos papotages à l'infini, pour tes nombreux conseils, ton optimisme et ta franchise.

De même, je remercie l'équipe E2C de Sanofi, plus particulièrement **Gigi, Cécile, Caroline** et **Valérie** pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche, mais surtout de m'avoir donné l'envie d'en faire!

Ma reconnaissance va à celles et ceux qui ont plus particulièrement assuré le soutien affectif durant cette thèse. Ma **Lorette**, ma petite sœur de cœur, merci d'être toujours été là avec ton sourire et ta douceur. Je peux dire que j'aime presque autant l'Aveyron que le Gers grâce à toi. **Marina** pour tous nos fabuleux moments passés ensemble mais aussi de m'avoir bousculé quand c'était nécessaire, **Delphine** pour être toujours été présente même si un océan nous sépare, **Justine**, pour ta gentillesse et pour avoir pris soin de moi lors de nos moments détente qui étaient pour moi des bouffées d'air, **Mandine**, merci de ne pas m'avoir fait mentir et d'être toujours là 18 ans après, de ne jamais me juger et d'être toujours honnête.

Marie Claude et Alain merci de votre affection et de m'avoir appris à ne jamais renoncer à ses rêves mêmes les plus fous, **Christine** merci de me montrer la voie, de me donner la force d'affronter les aléas de la vie et surtout de m'apprendre à profiter de chaque instant. **Dominique, Marie Claude, Emmanuelle, Martine et Jean Louis** merci de votre soutien et de vos encouragements.

Merci à **ma belle famille**, de m'avoir soutenu et d'avoir été là quand j'en ai eu besoin.

Merci à **ma famille**, toujours bienveillante et unie qui m'a entouré durant les dures épreuves de la vie, je ne vous remercierai jamais assez d'être toujours là. Un merci tout particulier à **mes grands parents Michel, Claude, Marie-Hélène, Camille** et **Jacqueline**.

Tontontoumet, mon papa d'adoption, mon roc, mon refuge, merci de tant m'apporter et me donner. Ma petite **Maman**, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir soutenu quoiqu'il se passe, de m'avoir permise d'en être là aujourd'hui et d'avoir été mon repère. Ton courage et ton abnégation ont été pour moi un modèle. **Mon Guillaume**, merci de m'avoir supporté et aidé durant cette période pas toujours facile, merci de

faire ressortir le meilleur de moi-même en me poussant toujours à faire mieux, mais surtout merci de partager ma vie et d'en faire un bonheur chaque jour.

Spéciale dédicace pour mon **papa**, merci de m'avoir donné le goût du travail et de l'exigence, j'espère que tu es fier aujourd'hui.

Un dernier Merci du plus profond de mon cœur, je n'aurais rien fait de tout cela sans votre amour.

Je tourne une page et j'en ouvre une autre : vivement la suite !

RÉSUMÉ

Les métastases sont à l'origine dans 90% des cas du décès des patients et sont donc un enjeu thérapeutique majeur. Les traitements anti-angiogéniques qui inhibent la vascularisation tumorale et augmentent l'hypoxie, ont une efficacité limitée en clinique. Cette inefficacité pourrait être une conséquence de l'hypoxie. En effet, des liens ont été établis entre l'hypoxie et le changement métabolique des cellules tumorales, l'augmentation des cellules souches cancéreuses, la transition épithélio-mésenchymateuse et la résistance aux traitements. Des arguments expérimentaux et cliniques suggèrent que l'hypoxie pourrait directement induire la dissémination métastatique.

Ces observations nous ont poussés à réévaluer le rôle de l'hypoxie dans la dissémination métastatique en nous focalisant sur l'étude du premier inhibiteur endogène de l'angiogenèse identifié, la Thrombospondine 1 (TSP1). La TSP1 est également un activateur du TGF β latent.

L'objectif de ce travail a été d'étudier le rôle de la TSP1 dans la progression et la dissémination tumorale du cancer du sein métastatique. En clinique, nous avons observé que l'expression de la TSP1 est corrélée aux marqueurs d'agressivité et qu'elle augmente avec le grade tumoral.

Dans un modèle orthotopique de tumeurs mammaires métastatiques, nous avons montré que l'inhibition de la TSP1 réduit fortement l'EMT, l'invasion et les métastases pulmonaires alors même que la vascularisation de la tumeur primaire est densifiée et plus fonctionnelle, réduisant l'hypoxie. Pour déterminer le rôle de la TSP1 dans la survenue des métastases, nous avons effectué des mutations ponctuelles de ce gène dans le domaine d'activation du TGF β ou dans celui de la liaison au CD36 qui médie majoritairement les propriétés anti-angiogéniques de la TSP1. La mutation de l'une ou l'autre de ces séquences entraîne une diminution drastique des métastases pulmonaires, ce qui confirme l'importance du TGF β dans la dissémination métastatique. Nos résultats établissent également un lien direct entre l'hypoxie et les métastases : l'inactivation des propriétés anti-angiogéniques de la TSP1, qui augmente la perfusion tumorale et diminue fortement l'hypoxie sans modifier la croissance des tumeurs primaires, bloque la dissémination métastatique alors même que les cellules ont la capacité de migrer.

Ce travail nous conduit à proposer un nouveau concept thérapeutique, visant à normaliser la vascularisation tumorale et à réduire l'hypoxie par une stratégie "anti-antiangiogénique" basée sur l'inhibition de la TSP1. Cette stratégie devrait inhiber la dissémination métastatique et favoriser la pénétration des traitements chimiothérapeutiques et augmenter l'efficacité de la radiothérapie, dépendante de la présence d'oxygène.

ABSTRACT

Metastasis are responsible for 90% of cases of patients death and so represent a major therapeutic challenge in oncology. Anti-angiogenic treatments, which inhibit tumor vascularization and increase hypoxia, have limited clinical efficiency. This inefficiency could be a consequence of hypoxia. Indeed, links have been established between hypoxia and: metabolic changes in tumor cells, increase in cancer stem cells, epithelial-mesenchymal transition and resistance to treatment. Experimental and clinical evidence also suggest that hypoxia may directly induce metastatic dissemination.

These observations led us to reassess the role of hypoxia in metastatic dissemination by focusing on the study of the first identified endogenous angiogenic inhibitor, the Thrombospondin 1 (TSP1). TSP1 is also an activator of latent TGF β .

The aim of this work was to study the role of TSP1 in tumor progression and dissemination of metastatic breast cancer. In clinic, we observed that the expression of TSP1 is correlated with markers of aggressiveness and that it increases with tumor grade.

In an orthotopic model of metastatic breast tumors, we have shown that inhibition of TSP1 strongly reduce EMT, invasion and lung metastasis meanwhile the vascularization of the primary tumor is densified and more functional, thus reducing hypoxia. To determine the role of TSP1 in the occurrence of metastasis, we generate point mutations of this gene in TGF β activation domain or in the binding domain to CD36 that predominantly mediates the anti-angiogenic properties of TSP1. Mutations of either of these sequences result in a drastic decrease in lung metastasis, which confirms the importance of TGF β in metastatic dissemination. Our results also demonstrate a direct link between hypoxia and metastasis: the inactivation of anti-angiogenic properties of TSP1, which increases tumor perfusion and decreases hypoxia without affecting primary tumor growth, blocks metastatic dissemination even though the cells have the ability to migrate.

This work led us to propose a new therapeutic concept aiming to normalize tumor vascularization and reduce hypoxia by an "anti-antiangiogenic" strategy based on TSP1 inhibition. This strategy should inhibit metastatic spreading, promote the diffusion of chemotherapeutic treatments and increase the efficiency of radiotherapy, dependent on oxygen presence.

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
I - DONNEES GENERALES SUR LES CANCERS	1
II - PROCESSUS METASTATIQUE	3
1 - Intravasation	3
2 - Survie dans la circulation	6
3 - Extravasation	8
4 - Colonisation d'un nouveau tissu	10
III - ANGIOGENESE TUMORALE	11
1 - Définition et historique	11
2 - Régulation de l'angiogenèse	12
a. Facteurs pro-angiogéniques	13
b. Facteurs Anti-angiogéniques	14
3 - Vascularisation tumorale	15
a. Switch angiogénique	15
b. Mécanismes de formation des vaisseaux tumoraux	17
c. Aspect et fonctionnalité de la vascularisation tumorale	18
IV - TRAITEMENTS ANTI-ANGIOGENIQUES	28
1 - Mode d'action	28
2 - Résistances	29
3 - Efficacité clinique	30
4 - Concept de normalisation vasculaire	32
5 - Induction de l'invasion	33
V - HYPOXIE TUMORALE	35
1 - Stress cellulaire	35
2 - Modification de l'agressivité cellulaire	35
a. Adaptation du métabolisme	35
b. Les cellules souches cancéreuses	37
c. Transition épithélio-mésenchymateuse	38
d. Résistances aux traitements	38
VI - LA THROMBOSPONDINE 1	40
1 - Définition	40
2 - Les principaux domaines et récepteurs de la TSP1	41

3 - Les fonctions majeures de la TSP1	42
a. Propriété anti-angiogénique	43
b. Adhésion/dé-adhésion et migration cellulaire	44
c. Activation du TGFβ latent	45
4 - Expression de la TSP1 dans le cancer	47

SUJET DE THESE :

<u>ROLE DE LA TSP1 DANS LA PROGRESSION ET LA DISSEMINATION DU CANCER DU SEIN</u>	49
---	-----------

<u>RESULTATS</u>	51
-------------------------	-----------

<u>DISCUSSION GENERALE</u>	102
-----------------------------------	------------

I - STRATEGIES ANTI-ANGIOGÉNIQUES	102
--	------------

II - ROLE DE L'HYPOXIE TUMORALE	103
--	------------

III - ROLE DE LA TSP1 DANS LA PROGRESSION ET LA DISSEMINATION METASTATIQUE	103
---	------------

IV - INDUCTION DE LA DISSEMINATION METASTATIQUE PAR L'HYPOXIE	106
--	------------

V - NORMALISATION VASCULAIRE	107
-------------------------------------	------------

VI - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	107
---	------------

<u>REFERENCES</u>	109
--------------------------	------------

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Nombre de cas et de décès par cancer par localisation en 2012 chez l'homme et chez la femme en France. (Institut national du cancer).....</i>	<i>1</i>
<i>Figure 2 : Taux d'incidence et de mortalité standardisés entre 1980 et 2012. (Institut national du cancer).....</i>	<i>2</i>
<i>Figure 3 : Modifications cellulaires intervenant au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). Modifié de (Lamouille et al. 2014).....</i>	<i>4</i>
<i>Figure 4 : Différentes techniques d'enrichissement des CTC. (Alix-Panabieres and Pantel 2014).....</i>	<i>7</i>
<i>Figure 5 : Sites métastatiques des cancers solides les plus souvent observés. (Nguyen et al. 2009)</i>	<i>8</i>
<i>Figure 6 : Différence de structures des vaisseaux en fonction des organes. (Nguyen et al. 2009)</i>	<i>9</i>
<i>Figure 7 : Formation de la vascularisation mature lors du développement embryonnaire. (Carmeliet 2003).....</i>	<i>12</i>
<i>Figure 8 : La balance angiogénique.(Zetter 2008).....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 9 : Famille des protéines VEGFs et leurs récepteurs. (Ellis and Hicklin 2008)</i>	<i>14</i>
<i>Figure 10 : Switch angiogénique. (Bergers and Benjamin 2003).....</i>	<i>16</i>
<i>Figure 11 : Différents mécanismes de formation des vaisseaux. (Carmeliet and Jain 2011).....</i>	<i>17</i>
<i>Figure 12 : Comparaison de la vascularisation normale et tumorale. (Jain 2005)</i>	<i>18</i>
<i>Figure 13 : Molécules anti-angiogéniques approuvées et leurs indications. (Jayson et al. 2016)</i>	<i>30</i>
<i>Figure 14 : Concept de normalisation vasculaire. (Gerstner et al. 2009)</i>	<i>32</i>
<i>Figure 15 : Résumé schématique des différents mécanismes d'adaptation tumorale en réponses aux inhibiteurs de l'angiogénèse. (Paez-Ribes et al. 2009).....</i>	<i>33</i>
<i>Figure 16 : Imagerie de suivi d'un patient atteint d'un glioblastome avant et après traitement par le bevacizumab (anticorps dirigé contre le VEGF). (Ellis and Reardon 2009).....</i>	<i>34</i>
<i>Figure 17 : Représentation schématique de la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie, et la glycolyse aérobie (effet Warburg). (Vander Heiden et al. 2009).....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 18 : Structures et domaines protéiques des membres de la famille des Thrombospondines (Jeong 2015)</i>	<i>40</i>
<i>Figure 19 : Relation structure-fonction de la TSP1. (Henkin and Volpert 2011).</i>	<i>41</i>
<i>Figure 20 : Modèle d'activation du TGFβ par la TSP1. (Sweetwyne and Murphy-Ullrich 2012)</i>	<i>46</i>
<i>Figure 21 : Incidence et mortalité estimées des cancers chez la femme en France métropolitaine en 2011. (D'après l'institut national du cancer 2015).</i>	<i>51</i>
<i>Figure 22 : Influence du grade tumoral sur la survie globale. (Elston and Ellis 2002)</i>	<i>52</i>
<i>Figure 23 : Définitions des sous-types intrinsèques du cancer du sein. (Senkus et al. 2015).....</i>	<i>53</i>
<i>Figure 24 : Courbe de Kaplan Meier de la survie globale en fonction des différents sous types histologiques intrinsèques. Modifié de (Sørli et al. 2001).....</i>	<i>53</i>

ABREVIATIONS

aSMA : alpha smooth muscle actin
ADN : Acide Desoxyribonucléique
ARN : Acide Ribonucléique
ATP : Adénosine Tri Phosphate
CAIX : Anhydrase Carbonique 9
CSC : Cellules souches cancéreuses
CTC : Cellules Tumorales Circulantes
cG : guanylate cyclase
cGMP : Cycline Guanosine Monophosphate
cGK : kinase cGMP-dépendante
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EMT : Transition Epithélio-Mésenchymateuse
FGF : Fibroblast Growth Factor
HIF1a: Hypoxia Inductible Factor 1 alpha
HSPG : Protéoglycanes Héparanes sulfates
IAP : Integrin Associated Protein
IFL : Irinotecan, Fluorouracil, Leucovorin
KO : Knock Out
LDH-A : lactate déhydrogénase A
LRP1 : Low density lipoprotein receptor related protein
MET : Transition Mésenchymo-Epithéliale
MMPs : Métalloprotéases Matricielles
MAP : Mitogen Activated Protein
NO : monoxyde d'azote
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide
OS : Overall Survival
PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor
PFS : Progression Free Survival
PI3K : Phosphoinositide 3 Kinase
PF4 : Platelet factor 4
pVHL : protéine Von Hippel–Lindau
ROS : Reactive Oxygen Species
shRNA : short hairpin RNA

TGF β : Transforming Growth Factor β

TSP1 : Thrombospondine 1

TIMPs : Tissue Inhibitors of Metalloproteinases

TSRs : Thrombospondin type I repeats

TNM Tumor Node Metastasis

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

INTRODUCTION

I - DONNEES GENERALES SUR LES CANCERS

Le cancer est une maladie qui se caractérise par une prolifération anarchique et incontrôlée de cellules anormales, se structurant pour former une masse tumorale au dépend du tissu environnant.

C'est un problème de santé majeur dans le monde. Il représente la première cause de décès en France, 29,72%, selon les données de l'Institut national du cancer.

En 2015, l'incidence des cancers chez les hommes est 1,2 fois supérieure à celle des femmes et leur taux de mortalité est 1,3 fois plus important. Des différences existent entre les hommes et les femmes, notamment sur la localisation des tumeurs. Les cancers causant le plus grand nombre de décès sont le poumon chez l'homme et le sein chez la femme (Figure 1).

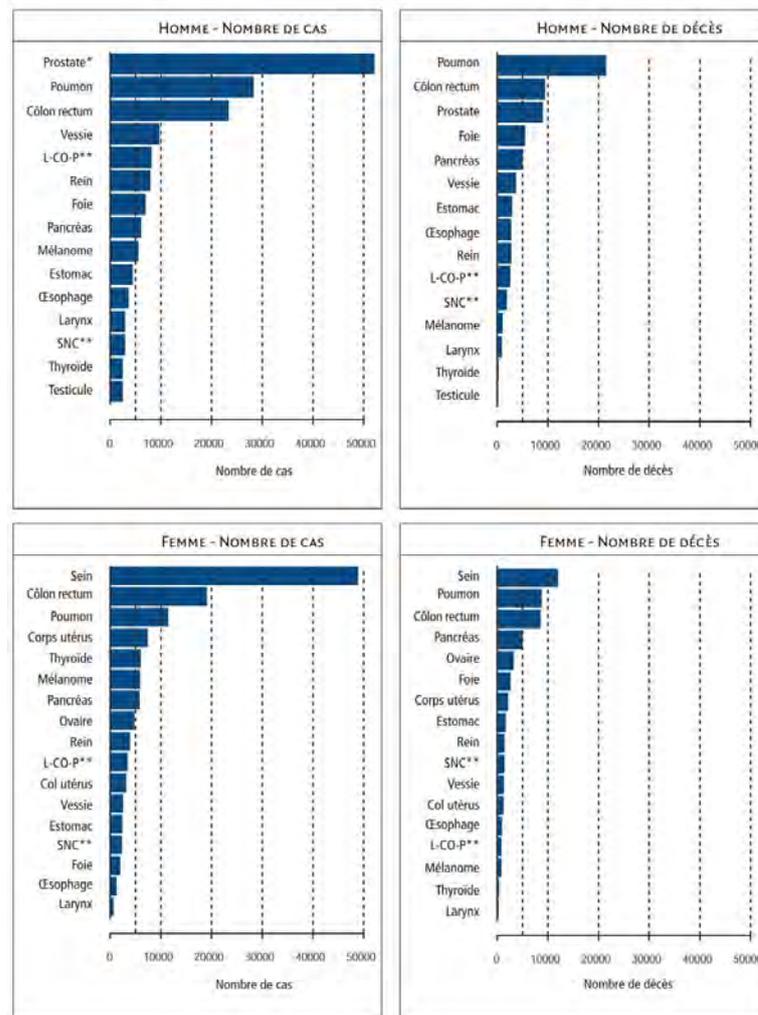


Figure 1 : Nombre de cas et de décès par cancer par localisation en 2012 chez l'homme et chez la femme en France. (Institut national du cancer)

Le nombre de nouveau cas de cancer en France a augmenté de 109% entre 1980 et 2012 alors que le nombre de décès n'a augmenté que de 15% sur la même période (Figure 2).

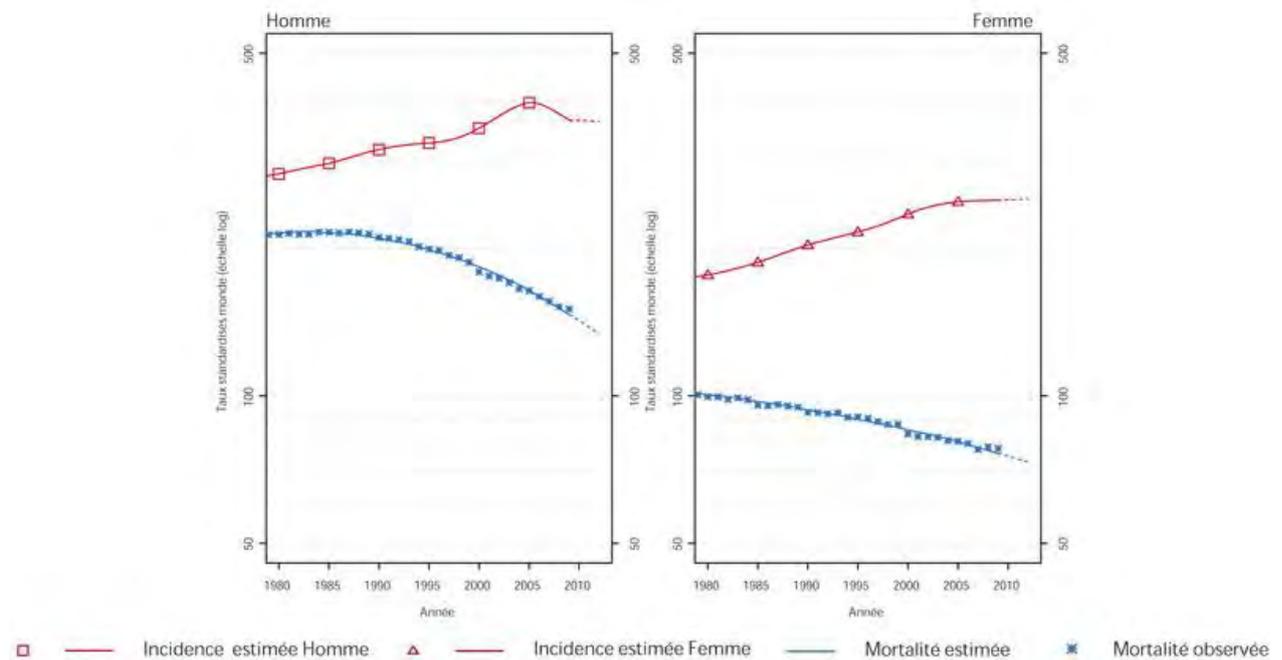


Figure 2 : Taux d'incidence et de mortalité de tous les cancers en France pour 100 000 personnes par années, standardisés par rapport aux taux d'incidence mondiaux, chez l'homme et la femme entre 1980 et 2012. (Institut national du cancer)

Ces chiffres sont le reflet de plusieurs facteurs : une augmentation de l'efficacité des traitements existants, l'apparition de nouveaux traitements (traitements spécifiques d'une mutation, traitements anti-angiogéniques, dernièrement l'immunothérapie) et une augmentation du dépistage précoce qui permet de diminuer fortement la mortalité mais augmente l'incidence apparente.

Malgré ces grandes avancées thérapeutiques, il reste une population de tumeurs qui sont résistantes à tous les traitements disponibles. Ces tumeurs sont particulièrement agressives et le pronostic de survie des patients est sombre, car elles sont capables de disséminer dans l'organisme pour former des tumeurs secondaires appelées métastases. Dans 90% des cas, ce sont les métastases qui causent le décès du patient.

Il est donc indispensable de mieux comprendre les facteurs et les mécanismes impliqués dans la dissémination tumorale pour développer de nouvelles thérapies ciblant ce phénomène.

II - PROCESSUS METASTATIQUE

Le processus métastatique comporte quatre grandes étapes successives, sur lesquelles des travaux récents apportent un nouvel éclairage.

1 - Intravasation

L'intravasation est le passage de la cellule tumorale de la tumeur primaire vers la circulation sanguine ou lymphatique.

La majorité des cancers sont des carcinomes qui se forment à partir de cellules épithéliales. Ces cellules forment l'épithélium qui recouvre la partie externe et interne d'un organe. Elles possèdent une polarité apico-basale qui définit des domaines fonctionnellement et biochimiquement distincts. Elles ont également la particularité d'être reliées les unes aux autres par plusieurs types de jonctions intercellulaires (serrées, adhérentes et communicantes), constituant une barrière qui empêche l'entrée de molécules indésirables ou de pathogènes, tout en laissant passer les molécules essentielles à la vie de l'organe, comme les nutriments. Les marqueurs les plus connus de ces cellules sont les familles des Cadhérines, des Claudines et des Connexines (Takeichi 2014) (Figure 3).

Il est communément admis que pour intravaser, les cellules cancéreuses épithéliales subissent une transition vers un phénotype mésenchymateux appelé transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) (Marcucci et al. 2016). Les cellules mésenchymateuses forment le mésenchyme, tissu de soutien et de réserve des organes. Elles sont caractérisées par une capacité de pluripotence, une faible quantité de jonctions intercellulaires et une polarité « avant arrière » adaptée à la migration/invasion du tissu. La N-Cadhérine, la Vimentine et l'alpha smooth muscle actin (α SMA) sont des marqueurs de ces cellules mésenchymateuses (Lamouille et al. 2014) (Figure 3).

L'idée qu'une cellule épithéliale puisse modifier l'expression de ses gènes pour induire un changement de phénotype et acquérir les caractéristiques d'une cellule mésenchymateuse a émergé dans les années 80 avec des études sur les embryons de poulets (Hay 1995). L'EMT, caractérisée notamment par une diminution de la E-Cadhérine et une augmentation de la N-Cadhérine, joue un rôle majeur dans le développement embryonnaire lors de la gastrulation, la formation du cœur et la fermeture du palais (Revue des Maladies Respiratoires, 2005). Chez l'adulte elle est impliquée dans la réparation tissulaire et la fibrose, notamment rénale et pulmonaire (Thiery 2003; Liu 2004).

Dans la tumeur, lors de l'EMT, la cellule tumorale se détache de l'épithélium en rompant les jonctions cellule-cellule et cellule-matrice, puis remodèle la matrice extracellulaire grâce notamment à l'induction des métalloprotéases matricielles (MMPs) pour progresser dans le tissu (Figure 3) et rejoindre la

circulation sanguine et/ou lymphatique en passant à travers la paroi des vaisseaux (Tam and Weinberg 2013).

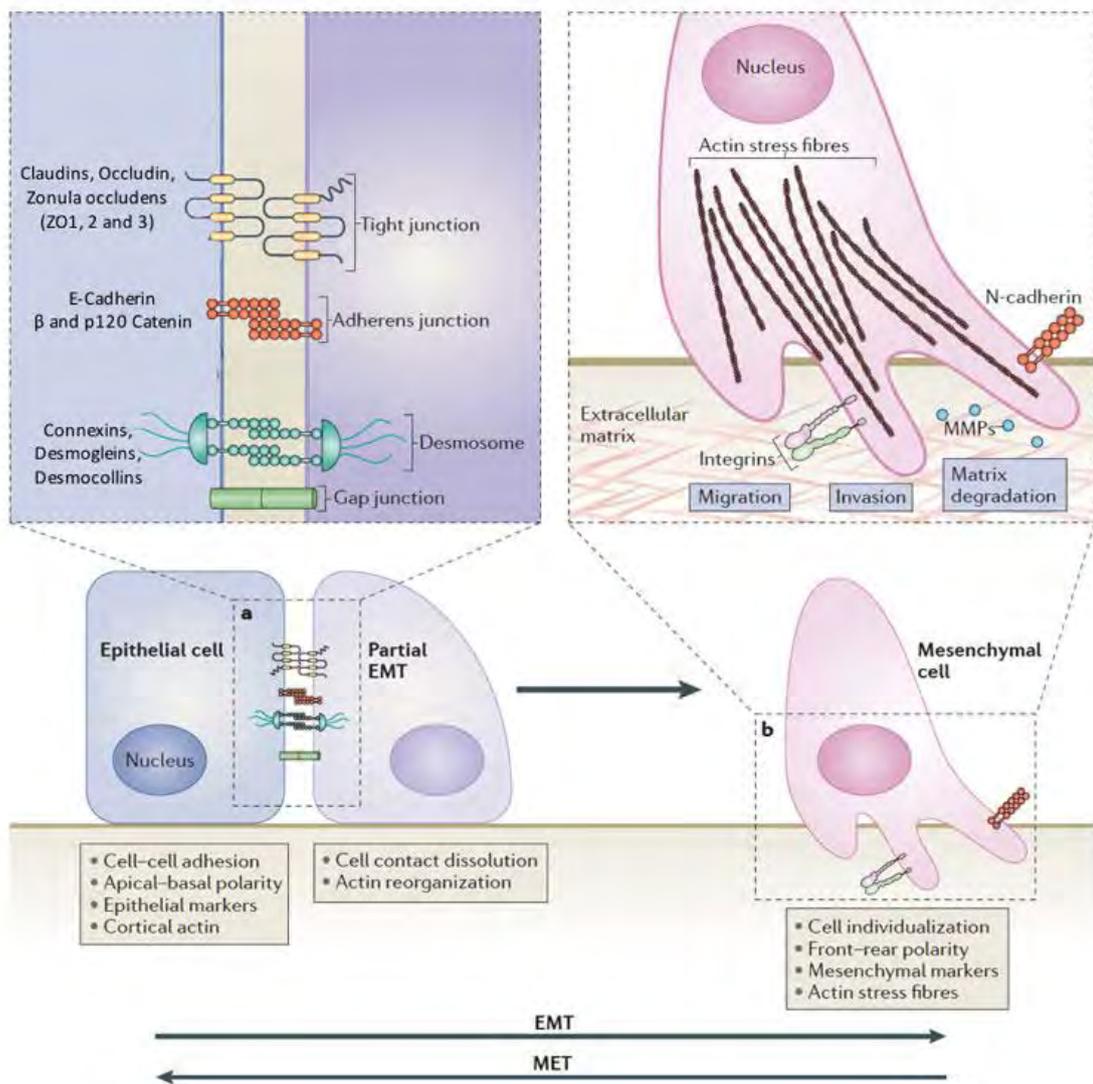


Figure 3 : Modifications cellulaires intervenant au cours de la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT).
Modifié de (Lamouille et al. 2014)

L'inducteur majeur de l'EMT est le Transforming Growth Factor beta (TGF β). Il interagit avec ses récepteurs TGF β RI (ALK5) et TGF β RII et active notamment les voies des PI3K, des SMAD et des protéines RHO, modulant l'expression génique, les changements du cytosquelette et la dissolution des jonctions cellulaires (Akhurst and Hata 2012). D'autres voies d'induction de l'EMT ont été décrites, comme les facteurs de transcription SNAIL, ZEB et TWIST, les glycoprotéines Wnt et Notch, mais également les régulations épigénétiques via l'action de miRNA (Lamouille et al. 2014).

Dans le cas des vaisseaux lymphatiques, le passage des cellules tumorales dans la circulation est facilité par la discontinuité de la lame basale et l'absence de péricytes (Wong and Hynes 2006). La détection de cellules tumorales dans les ganglions drainants la tumeur est un indicateur précoce de dissémination métastatique (Alitalo et al. 2005).

En ce qui concerne la voie sanguine, l'intravasation des cellules tumorales est fortement influencée par la densité vasculaire et la structuration des vaisseaux sanguins. L'absence de péricytes et une hyperméabilité vasculaire favoriseraient l'entrée des cellules dans la circulation (Carmeliet and Jain 2011). La formation des vaisseaux tumoraux par le processus d'angiogenèse tumorale sera détaillée dans la troisième partie. Une forte densité vasculaire a été décrite comme favorisant l'intravasation des cellules tumorales (Tien et al. 2001).

D'après de nombreuses études précliniques, l'EMT est nécessaire à l'intravasation et à l'extravasation des cellules tumorales qui conduisent à la dissémination tumorale dans l'organisme (Wendt et al. 2010; Labelle et al. 2011; Jayachandran et al. 2014; Xu et al. 2015; Zomer et al. 2015). Cependant ce mécanisme est difficile à démontrer et à quantifier en clinique. En effet, l'EMT est un phénomène dynamique entre deux états phénotypiques d'une cellule avec une coexpression de marqueurs épithéliaux et mésenchymateux. De plus, la cellule tumorale est capable de réaliser la transition inverse, c'est à dire passer d'un état mésenchymateux vers un état épithélial. Cette transition est appelée la transition mésenchymo-épithéliale (MET) (Figure 3). Il n'est pas possible sur une biopsie de discriminer les cellules qui s'engagent dans l'EMT de celles qui l'ont déjà réalisé ou de celles qui ont subi une MET (Tam and Weinberg 2013).

Toutefois des études ont montré que certains marqueurs mésenchymateux sont retrouvés en plus grande quantité dans certains sous types de cancers. Par exemple dans le cancer du sein, les marqueurs mésenchymateux : Vimentine, N-Cadhérine, Snail, Slug, Twist sont le plus souvent retrouvés spécifiquement dans le sous-type basal qui correspond au sous-type le plus agressif et de mauvais pronostic. C'est également le cas dans les tumeurs des poumons de hauts grades (Tam and Weinberg 2013).

En revanche dans un travail très récent, les auteurs ont montré dans trois modèles de souris transgéniques de cancers mammaires que les cellules tumorales composant les métastases pulmonaires ont majoritairement un phénotype épithélial et n'ont à aucun moment subi l'EMT durant leur dissémination (Fischer et al. 2015). Les cellules tumorales épithéliales seraient donc capables d'intravaser sans subir une EMT. Ce travail récent n'a cependant pas été confirmé dans d'autres modèles.

2 - Survie dans la circulation

Une fois dans la circulation sanguine, les cellules tumorales circulantes (CTC) n'ont plus de contact avec d'autres cellules ni avec la matrice extracellulaire. Dans une cellule normale, cette perte d'interaction, induit une mort cellulaire programmée, appelée anoïkis (Frisch et al. 2013). Elle joue un rôle clé au cours de l'embryogenèse et permet le maintien de l'homéostasie notamment lors du renouvellement tissulaire par exemple dans l'intestin ou dans la peau (Fouquet et al. 2004). Les cellules tumorales possèdent un contrôle anormal des voies de mort cellulaire et une activation continue des voies de survie, ce qui leur permet de résister à l'anoïkis (Swan et al. 2003; Simpson et al. 2008). C'est particulièrement le cas pour les cellules tumorales ayant subi l'EMT (Yu et al. 2013).

Par ailleurs, les CTC déclenchent une agrégation plaquettaire ayant pour conséquence la formation d'embolus néoplasiques, recréant des interactions cellule-cellule. Ces embolus permettraient aux cellules tumorales de se protéger des chocs contre la paroi des vaisseaux, des forces de cisaillement dues à la forte pression du flux sanguin et de leur reconnaissance et destruction par le système immunitaire (Nieswandt et al. 1999). En accord avec cela il a été mis en évidence que la déplétion de la glycoprotéine Ib α , exprimée à la surface des plaquettes et qui joue un rôle majeur dans leur agrégation avec les cellules tumorales, diminue de dix-neuf fois le nombre de foyers métastatiques dans les poumons (Jain et al. 2007).

L'étude des CTC est en plein essor car le nombre de CTC a une valeur pronostique dans certains cancers. L'abondance des CTC est corrélée à la progression et à la dissémination tumorale dans le cancer du sein, de la prostate, du poumon et du cancer colorectal. La quantification et la caractérisation phénotypique des CTC sont actuellement utilisées comme marqueur dans plus de 270 essais cliniques. Elles sont également utilisées pour la classification Tumor Node Metastasis (TNM) sous le sigle MO(i+), dans le cancer du sein, mais ne sont pas encore utilisées pour le choix du traitement (Alix-Panabieres and Pantel 2014).

De plus en plus de techniques permettent maintenant de quantifier les CTC et de les isoler, soit par leur propriétés biologiques (sélection positive grâce à des marqueurs spécifiques ou sélection négative en éliminant toutes les autres cellules présentes dans le sang) soit par leurs propriétés physiques, leur taille étant plus importante que celles des autres cellules sanguines (Figure 4).

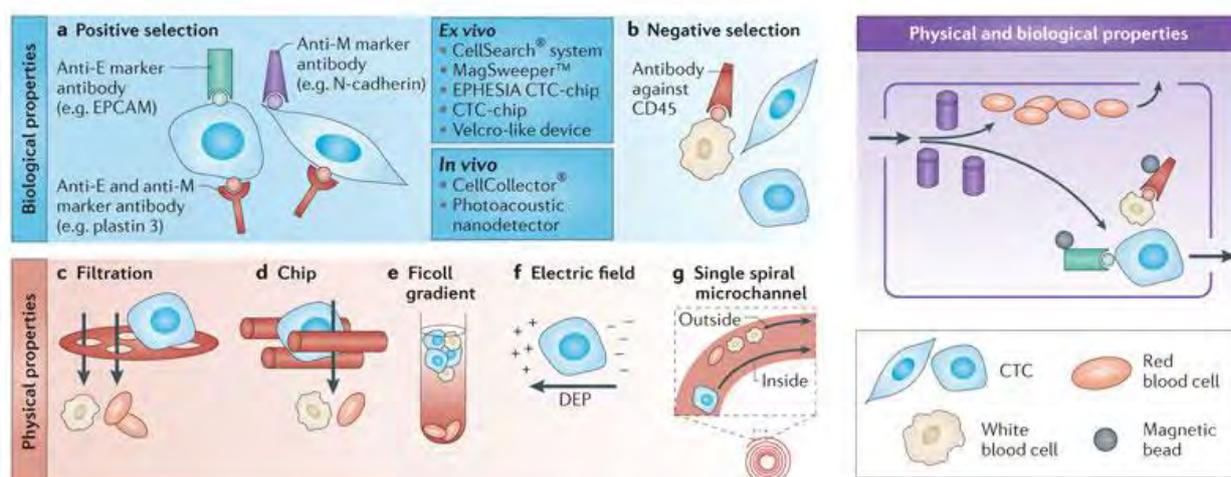


Figure 4 : Différentes techniques d'enrichissement des CTC. Il est possible de trier les CTC grâce à leurs propriétés biologiques. a) Sélection positive : Les CTC sont triées grâce à des anticorps dirigés contre des marqueurs de cellules épithéliales (EPCAM, E-Cadhérine) et/ou par des marqueurs de cellules mésenchymateuses (N-Cadhérine) car les cellules normalement présentes dans le sang n'expriment pas ces marqueurs. b) Sélection négative : Un anticorps dirigé contre CD45, marqueur communément exprimé par les lymphocytes, est utilisé pour retirer les lymphocytes de l'échantillon. Il est également possible d'enrichir l'échantillon en CTC en utilisant leurs propriétés physiques qui sont différentes des autres cellules du compartiment sanguin en terme de c) taille d) déformabilité e) densité f) charges électriques g) inertie. Enfin il est également possible d'enrichir en utilisant à la fois les propriétés biologiques et physiques des CTC. (Alix-Panabieres and Pantel 2014)

Cependant la concentration des CTC dans le sang est très faible, de l'ordre de 1 à 10 cellules pour 10ml de sang. Leur détection est donc un véritable challenge, quelle que soit la technique utilisée. D'autant plus que les CTC retrouvées sont très hétérogènes en termes de phénotype et d'expression de marqueurs. La détection par un marqueur spécifique, par exemple le marqueur épithélial EpCam, introduit un biais. En effet, les CTC n'exprimant pas ce marqueur sont éliminées, ce qui génère des faux négatifs. La tendance est donc à l'utilisation d'un cocktail de marqueurs permettant d'augmenter le champ de détection. Le risque étant d'augmenter également la probabilité d'isoler des cellules normales qui expriment un des marqueurs du cocktail utilisé à l'origine de faux positifs (Alix-Panabieres and Pantel 2014).

La caractérisation phénotypique et l'étude du profil d'expression génique des CTC isolées devraient permettre d'identifier de nouveaux marqueurs spécifiques des CTC et de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans l'intravasation et la survie dans la circulation. Par exemple, des études récentes mettent en évidence que les CTC expriment des marqueurs de l'EMT et de cellules souches qui sont des indicateurs d'agressivité tumorales (Mitra et al. 2015).

La recherche sur les CTC pourrait permettre à plus long terme de concevoir des thérapies personnalisées avec l'utilisation de xélogreffes réalisées à partir des CTC isolées du sang du patient, permettant de tester les molécules efficaces sur ces cellules responsable de la dissémination métastatique et de la rechute des patients (Alix-Panabières et al. 2016).

3 - Extravasation

Pour s'implanter dans un tissu distant et y former une métastase, la cellule doit sortir de la circulation sanguine. Cette extravasation est facilitée par des mécanismes passifs et actifs.

En passant dans les capillaires de petit diamètre, la cellule tumorale est freinée ou arrêtée induisant un temps de latence permettant la mise en place d'interactions moléculaires spécifiques (Kienast et al. 2010). Les embolus tumoraux formés dans la circulation favorisent cette étape, du fait de leur taille plus importante que celle d'une cellule isolée (Im et al. 2004). Le drainage lymphatique et sanguin des organes joue donc un rôle important dans l'extravasation.

Cependant il a été observé que les cancers possèdent des sites métastatiques préférentiels qui ne peuvent être expliqués seulement par la forte perfusion d'un organe. Les cancers de la prostate ou du sein par exemple, métastasent préférentiellement dans les os alors que le foie et les poumons sont les sites préférentiels du cancer du pancréas (Figure 5).

Tumour type	Principal sites of metastasis
Breast	Bone, lungs, liver and brain
Lung adenocarcinoma	Brain, bones, adrenal gland and liver
Skin melanoma	Lungs, brain, skin and liver
Colorectal	Liver and lungs
Pancreatic	Liver and lungs
Prostate	Bones
Sarcoma	Lungs
Uveal melanoma	Liver

Figure 5 : Sites métastatiques des cancers solides les plus souvent observés en fonction de la localisation de la tumeur primaire. (Nguyen et al. 2009)

Il existe donc une extravasation dirigée due à l'expression par les cellules endothéliales de molécules d'adhésion spécifiques à un organe, reconnu par les cellules tumorales. Les CTC interagissent en effet avec les cellules endothéliales des vaisseaux pour traverser la barrière endothéliale vers l'organe cible. Le mécanisme de diapédèse mis en jeu est semblable à celui utilisé par les leucocytes pour traverser l'endothélium lors d'une inflammation. La cellule tumorale interagit avec la cellule endothéliale via des protéines d'adhésion comme les sélectines et les intégrines pour traverser l'endothélium (Nguyen et al. 2009). Par exemple les cellules de mélanomes sont capables d'interagir avec la protéine d'adhésion Lu-E-CAM exprimée par les cellules endothéliales de poumons alors que les cellules tumorales de gliome et de foie n'ont pas d'affinité pour cette protéine d'adhésion (Zhu et al. 1991).

Les différences de structure de la barrière endothéliale qui délimite les organes peuvent également influencer l'extravasation. La barrière hémato-encéphalique est par exemple particulièrement étanche grâce à la combinaison des péricytes et des cellules gliales, comparée à celle de la moelle osseuse plus facilement pénétrable car elle ne possède pas de membrane basale (Figure 6).

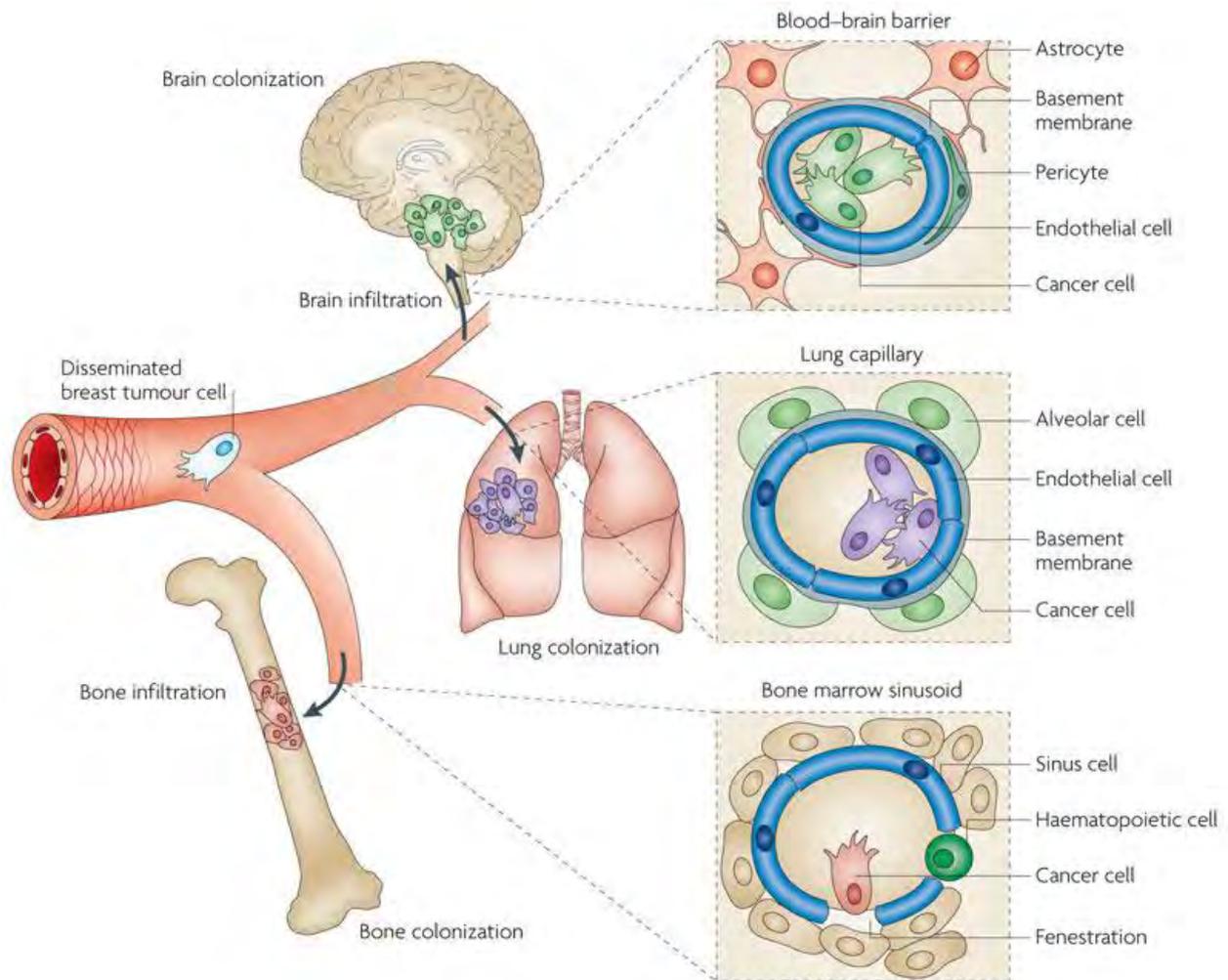


Figure 6 : Différence de structures des vaisseaux en fonction des organes. (Nguyen et al. 2009)

Des travaux montrent que pour traverser la barrière endothéliale, la cellule tumorale doit exprimer des protéines spécifiques pour cette barrière. Ces protéines semblent être exprimées dès la tumeur primaire mais ne servent que lors de l'extravasation. Par exemple, les tumeurs de sein expriment l'interleukine 11 qui ne procure aucun avantage pour la croissance tumorale mais permet la formation des métastases osseuses (Kang et al. 2003). La connaissance de ces marqueurs spécifiques dans la tumeur primaire pourrait permettre de mieux prévoir dans quel organe les cellules métastaseront et donc de mieux les cibler. Cette sélectivité pourrait être également due à la libération de chimiokines par certains organes qui attirent et orientent les cellules tumorales vers ces organes (Nguyen et al. 2009).

4 - Colonisation d'un nouveau tissu

Une fois la barrière endothéliale traversée, la cellule tumorale interagit avec le stroma du microenvironnement de l'organe hôte pour s'y adapter. Pour cela, comme dans la tumeur primaire, elle sécrète des facteurs de croissance pour permettre son développement, des facteurs immunosuppresseurs pour échapper au système immunitaire et des facteurs pro angiogéniques induisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Kang et al. 2003; Nguyen et al. 2009).

Ces modifications ne sont pas immédiates car il a été observé en clinique un temps de latence important entre la détection d'une tumeur primaire et la rechute métastatique, variable suivant le type de cancer. Par exemple, dans les cancers des poumons, la rechute métastatique est presque concomitante avec le diagnostic (Hoffman et al. 2000) alors que dans le cas du cancer du sein le délai avant la rechute se compte en années (Schmidt-Kittler et al. 2003). Ceci peut s'expliquer en partie par le fait que dans le cas du cancer du sein, la détection est précoce comparée à celle du pancréas. Ce temps de latence correspond au temps pendant lequel les cellules tumorales restent en « dormance » sous forme d'une micrométastase, caractérisée par des cellules peu prolifératives et une mort cellulaire importante qui maintient stable le nombre de cellules. La rechute métastatique se produit lorsque la micrométastase devient une macrométastase caractérisée par une forte prolifération et une forte agressivité (Karrison et al. 1999; Demicheli 2001).

Les facteurs influençant le passage de la micrométastase à la macrométastase ne sont pas clairement démontrés. Un switch angiogénique permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins semble être requis (Bergers and Benjamin 2003). En effet l'accessibilité vasculaire est considérée comme nécessaire à la croissance des métastases. Cependant une étude récente montre que les métastases pulmonaires formées à partir de six lignées tumorales différentes utilisent pour leur développement les vaisseaux normaux existants par le mécanisme de cooptation (Szabo et al. 2015). Ces métastases seraient donc angio-indépendantes.

L'angiogenèse tumorale joue un rôle majeur dans la dissémination métastatique puisqu'elle permet le développement de la tumeur, elle favorise l'intravasation des cellules et semble nécessaire au développement de la métastase.

III - ANGIOGENESE TUMORALE

1 - Définition et historique

En 1950 l'idée est émise que la croissance tumorale est dépendante d'un nouvel apport vasculaire (Algire et al. 1950), mais c'est Judah Folkman en 1971 qui le démontrera (Folkman 1971). Pour se développer, une tumeur a besoin comme les tissus normaux d'une vascularisation. Le réseau vasculaire apporte en effet l'oxygène et les nutriments nécessaires à la respiration et au métabolisme cellulaire, il permet l'élimination des déchets ainsi générés, et il transporte des informations entre les cellules via les facteurs de croissance, les cytokines, les hormones, les ARNs, les lipides et les exosomes (Hanahan and Weinberg 2011).

Toutefois, les vaisseaux sanguins préexistants dans le tissu sain ne suffisent pas pour alimenter une tumeur en prolifération. Les cellules du centre de la tumeur, s'éloignent de plus en plus des vaisseaux et au-delà d'une distance d'une dizaine d'assises cellulaires, les cellules se retrouvent en hypoxie (Folkman 2006). Le stress cellulaire engendré par ce manque d'oxygène est le plus agressif qui soit pour une cellule, il conduit donc à la libération de facteurs induisant la formation de néovaisseaux à partir de vaisseaux sanguins préexistants, par un processus appelé angiogenèse (Carmeliet 2000).

A la suite des travaux de Folkman, l'étude de l'angiogenèse a été largement approfondie, notamment grâce à un modèle de cornée avasculaire permettant de caractériser les mécanismes mis en jeu (Muthukkaruppan and Auerbach 1979).

Les vaisseaux sanguins normaux se forment lors du développement embryonnaire par vasculogenèse à partir de précurseurs hémangioblastiques. Ce sont des agrégats cellulaires mésodermiques, qui produiront d'une part des cellules souches hématopoïétiques, précurseurs de toutes les cellules sanguines et immunitaires, et d'autres parts des progéniteurs endothéliaux, à l'origine des cellules endothéliales composant les vaisseaux. Cette étape est suivie par une angiogenèse qui permet au réseau vasculaire de se développer à partir des vaisseaux sanguins préexistants, par exemple lors du développement des membres (Figure 7).

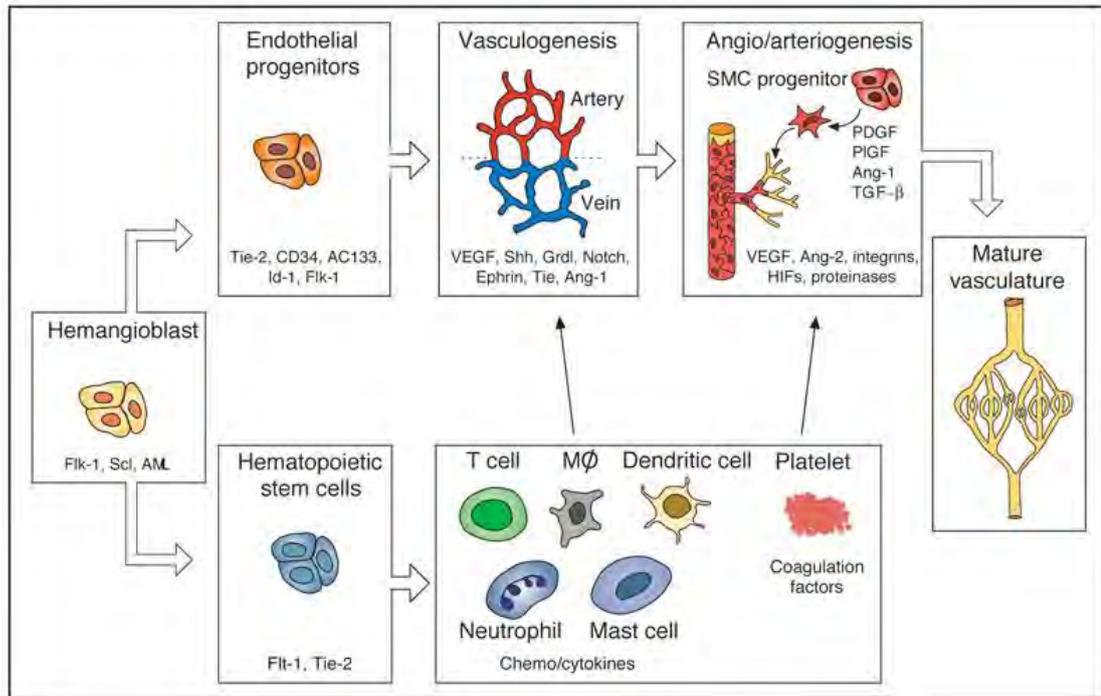


Figure 7 : Formation de la vascularisation mature lors du développement embryonnaire. (Carmeliet 2003)

Chez l'adulte, ce processus est restreint à la formation du placenta et à la transformation cyclique de l'endomètre chez la femme, mais également à la réparation tissulaire et à l'adaptation des tissus suite à une ischémie (Smith 2001). L'angiogenèse doit pouvoir se mettre en place rapidement pour éviter la nécrose des tissus, elle n'est donc pas éteinte chez l'adulte mais au contraire elle est maintenue dans un état de quiescence rapidement activable (Carmeliet 2005).

L'identification de l'importance de l'angiogenèse dans le cancer a guidé la recherche des facteurs qui régulent l'angiogenèse normale et pathologique et révélé la complexité de ces mécanismes qui nécessitent une excellente coordination dans le temps et dans l'espace d'une multiplicité de facteurs pour avoir des vaisseaux étanches et fonctionnels.

2 - Régulation de l'angiogenèse

Pour maintenir en quiescence le processus angiogénique dans un tissu sain, tout en permettant la sortie de quiescence lorsque c'est nécessaire, par exemple en cas de blessure, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins est régulée par deux grandes familles de facteurs : les inducteurs et les inhibiteurs (Figure 8). L'équilibre entre ces facteurs, communément appelé la balance angiogénique, est rompu dans la tumeur qui se comporte comme une blessure qui ne parvient pas à se réparer et dans laquelle l'angiogenèse ne revient pas à l'état de quiescence (Zetter 2008).

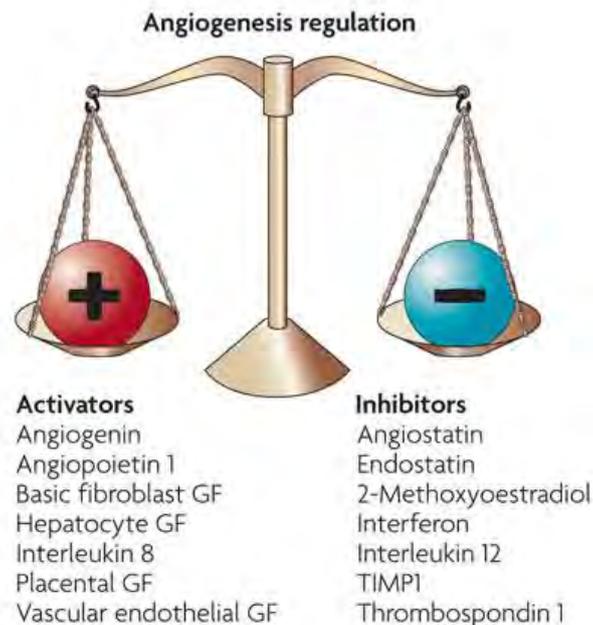


Figure 8 : La balance angiogénique. La régulation de l'angiogenèse est un équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques (Activators) et les facteurs anti-angiogéniques (Inhibitors). (Zetter 2008)

L'étude de l'angiogenèse a bénéficié du développement des méthodes de culture cellulaire et de biologie moléculaire. De nombreuses molécules ayant des activités pro ou anti-angiogéniques ont été identifiées et caractérisées (Figure 8). Seuls ceux reconnus comme jouant un rôle majeur dans de nombreux cancers sont présentés ci-dessous.

a. Facteurs pro-angiogéniques

Les facteurs pro-angiogéniques sont des activateurs de l'angiogenèse, capables de stimuler la prolifération, la migration et l'organisation tubulaire des cellules endothéliales via leurs interactions avec des récepteurs situés sur les cellules endothéliales.

Le premier facteur pro-angiogénique découvert a été le Fibroblast Growth Factor 2 (FGF2 ou FGFb). Il stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales, la dégradation de la matrice extracellulaire et la modulation des molécules d'adhésion.

Le facteur pro-angiogénique considéré comme central de l'angiogenèse est le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Le KO d'un seul allèle est létal chez la souris, causant un défaut majeur du système vasculaire (Ferrara 2009). Son action pro-angiogénique est médiée majoritairement par sa liaison aux récepteurs Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 et 2 (VEGFR1, VEGFR2), le récepteur VEGFR3 régulant quant à lui majoritairement la lymphangiogenèse (Ferrara et al. 2003) (Figure 9).

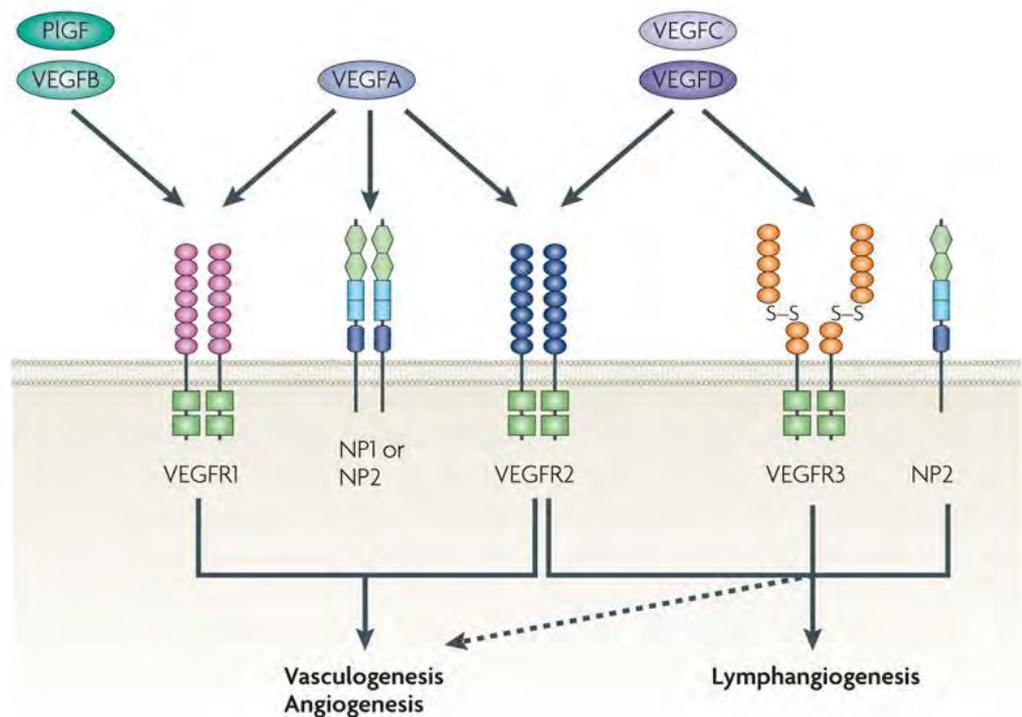


Figure 9 : Famille des protéines VEGFs et leurs récepteurs. La famille du VEGF est composée de 5 protéines différentes : le VEGF-A (ou VEGF), le VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF (Placenta Growth Factor). Les récepteurs tyrosines kinases VEGFR1 et VEGFR2 régulent majoritairement l'angiogenèse et la vasculogenèse, le VEGFR3 régule la lymphangiogenèse. Les récepteurs Neuropiline 1 et 2 (NP1 et NP2) agissent comme des corécepteurs des VEGF pour augmenter leur affinité pour les récepteurs tyrosine kinase VEGFR. (Ellis and Hicklin 2008)

La plupart des thérapies anti-angiogéniques actuellement utilisées dans le cancer ciblent le VEGF ou ses récepteurs.

b. Facteurs Anti-angiogéniques

Les facteurs anti-angiogéniques inhibent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, notamment en bloquant la prolifération et la migration des cellules endothéliales et en induisant leur apoptose. Il en existe de plusieurs types : ceux actifs sous forme native (Platelet factor 4 ou PF4, Tissu inhibitor of metalloproteinase ou TIMP), ceux générés par clivage de protéines de la matrice extracellulaire (Endostatine, Tumstatine) et les produits de clivage d'autres protéines (Angiostatine, Prolactine) (Figure 8).

La Thrombospondine 1 (TSP1) est le premier anti-angiogénique endogène découvert et un des plus étudié. C'est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire qui se lie à de nombreux récepteurs cellulaires de surface et interagit avec des protéines extracellulaires. Elle inhibe la migration et l'organisation des cellules endothéliales et induit leur apoptose. Cette fonction sera détaillée dans le chapitre 6.

Cependant la TSP1 régule de nombreux autres processus. De façon remarquable, c'est le cas de tous les facteurs anti-angiogéniques et de la plupart des facteurs pro-angiogéniques. Il est important de noter que le classement des régulateurs de l'angiogenèse entre facteurs pro ou anti-angiogéniques reflète mal la complexité de la biologie de tous ces facteurs. Des fonctions anti-angiogéniques ont ainsi été démontrées pour au moins une des isoformes du VEGF (Bates et al. 2002). De plus le VEGF a été identifié initialement sous le nom de Vascular Permeability Factor car il régule la perméabilité vasculaire.

3 - Vascularisation tumorale

a. *Switch angiogénique*

Lors des multiplications initiales des cellules tumorales au sein du tissu, les cellules du centre de la tumeur en formation, au-delà de quelques millimètres de diamètre, subissent un ensemble de stress. Ces stress sont de plusieurs types : mécaniques, métaboliques, hypoxiques, immunitaires, inflammatoires, génétiques (Carmeliet 2000) (Bergers and Benjamin 2003). Durant cette phase, les facteurs anti-angiogéniques produits par le microenvironnement inhibent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins nécessaires à la croissance de la tumeur.

L'augmentation des différents stress lors de l'accroissement du volume tumoral active des oncogènes et induit la délétion de gènes suppresseurs de tumeurs, permettant à la cellule tumorale de s'adapter en modifiant l'expression de son génome. Une des adaptations majeures mises en place par les cellules tumorales est l'angiogenèse qui permet à la tumeur de rompre l'équilibre de la balance angiogénique et d'induire la formation de vaisseaux sanguins. Le switch angiogénique, qui correspond au passage d'une phase pré vasculaire à une phase vasculaire, accélère considérablement la croissance tumorale. Il est généralement décrit comme une surexpression des facteurs pro-angiogéniques et une inhibition des facteurs anti-angiogéniques. En réponse aux facteurs pro angiogéniques, les cellules endothéliales composant les vaisseaux sanguins prolifèrent et migrent dans le tissu pour former de nouveaux vaisseaux. (Figure 10)

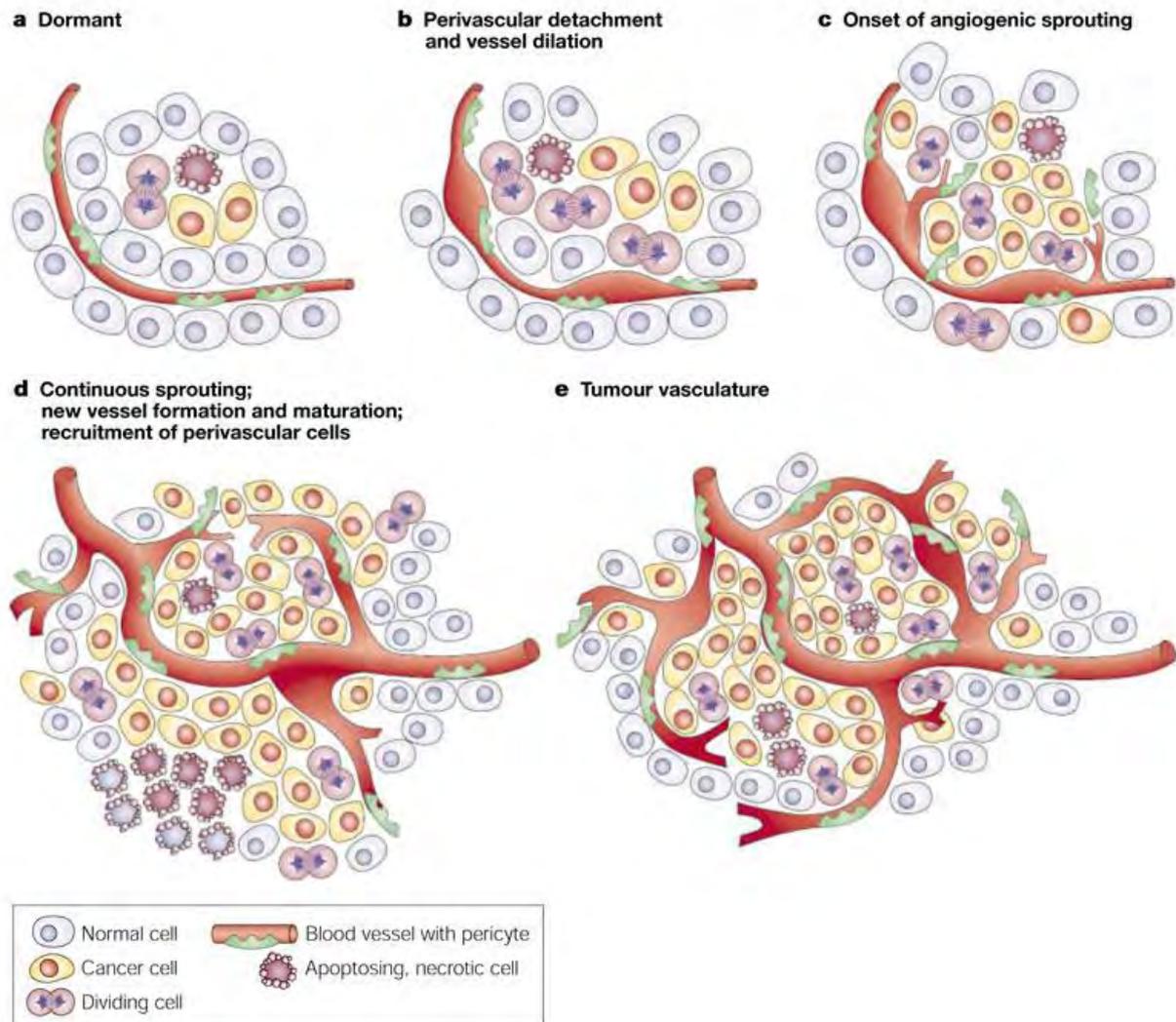


Figure 10 : Switch angiogénique. Le switch angiogénique est une étape du développement des tumeurs qui peut se produire à différents moments de la progression tumorale. Les tumeurs commencent à se développer sous forme de nodules avasculaires A) dormants dans lesquels le niveau de prolifération et d'apoptose induisent un état stable. L'initiation de l'angiogenèse doit se produire pour assurer la croissance exponentielle de la tumeur. Le switch angiogénique commence par B) le détachement des péricytes et la dilatation des vaisseaux sanguins, suivie par C) la germination angiogénique et D) la maturation des nouveaux vaisseaux formés par le recrutement des péricytes. La formation des néo vaisseaux se poursuivra aussi longtemps que la tumeur se développe car ils sont indispensables à l'apport en nutriments et en oxygène. (Bergers and Benjamin 2003)

b. Mécanismes de formation des vaisseaux tumoraux

Plusieurs mécanismes ont été décrits pour la formation des vaisseaux tumoraux, ils sont décrits ci-dessous. (Figure 11)

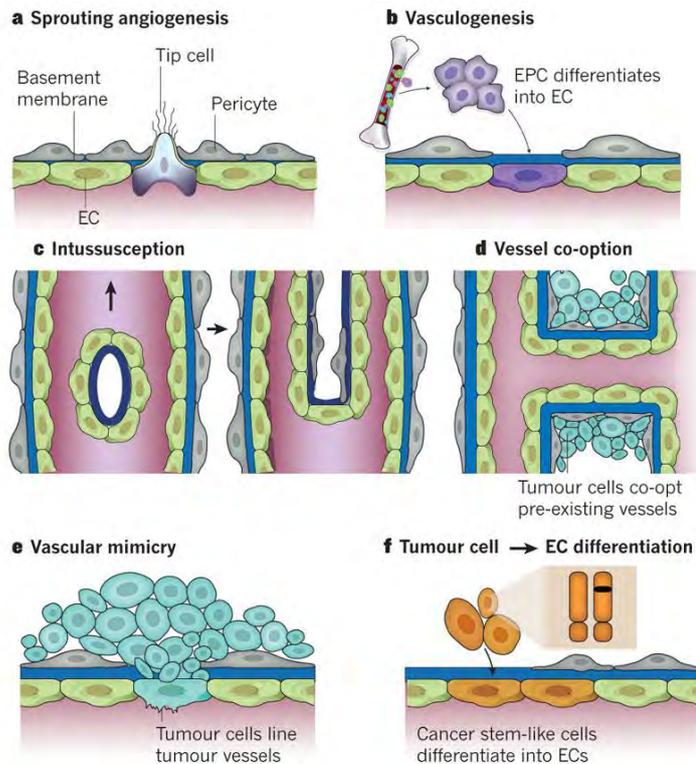


Figure 11 : Différents mécanismes de formation des vaisseaux. A) Sprouting angiogénique. B) Vasculogénèse. C) Intussusception. D) Cooptation des vaisseaux. E) Vascular mimicry. F) Différenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales. (Carmeliet and Jain 2011)

◆ Le « sprouting » ou bourgeonnement angiogénique

En réponse à des facteurs pro-angiogéniques, une cellule endothéliale composant un vaisseau déjà existant, se spécialise et émerge pour former un bourgeonnement, c'est la Tip cell. Elle guidera la formation de nouvelles ramifications. Les cellules situées à côté de cette Tip cell prolifèrent pour créer les parois du nouveau vaisseau, ce sont les Stalk cells.

◆ La vasculogénèse

Les progéniteurs endothéliaux de la moelle osseuse sont recrutés au niveau de la tumeur et se différencient en cellules endothéliales permettant la création de nouveaux vaisseaux.

◆ L'intussusception

Les cellules endothéliales forment une lumière au centre d'un vaisseau, induisant sa séparation en deux vaisseaux plus petits.

- ◆ Cooptation des vaisseaux

Il est également possible que les cellules tumorales cooptent des vaisseaux, c'est-à-dire englobent des vaisseaux normaux préexistants.

- ◆ Vascular mimicry

Certaines cellules tumorales ont la capacité de s'assembler en tubes, créant des pseudo vaisseaux qui permettent le passage du flux sanguin en absence de cellules endothéliales. Ces pseudos vaisseaux sont parfois constitués d'une mosaïque de cellules endothéliales et tumorales.

Les cellules cancéreuses ayant des capacités de pluripotence, appelées cellules souches cancéreuses (CSC), peuvent se différencier en cellules endothéliales « tumorales » pour former les nouveaux vaisseaux.

- c. *Aspect et fonctionnalité de la vascularisation tumorale*

Les vaisseaux normaux sont composés de cellules endothéliales qui constituent la couche la plus interne des parois vasculaires et de péricytes qui stabilisent les vaisseaux (Wilting et al. 2003). Une membrane basale, située à l'interface entre l'épithélium et l'endothélium, recouvre presque toute la longueur des cellules endothéliales.

La formation des vaisseaux tumoraux est un mécanisme imparfait. L'angiogenèse tumorale produit une vascularisation hétérogène, dans laquelle on ne peut faire la distinction entre capillaires, artérioles et veinules. Les péricytes sont fréquemment détachés des cellules endothéliales, ce qui conduit à un défaut d'étanchéité et à un diamètre variable. Ces vaisseaux sont peu stables, en constant remaniement. Ceci conduit à des vaisseaux souvent non fonctionnels, imparfaitement reliés entre eux ou ayant des fuites, entraînant la formation de lacs sanguins qui rend le tissu tumoral très hémorragique (Figure 12).

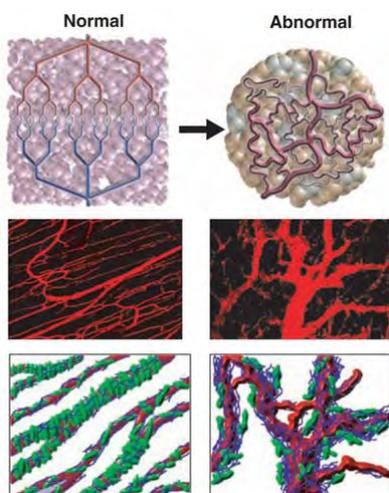


Figure 12 : Comparaison de la vascularisation normale et tumorale. Dans le tissu normal les vaisseaux sanguins (représentés en rouge) sont formés de cellules endothéliales organisées et stabilisés par une importante couverture péricytaire (les péricytes sont représentés en verts). Les vaisseaux tumoraux quant à eux sont d'un diamètre supérieur à celui des vaisseaux normaux, leurs branchements ne sont pas organisés et leur couverture péricytaire est faible. (Jain 2005)

L'angiogenèse tumorale est considérée aujourd'hui comme une des caractéristiques clé des cancers par son rôle sur la tumeur primaire et sur la dissémination métastatique (Hanahan and Weinberg 2000).

En 1971, Judah Folkman avait émis deux hypothèses. La première était que l'inhibition de l'angiogenèse tumorale devrait induire une forte hypoxie conduisant à la mort des cellules tumorales et à l'élimination de la tumeur. Cette hypothèse est à la base des traitements anti-angiogéniques utilisés actuellement en clinique dans plusieurs types de cancers.

La deuxième était que cette inhibition bloquerait la dissémination tumorale puisque les cellules tumorales migrent majoritairement via les vaisseaux (Folkman 1971).

IV - TRAITEMENTS ANTI-ANGIOGENIQUES

1 - Mode d'action

Le problème majeur des traitements contre le cancer est l'apparition de résistances, liée à la plasticité tumorale, elle-même liée à l'instabilité génétique des cellules cancéreuses. Face à ce problème thérapeutique, le développement d'inhibiteurs de l'angiogenèse est apparu comme une alternative séduisante (Wu and Staton 2012) :

- ◆ Ces traitements ciblent les cellules endothéliales de l'hôte dans le but de provoquer une forte hypoxie induisant la mort des cellules tumorales. Pour cela ils inhibent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et déstabilisent la vascularisation déjà en place. Les cellules endothéliales étant génétiquement stables, ces traitements ne devraient donc pas conduire au développement de résistances.
- ◆ Les cellules endothéliales étant directement en contact avec le sang qui achemine les antiangiogéniques, le traitement devrait être très efficace.
- ◆ L'angiogenèse physiologique chez l'adulte est restreinte, le traitement devrait donc être spécifique des vaisseaux tumoraux en formation, et ne pas générer d'effets secondaires.
- ◆ Ils sont utilisables dans un grand nombre de tumeurs solides, car la plupart sont dépendantes de l'angiogenèse.
- ◆ Les inhibiteurs de l'angiogenèse peuvent être associés avec des traitements ciblant les cellules tumorales.

L'avantage majeur perçu pour ces thérapies est la possibilité de cibler à la fois la tumeur primaire et les métastases qui sont dans la majorité des cas résistantes à tous les traitements.

Les premières études précliniques ont montré que l'inhibition du facteur pro-angiogénique majeur, le VEGF, induit une forte diminution du volume tumoral associée à une diminution de la densité vasculaire dans des modèles de rhabdomyosarcomes, de glioblastomes et de leiomyosarcomes (Kim et al. 1993). Par la suite d'autres études ont montré dans un modèle de cancer colorectal une diminution du nombre de métastases (Warren et al. 1995). Les résultats de ces premières études étaient très encourageants et ont été confirmés par de nouvelles études précliniques débouchant sur le développement et la mise sur le marché du premier traitement anti-angiogénique, un anticorps monoclonal humanisé contre le VEGF, le Bevacizumab.

Depuis cette découverte, la recherche sur les molécules anti-angiogéniques a connu un essor considérable et généré de nombreuses molécules thérapeutiques, notamment des inhibiteurs de

l'activité tyrosine kinase du récepteur VEGFR2 empêchant ainsi l'activation de la voie de transduction déclenchée par le VEGF. Toutes les molécules autorisées aujourd'hui en clinique bloquent soit le VEGF, soit le récepteur VEGFR2. De nouvelles molécules sont en évaluation clinique de phase III, par exemple les molécules ciblant le facteur pro-angiogénique angiopoïétine 1, utilisées en combinaison avec un anti-VEGF permettant d'augmenter la spécificité et éviter les résistances (Jayson et al. 2016).

2 - Résistances

Lors de l'utilisation de ces traitements il a été observé deux types de réponses différentes. Les tumeurs intrinsèquement résistantes qui ne répondent pas au traitement, constituent le premier cas de figure. Dans le cancer du sein, il a été montré que les tumeurs de haut grade surexpriment le facteur pro-angiogénique FGF2 plutôt que le VEGF (Relf et al. 1997). Les traitements anti-angiogéniques ne ciblant à l'heure actuelle que les voies du VEGF n'ont aucune efficacité sur ces tumeurs qui soutiennent leur angiogenèse via FGF2.

Le deuxième cas de figure est celui de tumeurs qui répondent dans un premier temps avec un ralentissement de la progression tumorale se traduisant par une augmentation de la PFS. Néanmoins, même ces tumeurs finissent par s'adapter et devenir résistantes (Kerbel et al. 2001).

Il semble donc qu'il soit impossible d'inhiber complètement la progression tumorale en inhibant l'angiogenèse tumorale. Dans la majorité des traitements chimiothérapeutiques, les cellules finissent par muter le gène ciblé par la chimiothérapie les rendant ainsi insensibles aux traitements. Dans le cas des traitements anti-angiogéniques il n'a pas été montré de mutations des cellules endothéliales. Au contraire, l'inhibition de la cible est bien démontrée et se maintient dans le temps, mais la tumeur développe une autre voie pour réaliser de l'angiogenèse ou devient angio-indépendante.

Quatre modes d'évasion aux traitements anti-angiogéniques ont été proposés : une activation et/ou une surexpression des autres facteurs pro-angiogéniques par exemple le FGF ou l'angiopoïétine 1 ; le recrutement de progéniteurs endothéliaux de la moelle osseuse capables de produire de nouvelles cellules endothéliales ; l'augmentation de la couverture péricytaire permettant de mieux stabiliser les vaisseaux déjà existants ; et l'activation de l'invasion pour coloniser un nouveau tissu ne nécessitant pas de néovascularisation (Bergers and Hanahan 2008).

Ces observations remettent clairement en question le fait que la progression tumorale nécessite une angiogenèse tumorale continue pour son développement.

3 - Efficacité clinique

Onze molécules anti-angiogéniques sont approuvées pour le traitement du cancer aujourd'hui et plus d'une centaine d'essais cliniques sont en cours (Figure 13). Cette thérapie est considérée comme la 4^{ème} modalité de traitement après la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie (Folkman 2006).

	US FDA approval year	EMA approval year	Comments
Bevacizumab			
Metastatic colorectal cancer	2004 (first line); 2006 (second line)	2005 (first and second line)	With chemotherapy, first and second line
Non-small-cell lung cancer	2006	2007	With chemotherapy, first line
Renal cell carcinoma	2009	2005	With interferon
Ovarian cancer	2014 for platinum-resistant recurrent ovarian cancer; not approved for first-line or platinum-sensitive recurrent ovarian cancer	2012 for first-line and platinum-sensitive recurrent ovarian cancer; 2014 for platinum-resistant recurrent ovarian cancer	With chemotherapy
Breast cancer	Withdrawn	2009	With chemotherapy
Regorafenib			
Refractory metastatic colorectal cancer	2013	2013	Single drug, refractory
Ramucirumab			
Gastric or gastro-oesophageal junction cancers	2014	2014	Refractory with or without chemotherapy
Non-small-cell lung cancer	2014	2014	Refractory with chemotherapy
Metastatic colorectal cancer	2015	Not yet approved	Refractory with chemotherapy
Sorafenib			
Hepatocellular carcinoma	2007	2006	Single drug, first line
Renal cell carcinoma	2005	2006	Single drug, first line
Thyroid cancer (differentiated)	2013	2014	Refractory to radioactive iodine
Sunitinib			
Renal cell carcinoma	2006	2007	Single drug, first line
Pancreatic neuroendocrine tumours	2011	2010	Single drug, progressive well differentiated pancreatic neuroendocrine tumours
Pazopanib			
Renal cell carcinoma	2009	2009	Single drug, first line
Soft tissue sarcoma	2012	2012	Single drug
Axitinib			
Renal cell carcinoma	2012	2012	Single drug, second line
Vandetanib			
Medullary carcinoma of thyroid	2011	2012	Unresectable, locally advanced, or metastatic medullary thyroid cancer
Lenvatinib			
Thyroid cancer	2015	2015	Locally recurrent or metastatic, progressive, radioactive iodine-refractory differentiated thyroid cancer
Nintedanib			
Non-small-cell lung cancer	Not licensed for lung cancer	2014	Locally advanced, metastatic or second line non-small-cell lung cancer.
Aflibercept			
Colorectal cancer	2012	2013	Second line

Figure 13 : Molécules anti-angiogéniques approuvées et leurs indications. FDA : Food and Drugs administration. EMA : European Medicines Agency. (Jayson et al. 2016)

Cependant, les traitements anti-angiogéniques étaient porteurs de grands espoirs qui ne se sont malheureusement que partiellement vérifiés.

En effet, les traitements anti-angiogéniques ont montré une augmentation significative de la survie sans progression (PFS) associée à une diminution de la douleur, celle-ci s'expliquant en partie par une diminution de la pression interstitielle. Néanmoins l'augmentation de la survie globale est modeste et restreinte à certains cas comme le cancer du rein métastatique, le cancer colorectal métastatique et le cancer du poumon non à petites cellules métastatique (Carmeliet and Jain 2011).

De plus, il existe un frein à ces traitements. Contrairement à ce qui était prévu, ils induisent de nombreux effets secondaires : hypertension artérielle, hémorragies, thromboses, perforations intestinales, protéinurie reflet d'atteintes rénales, dérégulations thyroïdiennes et nausées. Ces effets inattendus peuvent s'expliquer par le fait, que de façon semblable à de nombreuses protéines régulant l'angiogenèse, le VEGF possède d'autres fonctions, notamment dans la réparation tissulaire, la formation des os, la migration des cellules neuronales (Carlevaro et al. 2000) et qu'il est exprimé de façon ubiquitaire. Les inhibiteurs de tyrosine kinase utilisés, ne sont pas spécifiques du récepteur VEGFR2, induisant une augmentation de l'efficacité du traitement par l'inhibition de plusieurs cibles impliquées dans l'angiogenèse, mais modifiant également des fonctions physiologiques importantes.

Dans certaines indications, les traitements anti-angiogéniques sont utilisés en combinaison avec des chimiothérapies. C'est assez paradoxal car, par définition les traitements anti-angiogéniques détruisent et empêchent la formation des vaisseaux sanguins irrigants la tumeur, diminuant de ce fait l'accessibilité à la tumeur et donc la perfusion et l'efficacité des drogues chimiothérapeutiques. L'hypoxie massive induite diminue également l'efficacité de la radiothérapie puisque le mécanisme d'action de cette dernière nécessite de l'oxygène pour créer les espèces réactives de l'oxygène conduisant à la mort cellulaire.

Néanmoins certaines combinaisons chimiothérapies et anti-angiogéniques ont montré une meilleure efficacité que les drogues chimiothérapeutiques seules. Par exemple, la combinaison irinotecan, fluorouracil, leucovorin (IFL) et Bevacizumab permet une augmentation de la survie globale de 5 mois comparé à la chimiothérapie IFL seule dans le cancer colorectal métastatique (Hurwitz et al. 2004).

De même une étude préclinique montre de façon paradoxale que les traitements anti-angiogéniques augmenteraient l'oxygénation des tumeurs et donc l'efficacité de la radiothérapie quand ils sont délivrés en même temps (Lee et al. 2000). Ce qui a été confirmé par une étude de phase I sur quarante sept patients avec des cancers du poumons inopérables malgré des effets secondaires importants notamment sur la fonction cardiaque (Liao et al. 2005). Ces données doivent être confirmées à plus grande échelle et dans d'autres cancers.

4 - Concept de normalisation vasculaire

Rakesh Jain le premier a formulé le concept de normalisation vasculaire pour notamment tenter d'expliquer pourquoi les traitements antiangiogéniques pouvaient dans certains cas améliorer l'efficacité des chimiothérapies associées (Figure 14).

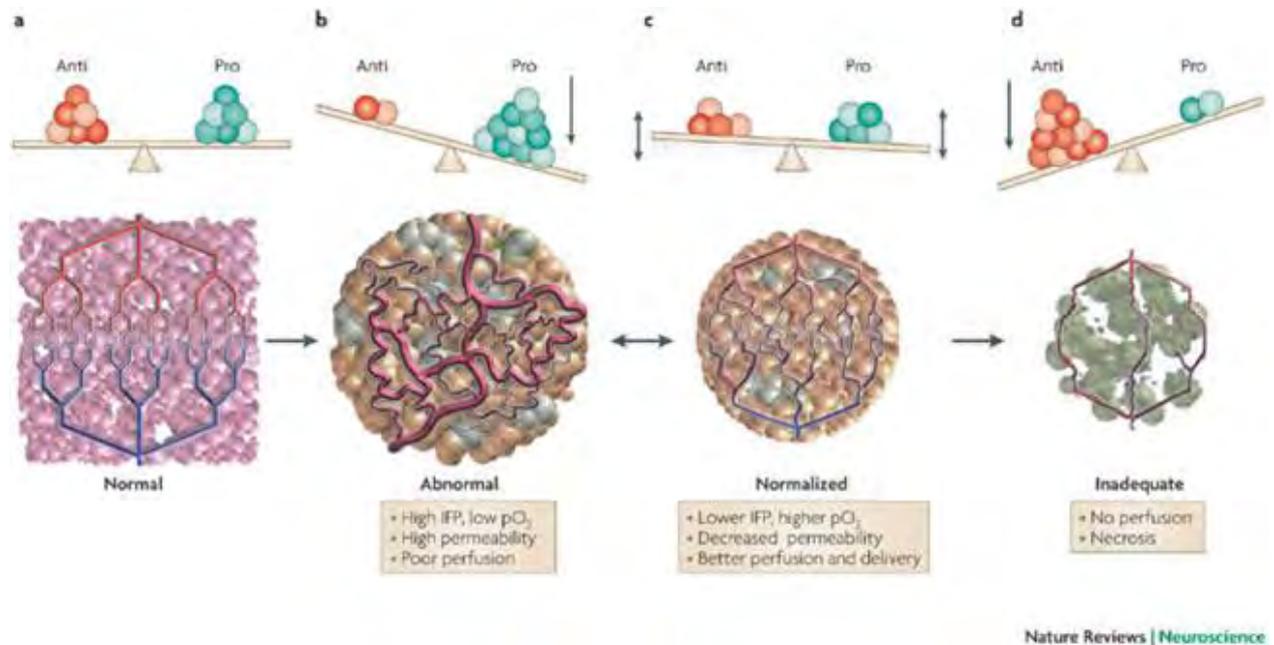


Figure 14 : Concept de normalisation vasculaire. A) Dans le tissu normal, il existe un équilibre entre les molécules pro-angiogéniques (représentées en dégradé de verts) et les molécules anti-angiogéniques (représentés en dégradé de rouges) qui permet le maintien d'une alimentation vasculaire organisée et efficace. B) Les tumeurs produisent des facteurs pro-angiogéniques qui induisent la formation d'un réseau vasculaire anormal et inefficace. C) Une thérapie anti-angiogénique judicieusement administrée peut rétablir l'équilibre de la balance angiogénique vers un état proche de celui retrouvé dans le tissu normal. Cette normalisation du réseau vasculaire permet l'amélioration de la perfusion et de l'efficacité des traitements. D) Une stratégie anti-angiogénique trop puissante et/ou persistante peut complètement détruire le réseau vasculaire, empêchant la perfusion de la chimiothérapie et diminuant l'efficacité de la radiothérapie par manque d'oxygène. Dans les tumeurs humaines, l'état vasculaire de la tumeur en C) revient généralement à l'état vasculaire en B) après une «fenêtre de normalisation» (représenté par la double flèche). Abréviations : Anti : molécules anti-angiogéniques; IFP : pression du liquide interstitiel; pO₂ : le niveau d'oxygène dans les tissus; Pro : molécules pro-angiogéniques. (Gerstner et al. 2009)

Dans les premiers temps d'un traitement anti-angiogénique, la diminution de la signalisation du VEGF, détruit en premier les vaisseaux non fonctionnels et les vaisseaux mieux organisés sont stabilisés. La perfusion et l'oxygénation tumorale seraient ainsi améliorées. Durant cette « fenêtre thérapeutique » la pénétration des traitements associés serait facilitée, augmentant l'effet des chimiothérapies et la radiothérapie. Mais cet état n'est que transitoire, puisque la poursuite du traitement déséquilibre la balance dans l'autre sens et induit une hypoxie massive dont on soupçonne aujourd'hui l'effet prométastatique qui sera détaillée dans le chapitre cinq.

Rakesh Jain propose aujourd'hui de modifier le mode d'administration, la dose et la durée des inhibiteurs de l'angiogenèse pour prolonger cet état transitoire de normalisation vasculaire pour revenir à une vascularisation proche de celle retrouvée dans un tissu sain (Jain 2005). Ce concept n'a cependant pas été démontré.

Par ailleurs, il est très difficile d'utiliser cette fenêtre thérapeutique en clinique, car il n'existe pas de marqueurs indiquant le moment opportun pour utiliser les traitements chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques. Une étude a même établi que la perfusion de la chimiothérapie n'est à aucun moment améliorée par l'utilisation des anti-angiogéniques (Van der Veldt et al. 2012).

5 - Induction de l'invasion

En 2009, deux études démontrent dans des modèles de cancer du pancréas, du sein, de mélanome et de glioblastome, qui font partie des cancers les plus agressifs, que les inhibiteurs de la voie du VEGF induisent une diminution du volume tumoral de façon transitoire mais qu'ils augmentent l'invasion et la dissémination métastatique (Ebos et al. 2009; Paez-Ribes et al. 2009). (Figure 15)

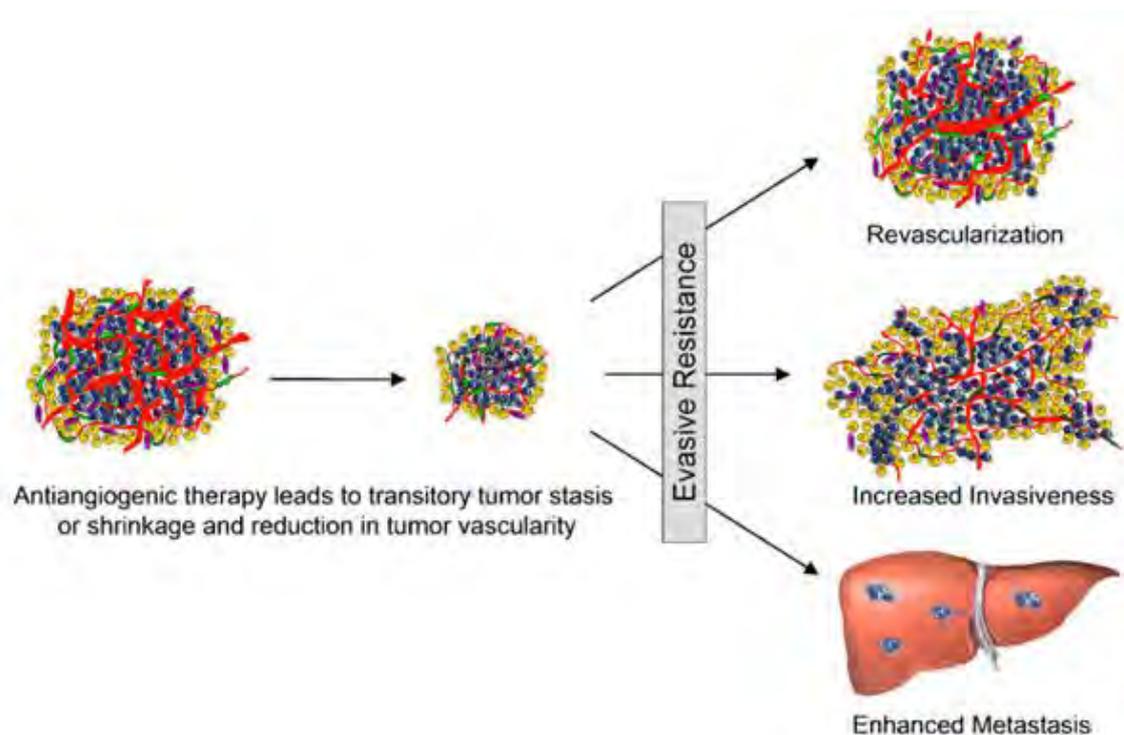


Figure 15 : Résumé schématique des différents mécanismes d'adaptation tumorale en réponses aux inhibiteurs de l'angiogenèse. Dans un premier temps, la diminution de la vascularisation tumorale induit une régression du volume tumoral, puis des mécanismes d'évitement et de résistance aux traitements anti-angiogéniques se mettent en place, notamment une augmentation de l'invasion locale et des métastases. (Paez-Ribes et al. 2009)

Dans la grande majorité des cancers cliniques, il n'a cependant pas été montré d'augmentation ni de diminution de l'incidence des métastases suite à un traitement antiangiogénique. Dans le glioblastome cependant, après une régression du volume tumoral, on observe une augmentation de l'invasion tumorale (Figure 16).

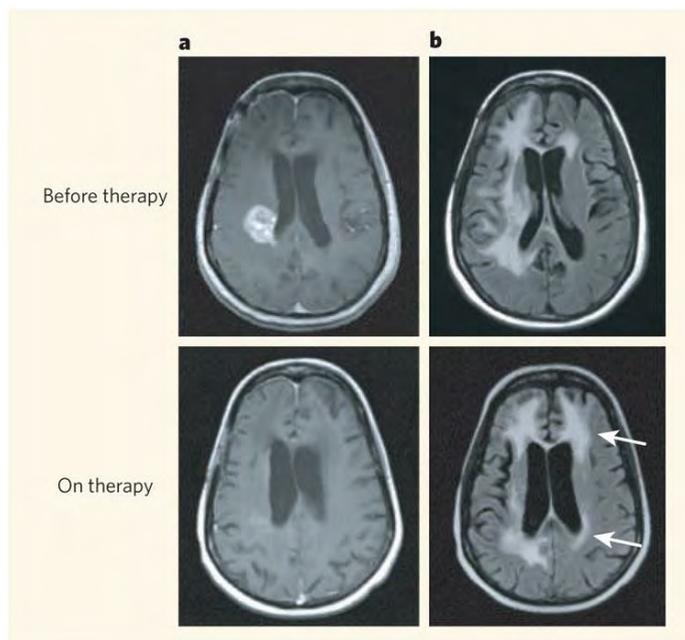


Figure 16 : Imagerie de suivi d'un patient atteint d'un glioblastome avant et après traitement par le bevacizumab (anticorps dirigé contre le VEGF). A) L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) d'un patient porteur d'un glioblastome montre après traitement avec le Bevacizumab et l'Irinotécan (agent chimiothérapeutique) une disparition de la masse tumorale visible. B) L'utilisation d'un type d'IRM différent permettant la mise en évidence de l'inflammation et du gonflement du cerveau montre une infiltration de la tumeur dans des régions du cerveau (localisées par des flèches) qui n'étaient pas atteintes avant le traitement. (Ellis and Reardon 2009)

Les traitements anti-angiogéniques permettent donc de ralentir la progression tumorale et d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie et la radiothérapie dans des indications très particulières mais ne permettent pas d'inhiber les métastases qui sont la cause de la rechute des patients.

Bien que cela reste à confirmer en clinique dans d'autres cancers que le glioblastome, on ne peut pas exclure qu'ils stimulent la dissémination métastatique. Ils possèdent également des effets secondaires qui limitent leur usage chez de nombreux patients. Il est donc important de réévaluer les conséquences de ces traitements et plus précisément le rôle de l'hypoxie qu'ils augmentent.

V - HYPOXIE TUMORALE

1 - Stress cellulaire

L'hypoxie est par définition un état d'oxygénation insuffisant du tissu ou de la cellule. Elle est considérée comme le stress le plus toxique pour une cellule puisqu'elle conduit inévitablement à la mort cellulaire si elle est maintenue, suivie de la nécrose du tissu. Vingt à trente secondes d'anoxie suffisent à entraîner la disparition des fonctions conscientes du cerveau. Différents mécanismes existent pour compenser rapidement ce manque d'oxygène. Une augmentation de la fréquence et du volume respiratoire et du débit sanguin est la première réaction de l'organisme pour contrecarrer l'hypoxie. Au niveau cellulaire, le mécanisme de survie majeur est la stabilisation du facteur de transcription Hypoxia Inductible Factor 1 alpha (HIF1a) qui modifie la transcription d'un pool de plus de 150 gènes impliqués en particulier dans la survie cellulaire, le passage d'un métabolisme aérobie à un métabolisme anaérobie et l'angiogenèse.

Dans une tumeur, l'hypoxie est le principal inducteur de la synthèse de facteurs pro-angiogéniques.

Cependant, de nombreuses études précliniques et cliniques montrent que les cellules tumorales mettent en place différentes stratégies pour s'adapter à l'hypoxie ou pour la fuir, ce qui à terme contribue à la sélection de cellules de plus en plus agressives et résistantes aux traitements.

2 - Modification de l'agressivité cellulaire

a. *Adaptation du métabolisme*

Le glucose est le nutriment essentiel à la production d'énergie sous forme d'ATP nécessaire à la survie des cellules et à leur prolifération. Il existe deux voies de production majeures d'ATP : la phosphorylation oxydative, très rentable en terme d'énergie car elle produit 36 molécules d'ATP pour 1 molécule de glucose et la glycolyse anaérobie peu rentable car ne produisant que deux molécules d'ATP. Néanmoins la conversion du glucose en ATP se réalise beaucoup plus rapidement via la glycolyse que par la phosphorylation oxydative, les deux voies sont donc équivalentes en terme de production d'ATP (Liberti and Locasale 2016).

La teneur en oxygène modifie le métabolisme glucidique car l'oxygène constitue un substrat nécessaire de la respiration mitochondriale composant la voie de la phosphorylation oxydative. A la très notable exception des cellules endothéliales (Eelen et al. 2015), les cellules non cancéreuses, utilisent la phosphorylation oxydative en présence d'oxygène et utilisent la glycolyse anaérobie lorsque la teneur en oxygène n'est plus suffisante (Vander Heiden et al. 2009).

Les cellules tumorales opèrent un changement métabolique vers la voie glycolytique pour continuer à proliférer quelle que soit la teneur en oxygène. Ce changement est décrit sous le nom d'effet Warburg,

du nom de celui qui l'a décrit en premier ou glycolyse aérobie (Figure 17). Pour cela elles réalisent un blocage total de la voie mitochondriale par une up régulation de la co-enzyme nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et par une inhibition des gènes impliqués dans la phosphorylation oxydative induite par le facteur de transcription majeur induit par l'hypoxie HIF1. Ce changement nécessitant une augmentation importante de la captation de glucose, les cellules tumorales surexpriment les transporteurs du glucose (GLUT) (Tung et al. 2015).

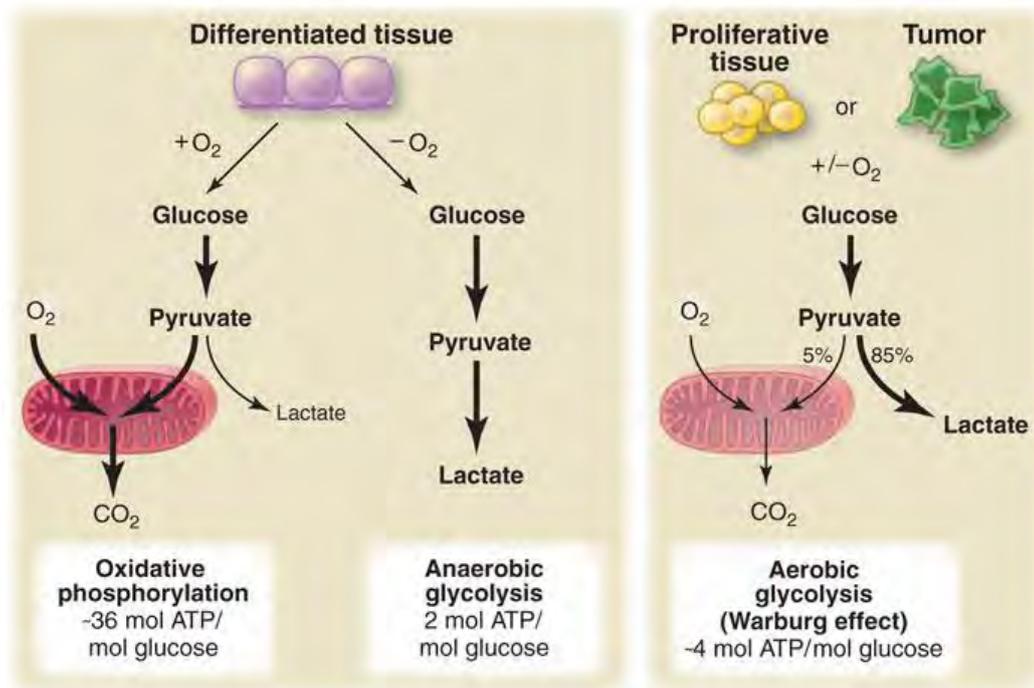


Figure 17 : Représentation schématique de la phosphorylation oxydative, la glycolyse anaérobie, et la glycolyse aérobie (effet Warburg). En présence d'oxygène, les tissus différenciés métabolisent le glucose en pyruvate par l'intermédiaire de la glycolyse. Le pyruvate est ensuite oxydé en CO₂ dans les mitochondries au cours de la phosphorylation oxydative. L'oxygène est l'accepteur final des électrons produits lors de cette oxydation, il est donc essentiel à ce procédé. Lorsque la teneur en oxygène diminue, les cellules peuvent rediriger le pyruvate généré par la dégradation du glucose vers la glycolyse anaérobie et générer du lactate. Warburg a observé que les cellules cancéreuses, comme les tissus en prolifération, ont tendance à convertir le glucose en lactate même en présence d'oxygène. (Vander Heiden et al. 2009)

Néanmoins il existe une forte hétérogénéité de métabolisme entre les différentes régions de la tumeur. Des travaux ont par exemple montré que lorsque le milieu s'appauvrit en glucose, les cellules tumorales sont capables d'utiliser à nouveau la phosphorylation oxydative, démontrant une forte plasticité cellulaire. De même le switch énergétique vers la glycolyse ne serait pas requis pour la progression tumorale, puisque la phosphorylation oxydative seule est capable de maintenir la prolifération tumorale. La composition du microenvironnement concernant la densité vasculaire et le gradient de nutriment, semble moduler ce métabolisme (Liberti and Locasale 2016).

Cependant, l'hypoxie renforce et soutient le changement métabolique vers la glycolyse qui permet une adaptation des cellules tumorales, qui deviennent alors indépendantes de l'oxygène. De plus, la forte production d'ATP induit la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) qui inhibe les gènes suppresseurs de tumeurs et augmente l'activation d'oncogènes et de GLUT1. Un cercle vicieux se crée et augmente l'effet Warburg et la mise en place de mécanismes impliqués dans l'agressivité cellulaire (Seliger et al. 2013; Tung et al. 2015).

Par exemple, la sur activation de la voie glycolytique induit une augmentation de l'expression des enzymes impliquées dans la glycolyse dont certaines, comme la lactate déhydrogénase A (LDH-A) ont été montrées comme responsables de la résistance des cellules tumorales aux traitements chimiothérapeutiques et une augmentation de la dissémination métastatique (Zhou et al. 2010).

Le fructose 6 phosphate, nécessaire à la glycolyse, est également utilisée par la voie des hexosamines qui conduit à la O-glycosylation de certaines protéines oncogènes qui augmentent leur agressivité (Ferrer and Reginato 2014). Le facteur anti-angiogénique, TSP1 subit par exemple une O-Glycosylation (Hofsteenge et al. 2001).

L'augmentation de l'activité glycolytique induit également une forte production du lactate qui est le produit de dégradation du glucose. Le lactate entraîne une diminution du pH du microenvironnement, favorisant l'invasion cellulaire. L'acidification du milieu permet notamment un remodelage de la matrice extracellulaire favorable à l'invasion et donc à la dissémination métastatique.

b. Les cellules souches cancéreuses

Certaines cellules de l'organisme, notamment les cellules souches possédant des capacités de pluripotence, sont localisées dans des niches hypoxiques. L'hypoxie tumorale favorise le maintien et le développement de cellules souches cancéreuses (CSC) qui sont particulièrement bien adaptées à l'hypoxie. La majorité des cellules tumorales ayant des caractéristiques de cellules épithéliales ne survivent pas à une hypoxie massive malgré l'adaptation métabolique. L'hypoxie conduit donc à une sélection des CSCs.

Les CSCs possèdent toutes les caractéristiques des cellules agressives : elles sont résistantes aux traitements, ce sont elles qui subissent majoritairement l'EMT et elles sont capables de reformer une tumeur avec la même hétérogénéité que la tumeur primaire.

Les CSCs représentent donc une population cellulaire importante à cibler pour éliminer la tumeur. Cependant il est difficile de trouver des marqueurs spécifiques de cette population cellulaire, car elles possèdent les mêmes marqueurs que les cellules souches saines normalement retrouvées dans le tissu

atteint par la tumeur. De plus, il est difficile de trouver des traitements ciblant cette population de façon efficace car elles ont une forte plasticité cellulaire et donc s'adaptent facilement.

c. Transition épithélio-mésenchymateuse

L'hypoxie a également été montrée comme étant un inducteur majeur de l'EMT. C'est un mécanisme clé de la dissémination tumorale. Elle exerce cet effet notamment via le facteur de transcription HIF1 alpha, stabilisé en condition hypoxique, qui induit la modification de l'expression des gènes impliqués dans l'EMT. Par exemple HIF1a induit l'expression de l'activateur majeur de l'EMT : le TGF β mais également la sous expression du marqueur épithélial E-Cadhérine via l'activation du facteur de transcription SNAIL dans le cancer de l'ovaire (Imai et al. 2003) et induit l'EMT des cellules cancéreuses de sein et de pharynx via l'activation du facteur de transcription TWIST. De même la coexpression de HIF1, TWIST et SNAIL est corrélée à la dissémination métastatique et à une moins bonne survie dans le cancer de la tête et du cou (Yang et al. 2008).

Plusieurs molécules ciblant l'EMT sont actuellement en évaluation clinique, dont des protéines pour lesquelles l'expression est régulée directement par l'hypoxie comme Hif1a et CAIX ou indirectement comme TGF β (Marcucci et al. 2016).

L'inhibition de l'EMT et/ou la réversion du phénotype mésenchymateux sont un enjeu majeur pour diminuer la formation de métastases, mais également pour diminuer la résistance aux traitements chimiothérapeutiques. Plusieurs études montrent en effet que les cellules ayant subies l'EMT deviennent également résistantes aux traitements (Fischer et al. 2015).

d. Résistances aux traitements

Le problème majeur des traitements aujourd'hui est l'apparition de cellules résistantes. Les traitements, en éliminant les cellules sensibles, sélectionnent les cellules résistantes qui prolifèrent et reforment une tumeur qui est généralement plus agressive que la première.

Il existe deux hypothèses sur l'origine de ces cellules résistantes. Il existerait une population de cellules résistantes intrinsèquement soit parce qu'elles ne prolifèrent pas, comme les cellules souches cancéreuses soit parce qu'elles expriment une mutation qui leur permet de résister. La deuxième hypothèse serait que les traitements auraient un pouvoir mutagène et augmenteraient le stress cellulaire. Ils favoriseraient donc l'apparition de mutations permettant l'acquisition de résistances.

L'hypoxie a également depuis longtemps été montrée comme diminuant l'efficacité des traitements. En effet, l'hypoxie tumorale traduit une mauvaise perfusion tumorale, rendant difficile l'accès des molécules thérapeutiques jusqu'au centre de la tumeur et donc réduisant leur efficacité. De même, la radiothérapie dont le principe repose sur la production de ROS à partir de l'oxygène, ne peut pas être efficace en

hypoxie. Cependant le stress hypoxique induisant la mort des cellules tumorales, les traitements anti-angiogéniques ont été développés dans le but de l'augmenter. Cependant l'échec relatif de ces traitements réside en grande partie dans le fait que les cellules résistant à l'hypoxie sont les cellules les plus agressives.

De nombreux mécanismes de résistances tumorales contre les traitements chimiothérapeutiques sont induits ou facilités par l'hypoxie :

- ◆ La stabilisation en hypoxie du facteur de transcription HIF1 entraîne une augmentation de l'expression des transporteurs ABC qui sont des pompes d'efflux permettant la sortie de la drogue avant qu'elle n'ait eu le temps d'agir.
- ◆ La forte acidification du milieu modifie négativement l'entrée des chimiothérapies basiques comme la doxorubicine.
- ◆ L'inhibition de l'expression des protéines pro-apoptotiques BAX et BID et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 ou G2 pour permettre la réparation des cassures de l'ADN avant le passage en phase S ou M, augmentant la résistance des cellules contre l'apoptose induite par la chimiothérapie.
- ◆ L'augmentation de l'instabilité génétique favorisant l'apparition de mutation pouvant permettre l'acquisition de résistances.

L'hypoxie est donc un puissant inducteur d'agressivité tumorale. En effet, elle modifie le métabolisme des cellules tumorales leur permettant de résister à l'absence d'oxygène, elle permet le maintien de la population cellulaire la plus agressive, les cellules souches cancéreuses, elle induit fortement la transition épithélio mésenchymateuse leurs permettant d'acquérir les capacités invasives nécessaire à la dissémination et elle entraîne la mise en place de mécanismes de résistances.

La TSP1 étant un des inhibiteurs de l'angiogenèse les plus puissants, je me suis au cours de cette thèse intéressée à son rôle potentiel dans la progression tumorale.

VI - LA THROMBOSPONDINE 1

1 - Définition

La TSP1 est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire découverte en 1971 à la surface des plaquettes activées par la thrombine, d'où son nom (Baenziger et al. 1971). Elle fait partie d'une famille composée de cinq membres : la TSP1, la TSP2, la TSP3, la TSP4 et la TSP5 qui se subdivise en deux sous groupes structurellement différents : le sous groupe A composé de la TSP1 et la TSP2, et le sous groupe B composé de la TSP3, le TSP4 et la TSP5. Les différences principales entre les deux sous groupes sont l'absence dans le sous groupe B, du domaine d'homologie au procollagène et des répétitions de type 1, une répétition de type II supplémentaire ainsi qu'une oligomérisation différente : le sous groupe A forme des homotrimères de 450kDa et le sous groupe B des pentamères (Kazerounian et al. 2008). (Figure 18)

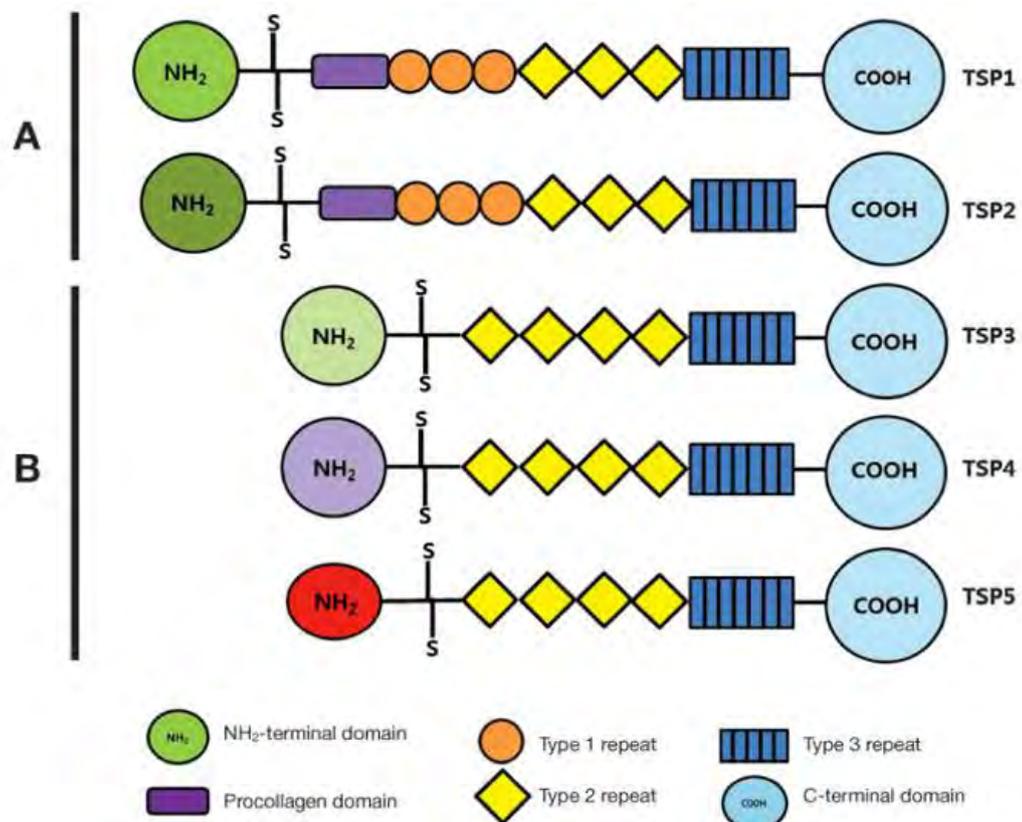


Figure 18 : Structures et domaines protéiques des membres de la famille des Thrombospondines (Jeong 2015)

Les TSP1 et 2 ont une expression presque ubiquitaire, alors que les TSP3, 4 et 5 ont une distribution plus restreinte (Wight et al. 1985; Iruela-Arispe et al. 1999). La TSP3 est fortement exprimée dans les poumons et la peau (Vos et al. 1992) ; la TSP4 dans les muscles squelettiques et cardiaques (Lawler et al. 1993) ; et la TSP5 dans les cartilages et les tendons (DiCesare et al. 1994).

2 - Les principaux domaines et récepteurs de la TSP1

La TSP1 est la première protéine découverte ayant des propriétés antiangiogénique et la plus étudiée de la famille des TSPs (Baenziger et al. 1971). Chaque monomère de 150 kDa de TSP1 est composé de sept domaines principaux qui interagissent avec de nombreux ligands et récepteurs différents (Figure 19). Ces interactions sont extrêmement variables selon la composition du tissu dans lequel la TSP1 est exprimée et sont à l'origine de la multiplicité de ses fonctions.

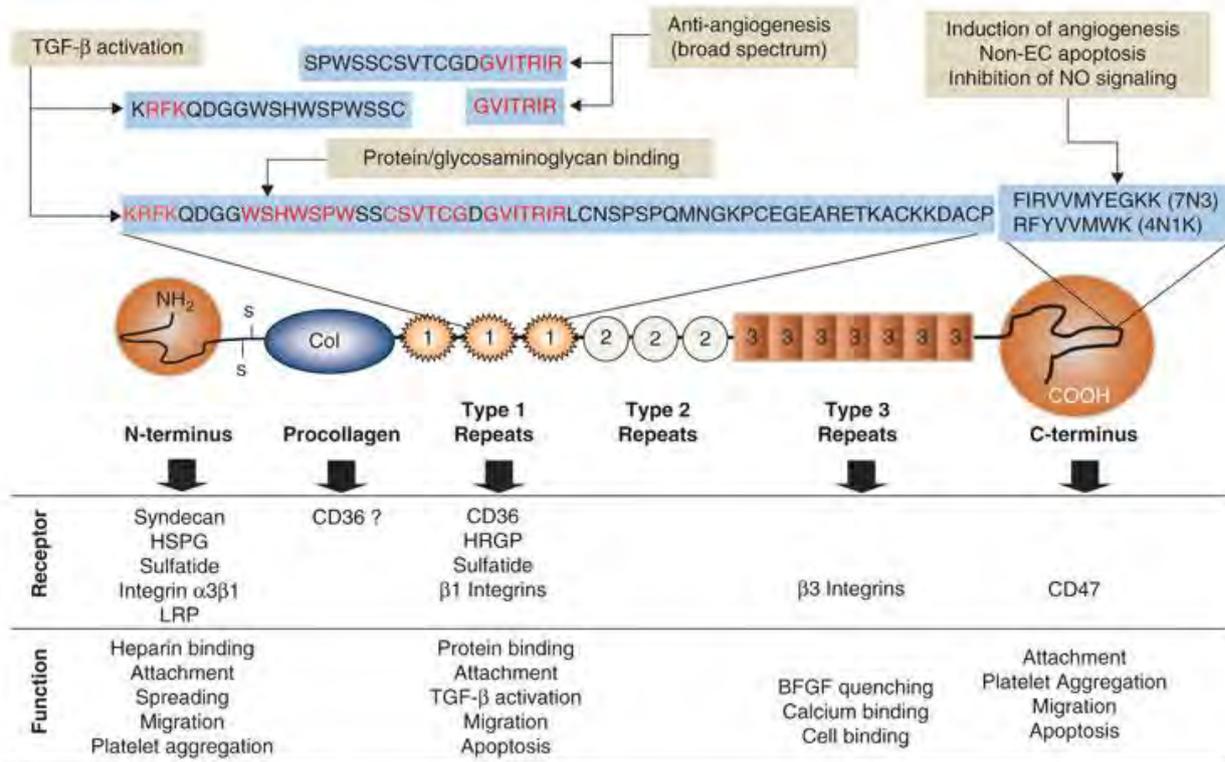


Figure 19 : Relation structure-fonction de la TSP1. Un monomère de TSP1 est représenté schématiquement avec ses différents domaines structuraux ainsi que les récepteurs interagissant avec et les fonctions associées. (Henkin and Volpert 2011).

On distingue structurellement et fonctionnellement de l'extrémité N-Terminale vers l'extrémité C-Terminale :

- ◆ Un domaine globulaire N-Terminale qui interagit notamment avec le récepteur LRP1 (low density lipoprotein receptor related protein), les héparanes sulfates et de nombreuses intégrines qui ont une fonction importante dans l'adhésion, la mobilité cellulaire et l'endocytose.
- ◆ Un domaine de trimérisation, comportant deux résidus de cystéines

- ◆ Trois répétitions de type I, aussi appelées TSRs (Thrombospondin type I repeats) ou de type properdine. Dans la seconde de ces répétitions, se situe le motif peptidique qui permet l'activation du TGFβ (Transforming Growth Factor β) latent. Seule la TSP1 possède cette capacité (Mirochnik et al. 2008). Ce domaine est également celui permettant la liaison avec le récepteur CD36, décrit comme médiant majoritairement l'activité anti-angiogénique de la TSP1.
- ◆ Ces répétitions de type 1 sont suivies d'un domaine de trois répétitions de type II ou de type EGF, puis de sept répétitions de type III riches à aspartate et capables de lier le calcium. Les répétitions de type III sont impliquées dans l'adhésion et la prolifération cellulaire.
- ◆ Le domaine globulaire C-Terminal lie quant à lui les intégrines β3, β6 et les protéoglycanes impliqués dans l'adhésion cellulaire. Il interagit aussi avec le récepteur CD47 impliqué dans la migration cellulaire notamment par son association aux intégrines mais aussi dans l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales (Sid et al. 2004).

3 - Les fonctions majeures de la TSP1

Du fait de son expression très ubiquitaire, de la variété des protéines et des récepteurs avec lesquelles elle peut interagir, la protéine TSP1 est impliquée dans de très nombreux processus physiologiques et pathologiques.

La TSP1 a été découverte à la surface des plaquettes activées par la thrombine (Baenziger et al. 1971). Cependant, par la suite, il est devenu évident que cette protéine est le constituant majeur des granules α des plaquettes et qu'elle est sécrétée après activation de ces dernières. Elle joue un rôle dans l'agrégation plaquettaire et la formation du caillot sanguin. De plus, en interagissant avec différentes enzymes dégradant la matrice (MMP), elle participe au remodelage de la matrice extracellulaire, par exemple après une blessure. La TSP1 joue également un rôle prépondérant dans le phénomène inflammatoire. En réponse à une inflammation, la sécrétion de TSP1 est augmentée induisant une hausse de la phagocytose et de l'apoptose des cellules endommagées, une stabilisation du flux sanguin et un recrutement des cellules de l'immunité au niveau du site inflammatoire grâce à ses propriétés chimioattractantes. La TSP1 est aussi une protéine de liaison du calcium. Elle en module de ce fait la concentration intracellulaire. La fixation du calcium modifie la conformation tridimensionnelle de la TSP1 et donc l'accessibilité de ses domaines (Sid et al. 2004).

Le KO de la TSP1 n'est pas létal, il induit une augmentation du nombre de monocytes circulants, une lordose variable de la colonne vertébrale et une perturbation de l'homéostasie pulmonaire (Lawler et al. 1998). Le rôle de la TSP1 dans la physiologie des poumons a été précisé en 2014 par un travail qui montre

que la TSP1 exprimée par les cellules endothéliales pulmonaires régule la différenciation des cellules souches bronchioalvéolaires (Lee et al. 2014).

Parmi ses nombreuses propriétés, la TSP1 possède trois fonctions que nous allons détailler car elles jouent particulièrement un rôle dans la progression et la dissémination tumorale.

a. *Propriété anti-angiogénique*

Étudiée pendant 20 ans pour ses propriétés sur l'agrégation plaquettaire, et la réparation tissulaire, la littérature s'est aujourd'hui focalisée sur son rôle dans l'angiogenèse. En effet, l'équipe de Noël Bouck en 1990, démontre les propriétés anti-angiogéniques de la TSP1 (Good et al. 1990). C'est le premier facteur anti-angiogénique endogène à avoir été découvert. Cette propriété est bien caractérisée, puissante, et la TSP1 étant présente dans de nombreux tissus, elle régule l'angiogenèse dans une grande variété de tumeurs. La TSP1 régule négativement la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en agissant sur plusieurs cibles.

Le récepteur CD36 médie majoritairement l'effet anti-angiogénique de la TSP1 (Dawson et al. 1997). C'est une glycoprotéine transmembranaire identifiée comme étant de la famille des récepteurs scavenger B et impliquée dans le métabolisme cellulaire, l'agrégation plaquettaire, la phagocytose et l'immunité notamment (Mirochnik et al. 2008; Silverstein and Febbraio 2009). Il est localisé à la surface des cellules endothéliales et associé à l'intégrine b1 et au récepteur VEGFR2 (Zhang et al. 2009). Le domaine CLESH (CD36, LIMP2, EMP, SRB-1) du CD36 interagit avec la séquence CSVTCG et les séquences adjacentes de la TSP1, situées dans la seconde et la troisième répétition de type I (de Fraipont et al. 2001). Cette liaison déclenche l'apoptose des cellules endothéliales par les activations successives de la tyrosine kinase p59^{fyn}, de la protéase caspase 3 et de la mitogen activated protein (MAP) kinase p38 (Volpert et al. 2002; Rege et al. 2009). Cette liaison inhibe également l'action des facteurs pro angiogéniques FGF2 et VEGF en inhibant la migration des cellules endothéliales activée par FGF2 et la phosphorylation du récepteur VEGFR2 permettant son activation. Enfin cette liaison inhibe la migration et l'organisation morphologique en tubes des cellules endothéliales (Dawson et al. 1997).

La TSP1 se lie également avec le CD47, un récepteur associé aux intégrines (IAP) (Wang and Frazier 1998; Sipes et al. 1999). Le complexe TSP1-CD47 bloque la voie de transduction physiologique du monoxyde d'azote (NO), composée notamment de la guanylate cyclase (cG), de la cyclic guanosine monophosphate (cGMP) et de la kinase cGMP-dépendante (cGK), régulant l'angiogenèse et la vasodilatation des vaisseaux (Isenberg et al. 2009). Cette interaction produit un effet anti-angiogénique sur les cellules endothéliales et une diminution du flux sanguin tissulaire (Isenberg et al. 2007; Maxhimer et al. 2009).

Les intégrines jouent un rôle majeur dans la médiation des interactions entre la matrice extracellulaire et les cellules. Elles favorisent l'adhésion physique des cellules et transmettant un signal intracellulaire qui

régule leur survie et leur comportement. Le domaine N-terminal de la TSP1 est par exemple capable d'interagir avec les intégrines $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 6\beta 1$ qui médient négativement la prolifération, l'adhésion et la chimioattraction des cellules endothéliales à la TSP1 (Calzada et al. 2003).

La liaison de la TSP1 sur le CD36 exprimé par les cellules endothéliales induit leur apoptose (Volpert et al. 2002). La TSP1 réduit également la mobilisation des progéniteurs endothéliaux de la moelle osseuse (Shaked et al. 2005). Par ailleurs, la liaison de la TSP1 sur l'intégrine $\beta 1$ induit la prolifération des péricytes, promeut leur survie et leur migration (Ichii et al. 2002; Mirochnik et al. 2008). Elle régule l'adhésion des péricytes aux cellules endothéliales de façon dépendante du calcium via la liaison de l'intégrine $\alpha v\beta 3$ avec le motif RGD (Arginine-Glycine-Aspartate) situé dans sa partie C-Terminale favorisant ainsi la stabilisation des vaisseaux existants (Lawler et al. 1988).

Elle est capable de se lier et de séquestrer les facteurs pro-angiogéniques VEGF et FGF circulant, bloquant ainsi l'interaction avec leurs récepteurs respectifs (Margosio et al. 2003).

D'autres mécanismes anti-angiogéniques de la TSP1 qui ne seront pas détaillés ici ont été décrits, comme la liaison du domaine N-Terminal de la TSP1 avec l'héparine et les protéoglycanes héparanes sulfates (HSPG) ou via le récepteur LRP1 (Rusnati et al. 2010).

Du fait du rôle important de l'angiogénèse tumorale dans la progression tumorale, l'effet des propriétés anti-angiogéniques de la TSP1 sur la croissance tumorale a été évalué par de nombreux travaux précliniques et cliniques. Il a ainsi été montré dans des modèles murins de xénogreffes de glioblastome (Tenan et al. 2000), de cancer mammaire (Weinstat-Saslow et al. 1994), de fibrosarcome (Volpert et al. 1998) et de cancer cutané (Bleuel et al. 1999; Streit et al. 1999) notamment, que la TSP1 induit la diminution de la densité vasculaire et inhibe la croissance tumorale. Ces données ont conduit au développement d'un nonatapéptide correspondant au site de liaison de la TSP1 sur le récepteur CD36. Ce peptide, ABT510, conserve les propriétés antiangiogéniques de la TSP1. Des essais cliniques de phase I puis de phase II dans différents cancers ont été réalisés avec ce peptide stabilisé. Si une inhibition de l'angiogénèse tumorale a bien été observée chez les patients traités, il n'y a cependant eu aucun bénéfice clinique et les essais ont été arrêtés. Ces données soulignent que l'inhibition de l'angiogénèse produite par surexpression d'un peptide dérivé d'un inhibiteur endogène, ou par administration d'un agent interférant avec la signalisation d'un activateur de l'angiogénèse produisent des résultats comparables sur la croissance tumorale en clinique.

b. Adhésion/dé-adhésion et migration cellulaire

La TSP1 est un puissant régulateur des processus d'adhésion, de dé-adhésion et de migration cellulaire. En effet, elle régule l'expression des intégrines et modifie l'interaction des cellules avec les protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, la décorine et l'héparine.

Lors de l'embryogenèse elle joue un rôle prépondérant dans la mise en place du système nerveux. Elle induit l'adhésion et la migration des cellules de la crête neurale à partir du tube neural embryonnaire permettant la formation du système nerveux. A l'âge adulte, la TSP1 sécrétée par les astrocytes, induit la synapse glutamatergique grâce à l'interaction de son domaine de type EGF avec le canal calcique de type-L des neurones (Tucker et al. 1999).

La TSP1 favorise la migration des fibroblastes en induisant le désassemblage de leurs points focaux d'adhérence via son domaine de liaison aux héparanes sulfates (Murphy-Ullrich et al. 1993; Barker et al. 2004). Par ailleurs, elle augmente l'expression de l'intégrine $\alpha 6$ favorisant l'attachement des kératinocytes à la matrice extracellulaire. La TSP1 régule l'expression des métalloprotéases qui dégradent la matrice, notamment la MMP2 et la MMP9, ainsi que les inhibiteurs de ces mêmes protéases, les TIMPS.

Ces propriétés permettent à la TSP1 de réguler finement l'adhésion et la migration cellulaire qui sont clés dans les différentes étapes de la dissémination métastatique.

En 1987, le groupe de Tuszynski démontre que la TSP1 augmente l'adhésion des cellules tumorales de sarcomes in vitro et induit une augmentation du nombre de métastases pulmonaires in vivo (Tuszynski et al. 1987). De nombreuses études ont depuis confirmé ces observations dans de nombreux types de cellules tumorales.

Par exemple, la TSP1 favorise la migration des cellules tumorales mammaires, via l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$ qui induit la polymérisation des filaments d'actine nécessaire à la migration des cellules (Ndishabandi et al. 2014). D'autres mécanismes sont mis en jeu pour cette propriété pro-migratoire. Par exemple, la TSP1 induit la migration des cellules tumorales prostatiques via le récepteur CD36 (Firlej et al. 2011). Une région située dans les répétitions de type 1 de la TSP1 a également été montrée comme induisant l'activation du récepteur EGFR de façon indirecte conduisant à l'augmentation de la migration des cellules de carcinome épidermoïde (Liu et al. 2009).

Les cellules tumorales semblent particulièrement sensible à cette activité pro-migratoire de la TSP1 puisqu'elle induit la migration et l'invasion de trois lignées cellulaires tumorales mammaires mais n'a aucun effet sur la lignée non tumorale MCF10A (Wang et al. 1996).

c. Activation du TGF β latent

Le TGF β doit être lié au peptide de latence pour être sécrété, et doit en être débarrassé pour agir avec ses récepteurs. Le TGF β est sécrété sous une forme inactive, appelée TGF β latent ou pro-TGF β , lié à un peptide de latence (LAP) dont il doit être libéré pour être activé et pouvoir interagir avec ses récepteurs. La TSP1 possède une séquence de quatre acides aminés KRFK, située entre la première et la seconde répétition de type I et un motif WxxW (WSPW, WSHW, WGPW) présent dans chacune des trois

répétitions de type I. Les séquences WxxW interagissent avec le site actif du TGF β pour positionner la TSP1 de façon idéale à ce que la séquence KRKF puisse interagir avec la séquence LSKL du peptide de latence, entrant en compétition avec celui-ci, et induisant son déplacement pour libérer le site actif du TGF β (Figure 20).

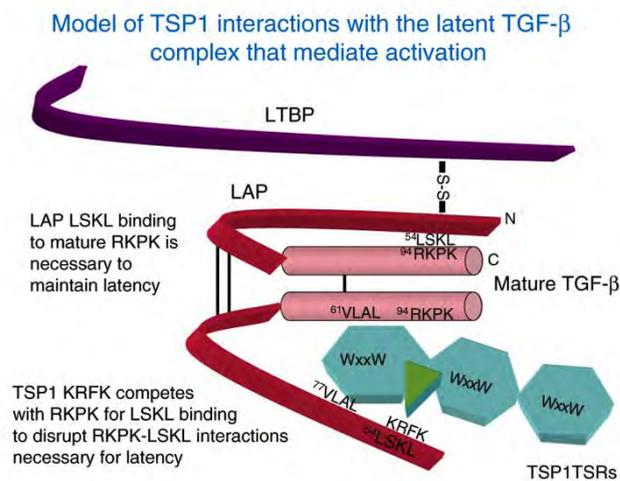


Figure 20 : Modèle d'activation du TGF β par la TSP1. (Sweetwyne and Murphy-Ullrich 2012)

La TSP1 est ainsi un activateur majeur des trois isoformes du facteur de croissance TGF β . De façon intéressante, seule la TSP1 possède la capacité d'activer le TGF β alors que la TSP2 possède également le motif WxxW, mais la séquence KRKF est absente. A la place, on trouve une séquence TRIR qui n'est pas capable d'entrer en compétition avec la séquence LSKL et activer le TGF β (Murphy-Ullrich and Poczatek 2000). D'autres protéines sont capables d'activer le TGF β latent, par exemple la Neuropiline 1 (Glinka and Prud'homme Gé 2008), la F-spondine (Attur et al. 2009) et ADAMTS1 (Bourd-Boittin et al. 2011). Ces protéines possèdent également la séquence KRKF, pouvant laisser penser que ce mécanisme pourrait être un mécanisme d'activation du TGF β commun à plusieurs protéines.

Le TGF β est un puissant régulateur du développement embryonnaire, de la croissance, de l'expression génique, de la différenciation cellulaire, du système immunitaire et de la réparation tissulaire. Un déficit ou une surproduction de TGF β induit donc d'importantes perturbations de ces fonctions (Murphy-Ullrich and Poczatek 2000). De même le KO du TGF β est létal.

Dans un tissu normal et lors des premiers stades de la tumorigenèse, le TGF β réprime la progression tumorale en inhibant le cycle cellulaire et en stimulant l'apoptose. Cependant dans les stades plus avancés, le TGF β active l'EMT et la dégradation de la matrice mais également diminue la surveillance immune, induisant l'invasion et la dissémination métastatique. Xu et al, montrent dans le cancer du sein,

que ce changement de fonction durant la progression tumorale est dû à la modification des partenaires de SMAD, le facteur de transcription majeur de la voie de signalisation du TGF β (Xu et al. 2015).

En clinique, l'expression du TGF β est corrélée avec le grade tumoral, une faible différenciation des tissus, une diminution de la survie globale et une augmentation des métastases dans de nombreux cancers, notamment dans le glioblastome dans lequel il est un oncogène majeur.

Les phénotypes des souris invalidées pour la TSP1 ou pour le TGF β présentent des similitudes et l'administration systémique du peptide KRFK aux souris invalidées pour la TSP1, active le TGF β et permet de restaurer en partie le phénotype. Certains effets de la TSP1 sont donc en partie superposables à ceux du TGF β .

4 - Expression de la TSP1 dans le cancer

La TSP1 régule non seulement l'angiogenèse mais également l'adhésion et la migration cellulaire. Ceci explique que la TSP1 ait des effets complexes, parfois contradictoires en fonction de sa concentration et du tissu.

Dans les premiers stades de la tumorigenèse, l'expression de la TSP1, qui est produite à la fois par les cellules tumorales et par les cellules stromales, est le plus souvent réprimée par rapport aux tissus normaux adjacents. En effet, le promoteur de la TSP1 a été retrouvé méthylé dans le lymphome, le neuroblastome (Yang et al. 2003), le cancer de l'estomac (Guo et al. 2010), du pénis (Guerrero et al. 2008) et de la prostate (Firlej et al. 2011). De plus, l'expression de la TSP1 est soutenue par des gènes suppresseurs de tumeurs tels qu' APC, p53, p73, PTEN, SMAD4 et réprimée par des oncogènes comme Ras, Myc, Id-1, src, c-Jun et HER2 (Mirochnik et al. 2008).

La TSP1 étant un puissant anti-angiogénique, l'inhibition de son expression, facilite le switch angiogénique nécessaire à la mise en place de la vascularisation tumorale. Une corrélation inverse entre l'index de vascularisation et le taux d'expression de la TSP1 a fréquemment été décrite (Henkin and Volpert 2011). C'est pour ces raisons que la TSP1 a été décrite comme étant anti-tumorale.

Cependant, des travaux précliniques ont montré que les tumeurs étaient capables de développer une résistance contre cet inhibiteur endogène de l'angiogenèse (Filleur et al. 2001). Une forte expression de TSP1 a été retrouvée dans de nombreux modèles précliniques, confirmée en clinique et associée à un mauvais pronostic dans différents types de tumeurs, en particulier aux stades les plus avancés. C'est notamment le cas dans les tumeurs de la prostate résistantes à la castration (Firlej et al. 2011), du pancréas (Okada et al. 2010), de la vésicule biliaire (Roh et al. 2009), de la thyroïde (Nucera et al. 2010), du sein (Fontana et al. 2005), dans le mélanome (Jayachandran et al. 2014) et dans les glioblastomes

(Kawataki et al. 2000). Enfin dans le cancer du sein l'expression de la TSP1 a été montrée pro-invasive et pro-métastatique. (Byrne et al. 2007; Suh et al. 2012; Horiguchi et al. 2013; Campone et al. 2015).

SUJET DE THESE : ROLE DE LA TSP1 DANS LA PROGRESSION ET LA DISSEMINATION DU CANCER DU SEIN

La TSP1 est un des plus puissants inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse comme le montre la corrélation inverse entre l'index de vascularisation et le taux d'expression de la TSP1 observée dans de très nombreuses tumeurs cliniques et expérimentales (Henkin and Volpert 2011).

Le promoteur de la TSP1 est méthylé dans les lymphomes, les neuroblastomes (Yang et al. 2003), les cancers de l'estomac (Guo et al. 2010), du pénis (Guerrero et al. 2008) et de la prostate (Li et al. 1999). De plus, l'expression de la TSP1 est induite par des gènes suppresseurs de tumeurs tels que APC, p53, p73, PTEN, SMAD4 et réprimée par des oncogènes comme Ras, Myc, Id-1, src, c-Jun et HER2 (Mirochnik et al. 2008). L'inhibition de la TSP1 dans les cellules tumorales dans les premiers stades de la tumorigenèse est interprétée comme un élément participant au switch angiogénique, et donc au démarrage des tumeurs naissantes.

L'angiogenèse étant indispensable à la croissance tumorale, l'inhibition de ce processus a été pendant longtemps considéré comme nécessairement antitumoral, et la TSP1 n'a de ce fait été considérée que sous cet angle par la majorité des études, en particulier dans les études cliniques rétrospectives.

Cependant, la TSP1 présente des propriétés qui peuvent au contraire faciliter le développement des tumeurs et des métastases, c'est en particulier le cas de ses propriétés régulatrices de l'adhésion et de la dé-adhésion, requises pour la migration, et de la capacité de la TSP1 à activer le TGF β . Dans les stades précoces du cancer du sein, le TGF β inhibe la prolifération cellulaire et augmente l'apoptose alors que dans les stades avancés il induit l'EMT, l'invasion et les métastases (Zarzynska 2014).

Dès 1987, avant que les propriétés anti-angiogéniques de la TSP1 n'aient été mises en évidence, le groupe de Tuszynski attribuait des propriétés pro-métastatiques à la TSP1 (Tuszynski et al. 1987). Une forte expression de TSP1 a été décrite dans de nombreuses lignées cellulaires tumorales agressives (ref). Par la suite d'autres travaux ont montré que l'effet pro-tumoral de la TSP1 était associé à une inhibition de l'angiogenèse (Fontana et al. 2005) (de Fraipont et al. 2004). Des travaux précliniques ont montré que des tumeurs dont la croissance était initialement inhibée par la TSP1 développaient une résistance contre cet inhibiteur endogène de l'angiogenèse (Filleur et al. 2001) .

En clinique, une forte expression de TSP1 a été associée à un mauvais pronostic dans différents types de tumeurs, en particulier aux stades les plus avancés. C'est notamment le cas dans les tumeurs de la prostate résistantes à la castration (Firlej et al. 2011), du pancréas (Okada et al. 2010), de la vésicule biliaire (Roh et al. 2009), de la thyroïde (Nucera et al. 2010), du sein (Fontana et al. 2005), dans le mélanome (Jayachandran et al. 2014) et dans les glioblastomes (Kawataki et al. 2000). Enfin dans le

cancer du sein l'expression de la TSP1 a été montrée comme augmentée dans les tumeurs par rapport aux tissus sains, et dans les tumeurs métastatiques par rapport aux tumeurs localisées (Byrne et al. 2007; Suh et al. 2012; Horiguchi et al. 2013; Campone et al. 2015).

Les effets de la TSP1 sur la croissance tumorale apparaissent donc contradictoires dans la littérature. Ceci pourrait être dû au modèle expérimental ou clinique étudié et à la fonction prédominante de la TSP1 dans ces différentes situations. Il est également possible que l'effet de la TSP1 change au cours de la progression tumorale.

Les inhibiteurs pharmacologiques de l'angiogenèse ont été développés pour augmenter l'hypoxie tumorale. Cependant leurs effets modestes sur la survie des malades, et un faisceau de données cliniques et expérimentales suggérant que l'hypoxie pourrait favoriser la survenue des métastases conduisent à réviser cette vision probablement trop simple du rôle de la vascularisation et de l'hypoxie dans les tumeurs.

Dans ce contexte, j'ai choisi de réévaluer l'effet de certaines fonctions de la TSP1 sur la croissance tumorale et la dissémination métastatique en me focalisant plus particulièrement sur sa capacité à inhiber l'angiogenèse d'une part et à activer le TGF β d'autre part. J'ai en particulier cherché à déterminer si ces deux propriétés exercent des actions opposées ou si au contraire elles stimulent toutes deux la croissance tumorale et la formation de métastases. Pour répondre à cette question, nous avons développé des outils cellulaires permettant soit de découpler ces deux voies pour étudier indépendamment leurs effets sur la dissémination métastatique, soit d'inhiber globalement l'expression de la TSP1.

Nous avons conduit cette étude dans un modèle du cancer du sein métastatique, correspondant au sous type histologique basal ou triple négatif, qui est le plus invasif et pour lequel il y a une demande importante de nouveaux traitements ciblés et efficaces.

RESULTATS

Le cancer du sein représente la maladie la plus fréquente chez les femmes occidentales. Depuis 1980, la mortalité par cancer du sein diminue de 1,3% par an en moyenne, ce qui s'explique en partie par l'augmentation du dépistage qui permet un diagnostic plus précoce, et par l'amélioration des traitements disponibles (Institut national du cancer. 2016). En France en 2015, le cancer du sein reste néanmoins chez les femmes, le plus fréquent des cancers avec 54 000 nouveaux cas (33,5% des cancers) et le plus mortel avec 11900 décès (18,5% des cancers) par an (Figure 21). Les facteurs de risque connus sont les mutations BRCA1/BRCA2, l'excès de poids, l'utilisation des thérapies hormonales lors de la ménopause, les contraceptifs oraux, l'inactivité physique et la consommation d'alcool (Shapiro et al. 2014) (Colditz et al. 2012).

Localisations	Incidence			Mortalité		
	Effectif(*)	Contribution à l'ensemble des cancers (%)	Rang	Effectif	Contribution à l'ensemble des cancers (%)	Rang
Sein	53 000	33,4	1	11 500	18,3	1
Côlon-rectum	19 000	12,0	2	8 300	13,2	2
Poumon	12 000	7,6	3	8 100	12,9	3
Corps de l'utérus	6 800	4,3	4	2 080	3,3	5
Lymphome malin non hodgkinien	5 300	3,3	5	1 680	2,7	6
Tous cancers	158 500	100,0	-	63 000	100,0	-

Figure 21 : Incidence et mortalité estimées des cancers chez la femme en France métropolitaine en 2011. Sont représentées les cinq principales localisations. (D'après l'institut national du cancer 2015).

Les traitements de référence dans le cancer du sein sont la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie (Harbeck et al. 2013). Les cancers du sein sont très hétérogènes en terme de localisation et de nature, de réponse aux traitements, d'agressivité et de survie (Sørli et al. 2001). Le protocole thérapeutique est donc orienté par plusieurs paramètres qui permettent la classification des différents cancers du sein. Il en existe de nombreux, seuls les principaux seront détaillés ici.

Le premier est le type histologique. On distingue les cancers du sein non invasifs ou in situ et les cancers du sein invasifs. Un carcinome est dit in situ lorsque les cellules cancéreuses sont présentes uniquement dans les canaux du sein (carcinome canalaire in situ) ou les lobules du sein (carcinome lobulaire in situ), sans atteinte des tissus environnants. Le carcinome canalaire in situ est le plus fréquent puisqu'il représente 90% des cas de cancer du sein non-invasif chez la femme. Ces tumeurs ont un bon pronostic avec une survie à 10 ans supérieure à 95% (Institut national du cancer. 2009).

En revanche les cancers du sein invasifs ou infiltrants sont des tumeurs capables de se disséminer dans l'organisme. Ils représentent environ 80% des cancers du sein dépistés par mammographie. Il en existe de nombreux sous types qui sont classifiés permettant une uniformisation au niveau mondial (Sinn and Kreipe 2013). Le carcinome canalaire infiltrant représente comme dans les tumeurs in situ le sous type le plus fréquent avec 70-75% des cas.

Le grade histopronostique ou grade tumoral rend compte quant à lui de l'agressivité de la tumeur. Le grade histopronostique d'Ellis-Elston (EE) est le plus communément utilisé (Elston and Ellis 2002). Il est classé de I à III et repose sur trois éléments : l'architecture tumorale, les atypies cytonucléaires et le nombre de mitoses. Plus le grade tumoral augmente plus la survie diminue (Figure 22). Les tumeurs de grade I sont bien différenciées et de bon pronostic, les tumeurs de grade II sont moyennement différenciées et de pronostic intermédiaire et les tumeurs de grades III sont indifférenciées et de mauvais pronostic.

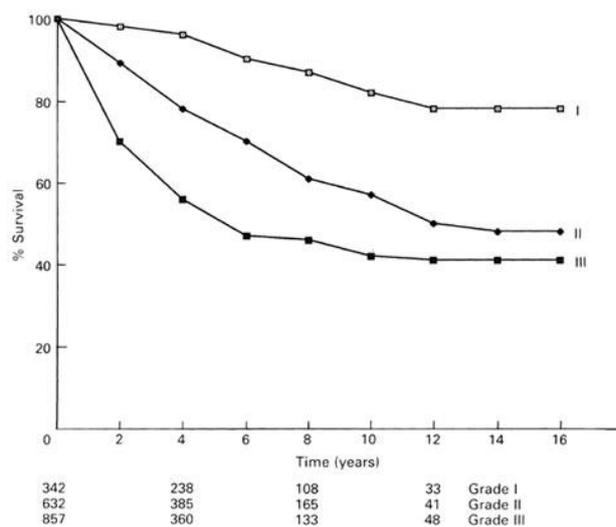


Figure 22 : Influence du grade tumoral sur la survie globale. (Elston and Ellis 2002)

Le stade tumoral permet de spécifier le degré de propagation de la tumeur dans les tissus environnants. La classification Tumor Node Metastases (TNM) est utilisée. Le T détermine la taille de la tumeur primaire et l'envahissement local. Le N la propagation du cancer aux ganglions lymphatiques voisins, la taille et le nombre de ganglions atteints. Le M détermine la propagation du cancer vers d'autres organes, la présence et le nombre de métastases (Senkus et al. 2015).

Enfin, le sous type histologique intrinsèque est basé sur l'expression des récepteurs hormonaux, le récepteur aux œstrogènes (RE) et le récepteur à la progestérone (RP), du récepteur au facteur de croissance épidermique humain (HER2) et du pourcentage de cellules positives pour Ki67 (marqueur de

prolifération). La combinaison de ces trois marqueurs définit 4 sous types histologiques intrinsèques (Figure 23).

Intrinsic subtype	Clinicopathologic surrogate definition	Notes
Luminal A	'Luminal A-like' ER-positive HER2-negative Ki67 low* PgR high** low-risk molecular signature (if available)	*Ki-67 scores should be interpreted in the light of local laboratory values: as an example, if a laboratory has a median Ki-67 score in receptor-positive disease of 20%, values of 30% or above could be considered clearly high; those of 10% or less clearly low, **Suggested cut-off value is 20%; quality assurance programmes are essential for laboratories reporting these results.
Luminal B	'Luminal B-like (HER2-negative)' ER-positive HER2-negative and either Ki67 high or PgR low high-risk molecular signature (if available) 'Luminal B-like (HER2-positive)' ER-positive HER2-positive any Ki67 any PgR	
HER2 overexpression	'HER2-positive (non-luminal)' HER2-positive ER and PgR absent	
'Basal-like'	'Triple-negative (ductal)' ER and PgR absent HER2-negative	There is ~80% overlap between 'triple-negative' and intrinsic 'basal-like' subtype, but 'triple-negative' also includes some special histological types such as (typical) medullary and adenoid cystic carcinoma with low risks of distant recurrence.

Figure 23 : Définitions des sous-types intrinsèques du cancer du sein selon le consensus défini à la Conférence St-Gallen de 2015. Légendes : ER : récepteur aux œstrogènes, HER2 : facteur de croissance épidermique humain et PgR : le récepteur à la progestérone. (Senkus et al. 2015).

Dans 90% des cas, les métastases sont à l'origine du décès du patient. La survie globale varie en fonction du sous type histologique considéré (Figure 24).

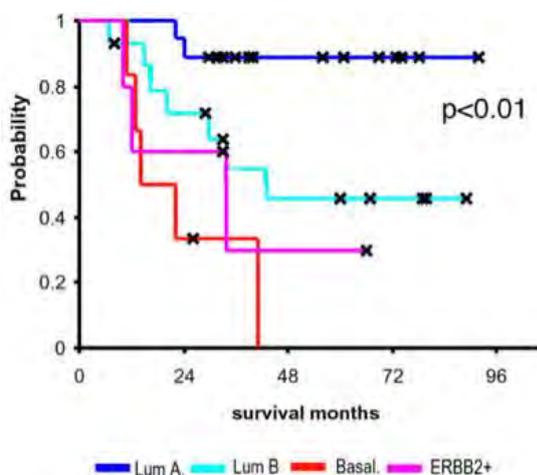


Figure 24 : Courbe de Kaplan Meier de la survie globale de 49 patientes atteintes d'un cancer du sein, uniformément traitées dans une étude prospective, en fonction des différents sous types histologiques intrinsèques. Légendes : Sous type Luminal A (Lum A), sous type Luminal B (Lum B), sous type Basal (Basal) et sous type HER2 (ERBB2+). Modifié de (Sørli et al. 2001)

Les sous types histologiques HER2 et Basal sont les plus agressifs. Pour le traitement des tumeurs du sous type HER2, il existe un anticorps monoclonal recombinant, le Trastuzumab ou Herceptine, ciblant

spécifiquement le récepteur HER2 surexprimé. Il permet d'augmenter la survie des patientes de façon significative (Haq and Gulasingam 2016). Cependant pour les tumeurs du type Basal, les traitements conventionnels disponibles ne sont souvent que palliatifs, ne fournissant qu'une extension très limitée de la survie.

Les traitements anti-angiogéniques étaient porteurs de nombreux espoirs pour améliorer la prise en charge de ces tumeurs du sein métastatiques. L'utilisation de l'anticorps ciblant le VEGF, le Bevacizumab ou Avastin a été approuvée par la FDA en février 2008 pour cette indication. Ils ont montré une efficacité dans la diminution de la douleur, grâce notamment à la réduction de la pression interstitielle (Jain 2005). Cependant, ces traitements n'ont pas démontré de bénéfice significatif sur la survie des patientes et ont de nombreux effets secondaires toxiques. Le Bevacizumab a été réévalué récemment par la FDA et son autorisation de mise sur le marché a été retirée dans cette indication. L'autorisation a été maintenue en Europe en combinaison avec la Capécitabine dans les cancers du sein métastatiques (Jayson et al. 2016).

Un des effets inattendus de ces traitements est une augmentation de l'invasion tumorale observé en préclinique (Ebos et al. 2009; Ellis and Reardon 2009; Paez-Ribes et al. 2009) et en clinique dans le glioblastome (Ellis and Reardon 2009), probablement due à l'hypoxie induite par ces traitements. Ces données posent la question du rôle des anti-angiogéniques endogènes dans la dissémination métastatique.

La TSP1, facteur anti-angiogénique endogène majeur, a été montrée dans un modèle de souris KO pour la TSP1, comme inhibant la progression tumorale mais favorisant la dissémination métastatique des tumeurs mammaires (Yee et al. 2009).

Ces résultats communs des inhibiteurs de l'angiogenèse synthétiques ou naturels, nous ont conduit à réévaluer le rôle de la TSP1 dans la progression tumorale et en particulier dans la dissémination métastatique du cancer du sein.

Pour cela nous avons choisi d'utiliser un modèle syngénique de tumorigenèse mammaire (67 NR) de phénotype comparable au sous type histologique Luminal et son pendant métastatique, les cellules 4T1 dont le phénotype est comparable au sous type histologique Basal. Les deux lignées cellulaires utilisées pour ces modèles proviennent d'un ancêtre commun mais ont ensuite dérivées de façon différente.

La TSP1 est une protéine pléiotropique qui interagit avec de multiples partenaires en fonction du contexte et possède de nombreux rôles. Pour mieux comprendre le rôle de l'hypoxie dans la dissémination métastatique, nous avons focalisé notre étude sur deux fonctions majeures de la TSP1 : ses propriétés anti-angiogéniques via le récepteur CD36 et sa capacité à activer le TGF β latent. Il semblait donc important d'utiliser un modèle immunocompétent pour garder la part du système immunitaire et ne pas biaiser l'analyse du rôle de ces deux fonctions dans la dissémination métastatique.

Silencing antiangiogenic Thrombospondin-1 normalizes vascularization and inhibits dissemination of metastatic breast cancer.

Julie Tenet^{*1,5}, Guillaume Labrousse^{*1}, Jessica Nakhlé^{*1,2}, Maud Chusseau², Elie Marcheteau², Raouia Ben Naya¹, Raphaëlle Duprez-Paumier³, Stephanie Delmas², Amélie Lusque⁴, Thomas Filleron⁴, Anne-Françoise Tilkin-Mariame¹, Odile Mondésert⁵, Christian Touriol¹, Hilary Brooks², Valérie Lobjois⁵, Hervé Prats¹, and Florence Cabon^{1,2}.

¹ Centre de Recherches en Cancérologie de Toulouse, INSERM UMR1037, Université Toulouse III Paul-Sabatier, ERL 5294 CNRS, 2 avenue Hubert Curien, 31047 Toulouse cedex 1, France

² SeleXel, 1 place Pierre Potier, BP 50624, 31106 Toulouse Cedex 1, France

³ Institut Universitaire du Cancer de Toulouse-Oncopole, CHU de Toulouse, France

⁴ Institut Claudius Regaud, ICUT-Oncopole Toulouse, France

⁵ ITAV, Université de Toulouse, CNRS, UPS, F-31106 Toulouse, France

* Equal contribution

SUMMARY

Thrombospondin-1 (TSP1), a potent inhibitor of angiogenesis and activator of latent TGF β , is repressed at tumor onset but expressed and of bad prognosis in high grade breast cancers. We show that TSP1 silencing inhibited EMT, migration, extravasation, and spontaneous metastasis, placing TSP1 as a major player of tumor progression. These effects were recapitulated mutating the TGF β -activating sequence by gene editing. Silencing TSP1, or impairing its antiangiogenic activity by gene editing of its CD36 binding site, increased and normalized vascularization, enhanced tumor perfusion, reduced hypoxia, and strongly inhibited metastasis. Only TSP1-positive tumor cells underwent a full metastatic process in mice, in agreement with our clinical data where breast cancer cells expressed TSP1 in 90% of metastatic tumors.

SIGNIFICANCE

We found antiangiogenic TSP1 associated with markers of aggressiveness and metastatic dissemination in clinical tumors. We demonstrate that at least two independent features of TSP1 concur to foster metastasis: its capacity to activate TGF β , and its antiangiogenic effect which increases hypoxia. In a self-amplifying positive-feedback loop, both TGF β and hypoxia increase TSP1 expression during tumor progression. We establish that TSP1 retards the onset of tumors but not the growth of already vascularized tumors. Inhibition of TSP1 strongly represses metastatic dissemination while it increases tumor perfusion and oxygen delivery in tumors, which should improve the efficacy of radiotherapy and delivery of chemotherapeutics. We thus propose this "anti-anti-angiogenic" strategy as a new therapeutic modality for metastatic breast cancers.

HIGHLIGHTS

- TSP1 silencing normalizes tumor vascularization and inhibits metastasis.
- TSP1-dependent activation of latent TGF β is required for EMT and migration.
- TSP1-induced hypoxia is a key trigger of metastatic dissemination
- Autocrine expression of TSP1 is required for a cell to successfully metastasize.

INTRODUCTION

Breast cancer is the most common malignant disease in western women. Of the deaths attributed to cancer, 90% are due to metastasis, and treatments that prevent or cure metastasis remain elusive. Emerging data indicate that hypoxia and the extracellular matrix might have crucial roles in metastasis (Gilkes et al., 2014). Thrombospondin-1 (TSP1) is a large - 450kDa - multidomain extracellular matrix protein secreted by a number of normal and tumor cell types. TSP1 binds to several cell surface receptors, and interacts with extracellular proteins, modifying their bioavailability and activity. In so doing, TSP1 regulates a wide variety of biological functions, notably cell adhesion and de-adhesion, migration, inflammation, inhibition of angiogenesis, and activation of latent TGF β (Rusnati et al., 2010) (Murphy-Ullrich and Sage, 2014).

In normal breast, TSP1 is not expressed, or at very low levels. In breast cancer, a high TSP1 level in lymph node-positive primary tumors was found associated with a reduction of progression-free survival, despite the fact that TSP1 expression was inversely correlated with microvessel blood density (Fontana et al., 2005). Several authors reported an increased level of TSP1 in plasma of patients with breast cancer as compared to controls, and a still higher level when tumors had metastasized (Byrne et al., 2007; Nathan et al., 1994; Pectasides et al., 2012; Suh et al., 2012).

Because increasing hypoxia in primary tumors by targeting vascularization is a strategy designed to inhibit tumor growth, TSP1, which triggers endothelial cell apoptosis by binding to CD36 (Jimenez et al., 2000), has long been considered as an antitumoral protein. However this concept is reconsidered today as hypoxia is suspected to foster metastatic dissemination (Mountzios et al., 2014). The antiangiogenic potency of TSP1 might thus be ambivalent, as for its capacity to activate TGF β . A short exposed linear peptide sequence in TSP1 type I repeats, KRFK, binds to a LSKL sequence in the Latency Associated Peptide of TGF β to release the active cytokine (Ribeiro et al., 1999), and some of TSP1 effects are superimposable to that of TGF β (Crawford et al., 1998). TGF β effects strongly depend on the cellular environment. In early stages of breast cancer this cytokine inhibits epithelial cell cycle progression and promotes apoptosis, showing tumor suppressive effects. However, in late stages, TGF β 1 promotes epithelial to mesenchymal transition (EMT) in malignant cells, and is linked with increased tumor progression, higher cell motility, cancer invasiveness, and metastasis (Zarzynska, 2014).

In this study, we combined clinical, *in vitro* and *in vivo* experimental studies to reevaluate how TSP1 affects breast cancer growth and metastasis, and to analyze the respective contributions in this process of its capacity to increase hypoxia on the one hand, and to activate TGF β on the other hand.

RESULTS

TSP1 is expressed in aggressive breast tumors samples and cell lines

Using an online survival analysis tool (www.kmplot.com) we assessed the effect of TSP1 on breast cancer prognosis using microarray data collected from 4142 patients (Gyorffy et al., 2010). Interestingly, a high TSP1 mRNA level was associated with a prolonged relapse free survival (RFS) in grade I cancers, but conversely with a reduced RFS in grade III (Figures 1A-1C). While TSP1 had no prognostic value for RFS in luminal A or luminal B cancers, a high TSP1 expression was associated with a reduced RFS in basal-type cancers (Figure 1D), and, whatever the tumor type or grade, with a reduced post progression survival (Figure 1E), and a reduced overall survival (hazard ratio HR: 1.6, CI95% 1.242.06, p=0.00027). These results thus associate a high TSP1 mRNA level with advanced or aggressive tumors.

To verify if this association was also true at the protein level, we analyzed 144 breast tumor samples (Supplementary Table 1). TSP1 was not expressed in normal breast tissue (Figure 1F). A high TSP1 protein level in tumor cells significantly associated with several markers of aggressiveness: high tumor and mitotic grades, high KI67 expression, presence of necrosis, and a trend for positive association with cytokeratin 5/6 expression (Figure 1G). TSP1 was also more expressed in Triple Negative Breast Cancers (TNBC) than in luminal A tumors (Figure 1H), confirming that TSP1 protein expression also correlates with features of breast cancer aggressiveness. Accordingly, in several breast tumor cell lines from human and mouse origin, TSP1 expression was higher in metastatic or TNBC basal-type cancer cell lines than in luminal-type, non-metastatic cells (Figure 1I).

To decipher whether TSP1 expression increases in response to tumor progression, or if it drives this progression, we selected the metastatic TNBC cell lines MDA-MB-231 and 4T1 cells of human and mouse origin respectively. The 4T1 and 67NR mouse cell lines were established from a mammary tumor that arose spontaneously in a BALB/c mouse (Aslakson and Miller, 1992). Injected into the mammary fat pad of syngeneic female mice, they form primary tumors with similar kinetics. However 4T1, but not 67NR, spontaneously disseminate and develop metastases into the lungs. We measured a significant increase in TSP1 mRNA, and protein levels in 4T1 metastatic cell homogenate and conditioned medium as compared to 67NR cells (Figures 2A and 2B).

TSP1 increases cell cohesion in mammospheres, EMT, migration, invasion and extravasation.

To study the role of TSP1 independently from its effect on angiogenesis, we first analyzed

3D mammospheres which mimic cell-cell and cell-matrix interactions occurring in tumors. We prepared mammospheres from 4T1 cells stably expressing an empty vector (4T1shC), or a plasmid coding for a shRNA targeting a sequence located in TSP1 exon 5, which silenced TSP1 expression by about 70% (4T1shT, Figures S2A and S2B), without modifying cell proliferation (Figures S2C).

By Scanning Electron Microscopy at day 6, cells appeared elongated and connected to each other on the surface of 4T1shC mammospheres, but round and loosely attached to each other in 4T1shT mammospheres (Figure 2C). The volumes of 4T1shT and 4T1shC mammospheres were initially similar (Figure 2D, bottom panel). However, after a week, cell density in 4T1shT mammospheres was significantly less than in 4T1shC (Figure 2D, upper panel), and after 3 weeks, 4T1shT mammospheres stopped developing altogether. This altered morphology in TSP1-silenced mammospheres, which shows that TSP1 participates to 3 dimensional cell density and cohesion, was accompanied by a repression in expression of the mesenchymal markers c-Met, Vimentin (Figure 2E), and Fibronectin (Figure 2F), as was the expression of 3 transcription factors regulating EMT (Figure 2F).

In transwell assays, 67NR cells appeared poorly motile as compared to 4T1 (Figure 2G). Transfection of a CMV-TSP1 expression plasmid, or activating TSP1 gene transcription using a CRISPR transcriptional activation strategy (Figures S2D and S2E) did not modify 67NR cell proliferation (Figure S2F and S2G), but stimulated migration (Figure 2H). Transfection of a CMV-TSP1 expression vector in 4T1 cells further enhanced their migration (Figure 2H). Conversely, silencing TSP1 either transiently, transfecting a TSP1-siRNA (Firlej et al., 2011) in 4T1 (Figures S2H and S2I), 67NR (Figure S2J) or MDA-MB-231 cells (Figure S2K), or stably, in 4T1shT cells, repressed migration (Figure 2I) without affecting proliferation (Figures S2L-S2N). In addition, while 4T1shC were able to exit from mammospheres embedded in matrigel and invade it, 4T1shT cells had lost this ability (Figures 2J and 2K).

To confirm these results *in vivo*, we injected in the tail vein of syngeneic Balb/c female mice 4T1 cells transiently transfected with TSP1-siRNA, 4T1shT, or their respective controls. All cells expressed a luciferase reporter gene. Silencing TSP1 resulted in over 70% inhibition of cell extravasation into the lungs as measured by luciferase mRNA content (Figure 2L). Similarly, silencing TSP1 in MDA-MB-231 cells reduced extravasation to lungs (Figure S2O).

TSP1 silencing reduces hypoxia, normalizes tumor vascularization, reduces EMT, and inhibits metastasis

We next engrafted 4T1shC and 4T1shT cells expressing a luciferase reporter, into the mammary fat pad of female syngeneic Balb/C mice. Once tumors were measurable, their growth appeared biphasic, a slow growing phase of about one week preceding a more rapidly growing phase (Figure 3A). The tumor take, defined as the delay between cell injection and a tumor volume of 150 mm³, and the growth rate were not statistically different in the two groups. However, visualization (Figure 3B) and quantification (Figure 3C) of luciferase activity in lungs showed that silencing TSP1 resulted into a 50% reduction in the number

of mice with detectable metastases, and in smaller metastases. The reduced expression of TSP1 in tumors was associated with a reduction of the EMT markers Ncadherin and c-Met (Figure 3D).

The density of CD31-positive vessels in 4T1shT tumors was increased 2.5 fold as compared to control tumors (Figures 3E and 3F), confirming the antiangiogenic activity of TSP1 in this TNBC model. The pericyte coverage, calculated as the percentage of vessels positive for both α -SMA and CD31, was also significantly increased in 4T1shT tumors (Figures 3E and 3G). A small increase of Lyve1-positive lymph vessels was observed in 4T1shT tumors but did not reach statistical significance (Figure 3H). To visualize hypoxia in tumors, some mice received an IV infusion of pimonidazole before sacrifice. Immuno detection of pimonidazole adducts showed that hypoxia was massively reduced in 4T1shT tumors as compared to controls (Figure 3E). Accordingly, Carbonic Anhydrase-IX (CA-IX), a prototypic hypoxia-induced gene, was frequently expressed in the close vicinity of vessels in 4T1shC tumors, indicating inefficient delivery of oxygen, while it was expressed only at a distance from vessels in 4T1-shT tumors (Figure 3E right panel). Importantly, and somewhat counter intuitively, these results show that the denser and more functional vasculature in the absence of TSP1 had no effect on the tumor growth rate while it was associated with a strong reduction in metastasis.

These experiments establish TSP1 expression as a driver of metastasis. At least two critical features of TSP1 might be implicated in this effect: its capacity to activate latent TGF β , and its antiangiogenic property, which increases hypoxia *in vivo*.

Hypoxia and TGF β induce TSP1 expression which in turn increases hypoxia and activates TGF β

Importantly, we found TSP1 mRNA and protein (Figures 4A and S4A) induced by hypoxia in 4T1 as in 67NR cells, as previously observed in prostate tumor cells (Firlej et al., 2011). Silencing TSP1 in 4T1 mammospheres had no effect on TGF β 1 mRNA level but significantly reduced that of both TGF β 2 and TGF β 3 (Figure 4B) showing that in addition to activate latent TGF β , TSP1 also regulates TGF β s mRNA levels. We observed that in turn, TSP1 expression was induced by TGF β in 4T1 cells (Figure 4C). Therefore, while TSP1 increases both hypoxia and active TGF β , hypoxia and TGF β in turn both increase TSP1 expression.

TSP1-dependent activation of TGF β , but not binding to CD36, is required for cell migration and extravasation.

We then used a knock-in strategy to introduce point mutations in the TSP1 gene without affecting its regulation. In 4T1 cells expressing luciferase, a first allele of TSP1 was disrupted using TALENS targeting the translational start site, and a CRIPR-Cas9-directed knock-in strategy was used to introduce mutations in the second TSP1 allele (Figure S4C). In 4T1mTGF β cells, the KRFK sequence was replaced by **KQWQ**, and no activation of a SMAD-reporter occurred in these cells (Figure S4D), thus corresponding to a

functional knock-down of TSP1-dependent TGF β activation. In 4T1mCD36 cells, CLGQCGDGVIEQIQ replaced the CSVTCGDGVITRIR sequence required for CD36 binding, an integral feature of TSP1 antiangiogenic activity. This mutation abolished the antiangiogenic effect of TSP1 on tube formation by HUVEC cells (Figure S4E), thus corresponding to a functional knockdown of TSP1 CD36-dependent antiangiogenic activity. Proliferation of 4T1mCD36 and 4T1mTGF β cells was not affected (Figure S4C).

As compared to 4T1 or 4T1mCD36 cells, the capacity of 4T1mTGF β to migrate was strongly reduced (Figure 4D). Treatment with recombinant active TGF β stimulated the migration of 4T1 cells and almost fully restored that of 4T1mTGF cells (Figure 4E).

Accordingly, when these cells were injected into the tail vein, the capacity of 4T1mCD36 cells to extravasate into the lungs was maintained, while that of 4T1mTGF β cells was strongly reduced, and restored when cells were pretreated with recombinant TGF β before injection (Figure 4F).

Inhibition of TSP1-dependent activation of TGF β impairs tumor development.

When grafted into mouse mammary fat pad, 4T1mTGF β tumors started to develop in 7 out of 7 implanted mice. However in less than a week, tumors started to regress either completely (3/7 mice) or transiently (4/7 mice), and the remaining tumors were not analyzed further due to their small size (Fig 4G). No metastases were detected in the lungs of mice bearing 4T1mTGF β tumors (Figure 4H). These data demonstrate the prominent effect in advanced tumors of TSP1-dependent activation of TGF β in all aspects of cancer pathology: migration, extravasation, development of primary tumors, and metastasis.

CD36-dependent TSP1 antiangiogenic activity drives metastasis.

As observed for 4T1shC and 4T1shT tumors, the 4T1 tumor growth was biphasic (Figure 4G). Remarkably, the initial slow growing phase was absent in 4T1mCD36 tumors, whose growth rate was constant throughout the experiment, comparable to that of established 4T1 (Figure 4G), 4T1shC, or 4T1shT tumors (Figure 3A). As compared to 4T1 tumors, the density of vascularization was increased in 4T1mCD36 tumors (Figures 4I and 4J), confirming that TSP1 binding to CD36 is central to its antiangiogenic function *in vivo*. The pericyte coverage of blood vessels was also statistically increased (Figures 4I and 4K), and the perfusion of 4T1mCD36 tumors was greatly improved, as shown by the better diffusion of injected Hoechst dye (figures 4I and 4L). The expression levels of TSP1 and of NCadherin in 4T1mCD36 tumors was comparable to that of 4T1 tumors (Figure 4M). In contrast, c-Met expression was significantly reduced (Figure 4M), although to a lesser extent than in TSP1 silenced tumors (4T1shT). Importantly, despite the fact that 4T1mCD36 cells were able to migrate and extravasate, that 4T1mCD36 tumors started to grow earlier, were larger, more vascularized and better perfused than 4T1 tumors, they did not give rise to any detectable metastases (Fig 4H). This result thus formally demonstrates that increasing tumor vascularization and perfusion robustly inhibits metastasis without stimulating the growth of primary tumors.

Tumor cells need to express TSP1 to metastasize

Heterogeneity is a hallmark of tumors and we thus asked whether TSP1 secreted by tumor or stromal cells could allow metastasis of tumor cells expressing low levels of TSP1. To answer this question, we first prepared mammospheres from a mix of 4T1shC and 4T1shT cells tagged with different fluorescent reporters. Cells from 4T1shC-GFP mammospheres invaded matrigel and migrated (Figure 5A, left), whereas only few 4T1shT-mCherry cells were able to do so (Figure 5A, right panel). When these cells were mixed in a 1/1 ratio in mammospheres, TSP1 negative cells migrated and invaded along with TSP1-positive cells, showing a local paracrine effect of TSP1 (Figure 5A, middle panel).

We then co-injected into the tail vein these reporter-tagged 4T1shC and 4T1shT cells and measured GFP and mCherry mRNA levels in the lungs. As previously, 4T1shT cells were poorly able to extravasate as compared to 4T1shC controls (Figure 5B). This capacity was increased when these cells were injected along with 4T1shC (1:1 mix, 10^6 total cells) but remained lower than that of 4T1shC cells (Figure 5B).

We then grafted 1:1 mixes of tagged 4T1shC and 4T1shT cells into mouse mammary fat pad and measured the expression of reporter genes in the lungs. Tumor growth was not statistically different between groups (Figure S5). However, in 12 mice out of 14 injected with 4T1shC:4T1shT mixes, only the fluorescent reporter expressed by TSP1-positive cells (4T1shC) was detected in lungs (Figure 5C).

These data show that the presence of TSP1 in the close vicinity of TSP1 negative cells in primary tumors, although sufficient to stimulate migration and invasion, was not sufficient to enable metastasis, suggesting that the expression of TSP1 by the tumor cell itself is critically required to undergo a complete metastatic process.

TSP1 is frequently expressed in paired primary breast tumors and liver metastases samples:

To explore this hypothesis in a clinical metastatic context, we analyzed by immunohistochemistry TSP1 expression in 31 breast tumors from patients with confirmed liver metastases (Supplementary Table 2). TSP1 was expressed in 90.3% of metastatic tumors (Table 1). Importantly, in 29 out of 31 tumors, TSP1 was detected in tumor cells but not in the stromal cells (Figure 5D upper panel), consistent with our finding that autocrine expression of TSP1 is paramount. Liver biopsies available from 24 of these patients were also analyzed. TSP1 was not expressed in the non-tumorigenic part of liver biopsies (Figure 5D lower panel). In two thirds of the paired samples, TSP1 was expressed both in the primary tumor and in liver metastases (Table 1).

DISCUSSION

TSP1 expression is repressed by several oncogenes such as Ras, Jun, WT1, and Myc, and activated by the tumor suppressor P53 (Stenina-Adognravi, 2014). It might thus appear conflicting that a high expression of antiangiogenic TSP1 in clinical tumors is associated with a worse prognosis in a number of tumor types including melanoma (Jayachandran et al., 2014), prostate (Firlej et al., 2011), thyroid (Nucera et al., 2010) or pancreatic carcinomas (Okada et al., 2010). In breast cancer, TSP1 protein expression was also found associated with a reduced RFS in lymph node positive tumors (Fontana et al., 2005), with lymph node metastasis (Horiguchi et al., 2013), and as a predictive marker of distant metastasis in TNBC (Campone et al., 2015). In plasma, TSP1 level was identified as a reliable predictive biomarker of aggressiveness (Suh et al., 2012), increased in metastatic tumors (Byrne et al., 2007). We show here that TSP1 protein expression is statistically increased in high grade tumors, associated with a high mitotic index and with necrosis.

TSP1 silencing in mouse mammary 4T1 cells had no effect on the tumor volume and growth rate, but significantly inhibited metastasis. This result shows that the TSP1 expression found in high grade tumor is not incidental but in fact required for metastasis. Inhibition of TSP1 in knock-out mice (Yee et al., 2009), or by systemic administration of antibodies (Wang et al., 1996) or siRNAs (Firlej et al., 2011) had also highlighted protumoral and/or pro metastatic effects of TSP1. Our experimental setting demonstrates that this property is linked to the TSP1 synthesized by tumor cells and not by the host cells. In addition, we demonstrate here that to undergo a full metastatic dissemination, tumor cells need to express TSP1 themselves: in experiments where tumor cells expressing high and low levels of TSP1 were mixed, as in the case of heterogeneous tumors, the secretion of TSP1 by the former did not allow TSP1-low cells to metastasize. This result is in line with a study showing that 74% of breast tumors with axillary lymph node invasion expressed TSP1 in the cytosol of tumor cells (Horiguchi et al., 2013), and also with our clinical analysis of metastatic breast tumors where TSP1 was expressed by tumor and not by stromal cells in over 90% of the cases. In paired liver metastases, TSP1 expression was also restricted to metastatic cells.

Intriguingly, in a set of over 4000 breast cancer microarray data, we found a high TSP1 expression associated with a longer relapse-free survival in low grade tumors, but conversely with a reduced survival in aggressive diseases. These data strongly suggested that TSP1 might have opposing effects depending on the stage of tumor development: inhibiting the onset of nascent tumors, but fostering the growth and metastatic dissemination of tumors once established.

This functional switch might be due to a loss or a reversal of TSP1 functions as tumors progress. Indeed, some authors proposed that TSP1 was no longer secreted in advanced renal cancers (Veliceasa et al., 2007), or even became proangiogenic in metastatic breast tumors (Byrne et al., 2007), but we found here

that TSP1 was secreted by metastatic cell lines, and inhibited angiogenesis both in vitro and in tumors, ruling out this hypothesis.

The TSP1 switch might result from a modification of its expression level, illustrated by its low levels in luminal, non-metastatic cell lines, and high levels in aggressive TNBC. Indeed, we found that hypoxia, which is increased by the antiangiogenic activity of TSP1, and TGF β that is activated by TSP1, both concur to increase TSP1 level in tumors, in a self-amplifying positive-feedback loop. We thus focused our study on these two features of TSP1 which might have opposing effects on tumors depending on their developmental stage. In particular, previous studies showed that TGF β stimulates the growth of mammary tumors (Park et al., 2011; Vafaizadeh et al., 2012), and it is well documented that TGF β exerts suppressor effects in normal cells and early carcinomas, but promotes EMT, invasion, and tumor metastasis when tumors progress (Pickup et al., 2013; Zarzynska, 2014).

We show here that in breast tumor cells, TSP1 silencing downregulated c-Met, N-Cadherin, fibronectin and several transcription factors identified as key EMT triggers: FoxC1, FoxC2, Zeb1, (Ansieau et al., 2014), and accordingly inhibited cell migration, invasion, and extravasation, as observed in other tumor models (Firlej et al., 2011; Jayachandran et al., 2014; Sargiannidou et al., 2004; Taraboletti et al., 1987). To analyze separately the effects on metastasis of the antiangiogenic activity of TSP1 on the one hand, and of its capacity to activate TGF β on the other hand, we used a CRISPR-cas9 directed strategy to introduce point mutations in the endogenous TSP1 gene, knocking-down these functions. This strategy ensures that all other TSP1 functions, and the endogenous regulation of its expression are maintained.

The inhibition of spontaneous metastasis of grafted 4T1shT cells, was recapitulated and even more pronounced upon grafting 4T1mTGF β cells. It was recently shown that spontaneous lung metastases of breast tumors in mice were almost exclusively constituted of epithelial cells that had never activated the EMT program (Fischer et al., 2015). Our results do not confirm these observations as we found that the capacity of TSP1 to activate TGF β , a potent trigger of EMT, is required for cell migration, tumor growth, extravasation and metastasis.

Several molecules aimed at interfering with TGF β signaling are currently under development for therapeutic applications (Herbertz et al., 2015), notably to increase responses to immunotherapies. However, TGF β signaling is complex and a number of mutations in this pathway can lead to rapid resistance. In addition, TGF β has important functions in normal tissues, as highlighted by the dramatic phenotype of TGF β knockout in mice (Shull et al., 1992). A major point of TGF β regulation occurs during conversion of the latent precursor to the biologically active molecule. Whereas a variety of molecular mechanisms can activate latent TGF β (Annes et al., 2003), our data highlight that in metastatic breast tumors, TSP1 is a major contributor to this process, and thus to all TGF β dependent effects in tumor cells.

In a therapeutic perspective, our results thus strongly support the idea of inhibiting TSP1, which is expressed at low levels in adult tissues but highly expressed in metastatic tumor cells, to impair TGF β activation in tumors instead of targeting TGF β production or downstream signaling.

In 4T1 as in 4T1mCD36 tumors, TSP1 silencing increased both the density of blood vessels, and their pericyte coverage while curtailing metastasis. TSP1 was previously shown to stimulate pericyte migration and proliferation (Scheef et al., 2009), and in breast cancers, a low pericyte coverage was significantly associated with reduced RFS and OS, and with the presence of distant metastasis (Cooke et al., 2012). Experimentally, depletion of pericytes in 4T1 tumors was shown to increase hypoxia, EMT, and metastasis (Cooke et al., 2012). Normalization of tumor vascularization induced by a chloroquine treatment in melanoma was also shown to reduce hypoxia and metastasis (Maes et al., 2014). In addition to the reduced activation of TGF β and EMT induced by TSP1 silencing, the increased pericyte coverage and reduced hypoxia in 4T1mCD36 and in TSP1-silenced 4T1 tumors thus most likely also contribute to impair EMT and metastasis.

If the protumoral role of TSP1-activated TGF β could be anticipated, the role of TSP1 antiangiogenic activity in tumor progression was less clear, especially since TSP1 inhibition had unexpectedly no effect on the growth of primary tumors. The growth rate of 4T1 tumors was characterized by a slow phase, followed by a more rapid growth. In contrast, the slow phase was absent in 4T1mCD36 tumors, while once established, both tumors grew at similar rates. This result indicates that the CD36-dependent antiangiogenic effect of TSP1 limits the initial growth of tumors but no longer that of already established tumors.

Importantly, no metastasis occurred in mice bearing 4T1mCD36 tumors, even though these tumors were larger, more vascularized, better perfused than control tumors, and composed of 4T1mCD36 cells that were able to migrate and extravasate. This result formally demonstrates that an endogenous inhibitor of angiogenesis triggers metastasis.

Reconciling apparently contradictory data in the literature, we thus propose that the consequences of TSP1 expression change during tumor progression (Figure 6). In benign and early-stage tumors, oncogenes repress TSP1 to induce angiogenesis and facilitate the initial onset of tumors. However, the anti-tumor effects of TSP1 are short lived. Tumors managing to bypass the early antiangiogenic effects of TSP1 adapt to the chaotic vasculature and low oxygen pressure. At that stage, a better perfusion does not boost their growth, and TSP1 becomes a significant pro-metastatic player, activating TGF β and increasing hypoxia, which both concur to foster EMT and metastatic dissemination.

Our clinical and experimental data question the paradigm of increasing hypoxia in advanced tumors with pharmacological inhibitors of angiogenesis. Indeed, a recent metaanalysis of randomized clinical trials concluded that these inhibitors were not statistically superior to chemotherapy alone in terms of PFS and OS in metastatic breast cancers (Wang et al., 2014). Our results demonstrate that the growth of mammary tumors is not stimulated by an increased oxygen supply, strongly suggesting that aggressive tumors are sufficiently adapted to hypoxia, thus unlikely to respond to treatments that further increase it. Our data clearly show that hypoxia within tumors drives their metastatic dissemination, reminiscent of experiments in mice showing that increasing hypoxia with VEGF pathway inhibitors, stimulated metastasis (Ebos et al., 2009; Pàez-Ribes et al., 2009), and of a recent study showing that maintaining mice in a supplemental oxygen supply reduced metastasis of 4T1 tumors (Hatfield et al., 2015).

Altogether, our data show that in metastatic breast cancers, TSP1 expression not only correlates with a reduced survival in patients, but that it fosters metastasis, increasing EMT and migration on the one hand, and increasing hypoxia on the other hand.

To date, there is no available targeted therapy for patients who are diagnosed with basaltype breast cancers. It was recently proposed that a better usage of antiangiogenic agents, or the development of novel hypoxia-alleviating agents, should increase overall survival (Jain, 2014). Our study provides a strong rationale to develop a new therapeutic modality for metastatic breast cancers: an "anti-anti-angiogenic" and anti-TGF β treatment based on TSP1 silencing to normalize vascularization in the long term, improving tumor perfusion, thus enhancing the outcome of radiotherapy, chemotherapy, and immunotherapy.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Detailed methods are described in Supplemental Experimental Procedures. Reagents used are detailed in Supplemental Table 3.

Cell lines, transfection, migration assay and mammospheres:

Cells were from ATCC. T47D, MDAMB453, BT549, MDA-MB-231, MDA-MB-435, 67NR, 4T1 and mWnt were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with high glucose. MCF7, ZR751, BT474 cells were maintained in RPMI and SKBR3 in McCoy's 5A medium. All media were supplemented with 10% FCS. HUVEC (Promocell) were grown in endothelial cell growth medium 2 (Promocell). DNA or siRNA were transfected into cells in culture using the TransIT-X2 Dynamic Delivery System (MIRUS BIO).

Vectors, RT-PCR, and Immunodetection

Primer sequences, antibodies and corresponding methods are listed in Supplemental Tables 4 and 5 and Supplemental Experimental Procedures.

Generation of expression vectors, gene activation, inactivation or mutation are described in Supplemental Experimental Procedures

Mouse Models

Animal procedures were approved by the Institutional Animal Care and Research Advisory Committee (CEEA-122) and were performed in accordance with the institutional and national guidelines and regulations. To assess tumor growth, 1 million cells expressing luciferase, were injected subcutaneously into Balb/C female mammary fat pad. Tumor volumes were measured with a caliper using the formula $V = \pi/6 \times d \times d^2$ where d is the minor tumor axis and D is the major tumor axis. Metastasis in lungs was evaluated measuring luciferase activity or mRNA level. For extravasation experiments, 1 million cells were injected into the tail vein of Balb/C mice, and after 2 days, mice were sacrificed and lungs collected.

Clinical study

Breast cancer patients were recruited for biopsy at the Institut Claudius Regaud, Toulouse, France after approval by the institutional review board and informed consent. The tissue microarrays (TMAs) were constructed from 1.50 mm cores of formalin-fixed paraffinembedded breast carcinoma (3 spots/patient). Immunostaining and scoring of the TMAs for TSP1 and of paired metastatic breast tissues and liver biopsies are described in Supplemental Experimental Procedures.

Statistical analysis

Data are presented as mean \pm SEM. Student t-tests were used for the comparison between two mean values. When appropriate, categorical variables were summarized through frequency and percentage. Comparisons between groups were performed using the chisquare test or the Fisher's exact test for

categorical data. All reported p-values were twosided. For all statistical tests, differences were considered significant at the 5% level. Statistical analysis was conducted using STATA version 13.0 software.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JT, GL, JN, MC, EM, RBN, SD, AL, AFTM, OM, CT, HB conducted the experiments; TF, RDP, AL analyzed clinical data and performed statistical analysis, GL, JT, JN, VL, HP and FC designed and analyzed the experiments; FC wrote the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge CREFRE and CRCT core facilities for their help. Supporting fellowships: Ligue Nationale contre le cancer and ARC to GL, INCA to RBN. Supporting grants: ANR (Prostirna) to FC, ARC to FC, INCA to HP, Fondation de l'Avenir to FC.

REFERENCES

- Annes, J. P., Munger, J. S., and Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGF β activation. *Journal of Cell Science* *116*, 217-224.
- Ansieau, S., Collin, G., and Hill, L. (2014). EMT or EMT-Promoting Transcription Factors, Where to Focus the Light? *Frontiers in Oncology* *4*, 353.
- Aslakson, C. J., and Miller, F. R. (1992). Selective Events in the Metastatic Process Defined by Analysis of the Sequential Dissemination of Subpopulations of a Mouse Mammary Tumor. *Cancer research* *52*, 1399-1405.
- Byrne, G. J., Hayden, K. E., McDowell, G., Lang, H., Kirwan, C. C., Tetlow, L., Kumar, S., and Bundred, N. J. (2007). Angiogenic characteristics of circulating and tumoural thrombospondin-1 in breast cancer. *Int J Oncol* *31*, 1127-1132.
- Campone, M., Valo, I., Jezequel, P., Moreau, M., Boissard, A., Campion, L., Loussouarn, D., Verrielle, V., Coqueret, O., and Guette, C. (2015). Prediction of Recurrence and Survival for Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) by a Protein Signature in Tissue Samples. *Mol Cell Proteomics* *14*, 2936-2946.
- Cooke, Vesselina G., LeBleu, Valerie S., Keskin, D., Khan, Z., O'Connell, Joyce T., Teng, Y., Duncan, Michael B., Xie, L., Maeda, G., Vong, S., *et al.* (2012). Pericyte Depletion Results in Hypoxia-Associated Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis Mediated by Met Signaling Pathway. *Cancer Cell* *21*, 66-81.
- Crawford, S. E., Stellmach, V., Murphy, U. J., Ribeiro, S. M., Lawler, J., Hynes, R. O., Boivin, G. P., and Bouck, N. (1998). Thrombospondin-1 is a major activator of TGF-beta1 in vivo. *Cell* *93*, 1159-1170.
- Ebos, J. M. L., Lee, C. R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G. A., Christensen, J. G., and Kerbel, R. S. (2009). Accelerated Metastasis after Short-Term Treatment with a Potent Inhibitor of Tumor Angiogenesis. *Cancer Cell* *15*, 232-239.
- Firlej, V., Mathieu, J. R. R., Gilbert, C., Lemonnier, L., Nakhlé, J., Gallou-Kabani, C., Guarmit, B., Morin, A., Prevarskaya, N., Delongchamps, N. B., and Cabon, F. (2011). Thrombospondin-1 Triggers Cell Migration and Development of Advanced Prostate Tumors. *Cancer research* *71*, 7649-7658.
- Fischer, K. R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S. T. C., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., *et al.* (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* *527*, 472-476.
- Fontana, A., Filleur, S., Guglielmi, J., Frappart, L., Bruno-Bossio, G., Boissier, S., Cabon, F., and Clézardin, P. (2005). Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo. *International Journal of Cancer* *116*, 686-691.
- Gilkes, D. M., Semenza, G. L., and Wirtz, D. (2014). Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* *14*, 430-439.

Gyorffy, B., Lanczky, A., Eklund, A. C., Denkert, C., Budczies, J., Li, Q., and Szallasi, Z. (2010). An online survival analysis tool to rapidly assess the effect of 22,277 genes on breast cancer prognosis using microarray data of 1,809 patients. *Breast Cancer Res Treat* 123, 725-731.

Hatfield, S. M., Kjaergaard, J., Lukashev, D., Schreiber, T. H., Belikoff, B., Abbott, R., Sethumadhavan, S., Philbrook, P., Ko, K., Cannici, R., *et al.* (2015). Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Sci Transl Med* 7, 277ra230.

Herbertz, S., Sawyer, J. S., Stauber, A. J., Gueorguieva, I., Driscoll, K. E., Estrem, S. T., Cleverly, A. L., Desai, D., Guba, S. C., Benhadji, K. A., *et al.* (2015). Clinical development of galunisertib (LY2157299 monohydrate), a small molecule inhibitor of transforming growth factor-beta signaling pathway. *Drug Design, Development and Therapy* 9, 44794499.

Horiguchi, H., Yamagata, S., Rong Qian, Z., Kagawa, S., and Sakashita, N. (2013). Thrombospondin-1 is highly expressed in desmoplastic components of invasive ductal carcinoma of the breast and associated with lymph node metastasis. *J Med Invest* 60, 9196.

Jain, Rakesh K. (2014). Antiangiogenesis Strategies Revisited: From Starving Tumors to Alleviating Hypoxia. *Cancer Cell* 26, 605-622.

Jayachandran, A., Anaka, M., Prithviraj, P., Hudson, C., McKeown, S. J., Lo, P. H., Vella, L. J., Goding, C. R., Cebon, J., and Behren, A. (2014). Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma. *Oncotarget* 5, 5782-5797.

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

Maes, H., Kuchnio, A., Peric, A., Moens, S., Nys, K., De Bock, K., Quaegebeur, A., Schoors, S., Georgiadou, M., Wouters, J., *et al.* (2014). Tumor Vessel Normalization by Chloroquine Independent of Autophagy. *Cancer Cell* 26, 190-206.

Mountzios, G., Pentheroudakis, G., and Carmeliet, P. (2014). Bevacizumab and micrometastases: Revisiting the preclinical and clinical rollercoaster. *Pharmacology & Therapeutics* 141, 117-124.

Murphy-Ullrich, J. E., and Sage, E. H. (2014). Revisiting the matricellular concept. *Matrix Biology*.

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

Nucera, C., Porrello, A., Antonello, Z. A., Mekel, M., Nehs, M. A., Giordano, T. J., Gerald, D., Benjamin, L. E., Priolo, C., Puxeddu, E., *et al.* (2010). B-Raf(V600E) and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 10649-10654.

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

Pàez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Viñals, F., Inoue, M.,

Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic Therapy Elicits Malignant Progression of Tumors to Increased Local Invasion and Distant Metastasis. *Cancer Cell* 15, 220-231.

Park, C.-Y., Son, J.-Y., Jin, C. H., Nam, J.-S., Kim, D.-K., and Sheen, Y. Y. (2011). EW7195, a novel inhibitor of ALK5 kinase inhibits EMT and breast cancer metastasis to lung. *European Journal of Cancer* 47, 2642-2653.

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

Pickup, M., Novitskiy, S., and Moses, H. L. (2013). The roles of TGF[β] in the tumour microenvironment. *Nat Rev Cancer* 13, 788-799.

Ribeiro, S. M., Poczatek, M., Schultz-Cherry, S., Villain, M., and Murphy-Ullrich, J. E. (1999). The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency- associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 274, 13586-13593.

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

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

Scheef, E. A., Sorenson, C. M., and Sheibani, N. (2009). Attenuation of proliferation and migration of retinal pericytes in the absence of thrombospondin-1. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 296, C724-C734.

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

Stenina-Adognravi, O. (2014). Invoking the power of thrombospondins: Regulation of thrombospondins expression. *Matrix Biology* 37, 69-82.

Suh, E. J., Kabir, M. H., Kang, U.-B., Lee, J. W., Yu, J., Noh, D.-Y., and Lee, C. (2012). Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. *Exp Mol Med* 44, 36-44.

Taraboletti, G., Roberts, D. D., and Liotta, L. A. (1987). Thrombospondin-induced tumor cell migration: haptotaxis and chemotaxis are mediated by different molecular domains. *The Journal of Cell Biology* 105, 2409-2415.

Vafaizadeh, V., Graab, U., Darvishi, T., Machado, R., and Groner, B. (2012). Transforming growth factor β signaling regulates the invasiveness of normal mammary epithelial cells and the metastasis

formation of tumor cells. *Horm Mol Biol Clin Investig* *10*, 227-239. Veliceasa, D., Ivanovic, M., Hoepfner, F. T., Thumbikat, P., Volpert, O. V., and Smith, N.

D. (2007). Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma. *FEBS J* *274*, 6365-6377.

Wang, T. N., Qian, X.-h., Granick, M. S., Solomon, M. P., Rothman, V. L., Berger, D. H., and Tuszynski, G. P. (1996). Inhibition of breast cancer progression by an antibody to a thrombospondin-1 receptor. *Surgery* *120*, 449-454.

Wang, Z., Wang, M., Yang, F., Nie, W., Chen, F., Xu, J., and Guan, X. (2014). Multitargeted antiangiogenic tyrosine kinase inhibitors combined to chemotherapy in metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Pharmacol* *70*, 531-538. Yee, K. O., Connolly, C. M., Duquette, M., Kazerounian, S., Washington, R., and Lawler, J. (2009). The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* *114*, 85-96.

Zarzynska, J. M. (2014). Two faces of TGF-beta1 in breast cancer. *Mediators Inflamm* *2014*, 141747.

TABLE

Table 1 : TSP1 expression in paired samples of breast tumor/liver metastases. All patients had liver metastases.

Primary tumor	N (% tumors)	Liver metastases	N (% of paired samples)
TSP1 low	3 (9.7)	TSP1 low	2 (8.3)
		TSP1 high	1 (4.2)
TSP1 high	28 (90.3)	TSP1 low	5 (20.8)
		TSP1 high	16 (66.7)
		Not available	7

FIGURES

Labrousse et al., Figure 1

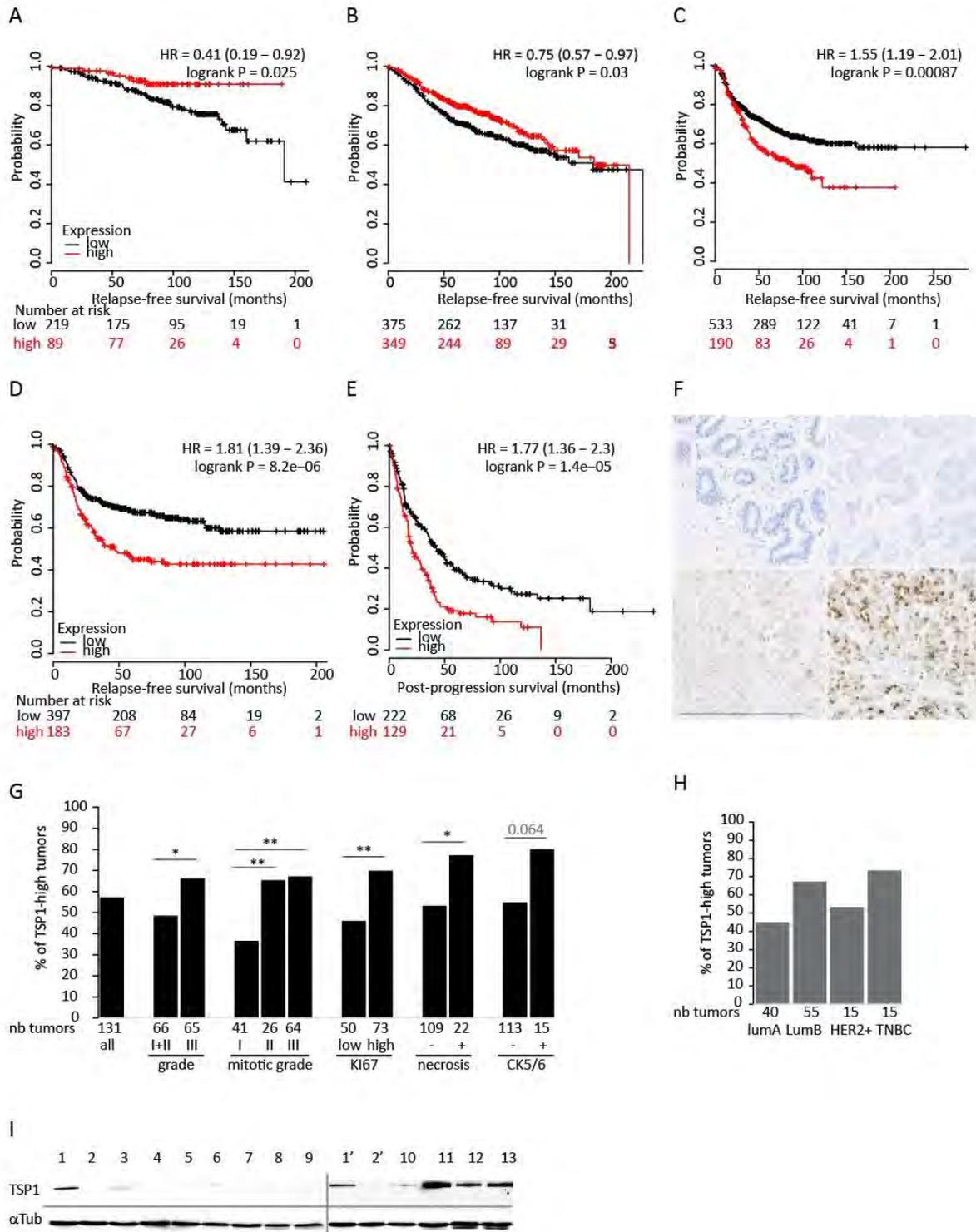


Figure 1: Prognostic value of TSP1 and expression in breast cancers. **A-E:** KaplanMeier survival analysis relating TSP1 mRNA levels and relapse-free survival (A-D) or post progression survival (E) in patients with **A:** grade I breast cancer; **B:** grade II tumors; **C:** grade III tumors. **D:** basal-type breast cancer of all grades. **E:** all types and grades of breast cancers. Hazard ratios (HR), 95% confidence interval and logrank p are indicated on the graphs. **F-H:** TSP1 protein expression in breast carcinomas. **F:** TSP1 immunodetection in normal breast (upper left, negative) and invasive mammary carcinomas scored negative (upper right), low (lower left) or high (lower right). **G** and **H:** Percentage of tumors with high TSP1 expression in the indicated subsets of 131 breast tumors. The number of tumors analyzed in each subgroup is indicated. *: p<0.05; **: p<0.01. **I:** western blot detection of TSP1 in cellular homogenates of mammary cell lines from mouse (lanes 1, 2, 3 and 10) or human origin (other lanes); cells are of luminal-type (3-9) or basal-type (1; 10-13). Alpha tubulin was used as a loading control. 1 and 1': 4T1; 3: 67NR; 4: T47D; 5: MCF7; 6: ZR75; 7: MDA-MB-453; 8: SKBR3; 9: BT474; 10: mWnt; 11: BT549; 12: MBA-MB-231; 13: MDA-MB-435. 4T1 cells were TSP1 gene was silenced were used as negative control (lanes 2 and 2'). Statistical significance in all panels is indicated as follows: *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 as compared to controls.

Labrousse et al. Figure 2

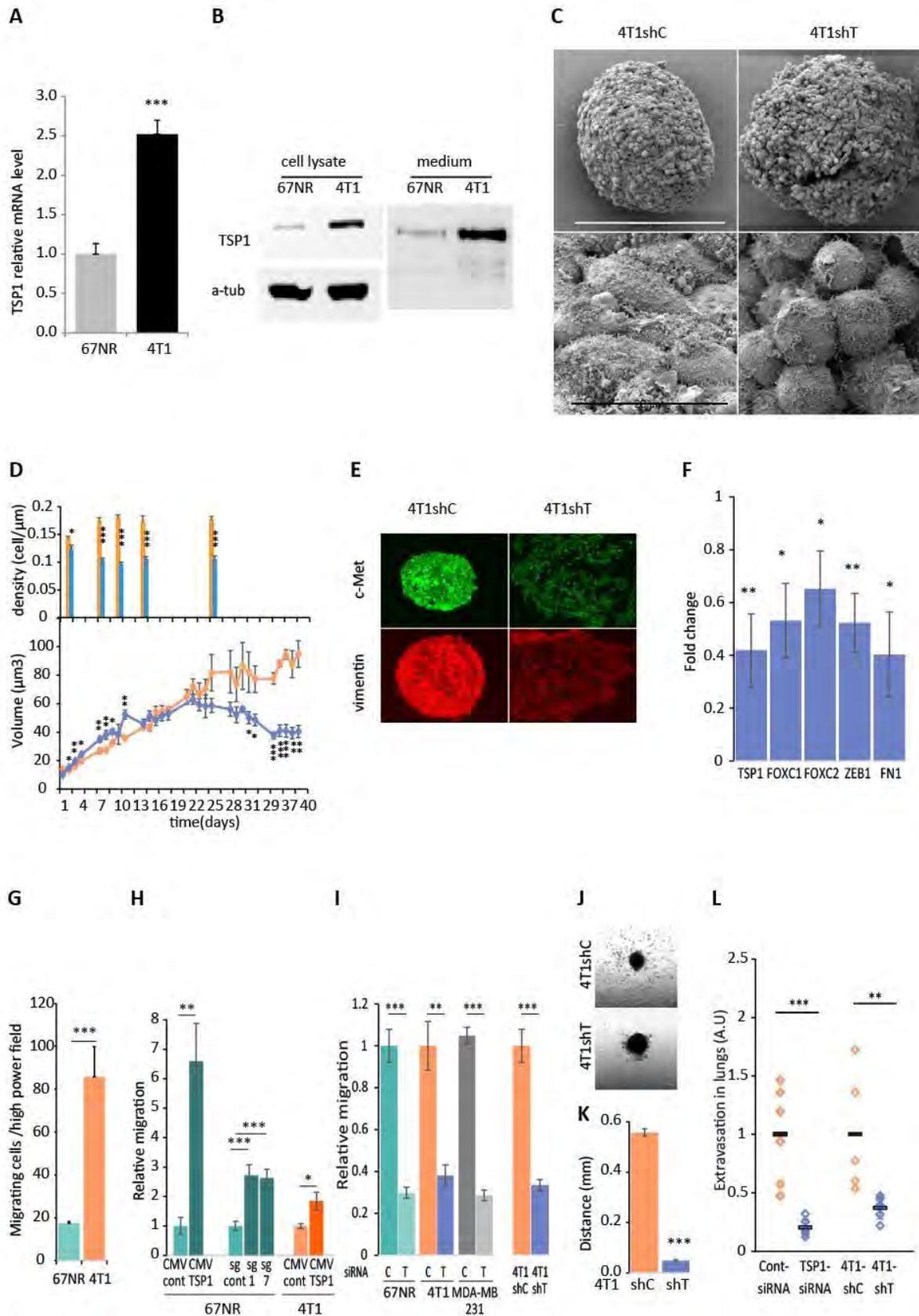


Figure2: TSP1 effect on cell cohesion, EMT, migration, invasion, and extravasation.

A: TSP1 mRNA normalized by cyclophilin-A mRNA level in 67NR and 4T1 cell lines (mean \pm SEM, n=3 independent experiments). **B:** TSP1 protein content by western blot analysis in cell homogenates and corresponding conditioned medium of 67NR and 4T1 cells. Beta tubulin was used as a loading control. **C:** Scanning Electron Microscopy of 4T1shC and 4T1shT mammospheres after 6 days in culture. Scale bars: upper panel 200 μ m, lower panel: 20 μ m. **D:** Mammospheres from 4T1shC (orange) or 4T1shT (blue) cells were prepared and analyzed for 40 days. Lower panel: volume of mammospheres over time (mean \pm SEM, n=10); upper panel: cell density measured counting cells on a 100 μ m distance at the periphery of fixed and sliced mammospheres (mean \pm SEM, n=10). **E:** CMet and vimentin immunodetection on cryosections of 4T1shC and 4T1shT mammospheres grown for 6 days (20X). **F:** mRNA levels of the indicated genes were measured by RT-qPCR in 4T1shC and 4T1shT mammospheres on day 6. Results are reported as fold change in 4T1shT as compared to 4T1shC mammospheres. **G:** Migration of 2×10^5 67NR and 4T1 cells in a transwell assay. Results are expressed as the number of cells per field (mean \pm SEM, n=3 independent experiments, control condition set to 1). **H:** 67NR (green bars) or 4T1 cells (orange bars) were transfected with either a CMV-TSP1 expression plasmid or control, or with a plasmid coding for dCas9-VP160 and the indicated sgRNAs. Migration was measured 24h after transfection (mean \pm SEM, n=3, control condition set to 1). **I:** Migration of 67NR, MDA-MB-231 or 4T1 cells transfected with TSP1-siRNA (noted T) or a control-siRNA (noted C), and migration of 4T1shC and 4T1shC cells (mean \pm SEM, n=3 independent experiments, control condition set to 1). **J-K:** 4T1shC and 4T1shT mammospheres grown for 3 days in culture were embedded for 3 additional days in matrigel to monitor cell invasion (10X). **J:** Representative image of 10 mammospheres, **K:** distance (mm) covered by cells (mean \pm SEM, n=10 cells /mammosphere, 10 independent mammospheres). **L:** Extravasation into lungs of 1 million 4T1-luciferase cells transiently (TSP1-siRNA) or stably (4T1shT) silenced for TSP1, and their respective controls, two days after bolus injection in the tail vein. Luciferase activity was corrected for protein content and for specific activity of luciferase in each cell population measured before injection. Results are normalized to the mean their respective control set to 1 (mean \pm SEM, n>= 6 mice per group). Black lines indicate mean values. Statistical significance in all panels is indicated as follows: *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 as compared to controls.

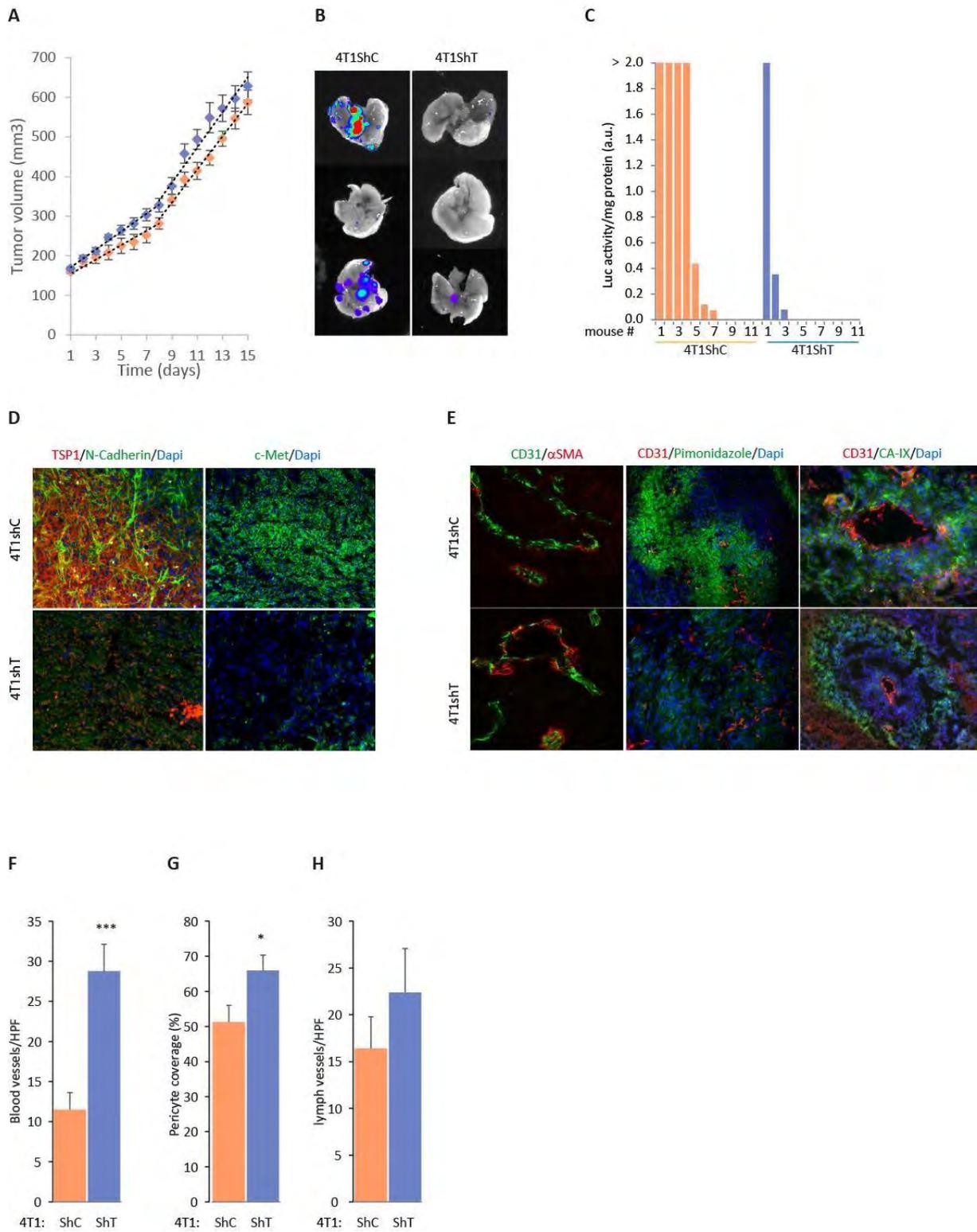


Figure 3: TSP1 effect on tumor growth and metastasis.

A: Tumor volume overtime of 1 million 4T1shC or 4T1shT cells implanted into female Balb/C mammary fat pad (mean \pm SEM, $n \geq 7$ mice/group). This experiment was repeated 6 times with comparable results.

B-C: Lung metastases in mice bearing orthotopic 4T1shC or 4T1shT tumors **B:** visualization of luciferase activity in dissected lungs from 3 representative mice/group. **C:** quantification of luciferase activity in lung homogenates

(luciferase activity/mg protein). Values over 2 (arbitrary units) are indicated as 2. **D:** Immunodetection of TSP1, N-cadherin and c-Met in 4T1shC and 4T1shT tumors. **E:** Immunodetection in 4T1shC and 4T1shT tumors of CD31 and α SMA (x40, left panel); CD31 and pimonidazole adducts (middle panel, x20); CD31 and CA-IX (right panel, x40). Dapi was used to counterstain nuclei. **F-H:** Quantification in tumors (mean \pm SEM $n \geq 7$ tumors /group) of **F:** CD31 positive vessels; **G:** pericyte coverage, calculated as the percentage of α SMA/CD31 positive vessels over total CD31 positive vessels; **H:** Lymph vessels, positive for CD31 and Lyve1. Statistical significance in all panels is indicated as follows: *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ as compared to controls.

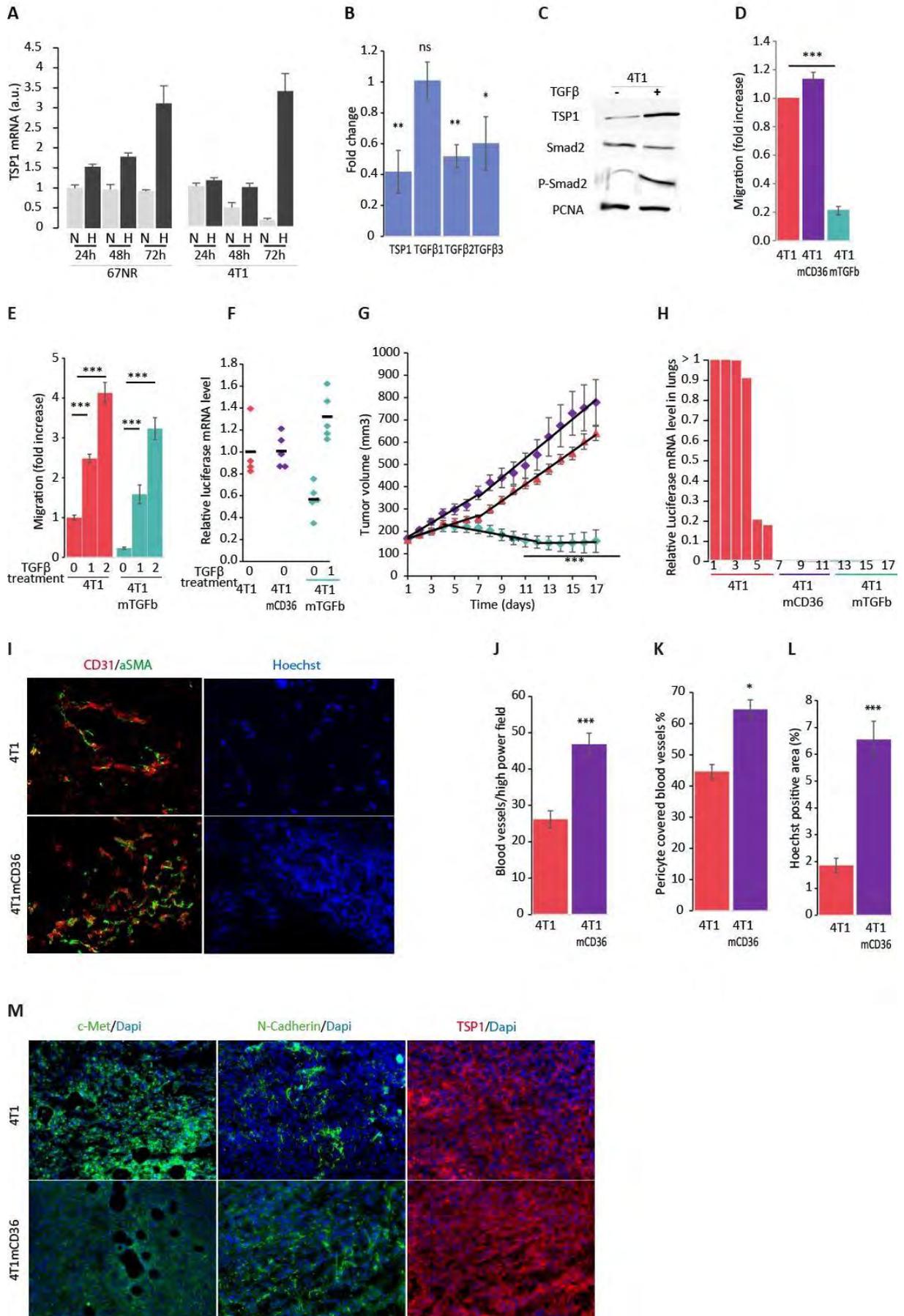
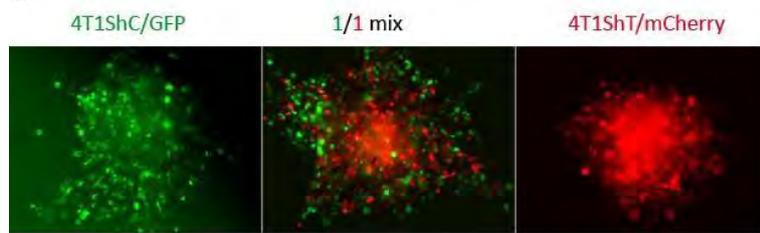


Figure 4: Effect of TSP1-induced TGFβ activation, and CD36-dependent TSP1 antiangiogenic activity in tumors.

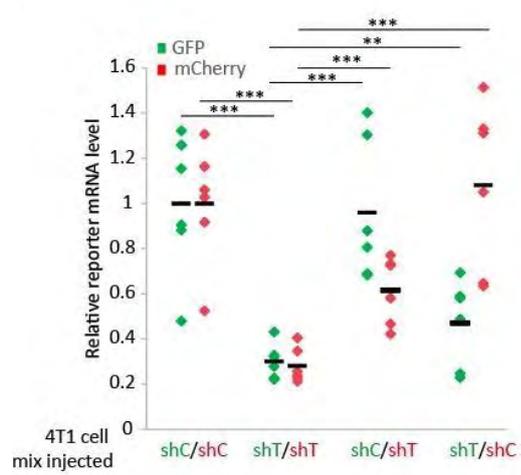
A: TSP1 mRNA level in 67NR and 4T1 cells grown in normoxia (20% Oxygen, grey bars) or hypoxia (1% oxygen, black bars) for 24, 48 or 72h. Mean ± SEM of 3 independent experiments each performed in triplicate. **B:** TSP1 and TGFβs mRNA levels in 4T1shT mammospheres grown for 6 days. Values (Mean ± SEM of 3 independent experiments) are expressed as fold change over 4T1shC mammospheres. **C:** Induction of TSP1 by TGFβ: 4T1 cells were grown for 24h with recombinant TGFβ (20 ng/ml). TSP1, total SMAD2, and phosphorylated Smad2 were analyzed by western blotting on cell homogenates. PCNA was used as a loading control. **D:** Capacity of migration of the indicated cell lines (mean ± SEM, n=3 independent experiments, control condition (4T1) set to 1). **E:** Stimulation of migration of 4T1 and 4T1mTGFβ cells by recombinant TGFβ. Condition 0: no TGFβ; condition 1 and 2: cells were grown for 24h in the presence of TGFβ (5 ng/ml) and migration assay was performed in the absence (condition 1) or presence (condition 2) of TGFβ (5ng/ml) (mean ± SEM, 4T1h cells in control medium set to 1). **F:** Cells were grown in control medium in the absence (0) or presence (1) of TGFβ (5ng/ml) before injection (1x10⁶ cells) into the tail vein. Luciferase mRNA level, corrected for cyclophilin-A mRNA level and specific luciferase expression in each cell line was measured in lungs 48h later.

Individual values (arbitrary units) and mean (black line) are indicated. **G:** Growth of 4T1 (red), 4T1mTGFβ (green), 4T1mCD36 (purple) orthotopic tumors over time. **H:** Quantification of metastases in lungs from experiment shown in G. Each bar represents the luciferase mRNA level normalized to cyclophilin A level in an individual mouse. Values over 1 (arbitrary units) are indicated as 1. **I:** Representative images of immunodetection of CD36 and αSMA (left panel) and perfused Hoechst (right panel) in 4T1 and 4T1mCD36 tumors. **J-L:** Quantification of CD36 positive blood vessels (J); percentage of pericyte covered (αSMA positive) blood vessels (K); percentage of Hoechst-positive surface in 4T1Th and 4T1mCD36 tumors (L). **M:** representative images of immunodetection of c-Met, N-cadherin and TSP1 in 4T1 and 4T1mCD36 tumors. Statistical significance in all panels is indicated as follows: *: p<0.05; **: p<0.01; ***: p<0.001 as compared to controls.

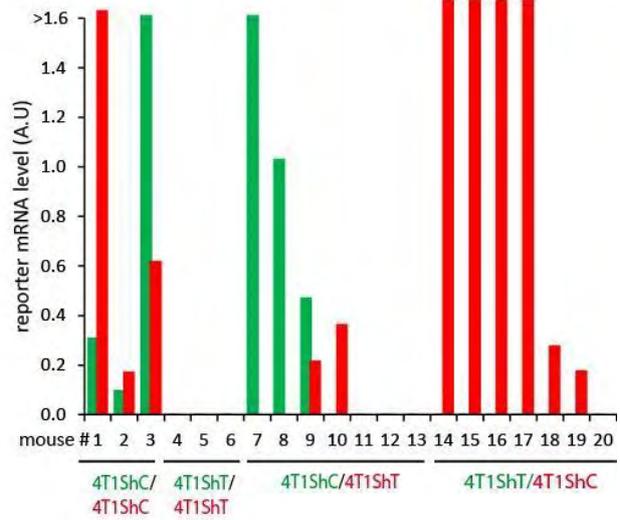
A



B



C



D

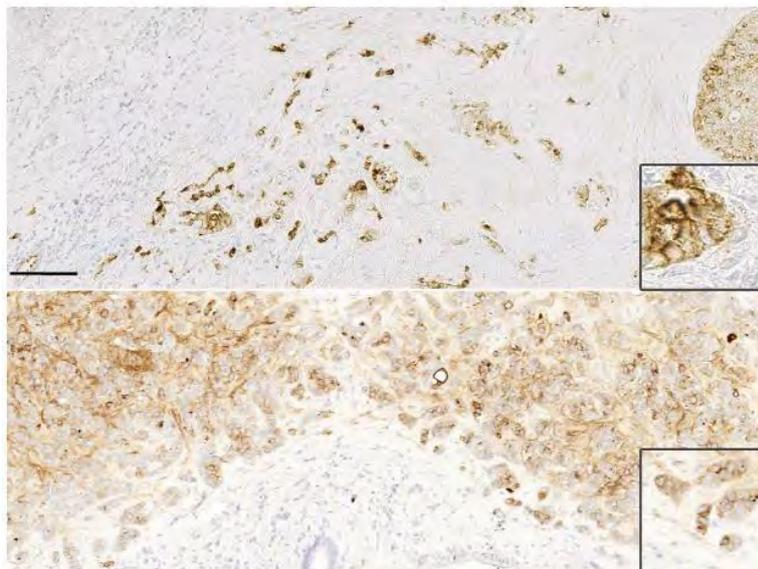


Figure 5: TSP1 role in heterogeneous tumors.

A: Mammospheres from 4T1shC-GFP (left panel), 4T1shT-mCherry (right panel) or a 1:1 mix of these cells (middle panel) grown for 3 days in culture were embedded for 3 days in matrigel and imaged by epifluorescence(x20). **B and C:** Mixes (1:1) of 4T1shC and 4T1shT cells, tagged with H2B-GFP (green) or H2B-mCherry (red) reporter genes as indicated were either injected into the tail vein (B) or implanted in mammary fat pad (C) (6 to 7 mice/group). Lungs were collected 2 (B) or 30 (C) days later. Reporter mRNA values in lungs, normalized to H2B mRNA are indicated for each individual mouse. In B, black lines indicate mean values; in C, Values over 1.6 (arbitrary units) are indicated as 1.6. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$ as compared to controls. D: Representative images of TSP1 expression in paired clinical samples of primary breast tumors (upper panel) and liver metastases (lower panel). Bar: 200 μ m.

Labrousse et al., Figure 6

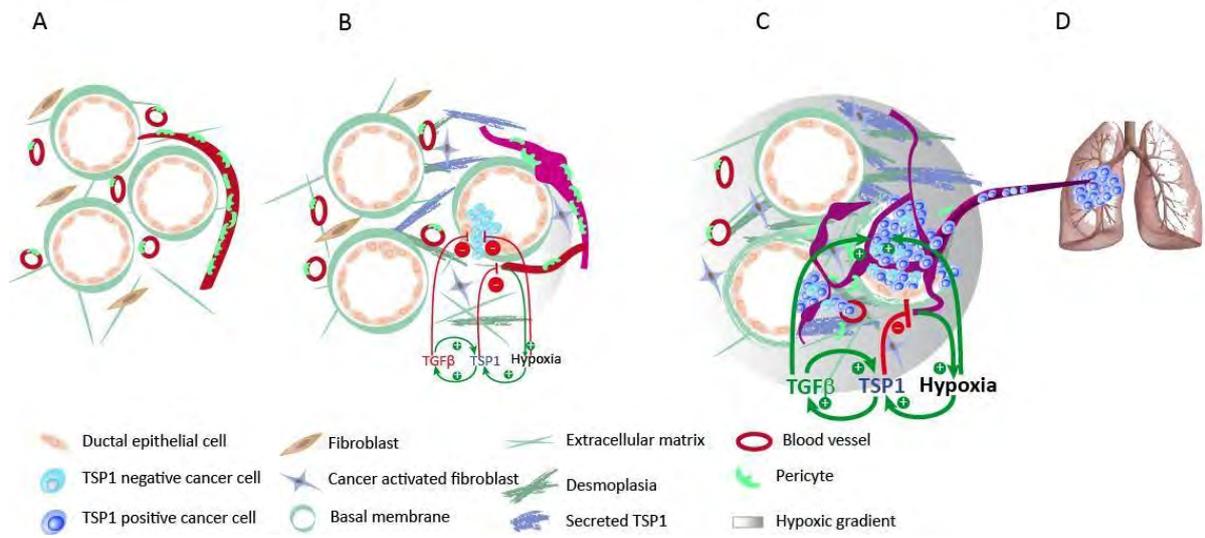


Figure 6: working model relative to TSP1 expression level and function during tumor progression.

A: In normal Breast, TSP1 is not expressed or at very low levels, and vessels are covered by pericytes. **B:** In low grade tumors, TSP1 is repressed in tumor cells and expressed at low levels in the reactive stroma. The antiangiogenic activity of TSP1 retards the onset of tumors and TSP1-activated TGF β produces anti-proliferative effects. As tumors progress, poorly functional vessels generated by neo angiogenesis increase hypoxia. Induction of TSP1 expression by TGF β and hypoxia, incrementally increase TSP1 level in tumor cells. **C:** in high grade and metastatic breast tumors, TSP1 is mostly expressed by tumor cells. TSP1-dependent increase in hypoxia and TSP1-activated TGF β concur to induce EMT, migration and foster metastasis. **D:** Only cells expressing TSP1 are able to metastasize to the lungs.

Supplemental tables, figures, experimental procedures and references

SUPPLEMENTAL TABLES

Supplemental table 1 corresponding to Figures 1F-1H: Characteristics of breast tumors analyzed

factor	N	%
Age (Y)	144	
median [range] : 59.0 [29.0-86.0] <= 60		
Years	79	54.9
>60 years	65	45.1
Stage	142	
1	79	55.6
2	57	40.1
3	5	3.5
4	1	0.7
Histology	144	
Ductal carcinoma	107	74.3
Lobular Carcinoma	20	13.9
Other	17	11.8
Grade	144	
I	18	12.5
II	55	38.2
III	71	49.3
Mitotic grade	144	
1	46	31.9
2	29	20.1
3	69	47.9
KI67	134	
<14%	47	35.1
>=14%	87	64.9
Vascular embolus	144	
no	95	66.0
yes	49	34.0
Lymph node	144	
0	67	46.5
1-3	42	29.2
>3	31	21.5
Hormonal status	144	
ER+	121	84.0
PR+	102	70.8
Luminal A	46	33.8
Luminal B	58	42.6
HER2+	15	10.4
TNBC	17	11.8

EGFR		141	
	>0	123	87.2
	<0	18	12.8
CK5/6		141	
	>0	124	87.9
	<0	17	12.1
Necrosis		144	
	no	122	84.7
	yes	22	15.3
Fibrosis		143	
	no	89	62.2
	yes	54	37.8

Supplemental table 2 corresponding to Figure 5D: Characteristics of metastatic breast tumors analyzed

Factor		N	%
grade	I	1	3.2
	II	17	54.8
	III	13	41.9
hormonal status	ER+ PR+ HER2-	12	38.7
	ER+ PR- HER2-	9	29.0
	ER+ PR+ HER2+	1	3.2
	ER+ PR- HER2+	1	3.2
	ER+ PR-	1	3.2
	HER2+	1	3.2
	Basal	4	12.9
	NA	2	6.5
lymph node	N0	6	19.4
	N+	13	41.9
	NA	12	38.7
Histology	DC + mucinous	1	3.2
	DC	23	74.2
	DC + CLI	2	6.5
	CLI	5	16.1

Supplemental Table 3: reagents used

Product/Kit	Provider	Reference
Recombinant Mouse TGF- β 1	R&D Systems	7666-MB-005/CF
TGF β Signal Reporter Assay Kit (GFP)	QIAGEN	CCS-017G
TransIT-X2 Dynamic Delivery System	MIRUS BIO	MIR-6000-US
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich	P8340
Formalin	Sigma-Aldrich	4583
Tissu Tek	Sakura	356231
Growth Factor-Reduced Matrigel	BD Biosciences	356230
Hoechst	Sigma-Aldrich	B2261
D-luciferin	PerkinElmer	122 796

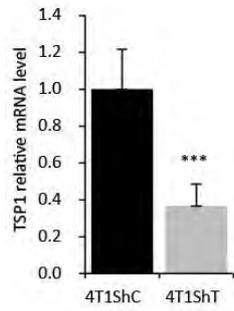
Supplemental table 4: Antibodies used

Antigen	Provider	Reference	dilution IHC	dilution WB	Species
TSP1	Abcam	Ab1823		1/100	mouse
TSP1	Thermo Scientific	MA5-11330	1/50		mouse
Phospho-Smad2	Cell Signaling	3101		1/1000	rabbit
Smad2/3	Cell Signaling	3102		1/1000	rabbit
α Tubulin	Sigma-aldrich	T6199		1/1000	mouse
C-Met	Cell Signaling	8198	1/100		Rabbit
Vimentin	Abcam	ab16700	1/100		Rabbit
CD31	BD Pharmingen	553370	1/100		Rat
CAIX	Novus Biologicals	NB100-417	1/100		Rabbit
α SMA	Sigma-aldrich	C6198	1/200		Mouse
N-Cadherin	Cell Signaling	13116	1/100		Rabbit
Hydroxyprobe	HPI	TM1 Plus Kit			

Supplemental table 5: primers used in qPCR reactions

Target	Species	Primer Forward (5' → 3')	Primer Reverse (5' → 3')
TSP1	mouse	GCTGCAGAATGTGAGGTTTGTC	TGTCCTGCAGCGTGGTCAC
FOXC1	mouse	CAGAACCTCCTCCATTTTTGCC	AAGCGAGTCTCTGAACGCAA
FOXC2	mouse	AACATGTTTCGAGAATGGCAGC	GACTTTCTTCTCGGCCTCCTT
ZEB1	mouse	CTGCTCCCTGTGCAGTTACA	GTGCACTTGAACCTGCGGTT
FN1	mouse	CAGGGGACCTCTCTGGAAGA	CTTAGGTCAGTGAGCTGGGG
LUCF		CTCACTGAGACTACATCAGC	TCCAGATCCACAACCTTCGC
GFP		CAAGATCCGCCACAACATCG	ATGTGATCGCGCTTCTCGTT
mCherry		CTGAAGGGCGAGATCAAGCA	TAGTCCTCGTTGTGGGAGGT

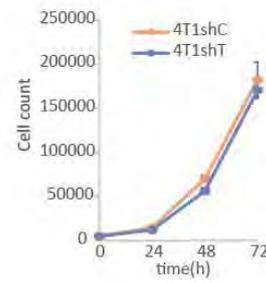
S2A



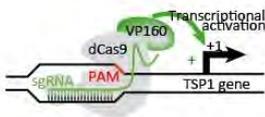
S2B



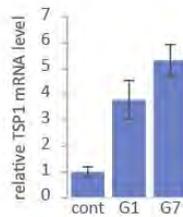
S2C



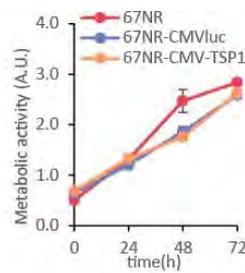
S2D



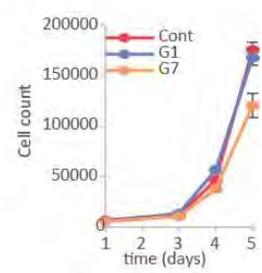
S2E



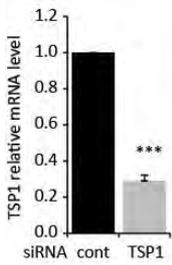
S2F



S2G



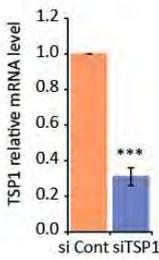
S2H



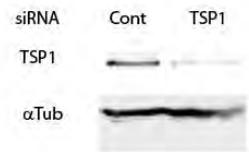
S2I



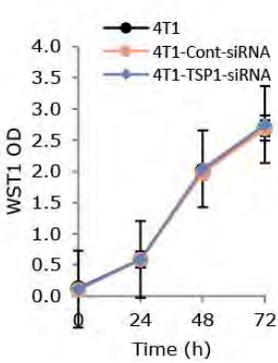
S2J



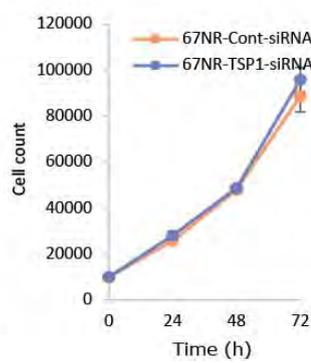
S2K



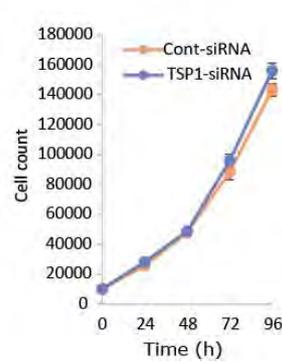
S2L



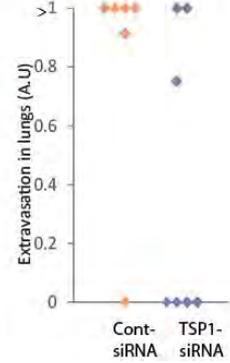
S2M



S2N



S2O



Supplemental Figure 2 relative to Figure 2

S2A: TSP1 mRNA level normalized to Cyclophilin A level in 4T1shC and 4T1 shC tumors.

S2B: Western blot analysis of TSP1 protein level in 4T1shC and 4T1shT cells. Tubulin was used as a loading control.

S2C: Proliferation over time of 4T1shC and 4T1shT.

S2D: Activation of the endogenous TSP1 gene in 67NR cells. Single stranded guide RNAs (sgRNA) matching sequences in the TSP1 promoter were designed and cotransfected with a plasmid coding for a mutated Cas9 fused to 10 repeats of VP16 (VP160) to transactivate TSP1 promoter.

S2E: TSP1 mRNA level, normalized to cyclophilin A was measured 16-24h after transfection of control (cont) or 2 different TSP1-directed sgRNA, G1 and G7 (mean \pm SEM of 3 independent experiments, values expressed as fold change over mock control).

S2F: Proliferation of 67NR cells untransfected, transfected by a control plasmid (CMV-luc) or a plasmid coding for TSP1 (CMV-TSP1).

S2G: Proliferation of 67NR cells untransfected or transfected by a mCas9-VP160 and the indicated RNA guides.

S2H, S2I: TSP1 mRNA level normalized to cyclophilin A level (S2H) and TSP1 protein (S2I) in 4T1 cells 48h after transfection with TSP1-siRNA.

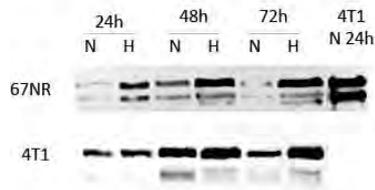
S2J: TSP1 mRNA level normalized to cyclophilin A level 67NR cells 48h after transfection with TSP1-siRNA.

S2K: Western blot analysis of TSP1 expression in MDA-MB-231 cells 48h after transfection with TSP1-siRNA. Alpha tubulin was used as a loading control.

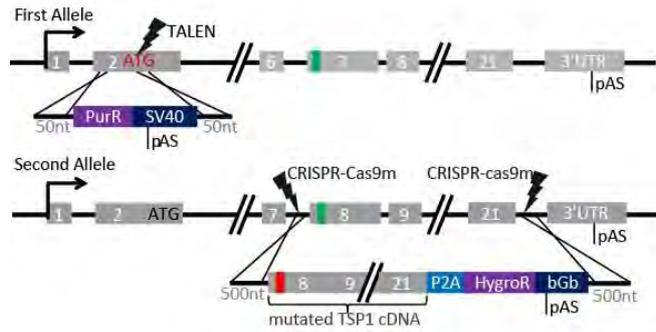
S2L-S2N: proliferation of 4T1 cells (S2L), 67NR (S2M) or MDA-MB-231 cells (S2N) after transfection of TSP1-siRNA.

S2O: Luciferase activity in the lungs 48h after tail-vein injection of MDA-MB-231 cells transfected with a CMV-luciferase expression vector and with TSP1-siRNA or control-siRNA.

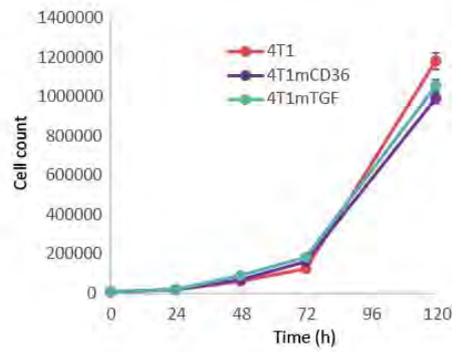
S4A



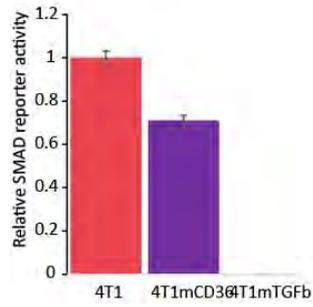
S4B



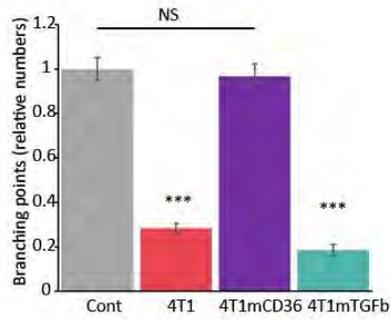
S4C



S4D



S4E



Supplemental Figure 4 relative to Figure 4

S4A: Western blot analysis of TSP1 protein in supernatant from 67NR and 4T1 cells grown in 20% (N) or in 1% (H) oxygen for the indicated time.

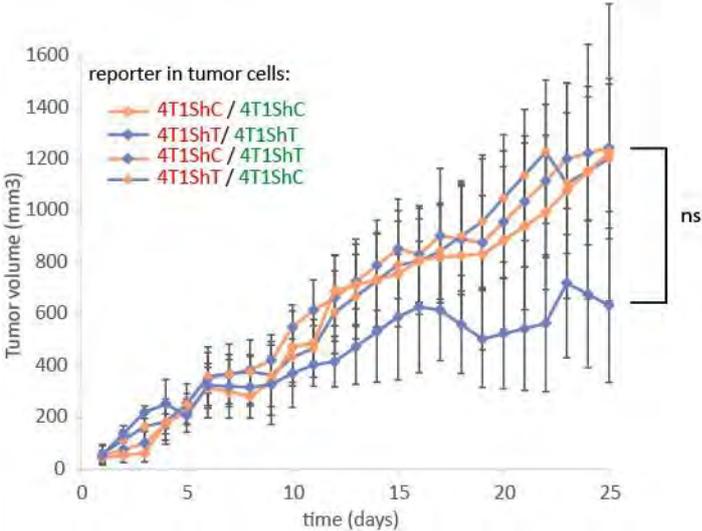
S4B: Knock-in strategy used to mutate TSP1 endogenous gene. To invalidate the first TSP1 allele, 4T1 cells were transfected with constructs coding for 2 TALENs flanking the TSP1 ATG and with a PCR product containing a Puromycin resistant sequence followed by a poly adenylation site and flanked by TSP1 homology sequences. To invalidate the second TSP1 allele, cells were transfected with plasmids coding for CRISPR-cas9m with nickase activity, RNA guides homologous to sequences in introns 7 and 21, and a TSP1cDNA encompassing exons 8-21 followed in 3' by sequences coding peptide 2A (P2A), hygromycin resistance and a poly adenylation signal, flanked by sequences homologous to introns 7 and 21. This cDNA was mutated either in the CD36 binding site or in the TGF β -activating site in the first TSP1 type I repeat. Cells were grown in the presence of puromycin and hygromycin TSP1 in resistant clones was sequenced to confirm mutation.

S4C: Proliferation of 4T1, 4T1mCD36 and 4T1mTGF β cells in culture.

S4D: 4T1, 4T1mCD36 and 4T1mTGF β cells were transfected with a Smad2-GFP reporter and GFP expression quantified 48h later in a fluorimeter (Tristar, Berthold).

S4E: HUVEC cells were grown for 24 h in control medium or in medium containing 5% of conditioned medium from 4T1, 4T1mCD36 or 4T1mTGF β cells. The number of branching points in HUVEC tubular network was quantified (mean \pm SEM, n=3).

Labrousse et al., Supplementary Figure 5 relative to Figure 5



Supplemental Figure 5 relative to Figure 5

Tumor growth in the mammary fat pad of 1:1 mixes of GFP or mCherry-tagged 4T1shC and 4T1shT cells as indicated. Values are mean \pm SEM, n=6 to 7 mice/group, except for 4T1shC/4T1shC and 4T1shT/4T1shT control groups, (n=3). NS: non statistical difference in tumor volume.

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Migration and invasion assay: The migration and invasion capacity was measured using a transwell assay. One to 5×10^5 cells were seeded in DMEM 0.5% FBS in the upper part of a cell culture-chamber-insert system (Greiner Bio-One, 665638) separated from the lower chamber by a 8 μm PET membrane. DMEM 10% FBS was added in the lower compartment. 16 hours later, non-migrating cells in the upper compartment were scrapped off with a cotton swab. Cells on the lower side of the membrane were fixed with formalin 10% and stained with crystal violet. Membranes were then washed with PBS, and quantified with the ImageJ software on digitalized pictures.

Tube formation assay: 24-well plates were coated with 250 μl of Growth Factor-Reduced Matrigel (BD Biosciences) and allowed to polymerize at 37°C for 30 min. HUVECs (Promocell, C-12203) were added at a density of 30000 cells/ml in endothelial culture medium (PromoCell, C-22111) containing 0,5% FBS, FGF2 (10 ng/ml) and VEGF (0,5 ng/ml) supplemented with 5% of cell-conditioned medium or control medium as indicated. After 24h at 37°C, pictures were taken and the number of branching points quantified using ImageJ.

Mammospheres preparation and analysis: 67NR and 4T1 were seeded (3000 cells/100 μl /well) in cell-repellent surface 96-round bottom well plates (Greiner, Cellstar) in DMEM 10% FBS. Plates were centrifuged (600g, 6min) and placed in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Size variation between mammospheres was less than 10%. Medium replenishment was performed by half every 6 days. Mammospheres were fixed for 2 h with formalin then washed with PBS and stored at 4°C. Mammospheres were incubated in 15% then 30% sucrose in PBS for 24 h at 4°C, embedded in Tissue-Tek OCT, and frozen. Cell density was evaluated on cryosections counting DAPI-stained cells on the 100 μm outer margin.

Scanning electron microscopy was performed with the M.E.B. ESEM Quanta 250 FEG on 6days old mammospheres fixed in glutaraldehyde.

Mammosphere invasion assay: To study invasion, cell culture medium (100 μl) from 5days old mammospheres was replaced by Matrigel. Once Matrigel was solidified 100 μl of culture medium was added on top and mammospheres were incubated for 3 days.

Immunohistochemistry: Cryosections (5 μm) from mammosphere samples or formalinixed tumor samples (7 μm) were blocked in PSB containing 1% BSA and 0.5% Triton for 45min, incubated with primary antibodies for 1 hour, washed and incubated in the appropriate goat anti-mouse, or goat anti-rabbit secondary antibodies conjugated with Alexa 488 or Alexa 594 Molecular Probes for 1 hour at room temperature. DNA was stained by DAPI and imaging was performed with a microscope equipped for epi fluorescence (Zeiss Cell Observer).

Sections from formalin-fixed paraffin-embedded clinical samples were incubated for 20min in anti-TSP1 antibody (Abcam, Ab1823 diluted 1:50) revealed with a HRP-conjugated secondary antibody (Dako, flex kit SM802). Scoring was performed on full sections for all samples. No or weak TSP1 expression was notified as low TSP1 level and moderate or strong TSP1 expression was notified as high TSP1 level.

Quantitative real-time PCR: Total RNA was extracted using Tri-reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (50-100 ng) was retro-transcribed in a total volume of 20 μ l with the RevertAid H Minus Reverse Transcriptase (Invitrogen). Real-time PCR was performed using SYBR Premix Ex Taq (Takara) in a reaction volume of 12.5 μ l including 2.5 μ l of Reverse Transcription product in StepOnePlus System (ThermoFisher SCIENTIFIC).

Western blot Analysis: Cellular extracts were prepared from sub-confluent cells. Cells were homogenized in RIPA buffer (150mM NaCl, 2mM EDTA, 50mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) containing a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich, P8340), then centrifuged (13,000xg, 5min, 4°C). Protein concentration was measured with the RC DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) according to the manufacturer's instructions. Cell lysate (40 μ g of protein) was run on 10% SDS polyacrylamide gel. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes (Amersham), blocked in Tris-Buffered Saline and Tween 20 (TBST) with 5% nonfat dried milk and incubated at 4°C overnight with primary antibodies. Membranes were washed, incubated for 2 hours with appropriate secondary antibodies and revealed with ECL PRIME detection reagent (Amersham). Images were captured using Chemi-capt imaging system (Vilber Lourmat).

Detection of hypoxia, and perfusion in tumors: To visualize hypoxic regions, mice bearing tumors received an IV injection of pimonidazole 60mg/kg 30 minutes before sacrifice. Pimonidazole adducts, which form with thiol-containing proteins in hypoxic conditions ($pO_2 \leq 10$ mm Hg), were revealed using a fluorescein-coupled antibody as indicated by the manufacturer (Hypoxyprobe).

To assess tumor perfusion, mice were injected 30 min before sacrifice with Hoechst (15mg/kg) injected 30 minutes and 2 minutes before sacrifice.

Luciferase activity in lungs: Luciferase activity was visualized in mice that were injected i.p. with 200 mg/kg of d-luciferin (PerkinElmer) 20min before sacrifice. Lungs were dissected and imaged using an IVIS spectrum system (Caliper Life Science). Images were acquired and analyzed using the LivingImage 4.3 software.

Quantification of luciferase expression was then performed on pieces of frozen lung tissues (about 100mg) which were homogenized with an automated tissue homogenizer (Precellys evolution) in 300 μ l of Passive Lysis Buffer (Promega, E1531) and centrifuged (13,000xg, 5 min, 4°C). Bioluminescent signal generated by the luciferase activity was quantified in a microplate reader (Berthold, Tristar2) adding 50 μ l

of detection buffer (Promega, E1500) to 50µl of tissue lysate in opaque 96-well microplates. Results, expressed in Relative Luminometric Units (RLU) were normalized by the protein content in tissue homogenate and by the specific luciferase activity (RLU/mg protein) of each cell line measured in cells the day of their injection into mice.

Quantification of TGFβ activation: TGFβ activation assay was performed transfecting in cells a GFP-reporter plasmid (Qiagen) designed to monitor in cultured cells the activation of the SMAD2/3 complex. When indicated, cell culture medium was supplemented 24h before transfection with 2 to 20µg/ml of recombinant TGFβ (R&D Systems). GFP expression was quantified by fluorimetry (Tristar apparatus, Berthold).

TSP1 overexpression: Mouse TSP1 cDNA was amplified by PCR with PrimeSTAR Max DNA polymerase (Takara Clontech, R045A) and cloned into the MCS region of a mammalian expression plasmid downstream of a CMV promoter that was then transfected into cells.

Cell lines establishment: Lentiviral vectors pLKO.1 expressing non-target shRNA, (Sigma-Aldrich, SHC002,) or shRNA construct targeting TSP1 exon 5, (Sigma-Aldrich, TRCN0000039696) and lentiviral vectors pTRIP (Dharmacon) expressing Luciferase Firefly, H2B-GFP or H2B-mCherry were produced in HEK293FT cells by the tri-transfection method using calcium phosphate. Lentiviral particles were harvested 72 hours after transfection. For lentiviral transduction, 5×10^4 cells were seeded onto 12-well plate and incubated 6 hours with lentivirus in OPTI-MEM.

Construction of sgRNA expression plasmids for TSP-1 activation: Target sites within the -250bp upstream transcription start site of TSP1 gene were identified using the online CRISPR design tool (crispr.mit.edu) as described (Ran et al., 2013). Pairs of DNA oligonucleotides encoding corresponding sgRNA were annealed together and ligated into BbsI-digested plasmid pAC154-dual-dCas9VP160 and transfected into cells along with a nuclease-dead Cas9 activator system pAC154-dual-dCas9VP160-sgExpression (Addgene, 48240) as described (Cheng et al., 2013). Quantitative real-time PCR was used to validate efficient transcriptional activation of TSP1 48 h after transfection.

sgRNA guide	Target sequence	Forward primer(5'→3')	Reverse primer (5'→3')
G1	GGGAGACTCCGATCCCGCAC	caccGGGAGACTCCGATCCCGCAC	aaacGTGCGGGATCGGAGTCTCCC
G7	CCAGGGCTCCTGTGCGGGAT	caccGCCAGGGCTCCTGTGCGGGAT	aaacATCCCGCACAGGAGCCCTGGC

TSP1 knock-in (genome editing): Genome editing was performed in 4T1 cells using both TALEN (Addgene, 1000000034) as described (Ding et al., 2013) and CRISPR/Cas9 nickase systems (Addgene,

42335) as described (Cong et al., 2013). Briefly, the first allele of *thbs1* was impaired by TALEN induced homologous recombination of puromycin resistance gene upstream of the TSP1 ATG (Fig). The second allele of *thbs1* was then modified by deletion of the genomic region ranging from exon 7 to 21 with 2 couples of CRISPR-nickase, then repaired with a donor matrix containing TSP1 cDNA bearing mutations in frame with a P2A-hygromycin resistance cassette (Fig). Recombination events were selected growing cells in medium containing 1µg/ml puromycin (StressMarq) and 0.2mg/ml hygromycin (Euromedex). Isolated clones were characterized by PCR on genomic DNA extracted with GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (SigmaAldrich). The mutations introduced were as follows:

Cell line	4T1mCD36	4T1mTGFβ
WT sequence	CSVTCGDGVITRIR	KRFK
Mutated sequence	CLGQCGDGVIEQIQ	KQWQ

SUPPLEMENTAL REFERENCES

- Cheng, A. W., Wang, H., Yang, H., Shi, L., Katz, Y., Theunissen, T. W., Rangarajan, S., Shivalila, C. S., Dadon, D. B., and Jaenisch, R. (2013). Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system. *Cell Research* 23, 1163-1171.
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., and Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 339, 819-823.
- Ding, Q., Lee, Y. K., Schaefer, E. A., Peters, D. T., Veres, A., Kim, K., Kuperwasser, N., Motola, D. L., Meissner, T. B., Hendriks, W. T., *et al.* (2013). A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. *Cell stem cell* 12, 238-251.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013). Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protocols* 8, 2281-2308.

CONCLUSION

Grâce à ce travail nous avons montré que l'expression de la TSP1 augmente avec le grade et l'agressivité tumorale dans le cancer du sein en clinique. Dans le modèle murin de cancer du sein métastatique 4T1, la TSP1 est un puissant inducteur des métastases, d'une part via l'activation du TGF β latent et l'augmentation du phénotype mésenchymateux des cellules et d'autre part via l'augmentation de l'hypoxie qui accroît l'agressivité tumorale.

On peut émettre comme hypothèse que dans les stades précoces de la tumorigenèse, les propriétés anti-angiogéniques de la TSP1 exerceraient une fonction anti-tumorale en inhibant la mise en place de la vascularisation tumorale nécessaire à l'initiation de la tumeur. Puis dans les stades plus avancés, l'expression de la TSP1 serait augmentée, conduisant à l'augmentation de la dissémination métastatique.

L'inhibition de la TSP1 ne modifie pas la progression tumorale mais diminue fortement l'hypoxie, l'EMT, l'invasion, l'extravasation et les métastases dans un modèle de cancer du sein métastatique possédant les caractéristiques du sous type histologique intrinsèque le plus agressif, le sous type Basal. Cette inhibition permet également de « normaliser » la vascularisation tumorale induisant la diminution de l'hypoxie tumorale.

La TSP1 est donc une cible thérapeutique pertinente dans le traitement des tumeurs du sein métastatiques, pour inhiber la dissémination métastatique qui cause la majorité des décès. L'augmentation de la perfusion tumorale devrait permettre d'améliorer l'efficacité des traitements chimiothérapeutiques et radiothérapeutiques. La diminution de l'hypoxie devrait quant à elle conduire à diminuer tous les mécanismes d'agressivité qu'elle induit.

La recherche sur le cancer a permis la découverte de caractéristiques communes des cellules cancéreuses (Hanahan and Weinberg 2000). C'est à partir de cette caractérisation que des molécules thérapeutiques ont pu être mises au point et ont permis de diminuer très significativement la mortalité due à cette pathologie. Néanmoins le traitement le plus efficace à ce jour reste la résection chirurgicale de la masse tumorale. En effet, l'utilisation de la chimiothérapie et la radiothérapie reste limitée par la sélection de cellules tumorales résistantes au cours de ces traitements (Baylin 2011).

La dissémination métastatique est le problème majeur de la prise en charge thérapeutique du cancer, à l'origine de 90% des décès. Il est donc urgent de mieux comprendre les mécanismes mis en cause et de mettre au point de nouveaux traitements permettant l'élimination des métastases.

I - STRATEGIES ANTI-ANGIOGÉNIQUES

Ces dernières années ont vu émerger de nouveaux concepts dans le traitement des cancers, et notamment l'idée de cibler le microenvironnement tumoral, plutôt que les cellules tumorales. En effet de nombreux travaux montrent que le microenvironnement tumoral composé de la matrice extracellulaire, des fibroblastes activés, des vaisseaux sanguins et des cellules immunitaires, réduit l'efficacité des traitements (Hirata et al. 2015), augmente l'invasion cellulaire (Levental et al. 2009; Tse et al. 2012) et possède des propriétés immunosuppressives (Zou 2005), constituant donc une cible de choix (Hanahan and Weinberg 2011).

Les traitements visant à inhiber l'angiogenèse tumorale constituent la première tentative de modification du microenvironnement tumoral. Le postulat de départ était que l'inhibition de la formation des néo-vaisseaux sanguins induirait une hypoxie massive conduisant à une mortalité cellulaire. Cette hypothèse était notamment basée sur les travaux de Judah Folkman qui démontraient que la croissance tumorale nécessite un apport vasculaire et que l'inhibition de cet apport permet de diminuer la croissance tumorale (Folkman 2006). Porteurs de nombreux espoirs, ces traitements ont apporté dans certains cancers une augmentation de la survie sans progression mais n'ont montré que dans quelques exceptions une augmentation de la survie globale (Carmeliet and Jain 2011). C'est notamment le cas lorsque les tumeurs sont porteuses de mutations les rendant fortement dépendantes de l'angiogenèse, par exemple dans le carcinome rénal à cellules claires dans lequel l'inhibiteur majeur du facteur de transcription HIF1 α , la protéine Von Hippel–Lindau est mutée (Jayson et al. 2016).

II - ROLE DE L'HYPOXIE TUMORALE

L'hypoxie tumorale a pendant longtemps été considérée comme étant anti-tumorale et le but des traitements anti-angiogéniques était donc de l'augmenter (Ellis and Hicklin 2008). Cependant cette vision commence à changer puisque de plus en plus d'indices convergent vers le fait que l'hypoxie pourrait être au contraire un inducteur de la prolifération (Terraneo et al. 2014) et de l'agressivité tumorale (Yang et al. 2008; Gilkes et al. 2014; McDonald et al. 2016). En effet, une hypoxie importante règne dans les tumeurs car la vascularisation tumorale est peu efficace, puisque composée de vaisseaux tumoraux mal structurés et peu fonctionnels (McDonald and Choyke 2003). Le cancer du pancréas (Koong et al. 2000) et le glioblastome (Vallabhajosula et al. 2011), deux des cancers les plus prolifératifs et les plus invasifs, sont des tumeurs particulièrement hypoxiques comme la plupart des tumeurs solides. De plus, des études précliniques et cliniques ont montré qu'un des effets secondaires des traitements anti-angiogéniques est l'augmentation de l'invasion cellulaire (Ebos et al. 2009; Ellis and Reardon 2009; Paez-Ribes et al. 2009). Il était donc nécessaire de réévaluer le rôle de l'hypoxie dans l'agressivité et la dissémination tumorale.

III - ROLE DE LA TSP1 DANS LA PROGRESSION ET LA DISSEMINATION METASTATIQUE

Dans les cancers, le niveau d'expression de la TSP1, inhibiteur majeur de l'angiogénèse, n'est pas très clair dans la littérature. Certaines études montrent une répression de son expression par rapport au tissu normal quand d'autres observent une surexpression, parfois pour un même organe (Roberts 1996; Fraipont et al. 2001). Le groupe de Gyorffy (Gyorffy et al. 2013) a compilé de nombreuses études de microarrays de tumeurs du sein et a normalisé ces données de façon à pouvoir les analyser globalement. Ceci permet de disposer de plus de 4000 échantillons analysés et de réaliser des études fines avec des résultats statistiquement significatifs, ce qui est difficile avec chacune de ces études prises séparément. Ceci nous a permis de montrer qu'une expression plus élevée de la TSP1 dans les tumeurs du sein de grade I est corrélée à une meilleure survie, qu'elle n'est d'aucun pronostic dans les tumeurs de grade II et qu'elle est corrélée à une moins bonne survie dans les tumeurs de grade III. Nos données cliniques confirment que l'expression protéique de la TSP1 augmente avec le grade tumoral. L'analyse de l'expression de la TSP1 de façon globale, comme réalisé dans différentes études, sans distinguer le grade tumoral n'est donc pas pertinente. Ceci peut expliquer les résultats non concordants des études sur l'expression de la TSP1 dans les cancers et montre la nécessité de confirmer ces résultats dans d'autres cancers ségrégués par grade tumoraux.

Nous montrons également dans cette étude que la TSP1 est plus fortement exprimée dans le sous type histologique Basal, le plus invasif et de moins bon pronostic de tous les sous types histologiques du cancer du sein. Son expression est corrélée avec les différents marqueurs d'agressivité tumorale tel que le

grade mitotique, le marqueur de prolifération Ki67 et la nécrose. Dans le cancer du sein invasif, son expression est reliée avec l'atteinte ganglionnaire (Byrne et al. 2007), à une moins bonne survie et à la rechute métastatique dans les cancers du sein triples négatifs (Campane et al. 2015). Une augmentation de la TSP1 dans les stades les plus agressifs a également été observée dans le cancer du pancréas (Okada et al. 2010), du rein (Veliceasa et al. 2007) de la prostate (Firlej et al. 2011) et dans les glioblastomes (Kawataki et al. 2000). L'expression de la TSP1 est donc clairement reliée à une augmentation de l'agressivité tumorale.

Nos données cliniques suggèrent que la TSP1 exerce un rôle différent en fonction du grade tumoral et du sous type histologique. On peut émettre comme hypothèse que dans les stades précoces ou peu agressifs, la fonction anti-angiogénique de la TSP1 exercerait un rôle anti-tumoral en inhibant la mise en place de la vascularisation tumorale et maintiendrait la tumeur dans un état de latence. De plus la TSP1 est un activateur majeur du TGF β latent qui inhibe la prolifération et induit l'apoptose des cellules tumorales dans les stades précoces de la tumorigenèse (Coffey et al. 1988; Zarzynska 2014). Le promoteur de la TSP1 a été retrouvé méthylé dans les lymphomes, les neuroblastomes (Yang et al. 2003), les cancer de l'estomac (Guo et al. 2010) et du pénis (Guerrero et al. 2008). Son expression a également été montrée comme réprimé par plusieurs oncogènes comme Myc, Jun, WT1 ou Ras et induite par le gène suppresseur de tumeur p53 (Stenina-Adognravi 2014). De même, dans le cancer du sein, nous montrons que l'expression de la TSP1 est faible ou inexistante dans les lignées cellulaires tumorales possédant les caractéristiques du sous type histologique Luminal correspondant à un bon pronostic. Pour étudier l'effet de la TSP1 dans les stades précoces de la tumorigenèse, il serait intéressant d'étudier si la surexpression de la TSP1 dans une lignée cellulaire l'exprimant faiblement, telle que la lignée murine 67NR ou humaine MCF7, modifie la prise tumorale des greffes orthotopiques réalisées à partir de ces cellules.

Les études sur l'angiogenèse ce sont concentrées sur l'analyse de l'expression des facteurs pro-angiogéniques au cours de la progression tumorale. L'étude de l'expression des facteurs anti-angiogéniques en fonction du grade tumoral et du sous type histologique semble nécessaire pour déterminer si l'augmentation de l'expression de la TSP1 au cours de la progression tumorale est un mécanisme commun à tous les facteurs anti-angiogéniques.

Pour expliquer l'augmentation de l'expression de la TSP1 avec le grade tumoral, nous pensons qu'un cercle vicieux pourrait se mettre en place entre la TSP1, le TGF β et l'hypoxie. En effet le TGF β activé majoritairement par la TSP1 (Ribeiro et al. 1999) induit lui-même l'expression de la TSP1 (Okamoto et al.

2002). De même, l'hypoxie induite par la TSP1 augmente également l'expression de la TSP1 (Osada-Oka et al. 2008; Firlej et al. 2011; Ortiz-Masià et al. 2012). Nous démontrons que tel est également le cas dans un modèle de cancer du sein métastatique.

Dans les tumeurs du sein de grade tumoral III et dans le sous type basal le plus agressif, il est probable que l'augmentation de la quantité de la TSP1 stimule également l'invasion des cellules tumorales. En effet, dans notre étude nous montrons que la surexpression de la TSP1 dans la lignée luminaire 67NR augmente fortement les capacités de migration et qu'à l'inverse, son inhibition dans des cellules qui l'expriment fortement (4T1 et MDA-MB-231) inhibe la migration et l'invasion.

Nous montrons que la mutation du site de la TSP1 permettant l'activation du TGF β (tumeurs 4T1 mTGF β) inhibe la formation des métastases. Dans la littérature, il a été montré dans les gliomes que les niveaux de TSP1 et de TGF β actifs augmentent simultanément au cours de la progression tumorale (Kawataki et al. 2000) et que la concentration plasmatique du TGF β augmente également avec les grades tumoraux dans le cancer du sein (Sheen-Chen et al. 2001). Cependant il est possible que l'inhibition des métastases observée dans ces tumeurs 4T1mTGF β , résulte en partie de la petite taille des tumeurs.

Nous avons en effet observé une inhibition massive de la croissance tumorale dans les tumeurs mTGF β , dans lesquelles la capacité de la TSP1 à activer le TGF β a été complètement inactivée, alors que l'inhibition de la TSP1 par un shRNA n'induit aucune modification de cette croissance, indiquant un possible effet de seuil. Le TGF β est un facteur de croissance qui régule la prolifération des cellules tumorales. Les cellules murines mammaires métastatiques 4T1 utilisées dans notre étude ont été décrites comme étant particulièrement dépendantes du TGF β pour leur croissance *in vivo* (Bandyopadhyay et al. 2010). Pour définir plus précisément le rôle du TGF β dans la dissémination métastatique de notre modèle l'étude, l'expression d'un rapporteur de la voie SMAD qui est activée par le TGF β pour induire l'EMT et l'invasion (Vincent et al. 2009; Lamouille et al. 2014) pourrait être suivie au cours de la progression tumorale suivant que la TSP1 est inhibée ou non.

Le TGF β possède également des propriétés immunosuppressives puissantes qui favorisent la croissance de la tumeur (Akhurst and Hata 2012). Il induit notamment la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes T régulateurs (Treg) qui inhibent la réponse immunitaire dans la tumeur (Liu et al. 2007; Lin et al. 2010). La comparaison de la quantité de lymphocytes Treg dans les tumeurs shTSP1 et dans les tumeurs 4T1mTGF β pourrait permettre de déterminer la part du système immunitaire dans l'inhibition de la croissance tumorale observée lorsque le site d'activation du TGF β est muté.

IV - INDUCTION DE LA DISSEMINATION METASTATIQUE PAR L'HYPOXIE

Le résultat majeur de notre étude est la démonstration qu'une meilleure oxygénation de la tumeur primaire réprime fortement la dissémination métastatique. En effet, les tumeurs 4T1mCD36 dans lesquelles le site d'interaction de la TSP1 avec le récepteur CD36, qui médie majoritairement ses propriétés anti-angiogéniques, a été muté ont une croissance comparable aux tumeurs contrôles, mais sont mieux vascularisées, moins hypoxiques et ne disséminent pas spontanément dans le poumon alors même que ces cellules activent le TGF β latent, sont capables de migrer et d'extravaser. Ces données rappellent l'effet pro-invasif des traitements anti-angiogéniques pharmacologiques observés en préclinique (Ebos et al. 2009; Paez-Ribes et al. 2009) et en clinique dans le glioblastome (Ellis and Reardon 2009).

Cependant le ou les mécanismes mis en jeu restent à déterminer précisément, plusieurs processus pouvant être impliqués.

Le TGF β activé par la TSP1 induit la mise en place d'un microenvironnement immunosuppresseur. Par ailleurs une étude a montré qu'une augmentation de l'oxygénation modifie le microenvironnement vers un état immunopermissif en diminuant la quantité de TGF β et de lymphocytes T régulateurs, et en augmentant l'infiltration et l'activation des lymphocytes T et des Natural Killer (NK). Cette réactivation du système immunitaire par l'oxygénation tumorale permet de diminuer fortement les métastases dans des modèles tumoraux de mélanome, de fibrosarcome et dans le modèle de cancer du sein métastatique 4T1 utilisé dans notre étude (Hatfield et al. 2015). Le système immunitaire peut jouer à différents niveaux de la dissémination métastatique : au niveau de la tumeur primaire en empêchant la croissance tumorale et l'intravasation, au niveau de la circulation sanguine en induisant la mort des cellules tumorales circulantes et au niveau de la colonisation du nouveau tissu en inhibant le développement de la métastase.

Les cellules 4T1mCD36 sont capables de migrer, mais il est possible que pour disséminer dans l'organisme et former des métastases, les cellules aient besoin d'un inducteur comme le stress hypoxique. En effet l'hypoxie est par exemple un puissant régulateur du métabolisme cellulaire (Liberti and Locasale 2016). Elle induit la modification des voies métaboliques impliquées dans la production d'énergie nécessaire à la croissance des cellules tumorales conduisant notamment à une augmentation de l'invasion et des métastases (Zhou et al. 2010). Une meilleure oxygénation des tumeurs pourrait permettre de réverser ce phénotype bloquant de ce fait la dissémination métastatique. L'hypoxie est également connue pour induire le maintien et la prolifération des cellules souches cancéreuses (Inukai et al.). Cette population cellulaire a été montrée dans de nombreux travaux comme subissant préférentiellement l'EMT et comme étant à l'origine des CTC et des métastases (Sheridan et al. 2006; Lathia et al. 2011; Soehngen et al. 2014;

Mitra et al. 2015). Une diminution de l'hypoxie tumorale pourrait permettre de diminuer le pool de CSCs présentes dans la tumeur.

Enfin, l'interaction de la TSP1 avec le récepteur CD36 exprimé par les plaquettes a été montré comme nécessaire à l'agrégation plaquettaire et à la formation du caillot sanguin (Kuijpers et al. 2014). La mutation du site d'interaction de la TSP1 avec le CD36 pourrait inhiber la liaison des cellules tumorales circulantes avec les plaquettes, réprimant la formation des embolus protégeant les cellules tumorales du système immunitaire et favorisant l'extravasation des CTC (Im et al. 2004).

V - NORMALISATION VASCULAIRE

Au vu de nos données expérimentales et cliniques, il semble clair qu'il est nécessaire de diminuer l'hypoxie tumorale pour inhiber l'invasion et la dissémination métastatique. Jain est le premier à avoir émis l'idée qu'une normalisation vasculaire induite par l'utilisation raisonnée des traitements anti-angiogéniques, permettant une diminution de l'hypoxie, était préférable à l'asphyxie de la tumeur, qui favoriserait l'agressivité tumorale et la dissémination métastatique (Jain 2005).

Nous proposons dans cette étude, de normaliser la vascularisation tumorale par l'inhibition d'un facteur anti-angiogénique, la TSP1. Cette inhibition induit effectivement une augmentation du nombre de vaisseaux fonctionnels, une diminution de l'hypoxie tumorale et une diminution de 80% des métastases. Cependant cette amélioration de la perfusion ne favorise pas la croissance tumorale. Cela démontre que dans notre modèle de cancer du sein métastatique la croissance tumorale est peu dépendante de l'apport en oxygène. Nos données cliniques montrent que 70% des métastases du foie issues de tumeurs TSP1 positives expriment également la TSP1, suggérant qu'en clinique également, la croissance des métastases soit peu dépendante de l'angiogenèse tumorale. Un travail a par ailleurs montré dans le mélanome que la vascularisation des métastases pulmonaires provient de la cooptation des vaisseaux existants (Szabo et al. 2015).

VI - CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons étudié deux fonctions majeures de la TSP1 dans la progression et la dissémination tumorale : l'activation du TGF β latent et les propriétés anti-angiogéniques via le récepteur CD36. D'autres partenaires de la TSP1 peuvent être également impliqués dans ses propriétés pro tumorales. Par exemple la TSP1 possède la capacité de remodeler la matrice extracellulaire et elle régule l'adhésion et la dé-adhésion cellulaire. Nous avons montré que l'inhibition de la TSP1 diminue la densité, la cohésion et la structuration du réseau d'actine d'une structure 3D. Or des études montrent que la confluence cellulaire peut modifier la réponse à un même stimulus. Par exemple, le PDGF induit la prolifération des cellules tumorales éparses, alors qu'il induit la migration des mêmes cellules lorsqu'elles

sont à confluence (Szöőr et al. 2016). L'augmentation de la densité cellulaire par la TSP1 pourrait donc induire l'invasion des cellules tumorales. De plus, cette augmentation de la densité pourrait augmenter la tension cellulaire au sein de la tumeur. Or une forte tension cellulaire est associée à une augmentation de l'invasion (Tse et al. 2012). Il serait intéressant de mesurer ces paramètres dans notre modèle de tumeurs du sein métastatiques *in vivo*.

Le compartiment immunitaire tumoral est l'objet de nombreuses recherches actuellement. Dans les tumeurs, l'expression de cytokines immunosuppressives comme le TGF β et l'expression de récepteurs inhibiteurs comme PDL1 par les cellules tumorales elles-mêmes diminuent l'efficacité de la réponse immunitaire contre la tumeur (Zou 2005). Le but des traitements immunothérapeutiques actuellement en développement clinique est justement de réactiver l'efficacité du système immunitaire (Hughes et al. ; Srivastava and McDermott 2014). La TSP1 est un activateur majeur du TGF β , un puissant immunosuppresseur, et elle interagit également avec le récepteur CD47 qui est impliqué dans de nombreux mécanismes de régulation du système immunitaire (Sokolosky et al. 2016). L'inhibition de la TSP1 pourrait donc également favoriser la réactivation du système immunitaire contre la tumeur.

Nous démontrons grâce à ce travail que la TSP1 est une cible thérapeutique pertinente pour le traitement des cancers du sein métastatiques et que son inhibition réprime fortement la dissémination métastatique. Pour cela, nous proposons d'utiliser une stratégie d'inhibition via le siRNA dirigé contre la TSP1 utilisé dans notre étude. Cette approche a déjà été utilisée dans un modèle de cancer de la prostate (Firlej et al. 2011).

Cette étude permet également de montrer que l'augmentation de l'hypoxie tumorale est une stratégie risquée. Dans notre modèle, les tumeurs hypoxiques sont en effet nettement plus métastatiques que les tumeurs mieux perfusées. Or les métastases sont la cause majeure du décès des patients. La normalisation vasculaire permettant de diminuer l'hypoxie et d'augmenter la perfusion des traitements chimiothérapeutiques semble être une voie plus prometteuse.

L'inhibition de la TSP1 permet d'obtenir un état vasculaire proche de celui observé dans un tissu sain, cependant pour ne pas se retrouver avec une angiogenèse incontrôlée et maintenir cette « normalisation vasculaire » dans le temps, l'inhibition concomitante d'un facteur anti-angiogénique, la TSP1 et d'un facteur pro-angiogénique, le VEGF pourrait être explorée.

La normalisation vasculaire seule ne peut suffire à traiter des tumeurs du sein métastatiques, mais utilisée en combinaison avec la chimiothérapie et la radiothérapie, elle devrait permettre d'une part de diminuer l'agressivité tumorale liée à l'hypoxie et d'autres parts améliorer la perfusion et l'efficacité de ces traitements.

REFERENCES

- Akhurst RJ, Hata A. 2012. Targeting the TGF[β] signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* **11**: 790-811.
- Algire GH, Chalkley HW, Earle WE, Legallais FY, Park HD, Shelton E, Schilling EL. 1950. Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. III. Vascular reactions' of mice to fibroblasts treated in vitro with methylcholanthrene. *J Natl Cancer Inst* **11**: 555-580.
- Alitalo K, Tammela T, Petrova TV. 2005. Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature* **438**: 946-953.
- Alix-Panabières C, Bartkowiak K, Pantel K. 2016. Functional studies on circulating and disseminated tumor cells in carcinoma patients. *Molecular Oncology* **10**: 443-449.
- Alix-Panabieres C, Pantel K. 2014. Challenges in circulating tumour cell research. *Nat Rev Cancer* **14**: 623-631.
- Attur MG, Palmer GD, Al-Mussawir HE, Dave M, Teixeira CC, Rifkin DB, Appleton CTG, Beier F, Abramson SB. 2009. F-spondin, a neuroregulatory protein, is up-regulated in osteoarthritis and regulates cartilage metabolism via TGF- β activation. *The FASEB Journal* **23**: 79-89.
- Baenziger NL, Brodie GN, Majerus PW. 1971. A thrombin-sensitive protein of human platelet membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**: 240-243.
- Bandyopadhyay A, Wang L, Agyin J, Tang Y, Lin S, Yeh IT, De K, Sun LZ. 2010. Doxorubicin in combination with a small TGF β inhibitor: a potential novel therapy for metastatic breast cancer in mouse models. *PLoS One* **5**: e10365.
- Barker TH, Pallero MA, MacEwen MW, Tilden SG, Woods A, Murphy-Ullrich JE, Hagood JS. 2004. Thrombospondin-1-induced Focal Adhesion Disassembly in Fibroblasts Requires Thy-1 Surface Expression, Lipid Raft Integrity, and Src Activation. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 23510-23516.
- Bates DO, Cui T-G, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ. 2002. VEGF165b, an Inhibitory Splice Variant of Vascular Endothelial Growth Factor, Is Down-Regulated in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Research* **62**: 4123-4131.
- Baylin SB. 2011. Resistance, epigenetics and the cancer ecosystem. *Nat Med* **17**: 288-289.
- Bergers G, Benjamin LE. 2003. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* **3**: 401-410.
- Bergers G, Hanahan D. 2008. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer* **8**: 592-603.
- Bleuel K, Popp S, Fusenig NE, Stanbridge EJ, Boukamp P. 1999. Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 2065-2070.
- Bourd-Boittin K, Bonnier D, Leyme A, Mari B, Tuffery P, Samson M, Ezan F, Baffet G, Theret N. 2011. Protease profiling of liver fibrosis reveals the ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 1 as a central activator of transforming growth factor β . *Hepatology (Baltimore, Md)* **54**: 2173-2184.
- Byrne GJ, Hayden KE, McDowell G, Lang H, Kirwan CC, Tetlow L, Kumar S, Bundred NJ. 2007. Angiogenic characteristics of circulating and tumoural thrombospondin-1 in breast cancer. *Int J Oncol* **31**: 1127-1132.
- Calzada MJ, Sipes JM, Krutzsch HC, Yurchenco PD, Annis DS, Mosher DF, Roberts DD. 2003. Recognition of the N-terminal Modules of Thrombospondin-1 and Thrombospondin-2 by $\alpha 6 \beta 1$ Integrin. *Journal of Biological Chemistry* **278**: 40679-40687.
- Campane M, Valo I, Jézéquel P, Moreau M, Boissard A, Champion L, Loussouarn D, Verrielle V, Coqueret O, Guette C. 2015. Prediction of Recurrence and Survival for Triple-Negative Breast Cancer (TNBC) by a Protein Signature in Tissue Samples. *Molecular & Cellular Proteomics* **14**: 2936-2946.
- Carlevaro MF, Cermelli S, Cancedda R, Descalzi Cancedda F. 2000. Vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage neovascularization and chondrocyte differentiation: auto-paracrine role during endochondral bone formation. *Journal of cell science* **113**: 59-69.
- Carmeliet P. 2000. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**: 389-395.
- . 2003. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**: 653-660.
- Carmeliet P. 2005. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**: 932-936.
- Carmeliet P, Jain RK. 2011. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**: 298-307.
- Coffey RJ, Jr., Sipes NJ, Bascom CC, Graves-Deal R, Pennington CY, Weissman BE, Moses HL. 1988. Growth modulation of mouse keratinocytes by transforming growth factors. *Cancer Res* **48**: 1596-1602.

- Colditz GA, Kaphingst KA, Hankinson SE, Rosner B. 2012. Family history and risk of breast cancer: nurses' health study. *Breast Cancer Research and Treatment* **133**: 1097-1104.
- Dawson DW, Pearce SFA, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. 1997. CD36 Mediates the In Vitro Inhibitory Effects of Thrombospondin-1 on Endothelial Cells. *The Journal of Cell Biology* **138**: 707-717.
- de Fraipont F, Keramidas M, El Atifi M, Chambaz EM, Berger F, Feige JJ. 2004. Expression of the thrombospondin 1 fragment 167-569 in C6 glioma cells stimulates tumorigenicity despite reduced neovascularization. *Oncogene* **23**: 3642-3649.
- de Fraipont F, Nicholson AC, Feige JJ, Van Meir EG. 2001. Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med* **7**: 401-407.
- Demicheli R. 2001. Tumour dormancy: findings and hypotheses from clinical research on breast cancer. *Semin Cancer Biol* **11**: 297-306.
- DiCesare P, Hauser N, Lehman D, Pasumarti S, Paulsson M. 1994. Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) is an abundant component of tendon. *FEBS letters* **354**: 237-240.
- Ebos JM, Lee CR, Cruz-Munoz W, Bjarnason GA, Christensen JG, Kerbel RS. 2009. Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. *Cancer Cell* **15**: 232-239.
- Eelen G, de Zeeuw P, Simons M, Carmeliet P. 2015. Endothelial cell metabolism in normal and diseased vasculature. *Circulation research* **116**: 1231-1244.
- Ellis LM, Hicklin DJ. 2008. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* **8**: 579-591.
- Ellis LM, Reardon DA. 2009. Cancer: The nuances of therapy. *Nature* **458**: 290-292.
- Elston CW, Ellis IO. 2002. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **41**: 154-161.
- Ferrara N. 2009. VEGF-A: a critical regulator of blood vessel growth. *European cytokine network* **20**: 158-163.
- Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J. 2003. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* **9**: 669-676.
- Ferrer CM, Reginato MJ. 2014. Cancer metabolism: cross talk between signaling and O-GlcNAcylation. *Methods Mol Biol* **1176**: 73-88.
- Filleur S, Volpert OV, Degeorges A, Volland C, Reiher F, Clezardin P, Bouck N, Cabon F. 2001. In vivo mechanisms by which tumors producing thrombospondin 1 bypass its inhibitory effects. *Genes Dev* **15**: 1373-1382.
- Firlej V, Mathieu JR, Gilbert C, Lemonnier L, Nakhle J, Gallou-Kabani C, Guarmit B, Morin A, Prevarskaya N, Delongchamps NB et al. 2011. Thrombospondin-1 triggers cell migration and development of advanced prostate tumors. *Cancer Res* **71**: 7649-7658.
- Fischer KR, Durrans A, Lee S, Sheng J, Li F, Wong ST, Choi H, El Rayes T, Ryu S, Troeger J et al. 2015. Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* **527**: 472-476.
- Folkman J. 1971. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine* **285**: 1182-1186.
- Folkman J. 2006. Angiogenesis. *Annu Rev Med* **57**: 1-18.
- Fontana A, Filleur S, Guglielmi J, Frappart L, Bruno-Bossio G, Boissier S, Cabon F, Clezardin P. 2005. Human breast tumors override the antiangiogenic effect of stromal thrombospondin-1 in vivo. *Int J Cancer* **116**: 686-691.
- Fouquet S, Lugo-Martínez V-H, Faussat A-M, Renaud F, Cardot P, Chambaz J, Pinçon-Raymond M, Thenet S. 2004. Early Loss of E-cadherin from Cell-Cell Contacts Is Involved in the Onset of Anoikis in Enterocytes. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 43061-43069.
- Frisch SM, Schaller M, Cieply B. 2013. Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis. *Journal of cell science* **126**: 21-29.
- Gerstner ER, Duda DG, di Tomaso E, Ryg PA, Loeffler JS, Sorensen AG, Ivy P, Jain RK, Batchelor TT. 2009. VEGF inhibitors in the treatment of cerebral edema in patients with brain cancer. *Nat Rev Clin Oncol* **6**: 229-236.
- Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. 2014. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer* **14**: 430-439.
- Glinka Y, Prud'homme G J. 2008. Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor β -1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J Leukoc Biol* **84**: 302-310.
- Good DJ, Polverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, Bouck NP. 1990. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 6624-6628.

- Guerrero D, Guarch R, Ojer A, Casas JM, Ropero S, Mancha A, Pesce C, Lloveras B, Garcia-Bragado F, Puras A. 2008. Hypermethylation of the thrombospondin-1 gene is associated with poor prognosis in penile squamous cell carcinoma. *BJU International* **102**: 747-755.
- Guo W, Dong Z, He M, Guo Y, Guo J, Chen Z, Yang Z, Kuang G. 2010. Aberrant Methylation of Thrombospondin-1 and Its Association with Reduced Expression in Gastric Cardia Adenocarcinoma. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* **2010**.
- Gyorffy B, Surowiak P, Budczies J, Lanczky A. 2013. Online survival analysis software to assess the prognostic value of biomarkers using transcriptomic data in non-small-cell lung cancer. *PLoS One* **8**: e82241.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**: 57-70.
- Hanahan D, Weinberg RA. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674.
- Haq R, Gulasingam P. 2016. Duration of trastuzumab in patients with HER2-positive metastatic breast cancer in prolonged remission. *Current oncology (Toronto, Ont)* **23**: 91-95.
- Harbeck N, Thomssen C, Gnant M. 2013. St. Gallen 2013: Brief Preliminary Summary of the Consensus Discussion. *Breast Care* **8**: 102-109.
- Hatfield SM, Kjaergaard J, Lukashev D, Schreiber TH, Belikoff B, Abbott R, Sethumadhavan S, Philbrook P, Ko K, Cannici R et al. 2015. Immunological mechanisms of the antitumor effects of supplemental oxygenation. *Science translational medicine* **7**: 277ra230.
- Hay ED. 1995. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta anatomica* **154**: 8-20.
- Henkin J, Volpert OV. 2011. Therapies using anti-angiogenic peptide mimetics of thrombospondin-1. *Expert opinion on therapeutic targets* **15**: 1369-1386.
- Hirata E, Girotti Maria R, Viros A, Hooper S, Spencer-Dene B, Matsuda M, Larkin J, Marais R, Sahai E. 2015. Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin B1/FAK Signaling. *Cancer Cell* **27**: 574-588.
- Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. 2000. Lung cancer. *Lancet* **355**: 479-485.
- Hofsteenge J, Huwiler KG, Macek B, Hess D, Lawler J, Mosher DF, Peter-Katalinic J. 2001. C-mannosylation and O-fucosylation of the thrombospondin type 1 module. *J Biol Chem* **276**: 6485-6498.
- Horiguchi H, Yamagata S, Rong Qian Z, Kagawa S, Sakashita N. 2013. Thrombospondin-1 is highly expressed in desmoplastic components of invasive ductal carcinoma of the breast and associated with lymph node metastasis. *The journal of medical investigation : JMI* **60**: 91-96.
- Hughes PE, Caenepeel S, Wu LC. Targeted Therapy and Checkpoint Immunotherapy Combinations for the Treatment of Cancer. *Trends in Immunology*.
- Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, Berlin J, Baron A, Griffing S, Holmgren E et al. 2004. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine* **350**: 2335-2342.
- Ichii T, Koyama H, Tanaka S, Shioi A, Okuno Y, Otani S, Nishizawa Y. 2002. Thrombospondin-1 Mediates Smooth Muscle Cell Proliferation Induced by Interaction With Human Platelets. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **22**: 1286-1292.
- Im JH, Fu W, Wang H, Bhatia SK, Hammer DA, Kowalska MA, Muschel RJ. 2004. Coagulation Facilitates Tumor Cell Spreading in the Pulmonary Vasculature during Early Metastatic Colony Formation. *Cancer Research* **64**: 8613-8619.
- Imai T, Horiuchi A, Wang C, Oka K, Ohira S, Nikaido T, Konishi I. 2003. Hypoxia Attenuates the Expression of E-Cadherin via Up-Regulation of SNAIL in Ovarian Carcinoma Cells. *The American Journal of Pathology* **163**: 1437-1447.
- Inukai M, Hara A, Yasui M, Kumabe T, Matsumoto T, Saegusa M. Hypoxia-mediated cancer stem cells in pseudopalisades with activation of hypoxia-inducible factor-1 α /Akt axis in glioblastoma. *Human Pathology*.
- Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Krutzsch HC, Lawler J, Roberts DD. 1999. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation* **100**: 1423-1431.
- Isenberg JS, Martin-Manso G, Maxhimer JB, Roberts DD. 2009. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nat Rev Cancer* **9**: 182-194.
- Isenberg JS, Romeo MJ, Abu-Asab M, Tsokos M, Oldenburg A, Pappan L, Wink DA, Frazier WA, Roberts DD. 2007. Increasing Survival of Ischemic Tissue by Targeting CD47. *Circulation Research* **100**: 712-720.
- Jain RK. 2005. Normalization of Tumor Vasculature: An Emerging Concept in Antiangiogenic Therapy. *Science* **307**: 58-62.

- Jain S, Zuka M, Liu J, Russell S, Dent J, Guerrero JA, Forsyth J, Maruszak B, Gartner TK, Felding-Habermann B et al. 2007. Platelet glycoprotein Iba supports experimental lung metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**: 9024-9028.
- Jayachandran A, Anaka M, Prithviraj P, Hudson C, McKeown SJ, Lo PH, Vella LJ, Goding CR, Cebon J, Behren A. 2014. Thrombospondin 1 promotes an aggressive phenotype through epithelial-to-mesenchymal transition in human melanoma. *Oncotarget* **5**: 5782-5797.
- Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, Harris AL. 2016. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet*.
- Jeong G-B. 2015. Thrombospondin-1 and Inhibition of Tumor Growth. *Korean J Phys Anthropol* **28**: 175-184.
- Kang Y, Siegel PM, Shu W, Drobnjak M, Kakonen SM, Córdón-Cardo C, Guise TA, Massagué J. 2003. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell* **3**: 537-549.
- Karrison TG, Ferguson DJ, Meier P. 1999. Dormancy of mammary carcinoma after mastectomy. *J Natl Cancer Inst* **91**: 80-85.
- Kawataki T, Naganuma H, Sasaki A, Yoshikawa H, Tasaka K, Nukui H. 2000. Correlation of thrombospondin-1 and transforming growth factor- β expression with malignancy of glioma. *Neuropathology* **20**: 161-169.
- Kazerounian S, Yee KO, Lawler J. 2008. Thrombospondins in cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**: 700-712.
- Kerbel RS, Yu J, Tran J, Man S, Vilorio-Petit A, Klement G, Coomber BL, Rak J. 2001. Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer metastasis reviews* **20**: 79-86.
- Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WEF, Goldbrunner R, Herms J, Winkler F. 2010. Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nat Med* **16**: 116-122.
- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**: 841-844.
- Koong AC, Mehta VK, Le QT, Fisher GA, Terris DJ, Brown JM, Bastidas AJ, Vierra M. 2000. Pancreatic tumors show high levels of hypoxia. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics* **48**: 919-922.
- Kuijpers MJ, de Witt S, Nergiz-Unal R, van Kruchten R, Korporaal SJ, Verhamme P, Febbraio M, Tjwa M, Voshol PJ, Hoylaerts MF et al. 2014. Supporting roles of platelet thrombospondin-1 and CD36 in thrombus formation on collagen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **34**: 1187-1192.
- Labelle M, Begum S, Hynes Richard O. 2011. Direct Signaling between Platelets and Cancer Cells Induces an Epithelial-Mesenchymal-Like Transition and Promotes Metastasis. *Cancer Cell* **20**: 576-590.
- Lamouille S, Xu J, Derynck R. 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 178-196.
- Lathia JD, Gallagher J, Myers JT, Li M, VasANJI A, McLendon RE, Hjelmeland AB, Huang AY, Rich JN. 2011. Direct in vivo evidence for tumor propagation by glioblastoma cancer stem cells. *PLoS One* **6**: e24807.
- Lawler J, Duquette M, Whittaker CA, Adams JC, McHenry K, DeSimone DW. 1993. Identification and characterization of thrombospondin-4, a new member of the thrombospondin gene family. *J Cell Biol* **120**: 1059-1067.
- Lawler J, Sunday M, Thibert V, Duquette M, George EL, Rayburn H, Hynes RO. 1998. Thrombospondin-1 is required for normal murine pulmonary homeostasis and its absence causes pneumonia. *Journal of Clinical Investigation* **101**: 982-992.
- Lawler J, Weinstein R, Hynes RO. 1988. Cell attachment to thrombospondin: the role of ARG-GLY-ASP, calcium, and integrin receptors. *J Cell Biol* **107**: 2351-2361.
- Lee C-G, Heijn M, di Tomaso E, Griffon-Etienne G, Ancukiewicz M, Koike C, Park KR, Ferrara N, Jain RK, Suit HD et al. 2000. Anti-Vascular Endothelial Growth Factor Treatment Augments Tumor Radiation Response under Normoxic or Hypoxic Conditions. *Cancer Research* **60**: 5565-5570.
- Lee JH, Bhang DH, Beede A, Huang TL, Stripp BR, Bloch KD, Wagers AJ, Tseng YH, Ryeom S, Kim CF. 2014. Lung stem cell differentiation in mice directed by endothelial cells via a BMP4-NFATc1-thrombospondin-1 axis. *Cell* **156**: 440-455.
- Levental KR, Yu H, Kass L, Lakins JN, Egeblad M, Erler JT, Fong SF, Csiszar K, Giaccia A, Weninger W et al. 2009. Matrix crosslinking forces tumor progression by enhancing integrin signaling. *Cell* **139**: 891-906.
- Li Q, Ahuja N, Burger PC, Issa JP. 1999. Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* **18**: 3284-3289.

- Liao Z, Komaki R, Milas L, Yuan C, Kies M, Chang JY, Jeter M, Guerrero T, Blumenshien G, Smith CM et al. 2005. A Phase I Clinical Trial of Thoracic Radiotherapy and Concurrent Celecoxib for Patients with Unfavorable Performance Status Inoperable/Unresectable Non-Small Cell Lung Cancer. *Clinical Cancer Research* **11**: 3342-3348.
- Liberti MV, Locasale JW. 2016. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences* **41**: 211-218.
- Lin GH, Wang J, Li SH, Wang J, Xu L, Li SP. 2010. Relationship and clinical significance of TGF-beta1 expression with Treg cell infiltration in hepatocellular carcinoma. *Chinese journal of cancer* **29**: 403-407.
- Liu A, Garg P, Yang S, Gong P, Pallero MA, Annis DS, Liu Y, Passaniti A, Mann D, Mosher DF et al. 2009. Epidermal growth factor-like repeats of thrombospondins activate phospholipase Cgamma and increase epithelial cell migration through indirect epidermal growth factor receptor activation. *J Biol Chem* **284**: 6389-6402.
- Liu VC, Wong LY, Jang T, Shah AH, Park I, Yang X, Zhang Q, Lonning S, Teicher BA, Lee C. 2007. Tumor Evasion of the Immune System by Converting CD4+CD25- T Cells into CD4+CD25+ T Regulatory Cells: Role of Tumor-Derived TGF- β . *The Journal of Immunology* **178**: 2883-2892.
- Liu Y. 2004. Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Fibrogenesis: Pathologic Significance, Molecular Mechanism, and Therapeutic Intervention. *Journal of the American Society of Nephrology* **15**: 1-12.
- Marcucci F, Stassi G, De Maria R. 2016. Epithelial-mesenchymal transition: a new target in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*.
- Margosio B, Marchetti D, Vergani V, Giavazzi R, Rusnati M, Presta M, Taraboletti G. 2003. Thrombospondin 1 as a scavenger for matrix-associated fibroblast growth factor 2. *Blood* **102**: 4399-4406.
- Maxhimer JB, Shih HB, Isenberg JS, Miller TW, Roberts DD. 2009. Thrombospondin-1-CD47 Blockade Following Ischemia Reperfusion Injury is Tissue Protective. *Plastic and reconstructive surgery* **124**: 1880-1889.
- McDonald DM, Choyke PL. 2003. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med* **9**: 713-725.
- McDonald PC, Chafe SC, Dedhar S. 2016. Overcoming Hypoxia-Mediated Tumor Progression: Combinatorial Approaches Targeting pH Regulation, Angiogenesis and Immune Dysfunction. *Front Cell Dev Biol* **4**: 27.
- Mirochnik Y, Kwiatek A, Volpert OV. 2008. Thrombospondin and apoptosis: molecular mechanisms and use for design of complementation treatments. *Curr Drug Targets* **9**: 851-862.
- Mitra A, Mishra L, Li S. 2015. EMT, CTCs and CSCs in tumor relapse and drug-resistance. *Oncotarget* **6**: 10697-10711.
- Murphy-Ullrich JE, Gurusiddappa S, Frazier WA, Höök M. 1993. Heparin-binding peptides from thrombospondins 1 and 2 contain focal adhesion-labilizing activity. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 26784-26789.
- Murphy-Ullrich JE, Poczatek M. 2000. Activation of latent TGF- β by thrombospondin-1: mechanisms and physiology. *Cytokine & Growth Factor Reviews* **11**: 59-69.
- Muthukkaruppan V, Auerbach R. 1979. Angiogenesis in the mouse cornea. *Science* **205**: 1416-1418.
- Ndishabandi D, Duquette C, Billah GE, Reyes M, Duquette M, Lawler J, Kazerounian S. 2014. Thrombospondin-1 Modulates Actin Filament Remodeling and Cell Motility in Mouse Mammary Tumor cells in Vitro. *Discoveries (Craiova)* **2**.
- Nguyen DX, Bos PD, Massague J. 2009. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* **9**: 274-284.
- Nieswandt B, Hafner M, Echtenacher B, Männel DN. 1999. Lysis of Tumor Cells by Natural Killer Cells in Mice Is Impeded by Platelets. *Cancer Research* **59**: 1295-1300.
- Nucera C, Porrello A, Antonello ZA, Mekel M, Nehs MA, Giordano TJ, Gerald D, Benjamin LE, Priolo C, Puxeddu E et al. 2010. B-RafV600E and thrombospondin-1 promote thyroid cancer progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**: 10649-10654.
- Okada K, Hirabayashi K, Imaizumi T, Matsuyama M, Yazawa N, Dowaki S, Tobita K, Ohtani Y, Tanaka M, Inokuchi S et al. 2010. Stromal thrombospondin-1 expression is a prognostic indicator and a new marker of invasiveness in intraductal papillary-mucinous neoplasm of the pancreas. *Biomedical research (Tokyo, Japan)* **31**: 13-19.
- Okamoto M, Ono M, Uchiumi T, Ueno H, Kohno K, Sugimachi K, Kuwano M. 2002. Up-regulation of thrombospondin-1 gene by epidermal growth factor and transforming growth factor β in human cancer cells - transcriptional activation and messenger RNA stabilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1574**: 24-34.

- Ortiz-Masià D, Díez I, Calatayud S, Hernández C, Cosín-Roger J, Hinojosa J, Esplugues JV, Barrachina MD. 2012. Induction of CD36 and Thrombospondin-1 in Macrophages by Hypoxia-Inducible Factor 1 and Its Relevance in the Inflammatory Process. *PLoS ONE* **7**: e48535.
- Osada-Oka M, Ikeda T, Akiba S, Sato T. 2008. Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1 α -dependent expression of thrombospondin-1. *Journal of cellular biochemistry* **104**: 1918-1926.
- Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O. 2009. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* **15**: 220-231.
- Rege TA, Stewart J, Dranka B, Benveniste EN, Silverstein RL, Gladson CL. 2009. Thrombospondin-1-induced apoptosis of brain microvascular endothelial cells can be mediated by TNF-R1. *Journal of Cellular Physiology* **218**: 94-103.
- Relf M, LeJeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. 1997. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* **57**: 963-969.
- Ribeiro SMF, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE. 1999. The Activation Sequence of Thrombospondin-1 Interacts with the Latency-associated Peptide to Regulate Activation of Latent Transforming Growth Factor- β . *Journal of Biological Chemistry* **274**: 13586-13593.
- Roberts DD. 1996. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *The FASEB Journal* **10**: 1183-1191.
- Roh YH, Kim YH, Choi HJ, Lee KE, Roh MS. 2009. Fascin overexpression correlates with positive thrombospondin-1 and syndecan-1 expressions and a more aggressive clinical course in patients with gallbladder cancer. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* **16**: 315-321.
- Rusnati M, Urbinati C, Bonifacio S, Presta M, Taraboletti G. 2010. Thrombospondin-1 as a Paradigm for the Development of Antiangiogenic Agents Endowed with Multiple Mechanisms of Action. *Pharmaceuticals* **3**: 1241-1278.
- Schmidt-Kittler O, Ragg T, Daskalakis A, Granzow M, Ahr A, Blankenstein TJ, Kaufmann M, Diebold J, Arnholdt H, Muller P et al. 2003. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 7737-7742.
- Seliger C, Leukel P, Moeckel S, Jachnik B, Lottaz C, Kreutz M, Brawanski A, Proescholdt M, Bogdahn U, Bosserhoff AK et al. 2013. Lactate-modulated induction of THBS-1 activates transforming growth factor (TGF)- β 2 and migration of glioma cells in vitro. *PLoS One* **8**: e78935.
- Senkus E, Kyriakides S, Ohno S, Penault-Llorca F, Poortmans P, Rutgers E, Zackrisson S, Cardoso F. 2015. Primary breast cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology* **26**: v8-v30.
- Shaked Y, Bertolini F, Man S, Rogers MS, Cervi D, Foutz T, Rawn K, Voskas D, Dumont DJ, Ben-David Y et al. 2005. Genetic heterogeneity of the vasculogenic phenotype parallels angiogenesis: Implications for cellular surrogate marker analysis of antiangiogenesis. *Cancer Cell* **7**: 101-111.
- Shapiro S, deVilliers TJ, Pines A, Sturdee DW, Archer DF, Baber RJ, Panay N, Farmer RD, Stevenson JC, Mueck AO et al. 2014. Re: Estrogen plus progestin and breast cancer incidence and mortality in the women's health initiative observational study. *J Natl Cancer Inst* **106**: djt372.
- Sheen-Chen SM, Chen HS, Sheen CW, Eng HL, Chen WJ. 2001. Serum levels of transforming growth factor beta1 in patients with breast cancer. *Archives of surgery (Chicago, Ill : 1960)* **136**: 937-940.
- Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R, Jr., Badve S, Nakshatri H. 2006. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast cancer research : BCR* **8**: R59.
- Sid B, Sartelet H, Bellon G, El Btaouri H, Rath G, Delorme N, Haye B, Martiny L. 2004. Thrombospondin 1: a multifunctional protein implicated in the regulation of tumor growth. *Crit Rev Oncol Hematol* **49**: 245-258.
- Silverstein RL, Febbraio M. 2009. CD36, a Scavenger Receptor Involved in Immunity, Metabolism, Angiogenesis, and Behavior. *Science Signaling* **2**: re3-re3.
- Simpson CD, Anyiwe K, Schimmer AD. 2008. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Letters* **272**: 177-185.
- Sinn HP, Kreipe H. 2013. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast Care* **8**: 149-154.

- Sipes JM, Krutzsch HC, Lawler J, Roberts DD. 1999. Cooperation between Thrombospondin-1 Type 1 Repeat Peptides and α v β 3 Integrin Ligands to Promote Melanoma Cell Spreading and Focal Adhesion Kinase Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 22755-22762.
- Smith SK. 2001. Regulation of angiogenesis in the endometrium. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **12**: 147-151.
- Sokolosky JT, Dougan M, Ingram JR, Ho CC, Kauke MJ, Almo SC, Ploegh HL, Garcia KC. 2016. Durable antitumor responses to CD47 blockade require adaptive immune stimulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: E2646-2654.
- Soehngen E, Schaefer A, Koeritzer J, Huelsmeyer V, Zimmer C, Ringel F, Gempt J, Schlegel J. 2014. Hypoxia upregulates aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1) expression and induces functional stem cell characteristics in human glioblastoma cells. *Brain Tumor Pathol* **31**: 247-256.
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS et al. 2001. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**: 10869-10874.
- Srivastava N, McDermott D. 2014. Update on benefit of immunotherapy and targeted therapy in melanoma: the changing landscape. *Cancer management and research* **6**: 279-289.
- Stenina-Adognravi O. 2014. Invoking the power of thrombospondins: Regulation of thrombospondins expression. *Matrix Biology* **37**: 69-82.
- Streit M, Velasco P, Brown LF, Skobe M, Richard L, Riccardi L, Lawler J, Detmar M. 1999. Overexpression of thrombospondin-1 decreases angiogenesis and inhibits the growth of human cutaneous squamous cell carcinomas. *Am J Pathol* **155**: 441-452.
- Suh EJ, Kabir MH, Kang UB, Lee JW, Yu J, Noh DY, Lee C. 2012. Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. *Exp Mol Med* **44**: 36-44.
- Swan EA, Jasser SA, Holsinger FC, Doan D, Bucana C, Myers JN. 2003. Acquisition of anoikis resistance is a critical step in the progression of oral tongue cancer. *Oral Oncology* **39**: 648-655.
- Sweetwyne MT, Murphy-Ullrich JE. 2012. Thrombospondin1 in tissue repair and fibrosis: TGF-beta-dependent and independent mechanisms. *Matrix Biol* **31**: 178-186.
- Szabo V, Bugyik E, Dezso K, Ecker N, Nagy P, Timar J, Tovari J, Laszlo V, Bridgeman VL, Wan E et al. 2015. Mechanism of tumour vascularization in experimental lung metastases. *J Pathol* **235**: 384-396.
- Szőör Á, Ujlaky-Nagy L, Tóth G, Szöllösi J, Vereb G. 2016. Cell confluence induces switching from proliferation to migratory signaling by site-selective phosphorylation of PDGF receptors on lipid raft platforms. *Cellular Signalling* **28**: 81-93.
- Takeichi M. 2014. Dynamic contacts: rearranging adherens junctions to drive epithelial remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 397-410.
- Tam WL, Weinberg RA. 2013. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med* **19**: 1438-1449.
- Tenan M, Fulci G, Albertoni M, Diserens AC, Hamou MF, El Atifi-Borel M, Feige JJ, Pepper MS, Van Meir EG. 2000. Thrombospondin-1 Is Downregulated by Anoxia and Suppresses Tumorigenicity of Human Glioblastoma Cells. *The Journal of Experimental Medicine* **191**: 1789-1798.
- Terraneo L, Virgili E, Caretti A, Bianciardi P, Samaja M. 2014. In vivo hyperoxia induces hypoxia-inducible factor-1 α overexpression in LNCaP tumors without affecting the tumor growth rate. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **51**: 65-74.
- Thiery JP. 2003. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current Opinion in Cell Biology* **15**: 740-746.
- Tien Y-W, Chang K-J, Jeng Y-M, Lee P-H, Wu M-S, Lin J-T, Hsu S-M. 2001. Tumor Angiogenesis and Its Possible Role in Intravasation of Colorectal Epithelial Cells. *Clinical Cancer Research* **7**: 1627-1632.
- Tse JM, Cheng G, Tyrrell JA, Wilcox-Adelman SA, Boucher Y, Jain RK, Munn LL. 2012. Mechanical compression drives cancer cells toward invasive phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 911-916.
- Tucker RP, Hagios C, Chiquet-Ehrismann R, Lawler J, Hall RJ, Erickson CA. 1999. Thrombospondin-1 and neural crest cell migration. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* **214**: 312-322.
- Tung JC, Barnes JM, Desai SR, Sistrunk C, Conklin MW, Schedin P, Eliceiri KW, Keely PJ, Seewaldt VL, Weaver VM. 2015. Tumor mechanics and metabolic dysfunction. *Free Radic Biol Med* **79**: 269-280.

- Tuszynski GP, Gasic TB, Rothman VL, Knudsen KA, Gasic GJ. 1987. Thrombospondin, a potentiator of tumor cell metastasis. *Cancer Res* **47**: 4130-4133.
- Vallabhajosula S, Solnes L, Vallabhajosula B. 2011. A Broad Overview of Positron Emission Tomography Radiopharmaceuticals and Clinical Applications: What Is New? *Seminars in Nuclear Medicine* **41**: 246-264.
- Van der Veldt AA, Lubberink M, Bahce I, Walraven M, de Boer MP, Greuter HN, Hendrikse NH, Eriksson J, Windhorst AD, Postmus PE et al. 2012. Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for scheduling of anti-angiogenic drugs. *Cancer Cell* **21**: 82-91.
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. 2009. Understanding the Warburg Effect: The Metabolic Requirements of Cell Proliferation. *Science* **324**: 1029-1033.
- Veliceasa D, Ivanovic M, Hoepfner FT, Thumbikat P, Volpert OV, Smith ND. 2007. Transient potential receptor channel 4 controls thrombospondin-1 secretion and angiogenesis in renal cell carcinoma. *Febs j* **274**: 6365-6377.
- Vincent T, Neve EPA, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, Pietras K, Virtanen I, Philipson L, Leopold PL et al. 2009. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF- β mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* **11**: 943-950.
- Volpert OV, Lawler J, Bouck NP. 1998. A human fibrosarcoma inhibits systemic angiogenesis and the growth of experimental metastases via thrombospondin-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**: 6343-6348.
- Volpert OV, Zaichuk T, Zhou W, Reiher F, Ferguson TA, Stuart PM, Amin M, Bouck NP. 2002. Inducer-stimulated Fas targets activated endothelium for destruction by anti-angiogenic thrombospondin-1 and pigment epithelium-derived factor. *Nat Med* **8**: 349-357.
- Vos HL, Devarayalu S, de Vries Y, Bornstein P. 1992. Thrombospondin 3 (Thbs3), a new member of the thrombospondin gene family. *J Biol Chem* **267**: 12192-12196.
- Wang TN, Qian X-h, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Berger DH, Tuszynski GP. 1996. Thrombospondin-1 (TSP-1) Promotes the Invasive Properties of Human Breast Cancer. *Journal of Surgical Research* **63**: 39-43.
- Wang X-Q, Frazier WA. 1998. The Thrombospondin Receptor CD47 (IAP) Modulates and Associates with α 2B1 Integrin in Vascular Smooth Muscle Cells. *Molecular Biology of the Cell* **9**: 865-874.
- Warren RS, Yuan H, Matli MR, Gillett NA, Ferrara N. 1995. Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J Clin Invest* **95**: 1789-1797.
- Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, VanHoutte K, Frazier WA, Roberts DD, Steeg PS. 1994. Transfection of Thrombospondin 1 Complementary DNA into a Human Breast Carcinoma Cell Line Reduces Primary Tumor Growth, Metastatic Potential, and Angiogenesis. *Cancer Research* **54**: 6504-6511.
- Wendt MK, Smith JA, Schiemann WP. 2010. Transforming growth factor- β -induced epithelial-mesenchymal transition facilitates epidermal growth factor-dependent breast cancer progression. *Oncogene* **29**: 6485-6498.
- Wight TN, Raugi GJ, Mumby SM, Bornstein P. 1985. Light microscopic immunolocation of thrombospondin in human tissues. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* **33**: 295-302.
- Wilting J, Christ B, Yuan L, Eichmann A. 2003. Cellular and molecular mechanisms of embryonic haemangiogenesis and lymphangiogenesis. *Naturwissenschaften* **90**: 433-448.
- Wong SY, Hynes RO. 2006. Lymphatic or Hematogenous Dissemination: How Does a Metastatic Tumor Cell Decide? *Cell cycle (Georgetown, Tex)* **5**: 812-817.
- Wu JM, Staton CA. 2012. Anti-angiogenic drug discovery: lessons from the past and thoughts for the future. *Expert Opinion on Drug Discovery* **7**: 723-743.
- Xu J, Acharya S, Sahin O, Zhang Q, Saito Y, Yao J, Wang H, Li P, Zhang L, Lowery Frank J et al. 2015. 14-3-3 ζ Turns TGF- β 's Function from Tumor Suppressor to Metastasis Promoter in Breast Cancer by Contextual Changes of Smad Partners from p53 to Gli2. *Cancer Cell* **27**: 177-192.
- Yang M-H, Wu M-Z, Chiou S-H, Chen P-M, Chang S-Y, Liu C-J, Teng S-C, Wu K-J. 2008. Direct regulation of TWIST by HIF-1 α promotes metastasis. *Nat Cell Biol* **10**: 295-305.
- Yang Q-W, Liu S, Tian Y, Salwen HR, Chlenski A, Weinstein J, Cohn SL. 2003. Methylation-associated Silencing of the Thrombospondin-1 Gene in Human Neuroblastoma. *Cancer Research* **63**: 6299-6310.
- Yee KO, Connolly CM, Duquette M, Kazerounian S, Washington R, Lawler J. 2009. The effect of thrombospondin-1 on breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res Treat* **114**: 85-96.

- Yu M, Bardia A, Wittner BS, Stott SL, Smas ME, Ting DT, Isakoff SJ, Ciciliano JC, Wells MN, Shah AM et al. 2013. Circulating Breast Tumor Cells Exhibit Dynamic Changes in Epithelial and Mesenchymal Composition. *Science* **339**: 580-584.
- Zarzynska JM. 2014. Two Faces of TGF-Beta1 in Breast Cancer. *Mediators of Inflammation* **2014**: 141747.
- Zetter BR. 2008. The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research. *Nat Rev Cancer* **8**: 647-654.
- Zhang X, Kazerounian S, Duquette M, Perruzzi C, Nagy JA, Dvorak HF, Parangi S, Lawler J. 2009. Thrombospondin-1 modulates vascular endothelial growth factor activity at the receptor level. *Faseb j* **23**: 3368-3376.
- Zhou M, Zhao Y, Ding Y, Liu H, Liu Z, Fodstad O, Riker AI, Kamarajugadda S, Lu J, Owen LB et al. 2010. Warburg effect in chemosensitivity: targeting lactate dehydrogenase-A re-sensitizes taxol-resistant cancer cells to taxol. *Mol Cancer* **9**: 33.
- Zhu DZ, Cheng CF, Pauli BU. 1991. Mediation of lung metastasis of murine melanomas by a lung-specific endothelial cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 9568-9572.
- Zomer A, Maynard C, Verweij Frederik J, Kamermans A, Schäfer R, Beerling E, Schiffelers Raymond M, de Wit E, Berenguer J, Ellenbroek Saskia Inge J et al. 2015. In Vivo Imaging Reveals Extracellular Vesicle-Mediated Phenocopying of Metastatic Behavior. *Cell* **161**: 1046-1057.
- Zou W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* **5**: 263-274.