THESE

Présentée à

L'UNIVERSITE DE NICE SOPHIA-ANTIPOLIS
Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Par **Mélanie GUYOT**

Pour l'obtention du grade de
DOCTEUR

Spécialité : Interactions moléculaires et cellulaires

LES THERAPIES ANTI-ANGIOGÉNIQUES :
ENTRE ESPOIR ET REALITE

Vers l'identification de **marqueurs prédictifs** et de nouvelles **cibles thérapeutiques** dans le traitement du **cancer du rein**

Thèse dirigée par le **Dr Gilles PAGES** et soutenue le **19 Juillet 2013**

Jury :

Pr Nicolas Glaishenhaus, CNRS IPMC, Valbonne	**Président**
Dr Béatrice Eymin, INSERM Institut Albert Bonniot, Grenoble	**Rapportrice**
Dr Fabrice Soncin, INSERM Institut de Biologie de Lille	**Rapporteur**
Pr Marc Pocard, INSERM Hôpital Lariboisière, Paris	**Examinateur**
Dr Renaud Grépin, Centre Scientifique de Monaco	**Membre invité**
Dr Gilles Pagès, IRCAN, Nice et Centre Scientifique de Monaco	**Directeur de thèse**

« Les yeux sont aveugles. Il faut chercher avec le cœur. »
Antoine de Saint-Exupéry
-
Extrait du Petit Prince

TITRE DE LA THESE

-

LES THERAPIES ANTI-ANGIOGÉNIQUES :
ENTRE ESPOIR ET REALITE

Vers l'identification de **marqueurs prédictifs**
et de nouvelles **cibles thérapeutiques**
dans le traitement du **cancer du rein**

A tous les gens que j'aime,
Ceux qui ont contribués de près comme de loin à cette aventure

REMERCIEMENTS

TABLE DES MATIERES

TABLE DES MATIERES

RESUME 15

ABBREVIATIONS 21

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX 23

PREAMBULE 29

L'ANGIOGENESE : DU REVE D'UN HOMME A LA REALITE POUR LES PATIENTS 29

INTRODUCTION 33

PARTIE 1 : L'ANGIOGENESE TUMORALE : UNE HISTOIRE SANS FIN… 33

1. LA PLACE DE L'ANGIOGENESE AU COURS DU DEVELOPPEMENT ET CHEZ L'ADULTE 33
2. L'ANGIOGENESE : UNE MARQUE DE FABRIQUE DES TUMEURS 35
3. L'ANGIOGENESE : UN MECANISME ESSENTIEL 37
4. LES INHIBITEURS ENDOGENES DE L'ANGIOGENESE : UNE BARRIERE NATURELLE A LA CROISSANCE TUMORALE 39
5. LES FACTEURS PRO-ANGIOGENIQUES 40
A) LE ROLE DU MICROENVIRONNEMENT TUMORAL 42
B) LES FACTEURS DE CROISSANCE 42
6. LA GRANDE FAMILLE DU VEGF 44
A) LE PLGF 44
B) LE VEGF-B 44
C) LE VEGF-C ET LE VEGF-D 45
D) LE VEGF 45
7. LE VEGF ET L'ANGIOGENESE TUMORALE 51
A) LE ROLE CENTRAL DU VEGF ET DES SES RECEPTEURS 51
B) LA REGULATION DE L'EXPRESSION DU VEGF 53
C) L'HYPOXIE, L'ANGIOGENESE ET LE CANCER : UN TRIO INSEPARABLE 55
D) LE VEGF ET LES MMPS (POUR « MATRIX METALLO PROTEASES ») 59
8. LE VEGF ET LE PARADOXE DES TUMEURS NEUROENDOCRINES (NETS) 61
9. LES AUTRES VOIES DE SIGNALISATIONS IMPLIQUEES DANS L'ANGIOGENESE 62
A) LA VOIE DE SIGNALISATION NOTCH/DLL4 62
B) LA VOIE DE SIGNALISATION PDGF/PDGFR 63
C) LE SYSTEME TIE/ANG 64
10. LA LYMPHANGIOGENESE 67
A) LE COUPLE VEGFR-3/VEGF-C OU VEGF-D 67
B) LA LYMPHANGIOGENESE ET LA PROGRESSION TUMORALE 68
C) UN LIEN ETROIT ENTRE ANGIOGENESE ET LYMPHANGIOGENESE 70

PARTIE 2 : INFLAMMATION ET CANCER « UN TANDEM DE CHOC » 71

1. LES MECANISMES DE L'INFLAMMATION 71
2. LES ACTEURS DE L'INFLAMMATION 72
3. INFLAMMATION ET ANGIOGENESE 73
4. INFLAMMATION ET DISSEMINATION METASTATIQUE 73
5. INFLAMMATION ET REPONSE IMMUNITAIRE ANTI-TUMORALE 75
6. L'INFLAMMATION COMME CIBLE THERAPEUTIQUE 76

PARTIE 3: LES CHIMIOKINES, DES REGULATEURS MAJEURS DE L'ANGIOGENESE TUMORALE ET DE LA FORMATION DE METASTASES 78

1. LES CYTOKINES CXC 78
A) L'ACTIVITE PRO-ANGIOGENIQUE DES CYTOKINES 79
B) LES RECEPTEURS CXCR1 ET CXCR2 80
C) LA REGULATION DE L'EXPRESSION DES CYTOKINES CXC 83
D) L'AXE CXCR4/CXCL12 84
2. LE ROLE DES CYTOKINES ELR- 84

PARTIE 4 : LES THERAPIES ANTI-ANGIOGENIQUES DANS LE TRAITEMENT DU CANCER 86

1. LE CONCEPT DES –INIB ET DES –UMAB 86
2. CIBLER LE VEGF POUR INHIBER LA FIXATION SUR SON RECEPTEUR 89
A) UN ANTICORPS CIBLANT LE VEGF : LE BEVACIZUMAB 89
B) LE RAPPORT BENEFICE/RISQUE DU BVZ 90
C) UN HYBRIDE VEGFR-1/VEGFR-2 : L'AFLIBERCEPT 92
3. INHIBER L'ACTIVITE TYROSINE KINASE DES RECEPTEURS AUX FACTEURS ANGIOGENIQUES 92
A) LE SUNITINIB 93
B) LE SORAFENIB 93
C) LES AUTRES MOLECULES 93
D) LE RAPPORT BENEFICE/RISQUE DES TKI 94
4. INHIBER LES EFFECTEURS EN AVAL DANS LA VOIE DE SIGNALISATION 95
5. VERS UNE THERAPIE PERSONNALISEE 96

PARTIE 5 : LES MECANISMES DE RESISTANCES AUX TRAITEMENTS ANTI-ANGIOGENIQUES 98

1. L'APPORT DE LA CHIMIOTHERAPIE 100
2. L'INHIBITION DE PLUSIEURS FACTEURS ANGIOGENIQUES 100
3. LA DESTABILISATION DES VAISSEAUX SANGUINS TUMORAUX 101
4. L'INHIBITION DU RECRUTEMENT DES CELLULES IMMUNITAIRES 102
5. L'INHIBITION DES PROCESSUS FAVORISANT LA PROGRESSION TUMORALE 103
A) LA VOIE DE SIGNALISATION DE L'HGF 104
B) L'HYPOXIE ET LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION HIF-1 105
6. L'INHIBITION DE L'ACTIVATION DES CELLULES SOUCHES CANCEREUSES 105
7. LA DORMANCE TUMORALE 106

PARTIE 6 : LA LIMITATION MAJEURE DES ANTI-ANGIOGENIQUES : L'ABSENCE DE MARQUEURS PREDICTIFS D'EFFICACITE 109

1. UN BON MARQUEUR PREDICTIF 109
2. MARQUEURS PREDICTIFS DE REPONSE AU BVZ 110
A) LES FACTEURS CIRCULANTS 110
B) LES CELLULES ENDOTHELIALES 110
C) LES RECEPTEURS DU VEGF 111
D) LES CELLULES MYELOÏDES 111
E) L'IMAGERIE 111
F) LES POLYMORPHISMES GENETIQUES 111
3. LES MARQUEURS PREDICTIFS D'EFFICACITE EN FONCTIONS DES CANCERS 112
A) LE CANCER COLORECTAL 112
B) LE CANCER DU SEIN 112
C) LES CANCERS HEPATOCELLULAIRES 113
D) LE CANCER DE LA THYROÏDE 113
E) LE CANCER DU REIN 113

PARTIE 7 : LES FORMES ANTI-ANGIOGENIQUES DU VEGF : DE LA DECOUVERTE A LA POLEMIQUE 114

1. MAIS A QUOI CORRESPONDENT CES FORMES ANTI ANGIOGENIQUES ? 114
A) L'ACTIVITE ANTI-ANGIOGENIQUE DU VEGF165B 115
B) LA STRUCTURE DE CES FORMES ANTI-ANGIOGENIQUES 115
C) LA REGULATION DU RATIO VEGFXXX/VEGFXXXB 117
2. LES ISOFORMES ANTI-ANGIOGENIQUES DU VEGF : LA POLEMIQUE 119
3. LE RATIO VEGFXXX/VEGFXXXB : UN MARQUEUR PREDICTIF DE REPONSE AU BVZ ? 119

PARTIE 8 : LE CANCER DU REIN : UN MODELE DE CHOIX POUR L'ETUDE DES THERAPIES ANTI-ANGIOGENIQUES 120

1. DESCRIPTION DE CES CANCERS 120
2. LA PRISE EN CHARGE THERAPEUTIQUE DES RCC 121
3. LES THERAPIES ANTI-ANGIOGENIQUES DANS LE TRAITEMENT DES RCC 122
4. UN ROLE MAJEUR DES CORECEPTEURS NRP DANS LES CCRCC 123
A) LES NRPS ET L'ANGIOGENESE TUMORALE 123
B) UN ROLE PREPONDERANT DANS LA CROISSANCE TUMORALE DES CCRCCS 124

ARTICLE 1 133

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIF 135
3. RESULTATS 136
A) HYPOTHESE DE NORMALISATION VASCULAIRE 136
B) LA LYMPHANGIOGENESE 138
C) SELECTION IN VIVO DE CELLULES TUMORALES PLUS AGRESSIVES 140
D) LA REDONDANCE ANGIOGENIQUE 142
4. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 143

ARTICLE 2 165

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIF 167
2. RESULTATS 169
3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 174

ARTICLE 3 211

1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE ET OBJECTIF 213
2. RESULTATS 215
3. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 221

DISCUSSION GENERALE 231

DE L'AMELIORATION DES TRAITEMENTS ANTI-ANGIOGENIQUES… 231

… VERS UNE THERAPIE PERSONNALISEE !!! 231

UN ENJEU DE TAILLE : LA MISE EN EVIDENCE DE MARQUEURS PREDICTIFS D'EFFICACITE 232
L'AMELIORATION DES MODELES PRECLINIQUES EST INDISPENSABLE 233
ET LA GENETIQUE DANS TOUT ÇA ? 238
ET POURQUOI PAS LE METABOLISME ? 242
UNE CHOSE ESSENTIELLE : NE PAS NEGLIGER LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL 242
ET SURTOUT LE SYSTEME IMMUNITAIRE… 243
UTILISER LES EFFETS DES ANTI-ANGIOGENIQUES POUR AMELIORER LA REPONSE IMMUNITAIRE 244

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 246

BIBLIOGRAPHIE **249**

ANNEXE 1 **307**

ANNEXE 2 **315**

RESUME

RESUME

L'ensemble de ce travail vise à étudier les mécanismes de résistance aux thérapies anti-angiogéniques dans le traitement du cancer du rein à cellules claires (ccRCC). Nous avons mis en évidence que le bévacizumab (BVZ), un anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF utilisé en clinique, accélère la croissance de ccRCC humain chez la souris *nude*. Ce modèle mime la phase d'échappement souvent observée chez les patients. Le traitement BVZ induit de la lymphangiogenèse associée à une surexpression du VEGF-C. Les cellules tumorales après traitement possèdent également des capacités d'invasion accrues. Ainsi, le traitement BVZ pourrait faciliter la progression tumorale et la formation de métastases dans les ccRCC. Le traitement entraine également une diminution de l'expression d'une phosphatase membranaire, la phospho-tyrosine phosphatase récepteur kappa (PTPRκ), impliquée dans le contrôle de l'activité de récepteurs à activité tyrosine kinase, comme le récepteur de l'EGF, du PDGF et de l'HGF. Ces récepteurs régulent la prolifération et la migration cellulaire. Le traitement BVZ faciliterait donc la croissance tumorale indépendante du VEGF. Enfin, le traitement induit une augmentation de la sécrétion de cytokines angiogéniques redondantes qui prennent le relais du VEGF, comme les cytokines CXCL7 et CXCL8, et facilitent le développement tumoral sous traitement BVZ. En particuliers, la cytokine CXCL7 et ses récepteurs CXCR1-2 ont un rôle central dans le développement des ccRCC. Cibler l'axe CXCL7/CXCR1-2 réduit efficacement la croissance tumorale. Les récepteurs cibles de PTPRκ, pour lesquels des inhibiteurs sont actuellement utilisés pour le traitement d'autres cancers, le VEGF-C et la cytokine CXCL7, pourraient donc constituer de nouveaux marqueurs prédictifs d'efficacité du BVZ et de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des ccRCC. La résistance au BVZ pourrait également s'expliquer par l'existence de formes "bénéfiques" anti-angiogéniques du VEGF qui sont reconnues par le BVZ avec la même affinité que les formes pro-angiogéniques. Nous avons mis en évidence qu'une immunisation prophylactique à l'aide d'un peptide spécifique du VEGF pro-angiogénique limite la croissance tumorale de ccRCC syngéniques de souris. De la même façon, en traitement curatif, l'utilisation d'anticorps spécifiques du VEGF pro-angiogénique bloque la croissance de ccRCC chez la souris nude sans induire les différents mécanismes d'échappement observés avec le BVZ. Ces résultats suggèrent la pertinence du ciblage spécifique des formes pro-angiogéniques de VEGF dans le traitement des ccRCC.

Mots clés : Angiogenèse, Traitements anti-angiogénique, Résistances, ccRCC, marqueurs prédictifs et pronostiques

ABBREVIATIONS

ABBREVIATIONS

ARE : AU Rich Element
ARNm : acide ribonucléique messager
ARNT: Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
SF2/ASF: Serine/arginine-rich splicing factor 1
BAP-1 : BRCA-1 associated protein
Bcl-2 : B-cell leukemia protein-2
Bcl-xl: B-cell lymphoma-extra large
BCR-ABL: Breakpoint cluster region-abelson
BVZ : Bévacizumab
ccRCC: clear cell Renal Cell Carcinoma
CSF-1R: Colony stimulating factor 1 receptor
CTLA4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CXCL : CXC chemokine ligand
CXCR : CXC chemokine receptor
DBZ : Dibenzazepine
Dll4 : Delta like ligand 4
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'age
EGF: Epidermal Growth Factor
ELAM-1: Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1
ELR : acide glutamique-leucine-arginine
EMT : Epithelial–mesenchymal transition
ERK: Extracellular signal-regulated kinases
FAE : Fatal Adverse Effects
FGF-2: Fibroblast Growth Factor
FDA: Food and Drug Administration
FIH : Factor Inhibiting HIF
Flt-1: Fms-like tyrosine kinase 1
FLT-3: fms-related tyrosine kinase 3
FOLFOX : 5-Fluorouracil, Leucovorin and Oxaliplatin
GIST: Gastro Intestinal Stromal Tumor
GM-CSF: granulocytes-macrophage colony stimulating factor
HER-2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HPV : Human Papilloma Virus
HRE : Hypoxia Response Element
HuR : human antigen R
HSPG : Heparan Sulfate ProteoGlycan
IFN : Interferon
IGF : Insulin Growth Factor
IL : Interleukine
IRES : Internal Ribosomal Entry Site
kDA : kiloDalton
KDR: kinase-insert domain-containing receptor
LYVE-1: Lymphatic Vessel Endothelial Receptor 1
M-CSF: Macrophage colony-stimulating factor
MAPK: mitogen-activated protein kinase
MMP : Matrix Metallo Protease
mTOR: mamalian Target Of Rapamycin
mTORC1: mamalian Target Of Rapamycin Complex 1
NET : Neuro Endocrine Tumor
NFκB: nuclear factor-kappa B
NK : Natural Killer
Nrf-2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NRP : Neuropilin Receptor
NSCLC: Non Small Cell Lung Carcinoma
OIS : Oncogene Induce Senescence
PBRM-1 : Protein polybromo 1
PD-1 : Programmed Death 1
PDL-1 : Programmed Death Ligand 1
PDGF: platelet-derived growth factor
PDGFR: platelet-derived growth factor receptor
PF-4 : Platelet Factor 4
PHD : prolyl hydroxylase domain-containing protein
Pi3K : phosphatidylinositol 3′–kinase
PLC : phospholipase C
PlGF : Placental Growth Factor

prox-1 : prospero homeobox 1
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
PTP-1B : Protein-tyrosine phosphatase 1B
PTTG: Pituitary tumour transforming gene
RCC : Renal Cell Carcinoma
ROS : Reactive Oxygene Species
SCCA : squamous cell carcinoma
SDF-1: Stromal cell derived factor 1
Shh : Sonic hedgehog
SMA : smooth muscle actin
Sp-1 : Specificity Protein 1
SRp40: Serine/arginine-rich splicing factor 4
SRp55: Serine/arginine-rich splicing factor 6
STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3
TGF : Tansforming growth factor
Tie: tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1
TKI : Tyrosine Kinase Inhibitor
TNF : Tumor Necrosis Factor
TSP: Thrombospondin
TTP: Tristetraprolin
UMPP: Ubiquitin-mediated proteolysis pathway
UTR : Untranslated Region
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VHL : Von Hippel Lindau

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Les étapes clés et les principaux acteurs de l'angiogenèse physiologique……..34

Figure 2 : L'angiogenèse, une des caractéristiques principales des cancers……....36

Figure 3 : Les principales étapes du « Switch Angiogénique »……...38

Figure 4 : La balance angiogénique, d'un état d'équilibre à la croissance tumorale……...41

Figure 5 : Le microenvironnement tumoral primaire……...43

Figure 6 : Représentation schématique de la famille du VEGF et de ses récepteurs……...46

Figure 7 : Les récepteurs et les voies de signalisations impliqués dans l'angiogenèse……...50

Figure 8 : Les principaux acteurs de l'angiogenèse tumorale……..52

Figure 9 : La régulation de l'angiogenèse par l'hypoxie…….....57

Figure 10 : Les récepteurs et voies de signalisations impliqués dans la lymphangiogenèse...69

Figure 11 : L'invasion tumorale, une étape clé dans la formation de métastases……74

Figure 12 : La normalisation vasculaire au cours d'un traitement anti-angiogénique…….....87

Figure 13 : Les deux modes de résistances aux traitements anti-angiogéniques…….99

Figure 14 : Les différents types de résistances aux traitements anti- angiogéniques…….108

Figure 15 : Les isoformes anti-angiogéniques du VEGF : le VEGFxxxb…….116

Figure 16 : La régulation de l'épissage alternatif du VEGF……..118

Tableau 1 : Les chimiokines CXC et leurs récepteurs…….82

Tableau 2 : Les principales molécules anti-angiogéniques utilisées en cancérologie…….....97

PREAMBULE

PREAMBULE

L'angiogenèse : du rêve d'un homme à la réalité pour les patients

Depuis le milieu des années 1900, les chercheurs ont mis en évidence que les cellules tumorales communiquent avec les cellules de l'organisme hôte. Elles sont capables de stimuler la prolifération de nouveaux capillaires (10 à 40% des cellules de la tumeur sont des cellules endothéliales). Ce phénomène est commun à un grand nombre de tumeurs et il est indispensable pour la croissance tumorale (Algire et al., 1945). En 1968, deux équipes ont mis en évidence dans deux modèles différents, que les cellules tumorales sont capables d'induire la croissance de nouveaux capillaires à distance (Greenblatt et Shubik, 1968 ; Ehrmann et Knoth, 1968). Mais l'essor de l'angiogenèse tumorale a commencé en 1971 avec le travail de Judah Folkman. Celui-ci part d'un postulat simple : une tumeur est comme n'importe quel autre tissu, elle a besoin d'oxygène et de nutriments apportés par la circulation sanguine. Il fait l'hypothèse qu'une tumeur ne va pas pouvoir grossir au delà de quelques millimètres cubes si elle n'est pas vascularisée. Au delà, de cette distance, les vaisseaux sanguins sont trop loin pour que la simple diffusion d'oxygène et des nutriments nécessaires à la prolifération des cellules tumorales suffise. La tumeur reste dans un état de dormance tant qu'elle sera a-vasculaire. Différents signaux, comme l'hypoxie, l'activation d'oncogènes vont entrainer le passage à une phase vasculaire à partir de laquelle la tumeur va pouvoir reprendre son expansion. Cet « interrupteur angiogénique » est un événement majeur pour la tumeur qui va passer d'une phase dormante à une phase invasive. Il émet l'hypothèse simple que la croissance tumorale et la formation de métastase dépendent de l'angiogenèse. A partir de cette simple observation va naitre le concept des thérapies anti-angiogéniques. Ce concept original stipule que détruire les vaisseaux tumoraux privera la tumeur de l'oxygène et des nutriments indispensables à sa croissance. Avec cette idée Judah Folkman est le premier à parler du concept de thérapie ciblée. La cible ici sont les cellules endothéliales, d'autant plus intéressantes qu'elles sont considérées comme génétiquement très stables et donc moins susceptibles de mettre en place des mutations leur permettant d'acquérir des résistances.

A partir de là, un nombre croissant d'équipes de recherche s'intéresse à ce concept et les travaux valident l'importance de ce mécanisme dans la croissance tumorale avec la découverte des facteurs de croissance angiogéniques comme le FGF-2 et surtout le VEGF. L'inhibition de ces deux facteurs représentera une révolution thérapeutique. Dans les années 2000, la découverte de molécules inhibitrices explosent et en 2004 le rêve de Folkman devient réalité avec la mise sur le marché de la première thérapie anti-angiogénique pour le traitement du cancer colorectal : le bévacizumab un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF. Ce traitement est le premier depuis de nombreuses années à augmenter la survie sans progression de patients atteints de cancer du colon métastatique. (Hurwitz et al., 2004).

INTRODUCTION

INTRODUCTION

PARTIE 1 : L'angiogenèse tumorale : une histoire sans fin…

Comme tous les tissus normaux, les tumeurs ont besoin d'oxygène et de nutriments mais également d'évacuer les déchets métaboliques et le dioxyde de carbone pour se développer. Ces besoins sont assurés par la néo-vascularisation tumorale formée par un processus appelé l'angiogenèse. Par définition, l'angiogenèse est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de l'endothélium vasculaire préexistant. La formation de nouveaux vaisseaux est critique pour les tissus en croissance et la réparation tissulaire. Il n'est donc pas surprenant que des altérations structurales ou fonctionnelles des vaisseaux entrainent de nombreuses pathologies. Ce réseau vasculaire permet de nourrir tous les tissus. L'angiogenèse est donc naturellement indispensable au cours du développement embryonnaire.

1. La place de l'angiogenèse au cours du développement et chez l'adulte

Au cours de l'embryogenèse, le développement vasculaire est initié grâce à l'émergence de précurseurs de cellules endothéliales, les angioblastes qui se regroupent pour former les premiers vaisseaux sanguins (mécanisme appelé vasculogenèse) (Swift et Weinstein, 2009). Un bourgeonnement à partir de ces vaisseaux sanguins préexistants (mécanisme appelé angiogenèse) permet de créer un réseau organisé en artères et en veines (Adams et Alitalo, 2007). Enfin, en fonction du type de vaisseaux, le recrutement des péricytes et autres cellules musculaires lisses favorise l'intégrité vasculaire. Il permet de stabiliser le réseau vasculaire, de réguler le flux sanguin et la perfusion tissulaire (mécanisme appelé artériogenèse) (Jain, 2003).

Chez l'adulte, les vaisseaux sanguins sont quiescent et ne nécessitent que très rarement la formation de nouvelles ramifications. Cependant, ils conservent la capacité de répondre à des signaux angiogéniques. Les cellules endothéliales sont parmi les cellules à durée de vie la plus longue, en dehors des cellules du système nerveux et seulement une cellule endothéliale sur 10000 est en cours de division (Hanahan et Folkman, 1996). L'angiogenèse permet l'extension du réseau vasculaire à partir des vaisseaux préexistants (Carmeliet et Jain, 2011). Attirées par des signaux pro-angiogéniques, les cellules endothéliales deviennent motiles et invasives et créent des extensions (FIG1). Ces cellules appelées « tip cells » permettent de guider la formation de nouvelles ramifications. Elles sont suivies par les cellules voisines ou

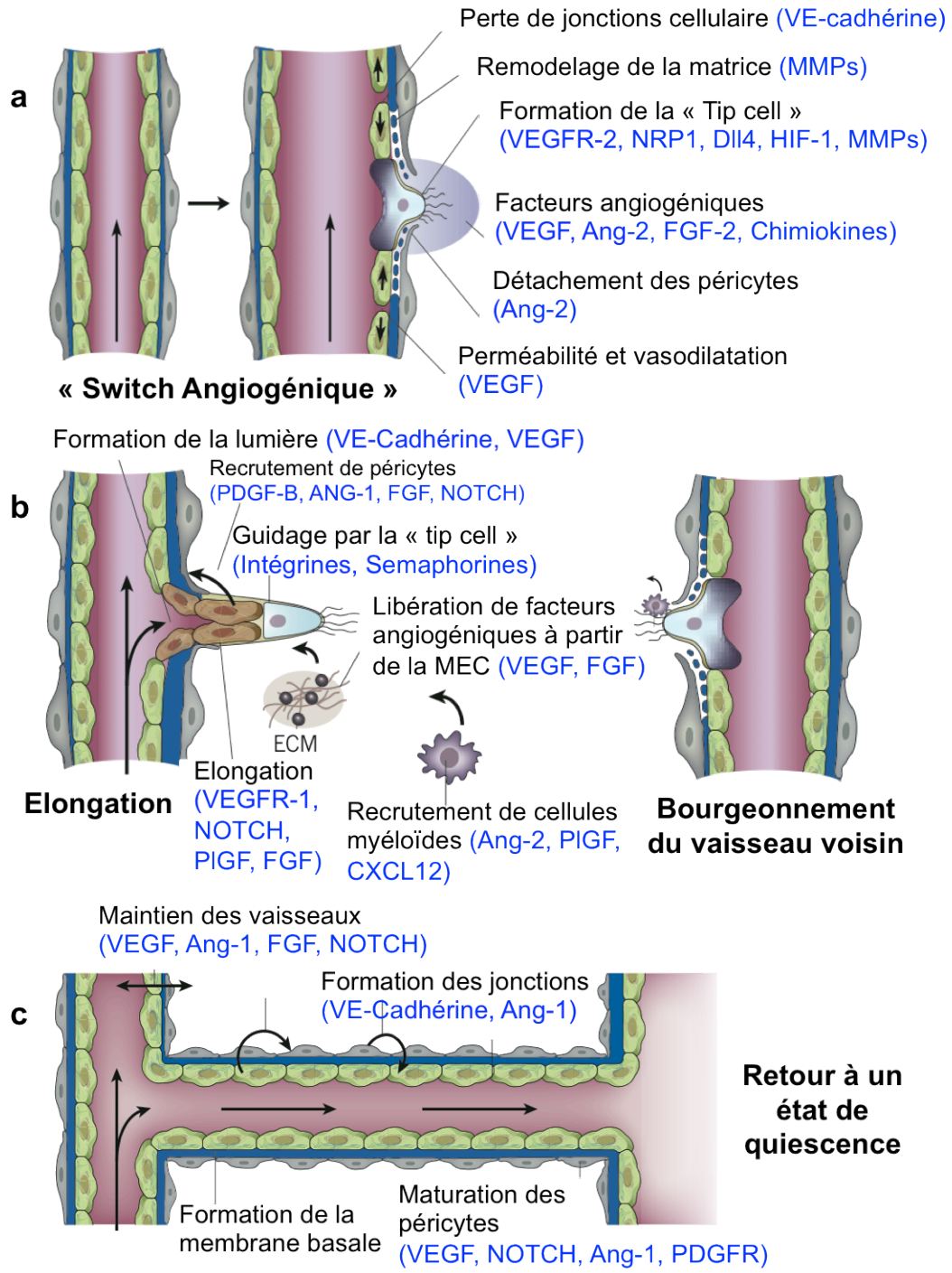


Figure 1 : Les étapes clés et les principaux acteurs de l'angiogenèse physiologique

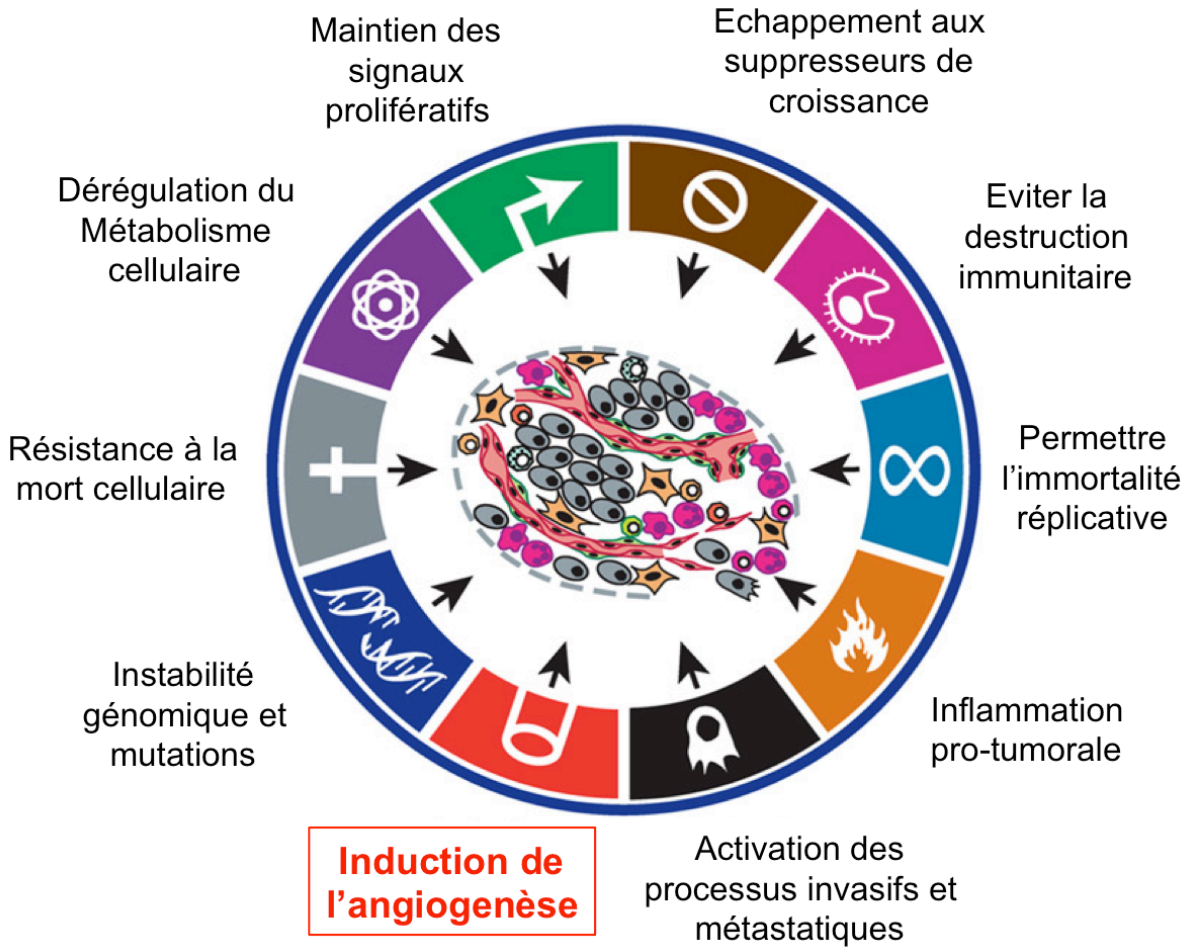
a) La stimulation par les facteurs angiogéniques et la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) permet la sélection de la « tip cell » et l'initiation du bourgeonnement vasculaire. **b)** La « tip cell » migre en fonction des signaux angiogéniques et les « stalk cells » voisines prolifèrent pour permettre l'élongation et la formation de la lumière. Ces cellules recrutent des péricytes pour stabiliser les vaisseaux en formation. **c)** La jonction avec les ramifications voisines permet le retour à un état de quiescence. Après maturation vasculaire un flux sanguin fonctionnel est mis en place. *(D'après Carmeliet P et Jain RK, Nature Reviews, 2011)*

« stalk cells » qui prolifèrent pour allonger et créer la lumière de ce nouveau vaisseau en formation. Le recrutement des cellules murales, la mise en place de la membrane basale et l'activation de la circulation sanguine, stabilise les nouvelles connections. Quand les signaux angiogéniques sont éteints, la formation de nouveaux vaisseaux s'arrête et l'état de quiescence est rétabli.

Chez l'adulte, l'angiogenèse est réactivée de façon transitoire pour répondre à des besoins physiologiques comme la cicatrisation et les cycles menstruels chez la femme (Ferrara et al., 2004). Bien qu'en quiescence, les vaisseaux sanguins conservent la capacité de répondre à différents stimuli, comme par exemple l'hypoxie. L'angiogenèse est un processus extrêmement régulé. Du fait de son rôle majeur, tout dysfonctionnement entraine le développement ou l'amplification de nombreuses pathologies. Un défaut d'angiogenèse entraine une ischémie tissulaire impliquée dans des problèmes cardiaques et les maladies neuro-dégénératives. À l'inverse, une croissance vasculaire anormale et excessive est impliquée dans les désordres inflammatoires, l'obésité, les problèmes oculaires comme la Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (ou DMLA qui est la première cause de cécité chez les personnes âgées) et dans les cancers.

2. L'angiogenèse : une marque de fabrique des tumeurs

L'angiogenèse est un processus essentiel au développement tumoral. Ce mécanisme fait parti des caractéristiques principales des cellules cancéreuses et des tumeurs décrites par Hanahan et Weinberg (Hanahan et Folkman, 1996; Hanahan et Weinberg, 2011). Ces caractéristiques permettent de définir et d'organiser ce processus complexe qu'est le développement tumoral (FIG2). Cela comprend une activation continue des signaux de prolifération, une insensibilité aux processus inhibant la croissance cellulaire, une résistance à la mort cellulaire, une immortalité réplicative, une activation des processus d'invasion et de formation de métastases et donc une induction de l'angiogenèse. Sur ces mécanismes majeurs sont venus se greffer d'autres paramètres importants comme l'instabilité génétique et l'inflammation. L'avancée des connaissances en cancérologie a permis d'ajouter deux caractéristiques essentielles à la croissance et la progression tumorale que sont la modification du métabolisme énergétique des cellules et l'échappement à la reconnaissance par le système immunitaire. Au delà des cellules tumorales, les tumeurs possèdent un autre niveau de complexité. En effet, la tumeur recrute des cellules normales qui forment le microenvironnement tumoral et favorisent la croissance tumorale et la dissémination métastatique.



<u>Figure 2</u> : L'angiogenèse, une des caractéristiques principales des cancers

Ce schéma met en évidence les capacités acquises par les cellules cancéreuses. Ces caractéristiques des cellules tumorales sont essentielles pour favoriser la croissance et la progression tumorale ainsi que la dissémination métastatique. Parmi ces caractéristiques, l'induction de l'angiogenèse est un prérequis au développement tumoral.
(D'après Hanahan D et Weinberg RA, Cell Review, 2011)

3. L'angiogenèse : un mécanisme essentiel

Les cellules tumorales sécrètent des facteurs de croissance qui activent la prolifération et la migration des cellules endothéliales et permettent la morphogenèse capillaire. Une tumeur ne peut pas se développer au delà de quelques millimètres cubes si elle n'est pas vascularisée. Elle secrète des facteurs pro-angiogéniques afin d'induire sa propre vascularisation. Cette néo-vascularisation favorise son développement et sa dissémination (Folkman, 1971, 1995; Holash et al., 1999a; Holash et al., 1999b). L'angiogenèse est donc un processus essentiel à la progression tumorale. Dans plusieurs cancers, la densité de vaisseaux intra-tumoraux est associée à la formation de métastases et à la survie des patients (Bigler et al., 1993; Horak et al., 1992; Macchiarini et al., 1992; Wakui et al., 1992). L'angiogenèse tumorale est orchestrée par une grande variété d'activateurs et d'inhibiteurs. Un déséquilibre de cette balance en faveur des facteurs pro-angiogéniques est indispensable pour passer d'un état de quiescence à un état angiogénique. C'est le « switch angiogénique » (FIG3). Dans ces conditions, de nouveaux vaisseaux sanguins se développent. Ils ont des caractéristiques uniques et sont complètement différents des vaisseaux sanguins normaux. Les nouveaux vaisseaux formés permettent l'apport en oxygène et nutriments au sein de la tumeur et favorisent le développement tumoral. Cependant, les vaisseaux tumoraux sont très différents des vaisseaux normaux. Ces néo-vaisseaux ont une structure et une fonction anormale (Carmeliet et Jain, 2000). La vascularisation est complètement désorganisée. Les vaisseaux sont dilatés, tortueux et très souvent hémorragiques. Leur diamètre est irrégulier. Ils sont caractérisés par des branchements et des dérivations excessifs. Cette structure anarchique est responsable d'un flux sanguin variable et chaotique (Baish et Jain, 2000). Ces vaisseaux présentent également un défaut de maturation. La paroi possède des fenestrations avec des jonctions inter-cellulaires très lâches. La membrane basale est souvent discontinue ou absente. Le recouvrement des vaisseaux par les péricytes n'est pas optimal (Benjamin et al., 1999). Cette vascularisation anormale et perméable entraine l'apparition d'une hypertension interstitielle. Elle favorise également l'apparition de zones hypoxiques et une acidification de la tumeur. Enfin, l'ensemble de ces caractéristiques implique un défaut de perfusion de la tumeur qui limite la délivrance des molécules thérapeutiques (Carmeliet et Jain, 2000). La tumeur reste hypoxique malgré cette néo-vascularisation. Ce maintien de l'hypoxie entraine une surproduction continue du facteur de croissance des cellules endothéliales, le VEGF (pour « Vascular Endothélial Growth Factor »). Ces conditions favorisent une aggravation persistante du phénotype anormal des vaisseaux tumoraux. L'hypoxie et le VEGF entrainent

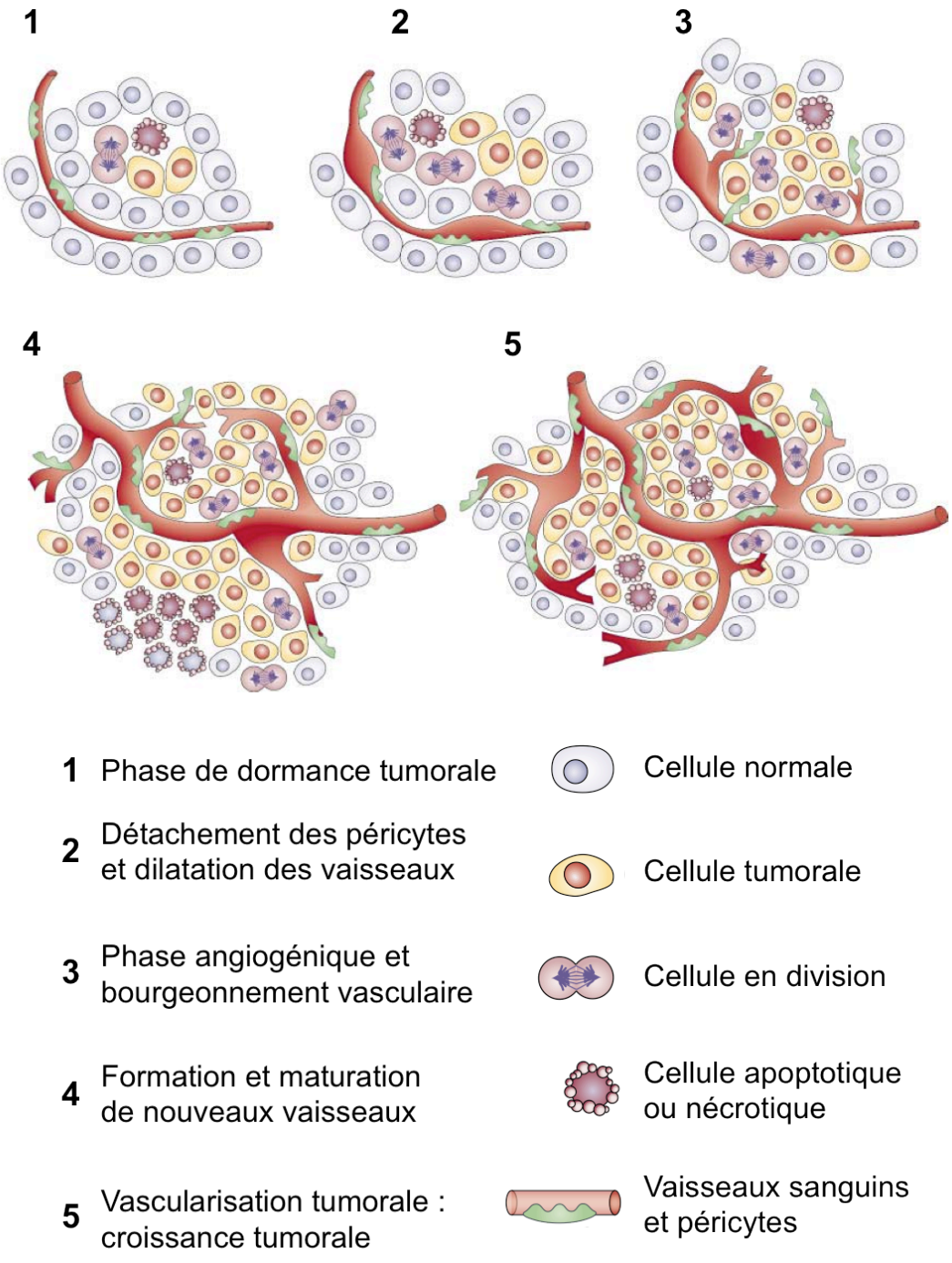


Figure 3 : Les principales étapes du « Switch Angiogénique »

Le « switch angiogénique » est une étape clé du développement tumoral qui dépend de la nature de la tumeur et du microenvironnement. La plupart des tumeur débute leur croissance de façon a-vasculaire avant d'atteindre un état de dormance **(1)** caractérisé par un équilibre entre prolifération et apoptose. Le « switch angiogénique » doit alors se produire pour permettre la croissance exponentielle de la tumeur. L'angiogenèse débute par la dilatation des vaisseaux **(2)** puis le bourgeonnement vasculaire **(3)** et enfin la formation et la maturation de nouveaux vaisseaux **(4)**. L'angiogenèse se poursuit tout au long de la croissance tumorale afin d'assurer un apport correct en oxygène et nutriments **(5)**. *(D'après Bergers G et Benjamin LE, Nature Reviews Cancer, 2003)*

des modifications majeures de la structure vasculaire. La diminution de l'intégrité vasculaire facilite l'invasion des cellules tumorales (Stoletov et al., 2010) et favorise la dissémination métastatique. L'apparition des métastases est un des plus importants facteurs de mauvais pronostic chez les patients. Plus de 90% des décès des suites d'un cancer surviennent après l'apparition des métastases. Le défaut en oxygène favorise également l'apparition de résistances à la radiothérapie (Jain, 2005) et la sélection de cellules plus agressives résistantes à l'hypoxie. Cette néo-vascularisation favorise la progression tumorale et limite l'efficacité de certains traitements anti-tumoraux. Différents signaux entrainent ce «switch angiogénique»; un stress métabolique, l'hypoxie, une baisse du pH, l'inflammation, une chute de la glycémie ou l'activation d'oncogènes (Carmeliet et Collen, 1999; Kerbel, 2000, 2008; Milanini et al., 1998) (FIG4). Dans des conditions physiologiques, il existe un équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques. Au sein d'une tumeur cet état d'équilibre est perdu. Les vaisseaux sanguins sont en remodelage constant pour répondre à la croissance tumorale rapide. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est indispensable au développement tumoral. En absence de néo-vascularisation, une nécrose (Brem et al., 1976) ou une apoptose (Holmgren et al., 1995) des cellules tumorales est observée.

4. Les inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse : Une barrière naturelle à la croissance tumorale

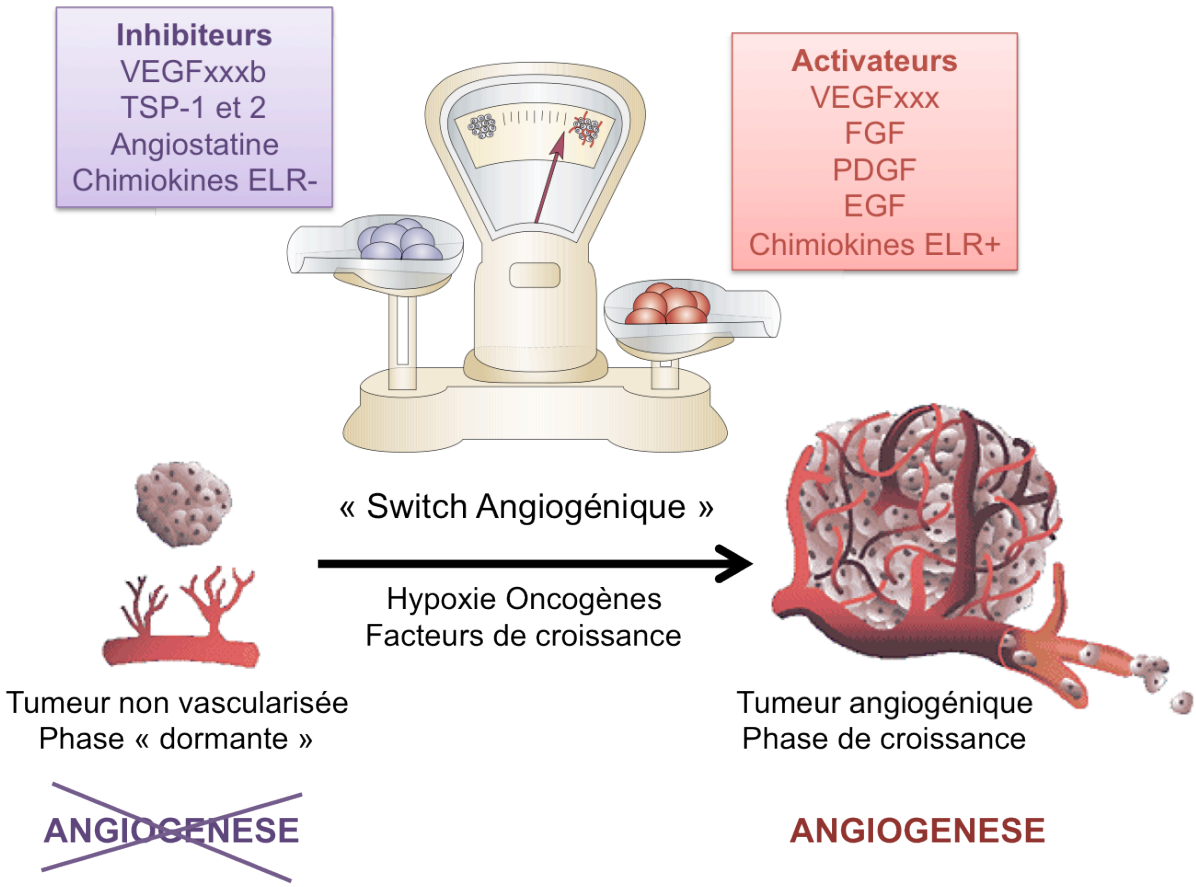
Des inhibiteurs naturels de l'angiogenèse ont été découverts dès les années 90; la thrombospondine-1 (TSP-1), l'angiostatine et l'endostatine (Kalluri, 2003). Durant ces dix dernières années, des dizaines d'autres molécules ont été identifiées (Folkman, 2006; Ribatti, 2009a). L'angiostatine et l'endostatine inhibent la prolifération et la migration des cellules endothéliales *in vitro* et la croissance tumorale de carcinomes du poumon, de fibrosarcomes et de mélanomes *in vivo* (Boehm et al., 1997; Gorski et al., 1998; Mauceri et al., 1998; O'Reilly et al., 1997). Les thrombospondines 1 et 2 (TSP-1 et TSP-2), possèdent également des propriétés anti-angiogéniques (Bornstein, 2009; de Fraipont et al., 2000). TSP-1 inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales *in vitro* et inhibe la néo-vascularisation *in vivo* (Streit et al., 2000). TSP-2 contrôle la vascularisation des organes (Kyriakides et al., 1998). L'expression de ces inhibiteurs est détectée dans la circulation de souris et de personnes saines. Inhiber l'expression de ces facteurs favorise la croissance des tumeurs chez la souris et à l'inverse, si leur expression est augmentée, la croissance tumorale est bloquée (Nyberg et al., 2005; Ribatti, 2009b). La cicatrisation et le dépôt de graisses sont également altérés lorsque l'expression de ces protéines est modifiée (Cao, 2010; Seppinen et al., 2008).

Ces résultats suggèrent que dans des conditions normales, ces inhibiteurs servent de régulateurs physiologiques modulant l'angiogenèse de façon transitoire, par exemple, lors de la réparation tissulaire et de la cicatrisation. Ils jouent également un rôle de barrière naturelle à l'induction ou la persistance de l'angiogenèse au cours du développement tumoral.

5. Les facteurs pro-angiogéniques

L'angiogenèse est dépendante de la production par les cellules tumorales de facteurs pro-angiogéniques. Les cellules du microenvironnement tumoral, favorisent l'angiogenèse et le développement tumoral. Les cellules impliquées dans ce mécanisme sont les cellules immunitaires, les cellules musculaires et les cellules stromales. Par exemple, le recrutement de macrophages au cours des étapes précoces du développement tumoral favorise le « switch angiogénique » dans le cancer du sein (Lin et Pollard, 2007). Les facteurs pro-angiogéniques capables de stimuler la prolifération, la migration et l'organisation tubulaire des cellules endothéliales sont nombreux. Les plus étudiés appartiennent à la famille du VEGF (description détaillée aux chapitres 6d et 7) et le FGF-2 qui est le premier facteur de croissance pro-angiogénique identifié (Gospodarowicz et Thakral, 1978). Le « switch angiogénique » est une étape indispensable à la progression tumorale favorisant la croissance tumorale et la formation de métastases (FIG4). L'angiogenèse est donc une cible de choix dans le traitement des cancers.

Au cours de la progression tumorale, l'angiogenèse est réactivée et permet une formation continue de nouveaux vaisseaux sanguins qui favorisent l'expansion tumorale. L'angiogenèse est induite de façon précoce au cours du développement tumoral aussi bien dans des modèles animaux que chez l'Homme mais est importante à tous les stades de la progression tumorale. Il existe une gradation dans le « switch angiogénique ». Certaines tumeurs, mêmes très agressives, ne sont que très faiblement vascularisées alors que d'autres tumeurs de grade clinique moins élevé sont très angiogéniques et richement vascularisées. Ces observations suggèrent qu'après l'induction de l'angiogenèse tumorale, la néo-vascularisation est variable et dépend d'une régulation fine par les cellules tumorales et le microenvironnement tumoral (Baeriswyl et Christofori, 2009; Bergers et Benjamin, 2003).



<u>Figure 4</u> : La balance angiogénique, d'un état d'équilibre à la croissance tumorale

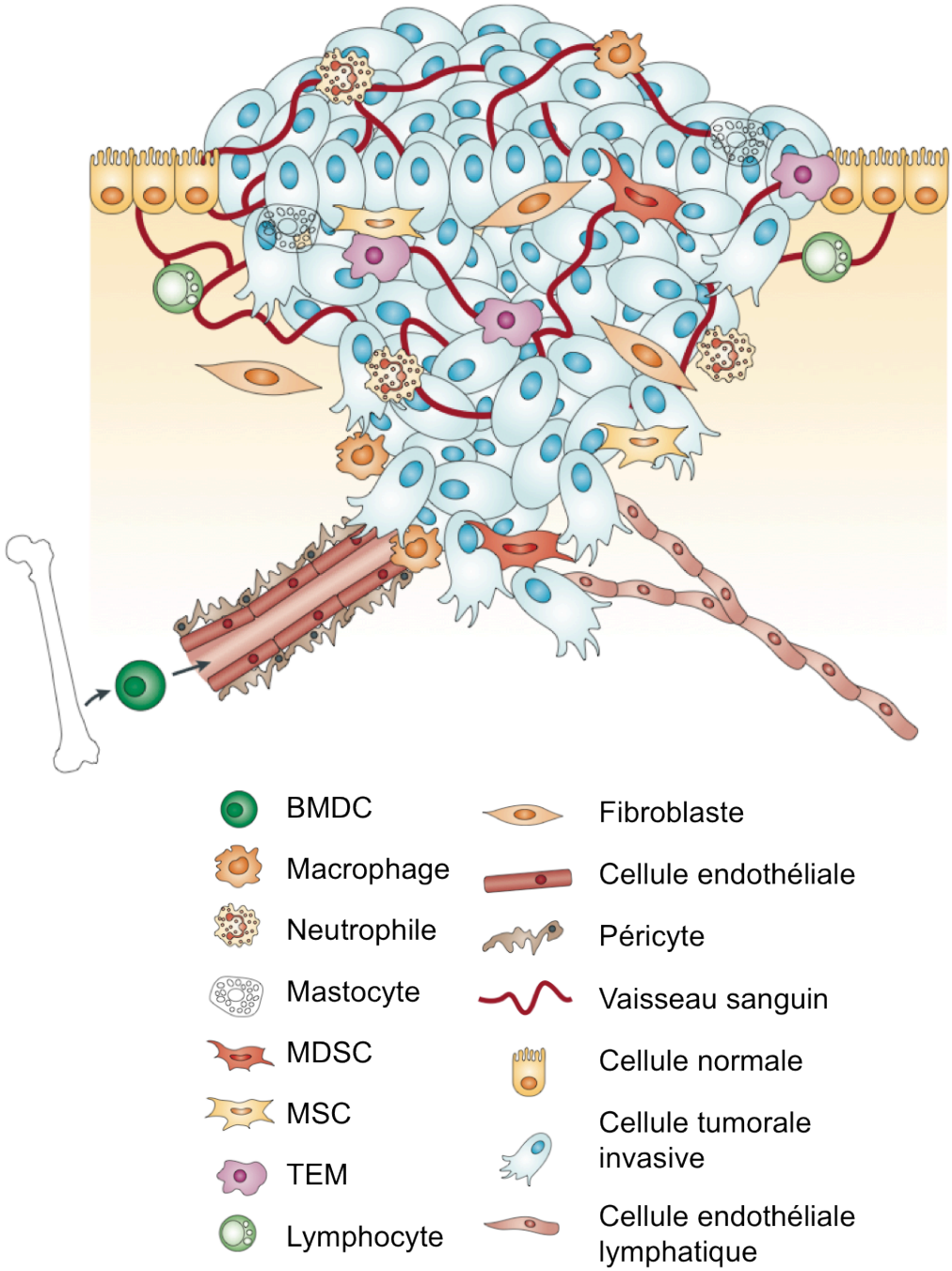
Les conditions hypoxiques, l'activation de certains oncogènes et la présence de différents facteurs de croissance favorisent la production de facteurs pro-angiogéniques et inhibent celle des facteurs anti-angiogéniques. Le déséquilibre de cette balance en faveur des facteurs pro-angiogéniques active de l'angiogenèse et favorise la croissance tumorale et la dissémination métastatique. *(D'après Bergers G et Benjamin LE, Nature Rewiews Cancer, 2003)*

a) Le rôle du microenvironnement tumoral

Un grand nombre de cellules dérivées de la moelle osseuse contribuent à l'angiogenèse tumorale. Les macrophages, les neutrophiles, les mastocytes et les progéniteurs myéloïdes participent à l'induction de l'angiogenèse et à son maintien au cours du développement tumoral et favorisent l'invasion tumorale (Qian et Pollard, 2010). Ces cellules protègent les vaisseaux de l'effet des drogues ciblant les cellules endothéliales (Ferrara, 2010a) et sont impliquées dans l'apparition de résistances aux traitements anti-angiogéniques. Les cellules hématopoïétiques influencent l'angiogenèse tumorale. Des précurseurs hématopoïétiques exprimant le VEGFR-1 et des monocytes exprimant Tie-2 se retrouvent proches de la tumeur et libèrent des molécules pro-angiogéniques qui favorisent l'angiogenèse (De Palma et Naldini, 2009). Les macrophages se différencient au sein de la tumeur en macrophage de type M2 possédant un phénotype pro-angiogénique. Ils stimulent l'angiogenèse en libérant du PlGF qui favorise la désorganisation des vaisseaux (Rolny et al., 2011). Les cellules dérivées de la moelle osseuse exprimant le récepteur CXCR4 sont retenues dans la tumeur via la production de CXCL12 (ou SDF-1 pour «Stromal Cell Derived Factor 1»), le ligand du récepteur CXCR4. Ces cellules augmentent l'angiogenèse tumorale en sécrétant des facteurs pro-angiogéniques. Ces résultats suggèrent que ces cellules favorisent l'apparition des résistances aux traitements anti-angiogéniques (Ferrara, 2010b). Les fibroblastes infiltrant la tumeur induisent le recrutement des cellules progénitrices endothéliales et sécrètent des facteurs pro-angiogéniques (Crawford et Ferrara, 2009; Erez et al., 2010) (FIG5).

b) Les facteurs de croissance

Le premier facteur de croissance angiogénique à avoir été découvert est le FGF-2 pour «Fibroblast Growth Factor 2». Il stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales, la dégradation de la matrice extracellulaire et la modulation des molécules d'adhésion. D'autres facteurs de croissance régulent la croissance et le maintien des vaisseaux sanguins. Parmi ces facteurs, le VEGF est le plus important (Ferrara, 2009). La plupart des thérapies anti-angiogéniques utilisées en clinique ciblent le VEGF ou ses récepteurs. Actuellement, le ciblage d'autres membres de la famille du VEGF est en cours d'évaluation thérapeutique. Les angiopoietines (Ang-1, Ang-2 et Ang-4) et leurs récepteurs à activité tyrosine kinase (Tie-1 et Tie-2) deviennent des cibles thérapeutiques intéressantes. Le système Ang/Tie permet le recrutement des péricytes. Il régule la maturation et la plasticité des vaisseaux sanguins (Augustin et al., 2009).



<u>Figure 5</u> : Le microenvironnement tumoral primaire

Au sein d'une tumeur primaire les cellules cancéreuses sont entourées d'un microenvironnement tumoral complexe comprenant différentes cellules. Parmi ces cellules on retrouve entre autres, des cellules endothéliales de la circulation sanguine et lymphatique, des fibroblastes et des cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDC) comme les macrophages, les cellules myéloïdes suppressives (MDSC), les monocytes exprimant Tie-2 (TEM) et les cellules souches mésenchymateuses (MSC). Ces cellules amplifient les différentes étapes du développement tumoral dont l'angiogenèse. *(D'après Joyce PA et Pollard JW, Nature Review Cancer, 2009)*

6. La grande famille du VEGF

Le VEGF stimule la prolifération, la survie et la migration des cellules endothéliales. C'est une famille de glycoprotéines de 40 kDa comprenant plusieurs membres : le VEGF-A, B, C et D et le PlGF pour « Placental Growth Factor ». Il existe également des formes plus rares : le VEGF-E retrouvé chez le para-poxvirus 1 et le VEGF-F retrouvé uniquement dans le venin de serpent. Le médiateur majeur de l'angiogenèse tumorale est le VEGF-A généralement nommé simplement VEGF. Ce facteur de croissance a été mis en évidence par plusieurs équipes en parallèle (Connolly et al., 1989; Ferrara et Henzel, 1989; Gospodarowicz et al., 1989; Keck et al., 1989; Leung et al., 1989; Nagy et al., 1989; Plouet et al., 1989). L'activité des différentes isoformes dépend de leur liaison à différents récepteurs à activité tyrosine kinase (FIG6). Le VEGF est impliqué dans la régulation de l'angiogenèse normale et pathologique via sa fixation sur le récepteur VEGF-R2 ou KDR (pour « kinase- insert domain-containing receptor »). Ce récepteur est donc considéré comme le médiateur majeur des effets mitogènes, angiogéniques et inducteur de la perméabilité vasculaire du VEGF. Cette isoforme se lie également au récepteur VEGF-R1 ou Flt1 (pour « Fms-related tyrosine kinase 1 ») mais pas au VEGFR-3. L'activité induite par le VEGF peut être amplifiée par l'activation de deux corécepteurs, les neuropilines 1 et 2 (NRP-1 et NRP-2). Le VEGF est le prototype du facteur angiogénique dans des conditions physiologiques et pathologiques (Folkman, 2007).

a) Le PlGF

Le PlGF pour « Placental Growth Factor » ne se lie qu'au récepteur VEGFR-1 et aux neuropilines (Park et al., 1994). Son invalidation chez l'embryon n'entraine pas d'anomalies dans le développement vasculaire. Mais le PlGF est impliqué dans l'angiogenèse tumorale (Luttun et al., 2002). Il augmente l'angiogenèse induite par le VEGF en déplaçant la liaison du récepteur VEGFR-1 vers le VEGFR-2 (Carmeliet, 2003). Mais dans certaines conditions, il agit comme un antagoniste naturel du VEGF (Eriksson et al., 2002). L'utilisation d'un anticorps spécifique du PlGF réduit efficacement la croissance tumorale (Fischer et al., 2007).

b) Le VEGF-B

Comme le PlGF, il ne se lie pas au récepteur VEGFR-2. Son activité dépend de sa fixation au VEGF-R1. Son invalidation n'entraine pas de défauts majeurs au cours du développement embryonnaire. Par contre, le cœur des souris VEGF-B -/- est plus petit et présente des défauts de vascularisation coronarienne et un échec de rétablissement après une ischémie cardiaque (Bellomo et al., 2000). Cette isoforme semble impliquée dans la vasculogenèse post-natale

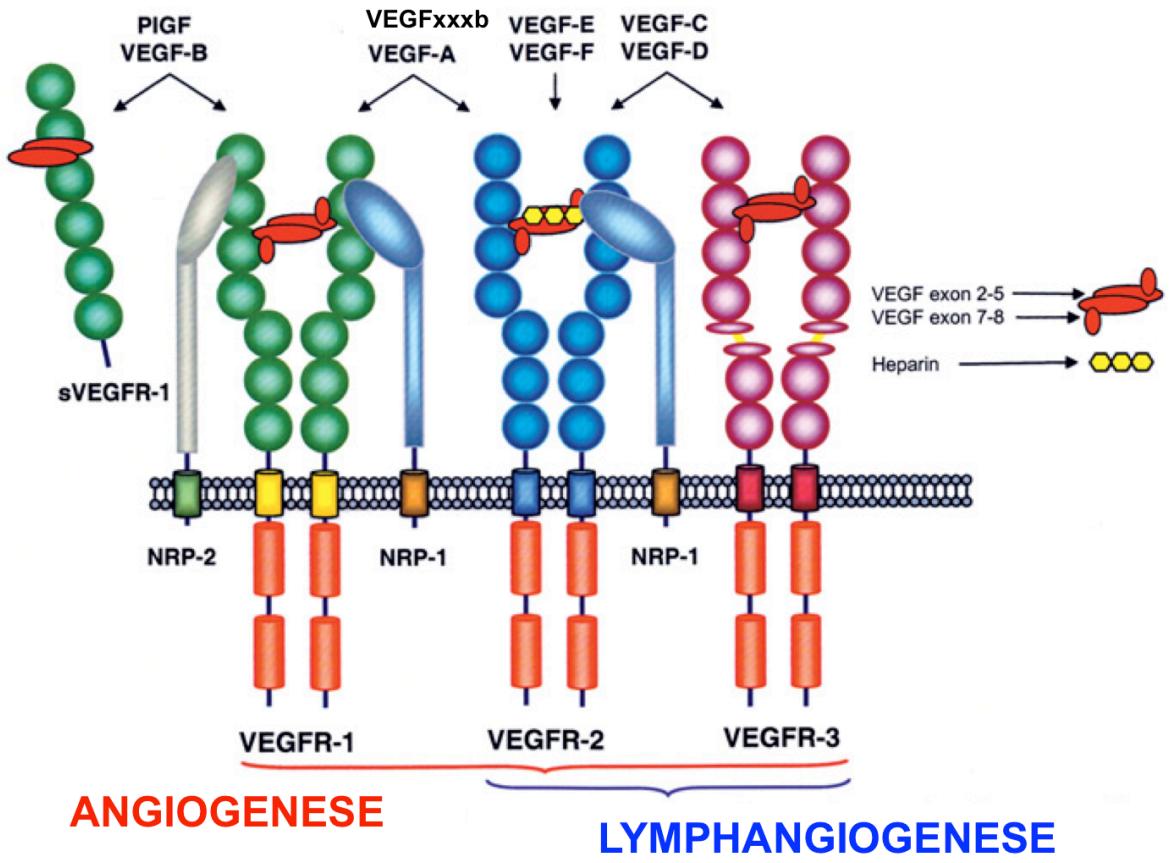
(Mould et al., 2005). Il possède une forte homologie avec le VEGF et le PlGF mais il n'est pas indispensable pour l'induction de l'angiogenèse normale et pathologique. Les résultats concernant cette isoforme sont très variables. Certaines études suggèrent une activité angiogénique et d'autres ne démontrent aucune activité angiogénique. En réalité, le VEGF-B serait plutôt impliqué dans la survie et le maintien des vaisseaux sanguins déjà formés (Zhang et al., 2009). C'est également un facteur de survie pour des cellules non vasculaires, en particuliers les neurones.

c) Le VEGF-C et le VEGF-D

Ils favorisent la croissance et la migration des cellules endothéliales lymphatiques. Leur activité dépend de la fixation au VEGFR-3 exprimé à la surface des cellules endothéliales lymphatiques (Makinen et al., 2001). Le VEGFR-3 est nécessaire pour le développement des vaisseaux sanguins au cours de l'embryogenèse précoce. Ce n'est que plus tard que son expression est restreinte aux vaisseaux lymphatiques (Haiko et al., 2008). Ces isoformes sont impliqués dans la régulation de la lymphangiogenèse (Alitalo et al., 2005) mais régulent également l'angiogenèse. Après clivage protéolytique, des formes courtes du VEGF-C et du VEGF-D peuvent se lier au VEGFR-2 et activer l'angiogenèse. Ces observations suggèrent un lien étroit entre la régulation de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse (Baldwin et al., 2001). Le VEGF-C et le VEGF-D se fixent également au corécepteur NRP-2 pour favoriser et moduler la lymphangiogenèse (Karpanen et al., 2006). Le VEGF-C et le VEGF-D ont des fonctions redondantes dans la régulation de la mise en place du réseau lymphatique chez l'embryon (Haiko et al., 2008).

d) Le VEGF

C'est l'isoforme majeure. Elle à un rôle prépondérant dans la mise en place de la vascularisation normale chez l'embryon (Ferrara, 2004). La délétion d'un allèle du gène est létale au cours du développement embryonnaire (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Cette mortalité est associée à des défauts majeurs dans le développement vasculaire (Ferrara, 2009). En parallèle, une augmentation d'expression de deux à trois fois entraine des problèmes cardiaques et une mortalité au cours du développement embryonnaire (Miquerol et al., 2000). Ces résultats suggèrent qu'une régulation fine des niveaux d'expression de ce facteur de croissance est très importante au cours du développement. Le VEGF est également le facteur clé de la régulation de l'angiogenèse tumorale (Ferrara, 2004). Il existe différentes isoformes de VEGF plus ou moins actives sur les cellules endothéliales et l'angiogenèse.



<u>Figure 6</u> : Représentation schématique de la famille du VEGF et de ses récepteurs

Ce schéma illustre la liaison des différentes isoformes de VEGF sur les récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 et le recrutement potentiel des corécepteurs NRP-1 et NRP-2. La liaison du VEGF sur ses récepteurs induit l'activation de plusieurs voies de signalisation qui favorisent l'angiogenèse ou la lymphangiogenèse ou les deux, en fonction du type de ligand et du récepteur impliqués. *(D'après Suarez SC, Cell Mol Life Sci, 2006)*

Certaines possèdent une activité pro-angiogénique et d'autres une activité anti-angiogénique. L'existence de plusieurs isoformes permet une régulation fine de son activité. La partie 7 de cette introduction traite de manière détaillée des formes anti-angiogéniques de VEGF.

i. Description des différentes isoformes

Le gène du VEGF est situé sur le chromosome 6 (Vincenti et al., 1996) et se compose de huit exons séparés par sept introns (Houck et al., 1991). Un mécanisme d'épissage alternatif génère plusieurs isoformes en fonction de l'exclusion des exons 6 et 7. Toutes les isoformes possèdent les exons 1 à 5 et l'exon 8. Les parties protéiques codées par les exons 6 et 7 sont responsables de l'adhésion du VEGF à la matrice extracellulaire et déterminent la biodisponibilité des différents variants. Ces isoformes sont nommées en fonction du nombre d'acides aminés de la protéine; le VEGF 121, 145, 165, 189 et 206. Les formes majoritaires étant le VEGF121, 165 et 189. La disponibilité et l'activité de ces isoformes dépendent de leur capacité à interagir avec les héparan sulfates (HSPGs) et leurs corécepteurs, NRP-1 et NRP-2.

Le **VEGF121** est une protéine faiblement acide qui ne contient ni l'exon 6 ni l'exon 7. Elle ne se lie pas à l'héparine, est entièrement soluble et diffuse librement après sa sécrétion par les cellules. Le **VEGF165** est une glycoprotéine basique capable de se lier à l'héparine (Ferrara et Davis-Smyth, 1997). Il possède une affinité modérée pour l'héparine. Après sécrétion, 50 à 70 % du VEGF est retenu à la surface des cellules ou dans la matrice extracellulaire alors que le reste est sécrété. Le VEGF165 est donc le juste équilibre entre activité et réserve. C'est la forme la plus importante de VEGF et aussi la plus étudiée. Le **VEGF189** et le **VEGF206** sont quasi exclusivement piégés dans la matrice extracellulaire (Park et al., 1993). Ces isoformes associées à la surface cellulaire et à la matrice extracellulaire peuvent être libérées sous formes actives et solubles après clivage protéolytique par l'héparine ou la plasmine. D'autres isoformes de VEGF existent, le **VEGF145 et 206**. La diversité des isoformes de VEGF et leur activité biologique sont décrites dans la revue suivante (Woolard et al., 2009).

L'activité de ces isoformes est variable ce qui permet une réponse biologique graduelle et contrôlée (Ferrara et Davis-Smyth, 1997). Cette différence d'affinité pour la matrice extracellulaire permet la formation d'un gradient spatial de VEGF. Le VEGF121 diffuse librement et agit sur de longues distances. Le VEGF165 agit à distance et sur les cellules voisines. Le VEGF189 lié à la matrice extracellulaire permet la mise en place de signaux à

courte distance. Le ratio de ces isoformes varie au cours du développement embryonnaire et au sein des différents organes chez l'adulte (Ng et al., 2001). Le profil d'expression des isoformes varie également au cours du développement tumoral et selon le type de tumeur. Dans l'angiogenèse tumorale, les isoformes majoritaires sont les isoformes diffusibles (Cheung et al., 1998). Le VEGF121 est considéré comme l'isoforme la plus tumorigène dans le cancer du sein (Zhang et al., 2000) et son rôle est prépondérant dans le mélanome (Yu et al., 2002). L'expression du VEGF121 est augmentée dans les cancers du colon (Uthoff et al., 2002) et de la prostate (Catena et al., 2007). L'augmentation du ratio VEGF121/VEGF165-VEGF189 dans les cellules de cancer de la prostate augmente la tumorigenèse *in vivo* suggérant un rôle important de cette isoforme dans la croissance tumorale. Ces résultats soulignent l'importance de l'expression relative des différentes isoformes de VEGF dans la régulation du développement des cancers de la prostate. De plus, le VEGF121 est capable de promouvoir la lymphangiogenèse dans le cancer du poumon via une induction du VEGF-C (Kawai et al., 2008). Le VEGF165 est essentiel pour la croissance d'un grand nombre de tumeurs (Folkman, 2002). Ainsi, son expression est augmentée dans de nombreux cancers comme les cancers colorectaux, du sein, du poumon et du rein et de l'ovaire (justifiant l'utilisation du BVZ). Le VEGF165 induit une forte angiogenèse et témoigne d'un mauvais pronostic vital dans les ostéosarcomes (Lee et al., 1999). Le VEGF189, de par sa structure et sa liaison à la matrice extracellulaire contribue au développement tumoral en favorisant la croissance locale des vaisseaux sanguins. Il participe au développement du cancer du sein via une interaction avec NRP-1 et la mise en place d'une boucle de croissance autocrine. Cette isoforme est augmentée dans les cancers du rein (RCC pour « Renal Cell Carcinoma ») et les carcinomes hépatocellulaires. Dans ces tumeurs, le VEGF189 joue un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse et de la croissance tumorale. Les niveaux d'expression sont corrélés avec la progression tumorale.

ii. Description des différents récepteurs du VEGF

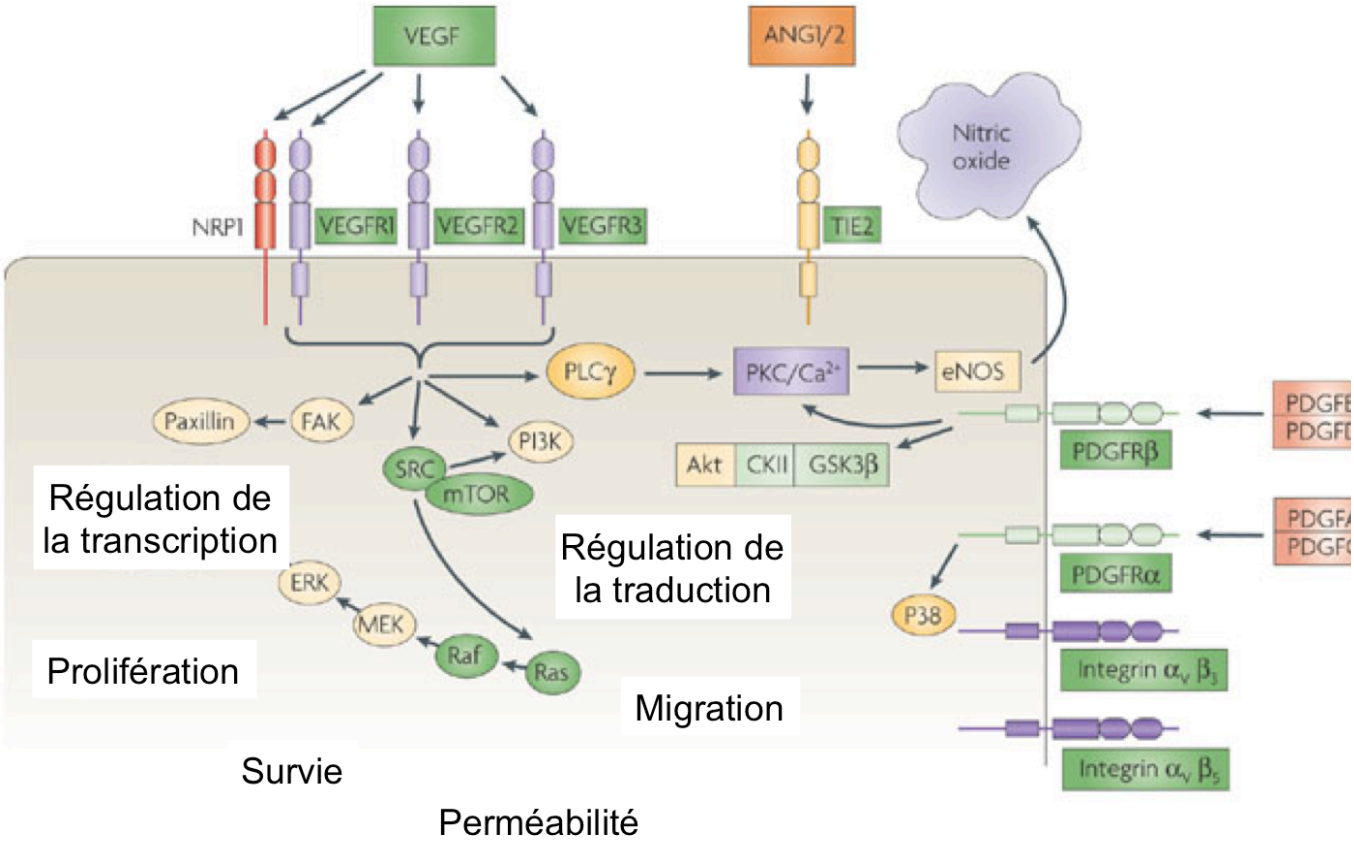
L'action du VEGF passe par une interaction avec les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Ces deux récepteurs sont indispensables à la mise en place d'un réseau vasculaire normal au cours du développement embryonnaire. L'invalidation de l'un ou l'autre de ces récepteurs entraine la mort *in utero* mais avec des phénotypes différents. Ces résultats suggèrent des rôles distincts de ces deux récepteurs (Fong et al., 1995; Shalaby et al., 1995). L'absence de VEGFR-1 empêche la formation de vaisseaux sanguins normaux alors que l'inactivation de

VEGFR-2 empêche la vasculogenèse normale et entraine un défaut de développement des cellules hématopoïétiques.

Le **VEGFR-1** se retrouve à la fois sous forme soluble et sous forme transmembranaire. Son rôle n'est pas très clair. L'affinité du VEGF pour ce récepteur est dix fois supérieure que pour le VEGFR-2. Mais la transduction du signal après liaison du VEGF est très faible (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). Il pourrait donc piéger le VEGF et empêcher sa fixation sur le VEGFR-2. Au cours du développement embryonnaire, il aurait un rôle inhibiteur de la vasculogenèse précoce. Chez l'adulte, il active l'angiogenèse et la réponse inflammatoire. Il maintient la survie des cellules endothéliales en quiescence ou en prolifération (Peters et al., 1993). Il régule également la migration des monocytes et des macrophages (Barleon et al., 1996). Le **VEGFR-2** est fortement exprimé à la surface des cellules endothéliales et des progéniteurs endothéliaux circulants. La liaison du VEGF entraine la dimérisation du récepteur. Cela permet l'activation de différentes voies de signalisation impliquées dans la survie, la prolifération et la migration des cellules endothéliales et favorise la perméabilité vasculaire (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). Comme pour le VEGFR-1, il existe une forme soluble qui pourrait avoir un rôle négatif sur l'angiogenèse (Ebos et al., 2004). Il est fortement exprimé au cours du développement embryonnaire puis son expression diminue chez l'adulte. Il est de nouveau surexprimé lors de l'angiogenèse tumorale (FIG7).

iii. L'action du VEGF sur d'autres cellules

Le VEGF agit sur les cellules endothéliales mais aussi sur d'autres cellules. Il exerce une action paracrine sur les cellules endothéliales et entraine la fenestration de l'endothélium (Roberts et Palade, 1995). Il a un rôle primordial dans l'induction de l'angiogenèse physiologique (Ferrara, 2001; Pepper et al., 1992). Il est important dans la physiologie du foie, du pancréas, des glandes surrénales et du rein. Dans le rein, une régulation fine des niveaux de VEGF est importante pour établir et maintenir la barrière de filtration glomérulaire. La délétion d'un allèle du VEGF dans les podocytes entraine des maladies rénales, des protéinuries, des endothélioses et des défauts de fenestration des capillaires. Mais le VEGF a des effets sur d'autres cellules. En particuliers, il a un rôle neuro protecteur de différents types cellulaires du système nerveux (Oosthuyse et al., 2001). Il a également un rôle dans la survie et l'activité des cellules responsables du métabolisme osseux (Zelzer et al., 2004). Il inhibe la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (Gabrilovich et al., 1995). Ces résultats suggèrent que le VEGF faciliterait la croissance tumorale en inhibant la réponse immunitaire



<u>Figure 7</u> : Les récepteurs et les voies de signalisations impliqués dans l'angiogenèse

Ce schéma illustre les principaux récepteurs et les voies de signalisations majeures impliquées dans la régulation de l'angiogenèse tumorale. Ces récepteurs sont présents à la surface des cellules endothéliales et leur activation favorise la survie, la prolifération et la migration de ces cellules. Les voies de signalisation activées en aval de ces récepteurs régulent l'expression de gènes et de protéines impliqués dans l'angiogenèse. Ces récepteurs sont également exprimés de façon aberrante à la surface des cellules tumorales. Les cellules tumorales secrètent les ligands de ces récepteurs et activent l'angiogenèse. *(D'après Jain RK, Nature Reviews Neuroscience, 2007)*

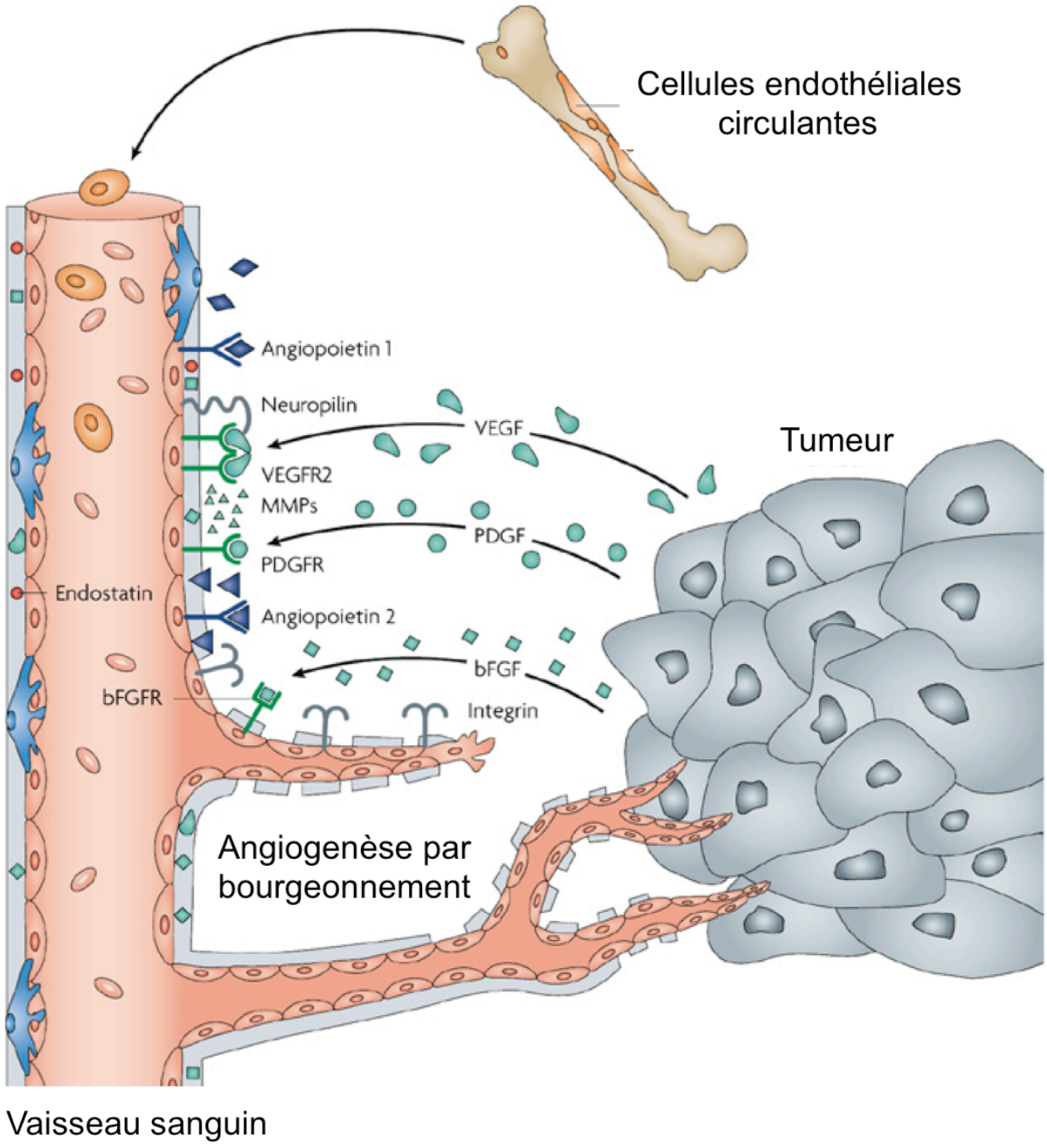
dirigée contre la tumeur en plus de son rôle sur l'induction de l'angiogenèse. Le VEGF a également des effets autocrines. L'expression membranaire des récepteurs est majoritaire mais les récepteurs du VEGF peuvent être exprimés à l'intérieur de la cellule (Carmeliet, 2003). Cette expression favorise les effets intracrines du VEGF. Il est impliqué dans la survie des cellules souches hématopoïétiques (Gerber et al., 2002), des cellules de cancer du sein (Lee et al., 2007b) et des cellules endothéliales (Lee et al., 2007a). Un défaut de VEGF induit l'apoptose des cellules endothéliales et la régression vasculaire (Bergers et Benjamin, 2003).

7. Le VEGF et l'angiogenèse tumorale

a) Le rôle central du VEGF et des ses récepteurs

Un grand nombre de cellules cancéreuses humaines expriment le VEGF à des niveaux élevés (Kerbel et Folkman, 2002). Différents facteurs peuvent induire l'expression du VEGF. L'activation de certaines voies génétiques ou épi-génétiques favorise l'expression du VEGF. L'hypoxie qui est caractéristique des tumeurs solides est un puissant inducteur du VEGF (Semenza, 2003). Des mutations qui activent des oncogènes ou inactivent des gènes suppresseurs de tumeurs induisent également l'expression du VEGF. Au sein de la tumeur les cellules infiltrantes sont également une source importante de VEGF.

L'expression des récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 et des corécepteurs NRP-1 et NRP-2 n'est pas restreinte aux cellules endothéliales. Les cellules tumorales expriment ces récepteurs qui sont fortement impliqués dans le développement de la tumeur (Ellis, 2006; Lee et al., 2007a; Lee et al., 2007b). Les cellules tumorales expriment à la fois les récepteurs et le ligand pour ces récepteurs. Ces observations suggèrent que le VEGF jouerait le rôle de facteur de croissance autocrine sur les cellules tumorales. La fixation sur son récepteur entraine la dimérisation, l'autophosphorylation et l'activation des voies de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK («Extracellular signal Regulated Kinase») et PI3K («Phosphoinositide 3 Kinase») impliquées dans la prolifération, la survie et la migration des cellules endothéliales (FIG7). L'activation du récepteur est amplifiée par la présence à la surface des cellules des NRPs. Ces corécepteurs ont également montré une possibilité de signalisation propre dans les cellules cancéreuses de RCC. Dans ces cellules la liaison du VEGF permet l'activation de la voie de signalisation AKT (Cao et al., 2008). L'expression de NRP-1 est également augmentée à la surface des cellules tumorales. Dans un grand nombre de cancers, l'augmentation de l'expression du VEGF par la tumeur est considérée comme un facteur de



<u>Figure 8</u> : Les principaux acteurs de l'angiogenèse tumorale

Les tumeurs secrètent un grand nombre de facteurs de croissance **(bFGF ou FGF-2, PDGF et VEGF)**. Ces facteurs angiogéniques agissent sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins proches de la tumeur. Ils stimulent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins en activant leurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales et en permettant le recrutement de précurseurs circulants à partir de la moelle osseuse. Les métalloprotéases **(MMPs)** et le système **Ang/Tie** sont également impliqués dans ce processus. *(D'après Folkman J Nature Rewiews Drug Discovery, 2007)*

mauvais pronostic (Kondo et al., 1994; Pathak et al., 2008; Poon et al., 2001; Salgia, 2011; Schoenleber et al., 2009). Les taux sériques de VEGF sont très souvent augmentés chez les patients. L'expression du VEGF est associée à une stimulation de l'angiogenèse et à un taux de rechute plus important dans le cancer du sein (Bando et al., 2005), le cancer gastrique (Maeda et al., 1996) et le cancer du poumon (Farhat et al., 2012). L'angiogenèse tumorale est fortement dépendante de l'expression du VEGF. L'administration d'un anticorps dirigé contre le VEGF diminue la vascularisation et la croissance de différents types de tumeurs chez la souris alors que ces anticorps n'ont aucun effet sur la prolifération cellulaire *in vitro* (Gerber et Ferrara, 2005). L'inhibition du VEGFR-2 a les mêmes effets (Millauer et al., 1996). A l'inverse, la surexpression du VEGF augmente l'angiogenèse et favorise la croissance tumorale (Larcher et al., 1998).

b) La régulation de l'expression du VEGF

Dans les conditions physiologiques, l'expression du VEGF est extrêmement contrôlée. L'expression anarchique des facteurs pro-angiogéniques et en particuliers le VEGF entraine la mise en place d'un réseau vasculaire anarchique et peu fonctionnel. Différents facteurs contrôlent l'expression du VEGF comme l'hypoxie, la déplétion en glucose, la diminution du pH, les cytokines inflammatoires, les facteurs de croissance, les oncogènes, les hormones et certaines chimiokines (Kerbel, 2008).

Même si l'induction d'expression la plus importante est observée après stimulation par les facteurs de croissance ou les oncogènes, la condition physio/pathologique d'induction de VEGF la plus étudiée est l'hypoxie (Shweiki et al., 1992). Elle régule la transcription, la stabilité et la traduction de l'ARNm du VEGF (Dor et al., 2001). Le VEGF possède dans son promoteur un élément de réponse à l'hypoxie, élément HRE pour «Hypoxia Response Element» (Forsythe et al., 1996). Cette séquence permet l'activation de la transcription du VEGF en réponse à l'hypoxie par la fixation du facteur de transcription HIF-1 pour «Hypoxia Inducible Factor». HIF-1 fonctionne sous la forme d'un hétéro-dimère. Il est composé d'une sous unité HIF-1β dont l'expression est constitutive et d'une sous unité HIF-1α régulatrice dont l'expression est régulée par l'hypoxie (Pugh et Ratcliffe, 2003; Semenza, 2003). En normoxie, la demi-vie de HIF-1α est très courte. La protéine VHL pour «von Hippel-Lindau» possède une activité E3 ubiquitine ligase et ubiquitinyle HIF-1α permettant sa dégradation par le protéasome (Cockman et al., 2000). En hypoxie, la protéine VHL est inactive ce qui entraine la stabilisation de HIF-1α. La translocation dans le noyau et l'interaction avec HIF-

1β entraine l'activation de la transcription du VEGF en réponse à l'hypoxie. L'hydroxylation de HIF-1α sur des résidus proline spécifiques permet la reconnaissance par la protéine VHL. C'est un moyen de contrôler la stabilité de la protéine en fonction de la concentration en oxygène et de réguler l'expression du VEGF en hypoxie. Il existe trois prolyl-hydroxylases (PHD1, 2, 3) capables d'hydroxyler HIF-1α sur les résidus responsables de l'interaction avec la protéine VHL (Epstein et al., 2001). PHD2 semble être le senseur majeur de la quantité d'oxygène responsable de la régulation d'HIF-1α (Berra et al., 2003). Une mutation ou une délétion de VHL provoque la maladie de von Hippel-Lindau. Il s'agit d'un syndrome caractérisé par l'apparition de multiples tumeurs bénignes ou malignes fortement vascularisées (Richard et al., 2004). Cette inactivation de la protéine VHL est également impliquée dans l'apparition de cancers sporadiques (Gimenez-Bachs et al., 2007).

L'expression du VEGF en hypoxie n'est pas uniquement régulée au niveau transcriptionnel. En hypoxie, la transcription du VEGF n'est augmentée que de 3 fois alors que les quantités d'ARNm sont augmentées de 12 fois (Levy et al., 1995). Cette différence peut être expliquée par une régulation de la stabilité de l'ARNm du VEGF (Levy et al., 1996a, b). Cette régulation de la stabilité est également observée dans le cas de la réponse à une déplétion en glucose (Iida et al., 2002). L'analyse du 3'UTR de l'ARNm VEGF a montré qu'il est suffisant pour déstabiliser rapidement un ARNm caractérisé par une demi-vie longue (Shima et al., 1996). Il possède dans sa séquence des séquences riches en AU (séquences ARE pour «AU Rich Element») impliquées dans la régulation de la stabilité des ARNm (Claffey et al., 1998). La fixation de différentes protéines sur ces séquences stabilise ou déstabilise l'ARNm du VEGF. La protéine HuR en particulier est responsable de la stabilisation de l'ARNm VEGF sous hypoxie (Levy et al., 1998). Des sites de polyadénylation sont présents dans le 3'UTR du VEGF. Ils permettent la polyadénylation différentielle et l'incorporation dans le 3'UTR de zones d'instabilités régulant la stabilité de l'ARNm du VEGF. Enfin, l'expression du VEGF est également régulée au niveau de la traduction de son ARNm. Plusieurs sites alternatifs d'initiation de la traduction liés à la présence de séquences d'entrées internes du ribosome (IRES) sont retrouvés dans le 5'UTR de l'ARNm du VEGF. Ces séquences sont notamment responsable de l'initiation de traduction CAP indépendante dans des conditions d'hypoxie, condition dans laquelle est observée une inhibition massive de la traduction des ARNm (Huez et al., 1998). Au niveau traductionnel, l'utilisation des séquences IRES est également responsable de la production des formes longues du VEGF. Ces formes pourront être activées et secrétées après clivage protéolytique (Huez et al., 2001). Ces séquences IRES augmentent

la traduction du VEGF dans des conditions de privation en nutriments (Akiri et al., 1998; Huez et al., 1998; Stein et al., 1998). L'expression du VEGF est également régulée indépendamment de l'hypoxie. Certains facteurs de croissances et certains oncogènes en via la voie de signalisation ERK induisant la phosphorylation du facteur de transcription Sp-1 activent la transcription du gène VEGF (Milanini-Mongiat et al., 2002; Milanini et al., 1998). Même en réponse à l'hypoxie, l'expression de l'ARNm du VEGF peut être induite indépendamment de HIF (Arany et al., 2008).

c) L'hypoxie, l'angiogenèse et le cancer : Un trio inséparable

Les cellules tumorales comme toutes les cellules doivent être à moins de 1 ou 2 millimètres de la circulation sanguine pour être approvisionnées par simple diffusion en oxygène et en nutriments et maintenir leur survie (Folkman, 1990). Une tumeur en croissance est fortement confrontée à des problèmes de défaut en oxygène c'est à dire d'hypoxie. Ces zones hypoxiques favorisent une division rapide des cellules endothéliales et une angiogenèse exacerbée. La présence de zones hypoxiques au sein de la tumeur est une des causes de l'échec de la radiothérapie dans les tumeurs solides. Les facteurs de transcription HIFs jouent un rôle central dans l'adaptation des cellules à la baisse de la quantité d'oxygène. Dans les cancers, un excès de facteurs pro-angiogénique favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Hanahan et Weinberg, 2011). Les facteurs de transcription HIFs activent l'expression d'un grand nombre de facteurs pro-angiogéniques afin de favoriser l'extension de la vascularisation et de réduire l'hypoxie intra tumorale (FIG9). Cette activation peut être directe si les facteurs en question possèdent dans leur promoteur un site de fixation pour HIF (comme le VEGF par exemple) ou indirecte si HIF active l'expression d'autres facteurs de transcription pour réguler l'expression de ces molécules pro-angiogéniques (comme la cytokine CXCL8 par exemple).

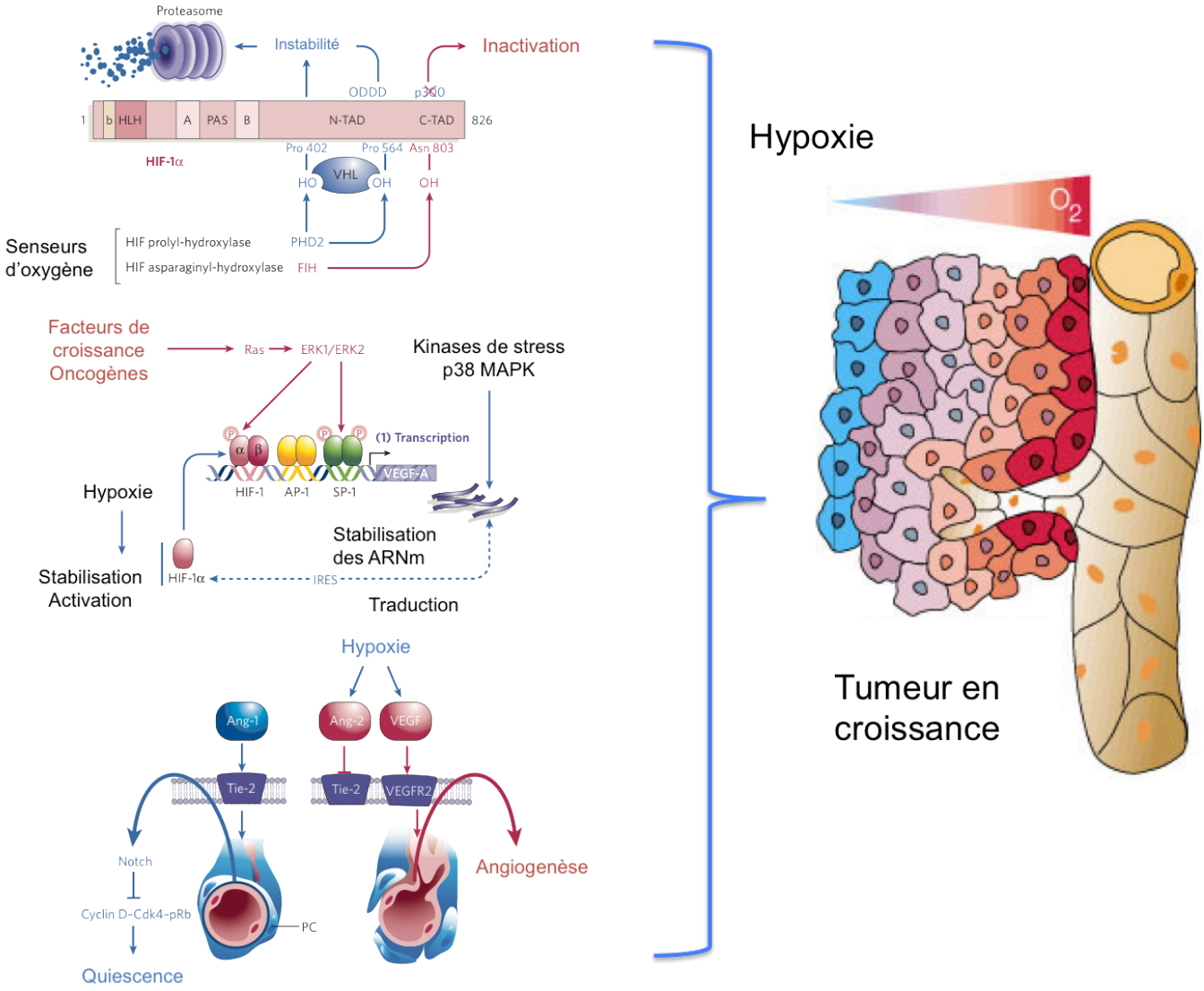
i. La régulation du facteur HIF

Les facteurs de transcription HIF sont des facteurs hétérodimériques composés de deux sous unités α et β. La réponse des cellules à l'hypoxie est majoritairement régulée par les facteurs de transcriptions HIF-1 et HIF-2. Contrairement aux sous unités β (également nommés ARNT pour « Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator ») dont l'expression est constitutive, les sous unités α sont régulées par l'hypoxie. Dans le noyau, ils régulent la transcription d'un grand nombre de gènes cibles, impliqués dans la réponse à l'hypoxie (Hu et al., 2007a). Ces deux isoformes régulent un grand nombre de gènes en commun mais possèdent également des

cibles plus spécifiques. HIF-1α induit préférentiellement des gènes impliqués dans la glycolyse (Wang et al., 2005). HIF-2α régule l'expression de gènes importants pour la croissance tumorale, la progression dans le cycle et le maintien de la pluripotence en régulant l'expression du proto-oncogène c-Myc (Gordan et al., 2007a).

Le facteur HIF-1α est le membre le plus étudié de la famille des facteurs de transcription HIF. De nombreuses différences qualitatives et quantitatives existent entre HIF-1α et HIF-2α. Les gènes activés sont différents (Kaelin et Ratcliffe, 2008). En particuliers, HIF-1α va activer ou inhiber l'activité de l'oncogène c-Myc en fonction du contexte. Dans les RCC, par exemple, il est considéré comme un gène suppresseur de tumeurs. A l'inverse, HIF-2α coopère avec c-Myc pour augmenter la transformation de fibroblastes normaux et la prolifération induite par l'oncogène. HIF-2α est considéré comme un oncogène (Gordan et al., 2007b). L'expression de HIF-2α est augmentée dans plusieurs types de tumeurs. Quand HIF-1α est inhibé dans les cellules souches embryonnaires humaines au profit de HIF-2α, la capacité de ces cellules à former des tératomes *in vivo* augmente (Covello et al., 2005). Ces résultats suggèrent un rôle prépondérant de l'isoforme HIF-2α dans le développement tumoral.

La plupart des gènes dont l'expression est régulée par HIF possèdent dans leur promoteur une séquence régulatrice de type HRE. L'expression de HIF-1α est induite à partir d'un pourcentage d'oxygène inférieur à 6% est elle est maximale à environ 0,5% d'oxygène. Il existe deux types majeurs de senseurs d'oxygène responsable du contrôle de l'expression de HIF-1α; des hydroxylases dont l'activité est régulée par l'oxygène. PHD2 et FIH sont les plus importantes. Dans des conditions d'oxygénation normale, l'hydroxylation de HIF-1α entraine sa poly-ubiquitinylation par la protéine VHL pour « von Hippel-Lindau » et sa dégradation par le protéasome. D'autres facteurs régulent l'expression de HIF-1α. Des modifications post-traductionnelles régulent son activité. La phosphorylation de HIF-1α par les MAPK joue un rôle important et augmente l'activité transcriptionnelle de HIF-1α (Richard et al., 1999). Certains oncogènes, l'inhibition de p53 et de PTEN permettent l'accumulation de HIF-1α et des ses gènes cibles (Jeong et al., 2002; Zundel et al., 2000). Certains facteurs de croissance régulent l'expression de HIF-1α, comme l'EGF (Jiang et al., 2001), le TGF-α (Zhong et al., 2000), l'IGF (Krishnamachary et al., 2003) et l'IL-1β (Jung et al., 2003).



<u>Figure 9</u> : La régulation de l'angiogenèse tumorale par l'hypoxie

En normoxie, les senseurs d'oxygène contribuent à la destruction et à l'inactivation du facteur de transcription HIF-1. Dans une tumeur en croissance les cellules tumorales s'éloignent des vaisseaux sanguins intra-tumoraux ce qui entraine la formation de zones hypoxiques où la pression en oxygène est très faible. En réponse à l'hypoxie intra-tumorale le facteur HIF-1 est stabilisé. Cette stabilisation induit la transcription de différents gènes impliqués dans l'angiogenèse tumorale, comme le VEGF. Les cellules tumorales hypoxiques augmentent la production de facteurs angiogéniques pour stimuler l'angiogenèse tumorale et rétablir une oxygénation normale et favoriser la croissance tumorale. *(D'après Pouyssegur J, Dayan F et Mazure N, Nature Reviews, 2006)*

ii. L'hypoxie et la progression tumorale

Les gènes cibles de HIF-1 impliqués dans l'angiogenèse tumorale sont le VEGF et ses récepteurs VEGFR, les angiopoietines, le PDGF-β, le récepteur Tie-2 et les MMP-2 et MMP-9 (Hickey et Simon, 2006). Parmi ces gènes cibles le VEGF à un rôle majeur. Sa transcription est stimulée par l'hypoxie et par la fixation de HIF-1 au niveau de son promoteur (Forsythe et al., 1996). Les facteurs HIF-1 et HIF-2 exercent des effets opposés sur la régulation de l'angiogenèse. Les deux isoformes augmentent l'expression du VEGF mais régulent de façon différentielle l'expression de la cytokine CXCL8 également impliquée dans l'angiogenèse. HIF-1 inhibe de façon indirecte l'expression de CXCL8 via une diminution de l'activité du facteur de transcription Nrf-2. A l'inverse, HIF-2 augmente de façon indirecte l'expression de CXCL8 en favorisant l'activité du facteur de transcription Sp-1 (Loboda et al., 2012). Ces résultats démontrent les effets complexes des isoformes de HIF. Cette complexité résulte d'une coopération avec d'autres facteurs de transcription. Ces facteurs pouvant constituer des cibles thérapeutiques potentielles dans les traitements pro- et/ou anti-angiogéniques. Pour clarifier le rôle d'HIF-1α dans le développement tumoral, des cellules souches embryonnaires HIF-1α +/+ ou HIF-1α -/-, ont été injecté en sous cutané à des souris immuno-déficientes. Ces cellules forment des tératocarcinomes. L'équipe du Dr Carmeliet a montré que dans les tumeurs HIF-1α -/- la densité vasculaire, le diamètre des vaisseaux, le flux sanguin, l'oxygénation et l'expression du VEGF sont diminués par rapport aux tumeurs HIF-1α +/+. Trois fois plus de zones hypoxiques sont détectées dans les tumeurs HIF-1α -/-. De façon surprenante, la croissance tumorale est identique dans les deux conditions voire supérieure dans le cas des tumeurs HIF-1α -/-. Dans ces tumeurs a-vasculaires, des cellules plus agressives sont sélectionnées et favorisent la reprise de la croissance tumorale (Carmeliet et al., 1998). De façon contradictoire, l'équipe du Dr Ryan a montré que les cellules HIF-1α -/- ont une capacité réduite à former des tumeurs. Au sein de ces tumeurs l'apoptose est augmentée mais aucune différence significative de densité vasculaire et de flux sanguin n'est observée (Ryan et al., 2000). Ces résultats démontrent que l'angiogenèse dépendante de HIF-1α n'est pas indispensable à la formation de tumeurs et qu'HIF-1α contrôle la croissance tumorale de façon conditionnelle en fonction du type de tumeurs et de l'environnement tumoral.

iii. L'hypoxie comme cible thérapeutique

L'hypoxie est un phénomène crucial pour la croissance et le développement tumoral. Le rôle central de HIF dans l'activation des différents facteurs et voies de signalisation favorisant la progression tumorale en fait une cible thérapeutique potentielle intéressante (Monti et Gariboldi, 2011; Poon et al., 2009; Semenza, 2003). Dans le cancer du sein, une expression élevée de HIF-1α est associée à un mauvais pronostic vital des patients. La survie sans progression et la survie globale sont diminuées (Trastour et al., 2007). Plusieurs inhibiteurs de HIF-1 sont en cours d'étude dans le traitement des cancers. Dans le cancer de la prostate, deux inhibiteurs de HIF-1α, le P3155 et le NSC-134754 sont utilisés dans des modèles précliniques. Le premier présente des effets anti-tumoraux *in vitro* et *in vivo* (Manohar et al., 2011). Le deuxième entraine des altérations métaboliques dans les cellules *in vitro*. *In vivo* cet inhibiteur inhibe la croissance tumorale sans altérer de façon significative les fonctions vasculaires (Baker et al., 2012). Un autre inhibiteur, ELRS10444, qui bloque l'activité de HIF-1α et HIF-2α est testé dans le cancer du rein. Il inhibe la prolifération, la survie et induit l'apoptose des cellules de RCC *in vitro*. Dans deux modèles indépendants de RCC *in vivo* il diminue l'angiogenèse et la croissance tumorale (Carew et al., 2012). Comme beaucoup d'autres protéines impliquées dans le développement des cancers, la surexpression de HIF-1 n'est pas retrouvée dans toutes les tumeurs. Quand celle-ci est présente elle n'est pas toujours associée à une augmentation de la mortalité. Dans les cancers oraux à cellules squameuses, la surexpression de HIF-1 dans les stades précoces de la maladie est favorable à la survie des patients (Fillies et al., 2005). Ces observations suggèrent qu'une généralisation est impossible et que HIF-1 ne peut pas être une cible thérapeutique dans tous les cancers.

d) Le VEGF et les MMPs (pour « Matrix Metallo Proteases »)

La biodisponibilité du VEGF est régulée par le clivage protéolytique du VEGF associé à la matrice extracellulaire. La matrice extracellulaire est un réservoir de VEGF. Ce VEGF est libéré lors de la dégradation de la matrice extracellulaire ou par un clivage du VEGF lui même pour donner des formes solubles. Les acteurs de cette libération sont les héparinases, la plasmine et les MMPs. Nous nous focaliserons ici sur le rôle des MMPs.

Les MMPs libèrent le VEGF lié à la matrice extracellulaire. Les formes solubles libérées se lient au VEGFR-2, induisent sa phosphorylation et stimulent l'angiogenèse *in vivo*. Le récepteur utilisé est identique mais le mode de formation des vaisseaux est différent de celui utilisé par le VEGF soluble. Ces formes liées à la matrice favorisent une hyperplasie vasculaire, caractérisée par une diminution de la densité vasculaire mais une augmentation de

la largeur des vaisseaux. A l'inverse, les formes de VEGF résistantes au clivage par les MMPs favorisent l'angiogenèse par bourgeonnement caractérisée par une formation excessive et anarchique de nouvelles ramifications à partir du réseau vasculaire existant. Les enzymes qui dégradent la matrice extracellulaire sont essentielles au développement tumoral. L'expression des MMPs est augmentée dans différentes lignées de cellules tumorales. Ainsi, ces protéases représentent des cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement des cancers. Cependant, le rôle des MMPs dans les tumeurs est très complexe. Dans certains cas, une inactivation des MMPs facilite l'expansion tumorale (Balbin et al., 2003; Overall et Lopez-Otin, 2002). Les MMPs ne possèdent pas seulement une activité pro-angiogénique (Pozzi et al., 2000). Elles suppriment la néo-vascularisation en activant et libérant des inhibiteurs de l'angiogenèse (Hamano et al., 2003). L'utilisation d'inhibiteurs bloquant l'activité de l'ensemble des MMPs n'a pour l'instant montré aucun effet bénéfique dans le traitement des cancers chez l'homme. Ces résultats suggèrent la nécessité d'approfondir les connaissances du rôle des MMPs dans l'angiogenèse tumorale en fonctions du type de tumeur. Cela permettrait d'évaluer la pertinence de cibler spécifiquement certaines MMPs dans le traitement des cancers.

En conclusion, l'interaction entre le VEGF et ses récepteurs est essentielle pour la régulation des processus angiogéniques physiologiques et pathologiques. Dans des conditions physiologiques il existe un équilibre entre les facteurs pro et anti-angiogéniques et donc une absence d'angiogenèse. Lors du « switch angiogénique » la tumeur a-vasculaire va devenir de plus en plus hypoxique et subit différentes mutations qui aboutissent au déséquilibre de cette balance en faveur des facteurs pro-angiogéniques et en particuliers du VEGF. L'induction de l'expression de HIF-1 dans les cellules tumorales, endothéliales et stromales hypoxiques stimule la libération d'un grand nombre de facteurs angiogéniques. Ce pool de stimuli attire au sein de la tumeur des cellules myéloïdes qui amplifient l'environnement angiogénique en sécrétant leurs propres cytokines et facteurs angiogéniques. Les cellules tumorales secrètent des quantités importantes de VEGF qui favorisent la prolifération des cellules endothéliales des vaisseaux adjacents à la tumeur. Cela permet d'attirer les vaisseaux sanguins au sein de la tumeur et de favoriser sa croissance et sa dissémination.

L'ensemble de ces informations démontre l'importance de l'angiogenèse dans le développement tumoral et la formation des métastases. L'angiogenèse est une cible thérapeutique de choix dans le traitement des cancers depuis le début des années 2000. La plupart des traitements ciblent la voie de signalisation du VEGF. Mais comme nous l'allons le

voir dans les chapitres suivant beaucoup d'autres facteurs peuvent moduler l'angiogenèse et offrir d'autres cibles thérapeutiques intéressantes. La composition de la matrice extracellulaire au contact du réseau vasculaire peut affecter l'angiogenèse positivement ou négativement (Nyberg et al., 2005). La libération par clivage protéolytique du VEGF piégé dans la matrice régule la biodisponibilité du VEGF et la formation des vaisseaux (Lee et al., 2005). Le contact entre les péricytes et les cellules endothéliales permet d'induire la quiescence des vaisseaux (Bergers et Song, 2005) et de réguler la maturation vasculaire.

8. Le VEGF et le paradoxe des tumeurs neuroendocrines (NETs)

Les NETs sont des tumeurs très vascularisées. La densité microvasculaire est 10 à 30 fois supérieure par rapport à d'autres cancers (Couvelard et al., 2005; Takahashi et al., 2007). Le tissu endocrine normal possède un réseau vasculaire dense indispensable au maintien des échanges entre les cellules endocrines et le sang ainsi qu'à la sécrétion hormonale. Les cellules endocrines normales produisent de façon constitutive du VEGF pour développer et organiser ce réseau vasculaire (Christofori et al., 1995). Ainsi, les cellules des NETs synthétisent et sécrètent des quantités importantes de VEGF (Villaume et al., 2010). L'angiogenèse dépendante du VEGF joue un rôle primordial dans la tumorigenèse endocrine et la progression tumorale (Inoue et al., 2002).

La vascularisation intratumorale est plus importante dans les tumeurs bénignes. De plus, la densité vasculaire est plus importante dans les tumeurs de bas grade que dans les tumeurs de haut grade. Elle est associée avec un bon pronostic et une augmentation de la survie (Couvelard et al., 2005; Takahashi et al., 2007). Dans ces tumeurs, contrairement à la plupart des autres carcinomes, la densité du réseau vasculaire est un marqueur de différenciation et pas un marqueur d'agressivité. Ainsi, les NETs les plus vascularisées sont, les plus différenciées et les moins angiogéniques donc les moins agressives. Ce paradoxe n'est pour l'instant validé que pour les NETs du pancréas. L'angiogenèse est très peu étudiée dans les autres NETs et les résultats sont contradictoires.

Les traitements anti-angiogéniques sont indiqués dans le traitement des carcinomes métastatiques. La régulation de l'angiogenèse dans ces tumeurs est-elle identique dans les phases métastatiques ? Une angiogenèse active est requise pour le développement tardif des métastases au foie. Malgré l'existence de ce paradoxe, l'intérêt potentiel des anti-angiogéniques dans le traitement des NETs de bas grades a largement été démontré par différentes études cliniques (Lindholm et al., 2012; Raymond et al., 2011). Des résultats spectaculaires ont été ont été obtenus avec l'utilisation du sunitinib dans le traitement des

tumeurs pancréatiques neuroendocrines. Dans une étude de phase III, un traitement journalier de 37,5 mg de sunitinib double le taux de survie sans progression (11,4 mois dans le groupe sunitinib vs 5,5 mois dans le groupe contrôle), augmente la survie globale (à la fin de l'étude, 9 décès dans le groupe sunitinib contre 21 dans le groupe contrôle) et le taux de réponse objective (9,3% dans le groupe sunitinib vs 0% dans le groupe contrôle) par rapport au groupe non traité. D'après ces résultats, l'utilisation du sunitinib dans le traitement des tumeurs pancréatiques neuroendocrines est très efficace (Raymond et al., 2011).

9. Les autres voies de signalisations impliquées dans l'angiogenèse

a) La voie de signalisation Notch/Dll4

La formation d'un réseau vasculaire hiérarchisé nécessite un dialogue entre différentes voies de signalisation. Les voies de signalisation Notch et VEGF interagissent à différents niveaux pour réguler l'angiogenèse tumorale. Les vaisseaux tumoraux sont anormaux et peu fonctionnels. Cependant, leur croissance peut encore être bloquée en ciblant ces voies.

i. Son rôle au cours de l'angiogenèse

Au cours de l'angiogenèse, les « tip cells » sont sélectionnées pour guider le bourgeonnement des vaisseaux en formation. Si toutes les cellules endothéliales répondent aux signaux pro-angiogéniques de façon non coordonnée, cela entraine un bourgeonnement non régulé. Les vaisseaux désorganisés ne forment pas un réseau mature et la perfusion est alors limitée. La signalisation Notch/Dll4 pour « Delta like ligand 4 » est essentielle pour la régulation du bourgeonnement vasculaire au cours du développement (Hellstrom et al., 2007). La délétion de Notch ou de Dll4 entraine des défauts majeurs dans la vascularisation et une mortalité embryonnaire (Gale et al., 2004; Limbourg et al., 2005). Une inhibition de cette voie de signalisation augmente la formation de « tip cells », le bourgeonnement et la formation de nouveaux vaisseaux. L'expression de Dll4 est augmentée dans les « tip cells » alors que dans les cellules voisines « stalk cells » la signalisation Notch permet de bloquer l'activation du bourgeonnement de ces cellules. Dll4 est un régulateur négatif du bourgeonnement vasculaire qui est indispensable pour la formation d'un réseau vasculaire normal au cours du développement (Suchting et al., 2007).

L'implication de Notch n'est pas restreinte à une angiogenèse physiologique. L'inhibition de cette voie dans des modèles de tumeurs augmente le bourgeonnement et la formation de nouvelles ramifications de façon excessive. Cependant ces vaisseaux ne sont pas fonctionnels. Cela entraine une augmentation de l'hypoxie et une diminution de la perfusion tumorale.

Bloquer la voie Notch/Dll4 dans les tumeurs inhibe la croissance tumorale. Ainsi la voie de signalisation Notch est considérée comme une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des cancers (Noguera-Troise et al., 2006; Ridgway et al., 2006). La signalisation VEGF est à l'origine de l'effet différentiel de la voie Notch sur les cellules endothéliales en cours de bourgeonnement. L'expression de Dll4 dans les « Tip cells » est induite en réponse au VEGF alors que dans les cellules voisines l'activation de Notch par Dll4 inhibe l'expression du récepteur au VEGF, le VEGFR-2 ce qui limite les réponses pro-angiogéniques dans ces cellules (del Toro et al., 2010; Lobov et al., 2007; Suchting et Eichmann, 2009). L'activation de la voie de signalisation Notch/Dll4 en aval du VEGF joue un rôle majeur dans le remodelage des vaisseaux sanguins tumoraux (Hainaud et al., 2006) mais aussi dans des modèles d'ischémie chez la souris (Cristofaro et al., 2013).

ii. La voie de signalisation Notch/Dll4 comme cible thérapeutique

La voie de signalisation Notch/Dll4 est une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des cancers. La voie de signalisation Notch en réponse au Dll4 contrôle et limite la réponse angiogénique induite par le VEGF. L'angiogenèse induite par le VEGF est excessive et non régulée. Les vaisseaux formés ne sont pas fonctionnels. La voie Notch/Dll4 permet une régulation négative induite par le VEGF lui même pour contrebalancer sa propre activité angiogénique. En réponse, les vaisseaux sont plus fonctionnels car plus différenciés et plus matures. Dans plusieurs modèles précliniques bloquer Dll4 inhibe la croissance tumorale des tumeurs sensibles ou insensibles aux anti-VEGFs. Ces résultats suggèrent que Dll4 constituerait une nouvelle stratégie thérapeutique dans le traitement des cancers. Un anticorps bloquant anti-Dll4, le demcizumab ou OMP-21M18, est en cours d'essai clinique de phase I dans le traitement du cancer pancréatique en association avec la gemcitabine (étude clinique NCT01189929) et celui du cancer du poumon (étude clinique NCT01189968) en combinaison avec le carboplatine. Cependant, les effets secondaires potentiels restent incertains. Une inhibition chronique de Dll4 perturbe l'homéostasie vasculaire ce qui pourrait entrainer des pathologies sévères dans différents organes.

b) La voie de signalisation PDGF/PDGFR

i. Le rôle des péricytes

Les péricytes ont été décrits, il y a plus de 100 ans, comme les cellules musculaires lisses entourant les capillaires sanguins. Ils favorisent la stabilisation vasculaire et régulent le flux sanguin. Mais ces cellules possèdent des fonctions plus complexes. Elles répondent à des stimuli angiogéniques pour guider le bourgeonnement vasculaire. Elles favorisent la survie

des cellules endothéliales et la réponse immunitaire avec une activité proche de celle des macrophages. Comme les macrophages, les péricytes effectuent de la pinocytose et de la phagocytose. Cette fonction inattendue et le rôle des péricytes dans la formation et le maintien des vaisseaux sanguins sont décrits dans la revue suivante (Bergers et Song, 2005).

ii. Le facteur de croissance PDGF-B

Le facteur de croissance PDGF-B est responsable du recrutement des péricytes lors de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales expriment le PDGF-B alors que les péricytes expriment le récepteur du PDGF-B (Betsholtz, 2004). Cette distribution suggère une signalisation paracrine entre les deux types cellulaires (Enge et al., 2002). Une fois recrutés au niveau des vaisseaux sanguins, les péricytes entrainent une différenciation et un arrêt de croissance des cellules endothéliales (Gerhardt et Betsholtz, 2003). Le contact entre les cellules endothéliales et les péricytes active la signalisation TGFβ. Cette activation inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Orlidge et D'Amore, 1987) et diminue l'expression du récepteur VEGFR-2 à la surface des cellules endothéliales (Mandriota et al., 1996). En retour les cellules péri-vasculaires se différencient en péricytes (Ramsauer et D'Amore, 2002). Ainsi, les vaisseaux sanguins sont stabilisés et fonctionnels.

c) Le système Tie/Ang

Une autre voie de signalisation importante dans la maturation vasculaire est le système Tie/Ang. Le récepteur Tie-2 est exprimé à la surface des cellules endothéliales. Sa stimulation par Ang-1 entraine la maturation vasculaire par le recrutement des péricytes. A l'inverse la stimulation par Ang-2, en diminuant le contact entre les cellules endothéliales et les péricytes, déstabilise les vaisseaux sanguins (Sundberg et al., 2002). En présence de VEGF, Ang-2 favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins par bourgeonnement. En absence de VEGF, Ang-2 provoque la mort des cellules endothéliales et la diminution du nombre de vaisseaux (Hanahan, 1997).

i. La maturation vasculaire au sein des tumeurs

L'angiogenèse tumorale provoque une vascularisation désorganisée et chaotique. Les vaisseaux formés sont tortueux avec un diamètre irrégulier et sont perméables. Le flux sanguins n'est donc pas efficace. La stimulation continue des cellules endothéliales par les facteurs pro-angiogénique produits par la tumeur entraine un remodelage constant des vaisseaux sanguins (Bergers et Benjamin, 2003). Les péricytes tumoraux sont également

anormaux. Leur abondance est largement diminuée par rapport au tissu sain et ils sont faiblement attachés aux cellules endothéliales. L'expression des marqueurs spécifiques des péricytes est différente. Dans les tumeurs l'expression du marqueur α-SMA est augmentée dans les péricytes. Cette augmentation est corrélée à une augmentation de la taille tumorale et est associée à une augmentation de l'expression d'un autre marqueur, la desmine dans les tumeurs de stade avancé. (Morikawa et al., 2002). Au cours du développement, la mort de l'embryon est provoquée par une diminution de plus de 90% des péricytes (Abramsson et al., 2003). Cela suggère que la quantité faible de péricytes présente au niveau des vaisseaux tumoraux est suffisante pour assurer la fonctionnalité vasculaire en favorisant la survie des cellules endothéliales et la stabilisation des vaisseaux sanguins. Dans des modèles de tumeurs pancréatiques et coliques, l'inhibition de la voie de signalisation PDGFR provoque un détachement des péricytes. Ces modifications entrainent une diminution de la densité vasculaire et inhibent la croissance tumorale (Bergers et al., 2003; Shaheen et al., 2001). Ces résultats démontrent que les vaisseaux tumoraux utilisent les mêmes signaux qu'au cours du développement embryonnaire. Même si au sein de la tumeur la quantité de péricytes diminue, elle permet de maintenir l'intégrité et la fonctionnalité des vaisseaux. Bloquer la signalisation PDGF constitue donc une méthodologie thérapeutique intéressante dans le traitement des cancers. Cibler le VEGF et le PDGF en même temps semble plus efficace pour déstabiliser les vaisseaux et diminuer la croissance tumorale (Pietras et Hanahan, 2005). En parallèle, les vaisseaux immatures dépourvus de péricytes sont plus sensibles aux thérapies anti-VEGF (Benjamin et al., 1999). Ces résultats suggèrent l'intérêt de cibler les deux voies en même temps. Cela expliquerait l'efficacité des inhibiteurs de récepteurs tyrosine kinase ciblant le VEGFR et le PDGFR sur la diminution de la vascularisation et l'inhibition de la croissance tumorale par rapport aux inhibiteurs spécifiques du VEGF (Bergers et al., 2003; Pietras et Hanahan, 2005; Shaheen et al., 2001).

ii. Les rôles physiologiques du système Ang-Tie

Ang-1, Ang-2, Tie-1 et Tie-2 sont impliqués dans le remodelage et la maturation vasculaire au cours du développement embryonnaire (Augustin et al., 2009). Ang-1 favorise la protection des vaisseaux sanguins. Il réduit la perméabilité vasculaire induite par des facteurs angiogéniques, comme le VEGF, en réduisant les espaces entre les cellules endothéliales (Baffert et al., 2006). Ang-2 favorise le détachement des péricytes dans un contexte angiogénique (Hammes et al., 2004). De plus, il permet le remodelage vasculaire pendant l'inflammation (Tabruyn et al., 2010).

iii. Le système Ang-Tie dans l'angiogenèse tumorale et la formation de métastases

Au cours de l'angiogenèse tumorale, l'expression d'Ang-2 est augmentée. Les niveaux plasmatiques chez les patients permettent d'évaluer la progression et la formation de métastases dans les mélanomes (Helfrich et al., 2009) et les cancers de la vessie (Szarvas et al., 2008). L'augmentation de l'expression d'Ang-2 entraine le détachement des péricytes et la régression vasculaire. Cela entraine l'apparition de zones hypoxiques, la production de VEGF et l'initiation de l'angiogenèse (Holash et al., 1999a). Différentes études cherchent à comprendre comment Ang-1 et Ang-2 peuvent induire respectivement une stabilisation vasculaire et une angiogenèse en se liant au même récepteur Tie-2 (Saharinen et al., 2008). L'inhibition d'Ang-2 réduit la croissance tumorale dans différents modèles murins. Ces résultats suggèrent qu'Ang-2 a un rôle prépondérant dans les cancers (Huang et al., 2011). Ang-2 est un régulateur important de l'angiogenèse, de la maturation et de l'intégrité vasculaire. L'expression dynamique d'Ang-2 est corrélée avec une angiogenèse exacerbée et un mauvais pronostic vital dans plusieurs types de tumeurs. Ang-2 est donc une cible thérapeutique intéressante. Dans des modèles de xénogreffes, son inhibition limite l'angiogenèse et la croissance tumorale (Leow et al., 2012). L'étude de la croissance cellules tumorales syngéniques dans des modèles murins Ang-2 -/- suggèrent qu'Ang-2 est requis pour les premières étapes du développement tumoral (Nasarre et al., 2009). Dans le cancer du sein, l'expression d'Ang-2 induit une modification profonde du phénotype vasculaire tumoral (Reiss et al., 2009). Inhiber Ang-2 réduit la croissance tumorale, la quantité de vaisseaux sanguins et favorise la maturation vasculaire. Bloquer Ang-1 n'inhibe pas la vascularisation ni la croissance tumorale. Inhiber Ang-1 en combinaison avec Ang-2 prévient la normalisation vasculaire (Falcon et al., 2009). Combiner l'inhibition d'Ang-2 avec l'utilisation des chimiothérapies ou des molécules anti-angiogéniques augmente l'effet anti-tumoral par rapport à la monothérapie (Brown et al., 2010; Hashizume et al., 2010). Dans les glioblastomes, la surexpression d'Ang-2 inhibe les effets du traitement anti-VEGFR-2. Ces résultats suggèrent que des niveaux élevés d'Ang-2 inhibent l'effet des thérapies anti-angiogéniques (Chae et al., 2010). Des études cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité anti-tumorale de la combinaison d'inhibiteurs d'Ang-2 et d'anti-angiogéniques. Au cours d'un traitement anti-angiogénique, Ang-1 protège la vascularisation tumorale, limite l'hypoxie, augmente le diamètre et la maturation des vaisseaux sanguins (Huang et al., 2009). La normalisation vasculaire observée au cours d'un traitement anti-angiogénique dépend de l'expression d'Ang-1 (Nasarre et al., 2009). Une augmentation de l'expression d'Ang-1 dans

la tumeur est responsable du recrutement des péricytes au cours de la normalisation vasculaire observée au cours d'un traitement anti-VEGFR-2 (Winkler et al., 2004).

En conclusion, le système Ang-Tie, en particuliers Ang-2, est une nouvelle cible thérapeutique pour les traitements anti-angiogéniques. Cibler Ang-2 améliorerait l'efficacité des traitements anti-VEGF. Cependant les mécanismes moléculaires résultants de l'activation de la voie de signalisation Ang-Tie ne sont pas totalement élucidés. Une meilleure compréhension est indispensable pour la mise en place des thérapies futures.

10. La lymphangiogenèse

Le système lymphatique joue un rôle essentiel dans la réponse immunitaire. Il facilite l'activation des défenses de l'organisme. Il permet de mettre en contact les antigènes et les cellules immunitaires au niveau des ganglions lymphatiques. Les vaisseaux lymphatiques sont également importants au cours du développement tumoral. Ils facilitent l'invasion tumorale et la dissémination métastatique. Le système lymphatique est considéré actuellement comme une cible thérapeutique potentielle dans le traitement des cancers.

a) Le couple VEGFR-3/VEGF-C ou VEGF-D

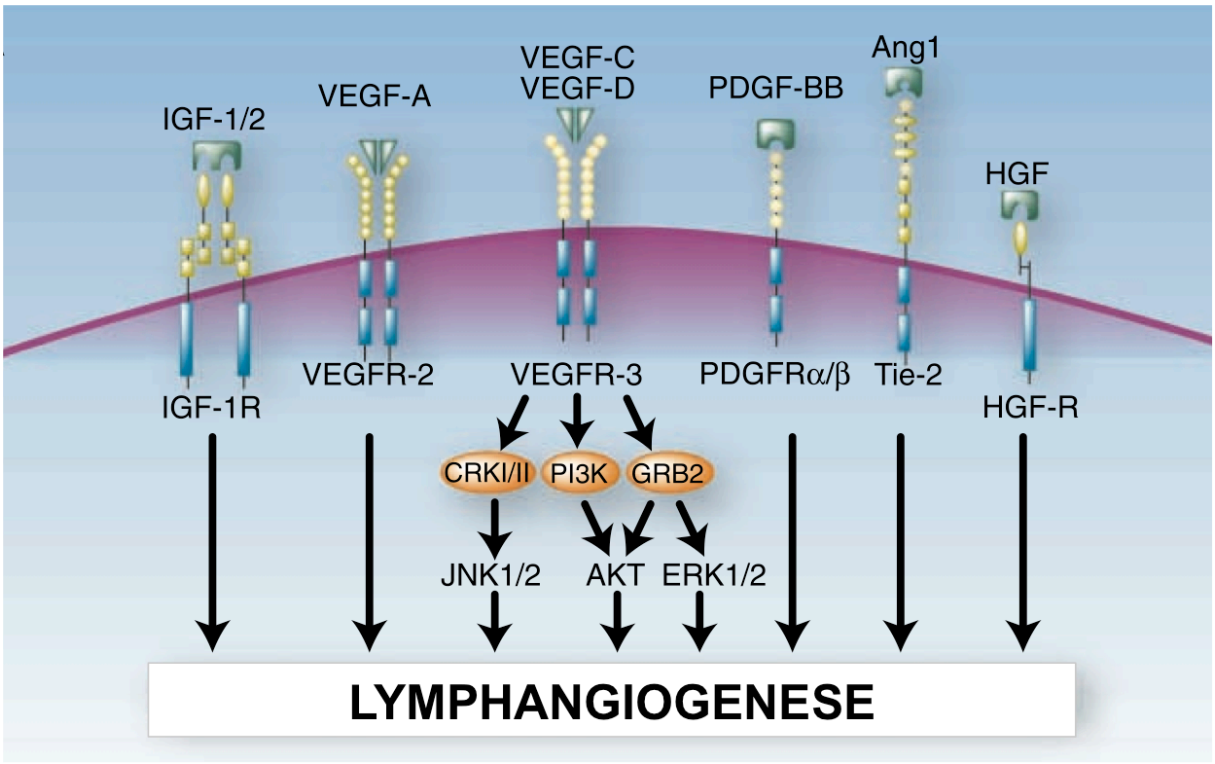
Le système VEGFR-3/VEGF-C/VEGF-D est un des acteurs majeurs dans le développement du système lymphatique (Karkkainen et al., 2004). L'invalidation du récepteur ou des ligands entraine la mort au cours du développement embryonnaire (Alitalo et al., 2005). Les cellules endothéliales lymphatiques se différencient à partir des vaisseaux sanguins. Ce mécanisme dépend de l'expression du facteur de transcription PROX-1 qui détermine la différenciation en cellule endothéliale lymphatique (Oliver et Alitalo, 2005; Wigle et Oliver, 1999). Deux copies fonctionnelles du gène *prox1* sont nécessaires pour induire la différenciation des cellules endothéliales lymphatiques et la formation des valves lymphatiques (Oliver et Srinivasan, 2010). Une autre protéine importante dans ce système est la glycoprotéine LYVE-1 pour «Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor 1». Il s'agit d'un homologue du récepteur CD44. C'est un marqueur des cellules endothéliales lymphatiques très utilisé dans les tissus normaux et tumoraux pour détecter la présence de vaisseaux lymphatiques. Mais le rôle physiologique de LYVE-1 dans le système lymphatique n'est toujours pas élucidé. Un article récent démontre une interaction entre FGF-2 et LYVE-1. FGF-2 induit la lymphangiogenèse de façon directe (Shin et al., 2006) ou indirecte via la surexpression de VEGF-C (Cao et al., 2012a). LYVE-1 inhibe la lymphangiogenèse induite par FGF-2. Ces

résultats suggèrent une interaction fonctionnelle entre LYVE-1 et FGF-2 (Platonova et al., 2013).

b) La lymphangiogenèse et la progression tumorale

La lymphangiogenèse est impliquée dans la progression tumorale. Le système lymphatique est la route privilégiée pour la dissémination métastatique (Fukumura et al., 2010). Les caractéristiques structurales des vaisseaux lymphatiques facilitent l'échappement des cellules tumorales. Ils sont dépourvus de lame basale et de jonctions serrées. Les jonctions intercellulaires sont beaucoup plus lâches que celles des vaisseaux sanguins. Enfin, les mouvements de fluides à l'intérieur des vaisseaux lymphatiques sont beaucoup plus lents. Ces caractéristiques facilitent l'entrée des cellules tumorales et la formation de métastases, cause majeure de mortalité (Achen et al., 2005).

Plusieurs études montrent une corrélation entre la lymphangiogenèse tumorale et l'envahissement des ganglions lymphatiques par les cellules tumorales (Achen et al., 2006). Cette invasion est souvent la première étape nécessaire à la dissémination métastatique. Les tumeurs sur-expriment le VEGF-C et le VEGF-D par rapport au tissu sain. Cette expression est attribuée aux cellules tumorales et aux cellules stromales infiltrant la tumeur. La production de VEGF-C et de VEGF-D par les macrophages amplifie la lymphangiogenèse tumorale (Tammela et Alitalo, 2010). En parallèle, la production par les cellules tumorales d'autres facteurs de croissance, comme le VEGF, le FGF, le PDGF, l'HGF et l'IGF induit également la lymphangiogenèse et la formation de métastases. Ces facteurs permettent le recrutement, au sein de la tumeur, des cellules inflammatoires qui stimulent la production de VEGF-C (Tammela et Alitalo, 2010) (FIG10).



<u>Figure 10</u> : Les récepteurs et les voies de signalisation impliqués dans la lymphangiogenèse

Ce schéma illustre les principaux récepteurs et voies de signalisation majeures impliquées dans la lymphangiogenèse. Ces récepteurs sont présents à la surface des cellules endothéliales lymphatiques et l'activation des voies de signalisation en aval régule la lymphangiogenèse. Les récepteurs impliqués dans la régulation de la lymphangiogenèse et les voies impliquées sont également impliqués dans la régulation de l'angiogenèse. Un lien étroit existe entre ces deux processus majeurs. *(D'après Wissmann C et Detmar M, Clinical Cancer Research, 2006)*

c) Un lien étroit entre angiogenèse et lymphangiogenèse

Dans des modèles murins, l'inhibition de la lymphangiogenèse par une forme soluble du récepteur VEGFR-3 ou un anticorps bloquant réduit l'invasion des ganglions lymphatiques par les cellules tumorales (Tammela et Alitalo, 2010). La signalisation VEGFR-3 contribue également à l'angiogenèse tumorale. Ce récepteur est présent sur les deux types de cellules endothéliales (Tammela et al., 2008). L'implication de ce récepteur à la fois dans l'angiogenèse et la lymphangiogenèse en fait une cible thérapeutique intéressante. Bloquer VEGFR-3 permettrait d'agir en même temps sur l'angiogenèse et la lymphangiogenèse pour limiter la progression tumorale. De plus, certaines formes de VEGF-C se lient au VEGFR-2 et donc exercent une action pro-angiogénique (Hirakawa et al., 2005). Ces résultats suggèrent un lien étroit entre l'angiogenèse et la lymphangiogenèse validant l'intérêt de cibler ces deux voies en parallèle dans les traitements anti-cancéreux. Plusieurs études établissent un lien direct entre la densité de vaisseaux lymphatiques et la formation de métastases intra ganglionnaires (Ji, 2006). Mais le développement lymphatique est également associé à un meilleur de taux de survie. Il faciliterait le recrutement des cellules dendritiques et la mise en place d'une réponse immunitaire dirigée contre les cellules tumorales (Ji, 2006). Il existe également une corrélation directe entre l'expression de VEGF-C/D et la formation de métastases ganglionnaires (Wissmann et Detmar, 2006). Des efforts sont nécessaires pour confirmer la valeur pronostique de la lymphangiogenèse dans la progression des différents types de cancers (Van der Auwera et al., 2006).

En conclusion, un lien étroit existe entre l'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorale. Ces deux mécanismes sont indispensables à la croissance tumorale et à la dissémination métastatique. De nombreux facteurs régulateurs sont communs aux deux mécanismes. Trouver un moyen de cibler de manière concomitante l'angiogenèse et la lymphangiogenèse limiterait de façon plus efficace la croissance tumorale et l'apparition de résistances souvent observées lors des traitements. C'est le cas par exemple du sunitinib et du sorafenib, deux inhibiteurs qui bloque, entre autre, l'activation des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Cela pourrait expliquer l'efficacité plus importante de ces inhibiteurs par rapport au BVZ spécifique du VEGF-A.

PARTIE 2 : Inflammation et cancer « Un tandem de choc »

L'inflammation a un rôle critique dans le développement tumoral (Karin, 2006). Le microenvironnement inflammatoire est un composant essentiel des tumeurs (Mantovani et al., 2008). Les deux voies de signalisations majeures sont la voie NFκB et la voie de signalisation STAT3. Une inflammation chronique peu favoriser le développement tumoral. Les personnes présentant des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) ont un risque plus important de développer un cancer colorectal (Jawad et al., 2011; Waldner et Neurath, 2009). L'infection par des virus de type HPV oncogènes (pour « Human Papilloma Virus ») augmente le risque de développer différents cancers, comme les cancers du col de l'utérus et les cancers de la tête et du cou. Toutes les inflammations chroniques ne sont pas associées à un risque accru de développer des cancers. Par exemple, le psoriasis, une maladie inflammatoire auto-immune de la peau, n'est pas associé à un risque plus élevé de développer un cancer de la peau (Nickoloff et al., 2005).

1. Les mécanismes de l'inflammation

Les mécanismes inflammatoires peuvent être induits par des expositions environnementales, comme l'alimentation et l'exposition au soleil. L'exposition au tabac entraine une obstruction et une inflammation pulmonaire et augmente le risque de cancer du poumon (Punturieri et al., 2009). L'obésité entraine une inflammation chronique qui favorise les carcinomes hépatocellulaires (Park et al., 2010). Ce développement tumoral induit par l'obésité dépend de l'augmentation de la production de deux types de cytokines pro-tumorales, l'IL-6 et le TNFα. Cette production provoque une inflammation du foie qui active le facteur de transcription oncogénique STAT3 et favorise le développement de cancers. La tumeur elle-même modifie le microenvironnement tumoral et favorise une réponse inflammatoire et pro-tumorale (Mantovani et al., 2008). Certains oncogènes favorisent également l'environnement inflammatoire. L'activation de Ras et c-Myc favorise le recrutement de leucocytes et de lymphocytes qui produisent des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires et pro-angiogéniques (Soucek et al., 2007). Les médiateurs clés de l'inflammation sont par exemple, l'IL-1β, l'IL-6, l'IL-23 et le TNFα. Quand la tumeur est privée d'oxygène et de nutriments, elle nécrose et libère des médiateurs pro-inflammatoires, comme l'IL-1β (Vakkila et Lotze, 2004). Ces molécules favorisent l'angiogenèse ou encore la survie des cellules tumorales (Karin, 2006). Dans le cancer du poumon, les cellules tumorales favorisent l'inflammation en sécrétant différentes molécules pro-inflammatoires (Kim et al., 2009). Les thérapies anti-

cancéreuses amplifient cet état inflammatoire. En particuliers, la radiothérapie et la chimiothérapie sont associées à une nécrose tissulaire qui favorise la réaction inflammatoire (Zong et Thompson, 2006). Cette nécrose peut donc favoriser la croissance tumorale (Ammirante et al., 2010) et la présentation antigénique, donc la réponse immunitaire anti-tumorale (Zitvogel et al., 2008).

2. Les acteurs de l'inflammation

Le microenvironnement tumoral contient des cellules de l'immunité innée (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques, cellules NK pour « Natural Killer »), de l'immunité adaptative (lymphocytes B et T) et des cellules stromales (fibroblastes et cellules endothéliales). Ces différents types cellulaires communiquent par contact ou de façon autocrine pour contrôler la croissance tumorale. L'inflammation, selon les conditions, favorise la croissance tumorale ou au contraire l'immunité anti-tumorale. Ces deux mécanismes coexistent au sein d'une tumeur et régulent la progression tumorale. La présence de macrophages favorise l'angiogenèse, la croissance tumorale et l'invasion métastatique (Condeelis et Pollard, 2006) et corrèle avec un mauvais pronostic vital (Murdoch et al., 2008). Les lymphocytes T peuvent avoir une activité pro et anti-tumorale (DeNardo et al., 2009). Dans le cancer du colon, du pancréas et dans le mélanome, l'augmentation des lymphocytes T diminue la croissance tumorale et augmente la survie (Laghi et al., 2009). Mais les lymphocytes T peuvent aussi faciliter la formation de métastases (Aspord et al., 2007). L'activité pro-tumorale de ces cellules est assurée par la production de cytokines (Lin et Karin, 2007). Les mêmes cellules peuvent avoir des effets opposés en fonction de leur état de différenciation, du type de tumeur et des cytokines produites. Le profil d'expression des cytokines et chimiokines au sein du microenvironnement tumoral défini l'effet pro ou anti-tumoral. Les seules cellules immunitaires qui n'exercent pas d'activité pro-tumorale sont les cellules NK. Les lymphocytes T régulateurs exercent une activité pro-tumorale en supprimant l'immunité anti-tumorale (Gallimore et Simon, 2008). Les macrophages ont un rôle central dans les réponses immunitaires innées et adaptatives. Ces cellules sont activées par plusieurs stimuli et polarisées vers des phénotypes différents. Il existe deux sous-types de macrophages : les macrophages de type M1 qui secrètent des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12, l'IL-23 et le TNFα et les macrophages de type M2 qui secrètent des molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGFβ. Les macrophages de type M1 possèdent une activité anti-tumorale et favorisent la destruction des cellules tumorales (Mantovani et al., 2002). Dans les tumeurs, la plupart des macrophages sont de type M2 et

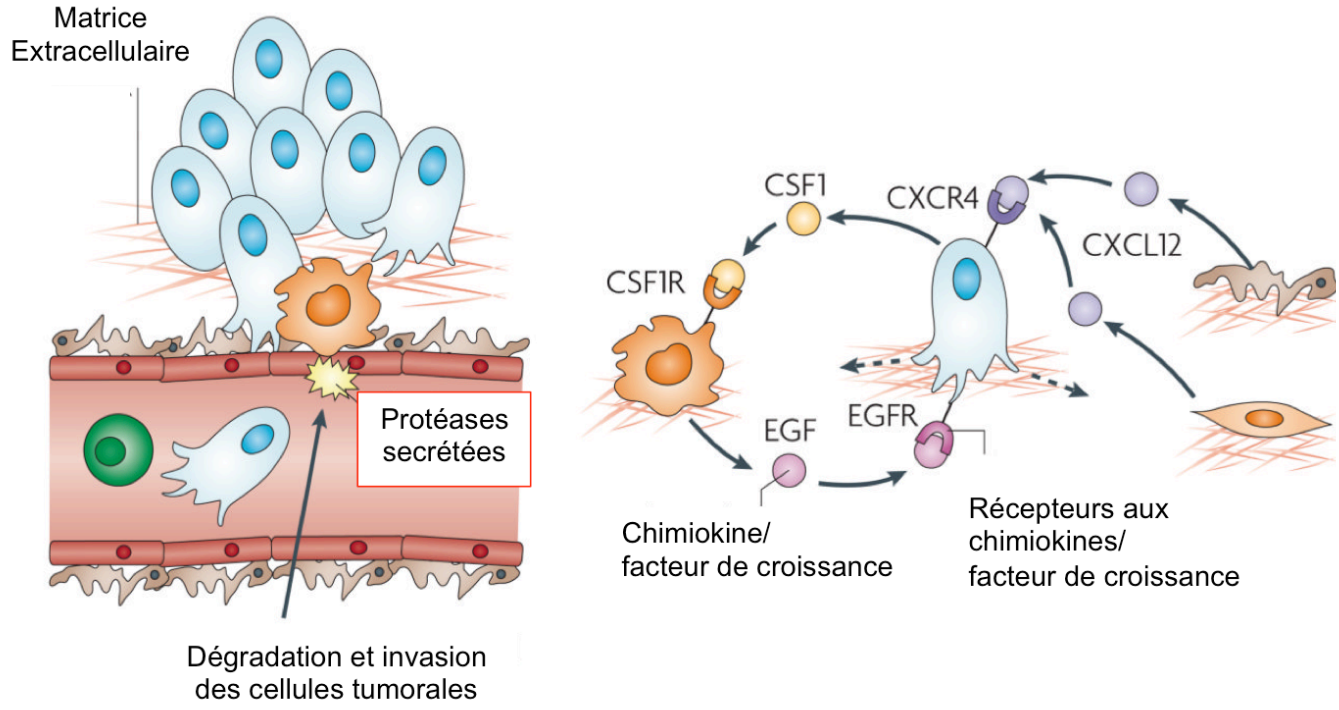
créent un environnement immunosuppresseur qui favorise l'angiogenèse et la croissance tumorale ainsi que la formation de métastases (Hao et al., 2012). Le dialogue entre les cellules tumorales et les macrophages favorise la tumorigenèse et la résistance aux traitements (Jinushi et al., 2011). Comme pour les macrophages, les neutrophiles infiltrants la tumeur possèdent deux états de différenciation et d'activation différents: les neutrophiles de types N1 anti-tumoraux et les neutrophiles de type N2 pro-tumoraux. Cet état de différenciation est régulé par le TGFβ (Fridlender, 2009).

3. Inflammation et angiogenèse

Il existe un lien étroit entre l'angiogenèse et l'inflammation. Le recrutement de macrophages au sein de la tumeur favorise la production de facteurs pro-angiogéniques et donc l'angiogenèse tumorale. La production de VEGF, facteur essentiel de l'angiogenèse tumorale, favorise le recrutement de monocytes au sein de la tumeur. Ces cellules secrètent des cytokines pro-inflammatoires et favorisent une angiogenèse indépendante du VEGF. Bloquer le recrutement des leucocytes augmente l'activité de certains anti-angiogéniques ciblant le VEGF. Des gènes importants pour l'angiogenèse sont directement régulés par des voies de signalisation inflammatoires (Kujawski et al., 2008). Inhiber les macrophages ou les voies de signalisation NFκB et STAT3 inhibe l'angiogenèse et la croissance tumorale. Ces résultats suggèrent un rôle critique de l'inflammation dans l'angiogenèse tumorale (Joyce et Pollard, 2009). Les facteurs NFκB et STAT3 ont un rôle central dans la tumorigenèse en régulant différentes fonctions dans les cellules tumorales et dans les cellules immunitaires. Dans ces dernières, NFκB induit la transcription de différents gènes codant pour des cytokines pro-inflammatoires. Dans les cellules tumorales, NFκB et STAT3 contrôle l'apoptose et favorise la prolifération et la migration. La voie NFκB active les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 (Catz et Johnson, 2001) et Bcl-xl (Chen et al., 2000) et inhibe p53 (Colotta et al., 2009). La voie STAT3 régule l'activation de la cycline D1, de c-MYc et stimule la prolifération cellulaire (Bollrath et al., 2009).

4. Inflammation et dissémination métastatique

Les capacités invasives des cellules tumorales augmentent en présence de cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-1β, l'IL-6 et le TNFα. Le TNFα augmente l'expression du récepteur CXCR4 à la surface des cellules cancéreuses ovariennes. Le ligand CXCL12 augmente l'angiogenèse et l'invasion des cellules tumorales (Kulbe et al., 2005) (FIG11).



<u>Figure 11</u> : L'invasion tumorale, une étape clé dans la formation de métastases

a. La modulation des jonctions cellules-cellules et la dégradation de la membrane basale sont indispensables à l'entrée des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins. Cette dégradation est favorisée par la production de protéases par les cellules tumorales et les macrophages présents au sein du microenvironnement tumoral. **b.** La migration des cellules tumorales est stimulée par plusieurs boucles paracrines (l'EGF, CSF1, la cytokine CXCL12 et leurs récepteurs) qui favorisent la migration directionnelle des cellules tumorales et la formation de métastases. *(D'après Joyce PA et Pollard JW, Nature Review Cancer, 2009)*

Dans le cancer du sein, l'expression de TNFα favorise la transition épithélium-mésenchyme Bates et Mercurio, 2003). Dans des modèles murins de cancer du sein, la déplétion des macrophages ne bloque pas la croissance tumorale mais empêche la formation de métastases pulmonaires (Lin et al., 2001). Dans le cancer ovarien, la présence de macrophages infiltrants augmente l'échappement tumoral. Dans le cancer du poumon, les cellules tumorales produisent du CCL9 qui permet le recrutement de cellules myéloïdes au sein de la tumeur. Ces cellules favorisent l'invasion en sécrétant MMP2 et MMP9 indispensables à la dégradation de la matrice extracellulaire (Kitamura et al., 2007). Les cytokines et les chimiokines présentes dans le microenvironnement tumoral augmentent la survie, la migration et l'invasion des cellules tumorales circulantes (Nguyen et al., 2009). Bloquer ces molécules, réduit la croissance de la tumeur primaire et la capacité des cellules à coloniser les autres organes (Marchesi et al., 2004; Shields et al., 2007). Cependant, la déplétion des macrophages ou des lymphocytes diminue la formation de métastases dans des modèles murins de cancer du sein (DeNardo et al., 2009; Joyce et Pollard, 2009).

5. Inflammation et réponse immunitaire anti-tumorale

Les cellules tumorales expriment des antigènes tumoraux pouvant être reconnus par le système immunitaire. Cela favorise la mise en place d'une immuno surveillance et l'élimination des cellules tumorales par les lymphocytes T et les cellules NK (Dunn et al., 2004). Cette surveillance immunitaire et l'effet pro-tumoral de l'inflammation coexistent au sein de la même tumeur (Bui et Schreiber, 2007). Cette surveillance a été mise en évidence pour la première fois dans des souris déficientes pour le gène *rag2*. Ces souris qui sont dépourvues de lymphocytes T matures, développent des tumeurs spontanées (Shankaran et al., 2001). Avant que la tumeur n'échappe au système immunitaire, il se créé un état d'équilibre entre croissance tumorale et destruction de la tumeur par le système immunitaire. Cet état d'équilibre entraine la mise en place d'un état de dormance de la tumeur (Koebel et al., 2007). Les cellules tumorales modifient constamment le répertoire d'antigènes pour diminuer la réponse anti-tumorale.

La chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie induisent une inflammation systémique locale. Cette inflammation est due à l'agression des tissus et la mort des cellules tumorales qui entraine la libération de médiateurs inflammatoires. En parallèle, l'inflammation induite stimule la présentation antigénique par les cellules dendritiques infiltrantes et la production de cytokines qui augmentent la réponse immunitaire anti-tumorale (Zhang et al., 2007). Les raisons de cet effet différentiel de la nécrose ne sont pas connues.

6. L'inflammation comme cible thérapeutique

D'après l'ensemble de ces observations, supprimer l'inflammation limiterait le développement tumoral. L'environnement inflammatoire peut augmenter le taux de mutations responsables de l'initiation tumorale et la prolifération des cellules mutées. Les cellules inflammatoires produisent des espèces réactives de l'oxygène (ROS) qui entrainent des dommages à l'ADN et une instabilité génétique (Hussain et al., 2003). En retour, l'activation de certains oncogènes stimule certaines voies de signalisation et favorise la production de cytokines inflammatoires (Mantovani et al., 2008). L'inflammation active différents processus impliqués dans la progression tumorale. Les cellules inflammatoires sont une source de cytokines pro-tumorales, comme l'IL-1β, le TNFα, l'IL-6 et l'IL-23 qui stimulent de façon continue la prolifération et la survie des cellules tumorales. Cibler ces cytokines inhibe la croissance tumorale (Grivennikov et al., 2009; Hedvat et al., 2009). Le ciblage de l'inflammation dans le traitement des cancers serait-il une bonne alternative thérapeutique ? L'avantage majeur est que les cellules cibles sont des cellules normales. Ces cellules ne sont pas en mutation constante ce qui limite l'apparition de résistances. Mais cibler l'inflammation n'est pas suffisant. Il faut combiner au traitement une chimiothérapie conventionnelle. Dans le cancer du poumon, l'utilisation d'une drogue anti-inflammatoire diminue l'incidence et la progression tumorale et augmente la survie des patients (Gupta et Dubois, 2001). L'aspirine réduit l'incidence de cancers du sein (Gierach et al., 2008) et le risque d'apparition de cancers de la prostate (Liu et al., 2006). Des antagonistes des récepteurs de l'IL-6 (IL-6R) et de CXCL12/SDF-1 (CXCR4) sont actuellement en cours d'évaluation thérapeutique respectivement dans le cancer de la prostate et les leucémies. Une étude clinique portant sur l'efficacité thérapeutique d'un inhibiteur du TNFα dans le traitement de différents types de cancers avancés a montré une stabilisation de la maladie et dans certains cas une réponse partielle (Brown et al., 2008; Madhusudan et al., 2005). Les résultats les plus encourageants ont été obtenus pour le traitement des RCC résistants à l'immunothérapie. Dans cette étude, les niveaux plasmatiques des cytokines inflammatoires TNFα, IL-6 et CCL-2 pourraient constituer des marqueurs pronostic et prédictifs dans les RCCs (Harrison et al., 2007).

En conclusion, l'inflammation affecte les différents aspects du développement tumoral et de la réponse aux traitements. L'inflammation augmente le risque de développer différents cancers (vessie, intestin, œsophage, ovaire, prostate, thyroïde). Plusieurs types de cellules immunitaires et inflammatoires sont présents au sein du microenvironnement tumoral. Les cellules immunitaires affectent les cellules tumorales par la production de cytokines, de

chimiokines, de facteurs de croissance. L'inflammation est importante à tous les stades du développement tumoral, de l'initiation à la dissémination métastatique. Dans une tumeur les mécanismes inflammatoires pro- et anti-tumoraux coexistent. Mais si la tumeur n'est pas éliminée par le système immunitaire alors ce sont les effets pro-tumoraux qui dominent.

Les évidences en faveur d'un lien étroit entre inflammation et cancer sont:

- les maladies inflammatoires augmentent le risque de développer certains cancers comme les cancers de l'intestin, de l'ovaire et de la prostate.
- l'utilisation de molécules anti-inflammatoires réduit le risque de développer certains cancers comme les cancers du colon et du sein. Une réduction de la mortalité est également observée.
- les voies de signalisation inflammatoires sont en aval de certains oncogènes impliqués dans le développement tumoral comme Ras, c-Myc et Ret.
- les cellules inflammatoires ou les cytokines et les chimiokines impliquées dans l'inflammation sont présentes au sein du microenvironnement.
- cibler les médiateurs inflammatoires comme les cytokines (IL-1β, TNFα), les chimiokines, les facteurs de transcription (NFκB, STAT3) ou les cellules inflammatoires elles mêmes diminue l'incidence et le développement de certains cancers.
- le transfert de cellules inflammatoires ou l'augmentation des cytokines inflammatoires au sein de la tumeur favorise le développement tumoral.

L'inflammation régule tous les aspects du développement tumoral. Cibler l'inflammation permettrait d'attaquer la tumeur sur plusieurs fronts.
Pour cibler l'inflammation il faudrait :

- bloquer les facteurs importants pour la régulation de la survie des cellules tumorales induite par l'inflammation.
- bloquer les cytokines qui attirent les cellules immunitaires au sein de la tumeur.
- moduler les réponses inflammatoires provoquées par les traitements anti-cancéreux.
- bloquer les cytokines favorisant le développement tumoral.
- éliminer les cellules immunitaires et inflammatoires du microenvironnement tumoral.

En conclusion, il existe un lien étroit entre inflammation et cancer. Les médiateurs de l'inflammation régulent, entre autres, l'angiogenèse tumorale et la formation de métastases. Ces molécules sont donc très importantes dans le développement tumoral et représentent des cibles thérapeutiques intéressantes.

PARTIE 3: Les chimiokines, des régulateurs majeurs de l'angiogenèse tumorale et de la formation de métastases

Les chimiokines (contraction de « chemotactic cytokine ») font parties d'une large famille de cytokines de faible poids moléculaire (entre 8 et 11 kDa) connues pour attirer et activer sélectivement différents types cellulaires. Il existe plus de 50 chimiokines classées en quatre sous-familles : CXC, CC, C et CX_3C. Nous nous focaliserons par la suite sur la famille des cytokines CXC dont un rôle majeur dans l'angiogenèse est bien établi. Comme je l'ai décrit dans la partie précédente, la fonction primaire des chimiokines est de réguler l'inflammation et la réponse immunitaire en attirant les leucocytes. Elles jouent également un rôle dans le développement tumoral et en particuliers dans la croissance, l'angiogenèse et la formation de métastases. Ces différentes fonctions font des chimiokines des molécules importantes pour le dialogue entre les cellules tumorales et leur microenvironnement. L'angiogenèse est un processus biologique critique dans des conditions physiologiques et pathologiques. Une grande variété de facteurs active ou inhibe l'angiogenèse. L'angiogenèse tumorale est induite par une modification de la balance angiogénique en faveur des facteurs pro-angiogéniques. La famille des cytokines CXC est composée de membres pro- ou anti-angiogéniques qui pèsent dans cette balance et régulent l'angiogenèse.

1. Les cytokines CXC

Ces cytokines sont caractérisées par la présence de quatre résidus cystéines dont les deux premiers sont séparés par un acide aminé non conservé (Strieter et al., 1995b; Strieter et al., 1995c). La présence dans la partie N-terminale de la protéine d'un motif conservé acide glutamique-leucine-arginine (ELR) détermine l'activité des différentes cytokines CXC (Luster, 1998; Vandercappellen et al., 2008). Ce motif protéique définit deux sous familles; les cytokines ELR- et les cytokines ELR+. Les cytokines qui possèdent ce motif ont une importante activité pro-angiogénique alors que celles qui ne le possèdent pas, comme la cytokine CXCL4 (ou PF-4 pour « Platelet Factor 4 ») et les autres cytokines induites par l'interféron (IFN) sont des inhibiteurs puissants de l'angiogenèse (Strieter et al., 1995c). Les

cytokines ELR- inhibent la néo-vascularisation induite par les facteurs angiogéniques classiques comme le FGF-2 et le VEGF (Keeley et al., 2011; Strieter et al., 1995a).

a) L'activité pro-angiogénique des cytokines

La famille des cytokines ELR+ regroupe les cytokines CXCL1, 2, 3, 5, 6, 7 et 8. Seules ou en association avec d'autres facteurs angiogéniques et de façon directe ou indirecte ces cytokines stimulent l'angiogenèse tumorale. Par exemple, le VEGF augmente l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules endothéliales. Cette augmentation favorise la production de CXCL8 par les cellules endothéliales (Nor et al., 2001).

i. Un rôle prépondérant du CXCL8

Parmi l'ensemble des cytokines ELR+, le rôle de CXCL8 (également appelé IL-8) est très étudié dans l'angiogenèse. L'injection de CXCL8 dans la cornée de rat favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales (Koch et al., 1992). CXCL8 agit directement sur les cellules endothéliales. Il augmente leur survie (Yoshida et al., 1997), leur prolifération (Li et al., 2003) et limite l'apoptose (Li et al., 2005).

L'activité de CXCL8 sur les cellules endothéliales est directement liée à sa fixation sur les récepteurs CXCR1 et CXCR2 présents à la surface des cellules endothéliales ou des cellules tumorales. Cette liaison favorise l'expression des cytokines et l'angiogenèse tumorale. CXCL8 exerce son activité angiogénique en augmentant l'activité des MMP-2 et MMP-9 dans les cellules tumorales et les cellules endothéliales (Li et al., 2005). La dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs est un événement précoce requis pour induire l'angiogenèse tumorale. Il existe une corrélation entre des niveaux élevés de CXCL8 et l'angiogenèse tumorale, la progression et la formation de métastases dans des modèles de xénogreffes de cellules cancéreuses humaines. Dans un modèle murin de cancer ovarien, l'expression de CXCL8 est directement corrélée avec la néo-vascularisation et un taux de survie faible (Yoneda et al., 1998). CXCL8 joue également un rôle dans l'angiogenèse associée au cancer du sein et de la prostate. Les niveaux de CXCL8 sont élevés chez les patients et sont corrélés au stade de la maladie (Benoy et al., 2004; Uehara et al., 2005). Dans les mélanomes l'expression de CXCL8 et de ces récepteurs favorise l'angiogenèse, la progression tumorale et la formation de métastases. L'inhibition de CXCL8 dans le mélanome limite la croissance tumorale et la dissémination métastatique (Singh et al., 2010b). L'activation constitutive de la voie de signalisation MAPK/ERK dans les cellules de mélanomes inhibe l'activité de la protéine tristetraproline (TTP) ce qui permet une stabilisation de l'ARNm de CXCL8. La perte d'expression de TTP représente un événement

clé dans l'établissement du mélanome via une expression constitutive de CXCL8 (Bourcier et al., 2011). Dans le cancer du colon, une augmentation de l'expression de la cytokine CXCL8 dans le microenvironnement tumoral favorise la croissance tumorale et la formation de métastases (Lee et al., 2012) La cytokine CXCL8 est également impliquée dans la croissance et l'invasion tumorale dans le cancer du sein (Yao et al., 2007). L'expression de CXCL8 est régulée par l'oncogène RAS et est concomitante de l'expression de VEGF dans les cellules transformées par RAS V12 (Sparmann et Bar-Sagi, 2004).

ii. Les autres cytokines pro-angiogéniques

D'autres cytokines ELR+, sont associées à l'angiogenèse et au développement tumoral. Chez la souris, une déplétion de CXCL5 (ENA-78 chez la souris) atténue la croissance tumorale, l'angiogenèse et la formation de métastases (Arenberg et al., 1998). Dans le cancer du rein, des niveaux élevés de CXCL1, CXCL3, CXCL5 et CXCL8 sont présents dans la tumeur et le plasma et le récepteur CXCR2 est exprimé sur les cellules endothéliales présentes autour de la tumeur (Mestas et al., 2005). L'expression des cytokines CXCL1 et CXCL2 favorise la survie des cellules tumorales au niveau des sites métastatiques et la résistance à la chimiothérapie (Acharyya et al., 2012). L'expression de CXCL1 favorise la migration et l'invasion des cellules de cancers de la prostate (Kuo et al., 2012). L'expression de la cytokine CXCL7 favorise les capacités invasives des cellules de cancers du sein (Tang et al., 2008). L'expression de CXCL7 est augmentée chez les patients atteints de cancer du poumon (Lee et al., 2011). Les modulations d'expression des cytokines CXCL5, 7 et 8 influence l'évolution primaire des cancers du sein (Wang et al., 2013a).

b) Les récepteurs CXCR1 et CXCR2

Toutes les cytokines CXC ELR+ exercent leur activité en se liant au récepteur CXCR2. Deux récepteurs existent CXCR1 et CXCR2 mais CXCR1 est spécifique des cytokines CXCL6 et CXCL8 alors que toutes les cytokines activent CXCR2 (Addison et al., 2000b). CXCR1 et CXCR2 sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires. La liaison du ligand entraine l'activation de plusieurs voies de signalisation. La voie des protéines kinases C, de la phospholipase C, la voie PI3K/AKT/mTOR, la voie ERK et la voie NFκB sont les voies majoritaires. Ces voies de signalisation favorisent la prolifération, la migration et l'inhibition de l'apoptose. L'importance du récepteur CXCR2 dans l'angiogenèse tumorale induite par les cytokines ELR+ a largement été étudié dans des modèles murins. Le récepteur CXCR2 est nécessaire et suffisant pour induire l'angiogenèse tumorale dans un modèle murin de cancer du poumon (Keane et al., 2004). Dans ce modèle, l'inhibition de CXCR2 réduit la croissance

tumorale et la formation de métastases. Dans le cancer du sein, un lien intéressant a été établi entre l'expression de CXCR1 et la présence de cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur. Une population de cellules cancéreuses souches capables de se diviser de façon excessive, de contribuer à la formation de métastases et à la résistance aux traitements est présente dans les tumeurs du sein. Ces cellules expriment le récepteur CXCR1. Dans des modèles murins, l'inhibition de CXCR1 cible spécifiquement les cellules souches cancéreuses présentes dans les tumeurs. Cette déplétion permet une diminution de la croissance tumorale et de la formation de métastases. L'inhibition de CXCR1 est une nouvelle approche thérapeutique intéressante pour cibler et éliminer les cellules souches cancéreuses dans le cancer du sein (Ginestier et al., 2010). A l'opposé de ces résultats, un lien a été établi entre l'expression de CXCR2 et la sénescence. La sénescence est un arrêt irréversible de la croissance cellulaire. L'activation de certains oncogène induit un mécanisme de sénescence (OIS pour « Oncogene Induce Senescence »). Cette OIS est observée dans les lésions précancéreuses mais pas dans les tumeurs malignes. Cela suggère un rôle suppresseur de tumeurs de cette sénescence. L'OIS induit la sécrétion d'un grand nombre de cytokines. Certaines vont favoriser et d'autres inhiber le développement tumoral. Les cellules en sénescence produisent des MMP, du CXCL8 et du VEGF favorisant l'angiogenèse et la croissance tumorale (Coppe et al., 2006; Parrinello et al., 2005). Mais elles produisent également des facteurs impliqués dans la suppression de la croissance tumorale (Kortlever et al., 2006) et le renforcement de la sénescence comme PAI-1 (pour « Plasminogen Activator Inhibitor-1). L'inhibition de CXCR2 inhibe la sénescence réplicative et l'OIS. Les cytokines CXCL1 et CXCL8 produites par les cellules en sénescence permettent le maintien et le renforcement de l'état sénescent. La signalisation CXCL1 et CXCL8 via le récepteur CXCR2 limite la croissance tumorale en favorisant la sénescence au cours du développement tumoral précoce. Comment interpréter ces résultats en connaissant le rôle pro-tumoral prépondérant du récepteur CXCR2 et de la cytokine CXCL8 ? Les cytokines IL-6, CXCL1 et CXCL8 ont des rôles pro-tumoraux multiples. L'action exercée par le récepteur CXCR2 et ses ligands pendant la progression tumorale est complexe. Ce récepteur induit la sénescence dans les cellules primaires et a une action pro-tumorale pendant la progression tumorale. L'effet dépend du stade et de l'état de la lésion, de l'origine et du fond génétique de la tumeur (Acosta et Gil, 2009). Ces résultats suggèrent un rôle complexe du couple CXCL/CXCR2 dans la régulation de la progression tumorale.

Les chimiokines CXC	*Nom(s) commun(s)*	*Récepteur(s)*	*ELR*
CXCL1	**GRO-α Growth related oncogene α**	**CXCR1, CXCR2**	**+**
CXCL2	**GRO-β Growth related oncogene β**	**CXCR2**	**+**
CXCL3	**GRO-γ Growth related oncogene γ**	**CXCR2**	**+**
CXCL4	**PF-4 Platelet factor 4**	**CXCR3B**	**-**
CXCL5	**ENA-78 Epithelial cell derived neutrophil activating factor 78**	**CXCR2**	**+**
CXCL6	**GCP-2 Granulocyte chemoattractant protein 2**	**CXCR1, CXCR2**	**+**
CXCL7	**NAP-2 Neutrophil activating protein 2**	**CXCR1, CXCR2**	**+**
CXCL8	**IL-8 Interleukin 8**	**CXCR1, CXCR2**	**+**
CXCL9	**MIG Monokine induced by IFN- γ**	**CXCR3**	**-**
CXCL10	**IP-10 IFN inducible protein 10**	**CXCR3**	**-**
CXCL11	**I-TAC IFN inducible T cell chemoattractant**	**CXCR3**	**-**
CXCL12	**SDF-1 Stromal derived factor 1**	**CXCR4**	**-**
CXCL13	**BCA-1 B cell activating chemokine 1**	**CXCR5**	**-**
CXCL14	**BRAK Breast and kidney chemokine**	**?**	**-**
CXCL15	**Lungkine**	**?**	**-**
CXCL16	**SR-PSOX Scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein**	**CXCR6**	**-**

<u>Tableau 1</u> : Les chimiokines CXC et leurs récepteurs

Ce tableau liste les chimiokines CXC, leurs noms communs et les récepteurs CXCR. Les récepteurs majeurs sont le CXCR1 et le CXCR2. La présence ou l'absence du triplet d'acides-aminés ELR est également indiquée. Les chimiokines anti-angiogéniques sont indiquées en vert et les chimiokines pro-angiogéniques en noir. Ces chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués dans le développement d'un grand nombre de cancers. *(D'après Zhu Q, J Mol Histol, 2012).*

c) La régulation de l'expression des cytokines CXC

Différents stimuli favorisent l'expression des cytokines CXC pendant l'angiogenèse tumorale. Toutes ces cytokines possèdent dans leur promoteur un domaine de liaison pour les facteurs de transcription de la famille NFκB. Le facteur de transcription NFκB joue un rôle majeur dans la transcription des gènes des cytokines CXC.

Dans le cancer du poumon de type NSCLC pour « Non small Cell Lung Carcinoma », la surexpression du gène *cox-2* favorise l'activation de NFκB et induit une augmentation de l'expression de CXCL5 et CXCL8. Dans ces tumeurs, ces deux cytokines jouent un rôle prépondérant dans la régulation de l'angiogenèse tumorale et leur inhibition réduit la croissance tumorale (Pold et al., 2004). Les niveaux de CXCL5 et CXCL8 sont directement corrélés avec l'angiogenèse et la croissance tumorale. Dans des modèles murins, l'inhibition de CXCL5 et de CXCL8 diminue la croissance tumorale et la formation de métastases (Arenberg et al., 1998; Arenberg et al., 1996a).

Dans un modèle de glioblastome, l'expression d'un gène suppresseur de tumeur, le gène *ing4*, est importante pour la régulation de l'angiogenèse et de la croissance tumorale. L'inhibition de l'expression d'ING4 induit une diminution de l'activité de NFκB qui entraine une diminution de l'expression de CXCL8. Dans ces tumeurs, l'inhibition de CXCL8 réduit de façon significative l'angiogenèse et la croissance tumorale (Garkavtsev et al., 2004). Dans un modèle de cancer pancréatique, l'activation du récepteur de l'EGF augmente l'activité de NFκB et favorise l'expression de CXCL8 (Xiong et al., 2004).

Dans Les cytokines CXCL1, 2 et 3 sont fortement exprimées dans les mélanomes humains (Luan et al., 1997). Des mélanocytes transfectés avec les différents gènes des cytokines CXCL1, 2 et 3 acquièrent la capacité à former des tumeurs richement vascularisées chez la souris comparable à celles obtenues avec les cellules de mélanomes B16. A l'inverse, l'inhibition de ces trois cytokines réduit l'angiogenèse tumorale et inhibe la croissance tumorale (Owen et al., 1997).

Dans le cancer ovarien, les niveaux d'expression de CXCL8 sont directement corrélés avec la néo-vascularisation et inversement corrélés avec la survie (Yoneda et al., 1998). De la même façon, chez les patients atteints de cancer de la prostate, les niveaux plasmatiques de CXCL8 sont très élevés et corrélés au stade de la maladie (Bostwick et Murphy, 1998).

L'ensemble de ces résultats démontre l'importance des cytokines CXCL ELR+ dans la régulation de l'angiogenèse tumorale, du développement tumoral et de la formation des métastases. Ils mettent également en évidence le rôle prépondérant de la cytokine CXCL8.

d) L'axe CXCR4/CXCL12

Bien qu'il s'agisse d'une cytokine ELR-, CXCL12 stimule son récepteur CXCR4 présent sur les cellules endothéliales et induit leur prolifération et leur migration et la production de VEGF (Salcedo et Oppenheim, 2003). Une inhibition de l'axe CXCR4/CXCL12 induit une inhibition de l'angiogenèse et une diminution de la croissance tumorale (Guleng et al., 2005). Ces résultats ne peuvent pas être extrapolés à l'ensemble des cancers. Cette inhibition dans les NSCLC n'a aucun effet sur l'angiogenèse tumorale (Phillips et al., 2003). L'activité de la cytokine CXCL12 est donc tumeur spécifique et dépend de l'activité d'autres cytokines. Parmi les récepteurs de type CXCR, le récepteur CXCR4 est le plus fortement exprimé à la surface des cellules tumorales (Balkwill, 2004). Dans des modèles murins de cancer du sein (Smith et al., 2004), du poumon (Burger et al., 2003), du pancréas (Saur et al., 2005), de l'ovaire (Scotton et al., 2002) et du rein (Pan et al., 2006), l'axe CXCR4/CXCL12 joue un rôle critique dans la croissance tumorale et la formation de métastases. Une inhibition spécifique de CXCR4 ou de CXCL12 bloque la migration et l'invasion des cellules tumorales et diminue la formation de métastases. Dans les cancers du sein et du poumon de type NSCLC, cette inhibition ne réduit ni la taille de la tumeur primaire ni l'angiogenèse tumorale mais atténue de façon significative la formation de métastases. Ces résultats suggèrent que l'activité anti-métastatique de l'axe CXCR4/CXCL12 est indépendante de l'angiogenèse (Muller et al., 2001; Phillips et al., 2003). Les patients exprimant des niveaux élevés de CXCR4 dans le cancer du sein (Cabioglu et al., 2005), les NSCLC (Su et al., 2005), le cancer colorectal (Schimanski et al., 2005) et de la prostate (Arya et al., 2004) montrent une augmentation significative de la formation de métastases. L'expression de CXCR4 dans les cancers de l'œsophage (Kaifi et al., 2005) et dans le mélanome (Scala et al., 2005) est associée à un mauvais pronostic vital.

2. Le rôle des cytokines ELR-

Contrairement à la cytokine CXCL12, les autres cytokines ELR-, CXCL4, 9, 10, 11 et 14 sont des inhibiteurs puissants de l'angiogenèse tumorale. L'expression de ces chimiokines est induite par l'IFN de type I (IFNα et β), et de type II (IFNγ). Les cellules immunitaires de type Th1 produisent des cytokines pro-inflammatoires, comme l'IL-2 et l'IFNγ, et régulent l'expression de ces chimiokines. Ces informations témoignent d'un lien étroit entre l'immunité anti-tumorale et l'inhibition de l'angiogenèse. L'activité des chimiokines ELR- dépend de leur liaison au récepteur CXCR3. Il existe deux variants d'épissage alternatif de ce

récepteur, CXCR3A et CXCR3B. CXCR3A est responsable du recrutement des cellules immunitaires de types Th1 et CXCR3B est impliqué dans l'inhibition de l'angiogenèse. Dans le cancer du poumon, l'expression de CXCL10 est plus importante dans les carcinomes à cellules squameuses (SCCA) que dans les adénocarcinomes. L'inhibition de CXCL10 dans les SCCA entraine une augmentation de l'activité angiogénique et son expression est inversement corrélée à la croissance tumorale (Arenberg et al., 1996b). De plus, dans les NSCLC la surexpression de CXCL9 inhibe la croissance tumorale et la formation de métastases via une diminution de l'angiogenèse tumorale (Addison et al., 2000a). Les cellules tumorales exploitent ces chimiokines pour leur propre prolifération, survie et invasion. Le récepteur CXCR3 est exprimé à la surface de plusieurs types de cellules cancéreuses comme les cellules tumorales de cancer du sein, de mélanomes et de RCC. Le récepteur CXCR3 régule la formation de métastases au niveau des ganglions lymphatiques dans le mélanome et le cancer du sein (Kawada et al., 2004; Longo-Imedio et al., 2005). Ces résultats suggèrent que l'activité pro ou anti-angiogénique de ces chimiokines dépend de l'expression du récepteur CXCR3 à la surface des cellules tumorales. Les chimiokines ELR- jouent un rôle critique dans la régulation l'immunité cellulaire induite par les cytokines de type Th1. L'effet anti-tumoral de l'IL-12 est perdu en absence des ligands de CXCR3 (Tannenbaum et al., 1998).

En conclusion, l'axe CXCR3/CXCL ELR- est très important pour le développement de l'immunité anti-tumorale et l'inhibition de l'angiogenèse pour un grand nombre de tumeurs.

L'ensemble de ces informations témoigne du rôle important des chimiokines et de leurs récepteurs dans la progression tumorale et la formation de métastases. Différents études rétrospectives démontrent que l'expression de certaines de ces chimiokines est associée avec un mauvais pronostic vital. Les niveaux d'expression de ces cytokines et de leurs récepteurs pourraient devenir des marqueurs de l'agressivité tumorale. Ils permettraient de sélectionner les traitements les plus appropriés pour les patients. Mais une meilleure compréhension des mécanismes mis en place est nécessaire afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement des cancers.

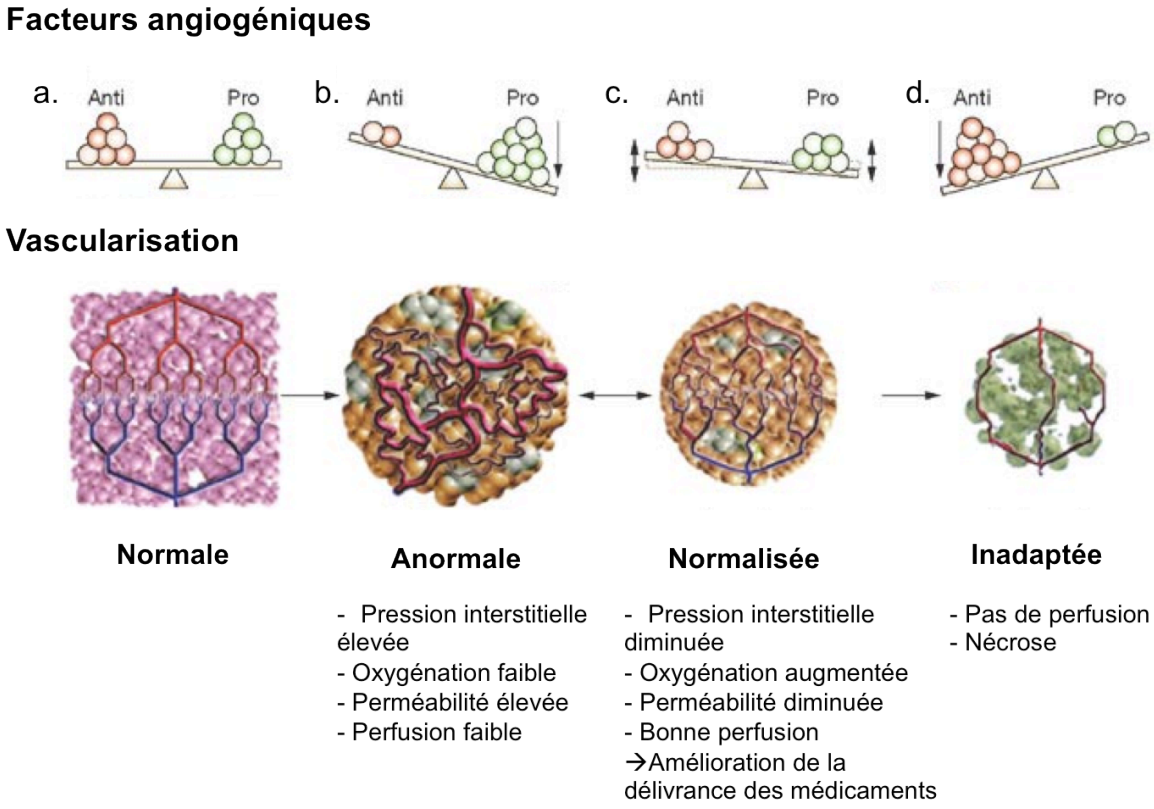
PARTIE 4 : Les thérapies anti-angiogéniques dans le traitement du cancer

Depuis la découverte de l'angiogenèse et de son rôle crucial dans le développement tumoral, un grand nombre de thérapies anti-angiogéniques ont vu le jour. Le VEGF et ses récepteurs ont un rôle central dans la régulation de l'angiogenèse tumorale. Cela en fait une cible de choix pour le traitement d'un grand nombre de tumeurs solides. Le bénéfice clinique des traitements anti-angiogéniques est du à différents mécanismes. Ces molécules inhibent l'expansion des vaisseaux tumoraux. Elles bloquent la formation de nouvelles ramifications et inhibent l'arrivée au sein de la tumeur des cellules dérivées de la moelle osseuse. Elles permettent également la régression des vaisseaux préexistants. Le traitement inhibe les signaux de survie adressés aux cellules endothéliales. Ainsi, ces cellules deviennent plus sensibles à la chimiothérapie et la radiothérapie. Les anti-angiogéniques augmentent également cette sensibilité en entrainant une normalisation du réseau vasculaire (FIG12). Sous traitement, les vaisseaux deviennent matures et fonctionnels (Goel et al., 2011). Ces observations expliquent pourquoi un traitement anti-angiogénique associé à une chimiothérapie est plus efficace que la chimiothérapie utilisée seule (Jain, 2005). Malheureusement cette normalisation est transitoire. Après cette phase objective une régression excessive de la vascularisation ou un échappement de la tumeur au traitement est souvent observé.

1. Le concept des –INIB et des –UMAB

Deux grands types d'inhibiteurs ont vu le jour ces dernières années; les INIB et les UMAB. Les INIB sont de petits inhibiteurs pharmacologiques qui passent la membrane plasmique très facilement. Les UMAB sont des anticorps monoclonaux, humanisés, qui ciblent le développement tumoral.

Les INIB sont des inhibiteurs mimétiques de l'ATP qui bloquent des enzymes à activité kinase. Ces dernières sont de deux types; soit des récepteurs à activité kinase soit des kinases intracellulaires. Les kinases comportent onze domaines hautement conservés. Les deux premiers sont responsables de la fixation de l'ATP. Les acides aminés entre les domaines 1 et 2 sont très variables d'une kinase à une autre. Ces différents acides aminés ont permis d'amener une spécificité de design d'inhibiteurs pour l'ensemble des kinases.



<u>Figure 12</u> : La normalisation vasculaire au cours d'un traitement anti-angiogénique

a. De façon physiologique, il existe un état d'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques favorisant un réseau vasculaire organisé et fonctionnel. **b.** La tumeur produit un excès de facteurs angiogéniques favorisant un réseau vasculaire anormal et non fonctionnel. **c.** L'utilisation d'un traitement anti-angiogénique permet de rétablir un état d'équilibre et d'induire une normalisation partielle du réseau vasculaire favorisant l'efficacité des traitements anti-cancéreux. **d.** Une inhibition prolongée de l'angiogenèse peut entrainer la destruction du réseau vasculaire et de la tumeur. *(D'après Jain RK, Nature Reviews Neurosciences, 2007)*

C'est sur ce concept que sont nés récemment des inhibiteurs comme le glivec, dont la cible est la chimère BCR/ABL, un gène de fusion issu d'une translocation chromosomique et responsable de la leucémie myéloïde chronique. Le glivec fonctionne chez tous les patients mais ce n'est pas le cas de tous les inhibiteurs. Par exemple, le gefitinib présente, quant à lui, un certain paradoxe. Malgré des essais cliniques sur la souris montrant sa très haute activité anti-tumorale par ciblage du récepteur de l'EGF (EGFR), il ne fonctionne que sur une certaine catégorie de patients. Deux articles princeps parus simultanément dans le New England Journal of Medicine et Science en 2004 expliquent que l'inefficacité relative de cet inhibiteur est liée à certaines mutations de l'EGFR (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004). Les deux études ont identifié des mutations de l'EGFR qui induisent une inhibition de l'activité tyrosine kinase du récepteur à faibles doses de la drogue. En absence de ces mutations, les doses induisant la même inhibition sont beaucoup plus importantes. Ces doses élevées ne peuvent en aucun cas être utilisées chez le patient à cause d'effets secondaires graves. La présence de ces mutations est maintenant analysée chez les patients avant traitement.
Les UMAB vont avoir un impact sur l'activité de certains récepteurs. Dans le cas du récepteur HER2, il est sur-amplifié chez certaines patientes atteintes d'un cancer du sein. Avant l'avènement des thérapies ciblées, les patientes qui présentaient un cancer HER2 positif avaient un très mauvais pronostic vital. La thérapie ciblée a révolutionné le pronostic de ces patientes et entraîne un effet thérapeutique évident. Le ciblage de ce récepteur diminue notamment la prolifération cellulaire par inhibition des voies de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK et PI3K/AKT/mTOR, empêche le clivage de la portion extra cellulaire du récepteur, induit l'apoptose des cellules tumorales et bloque l'angiogenèse tumorale.

Les deux approches thérapeutiques INIB et UMAB ciblent toutes deux la cellule tumorale. Ces dernières années, une nouvelle stratégie thérapeutique est apparue. Elle vise une inhibition de l'angiogenèse tumorale, stratégie consistant à «asphyxier» les cellules tumorales en les privant d'oxygène et de nutriments par ciblage des cellules endothéliales constituant les vaisseaux sanguins. Cette stratégie visant des cellules normales devait empêcher d'augmenter la plasticité génétique des cellules tumorales et donc être particulièrement efficace. Déjà, dans

les années 70, l'observation avait été faite qu'une tumeur ne pouvait pas se développer au-delà d'un certain volume si elle n'était pas correctement vascularisée. Une tumeur peut rester à l'état dormant pendant des années. Pour des raisons encore inexpliquées, une tumeur pourra être irriguée par un nouveau réseau vasculaire. Du fait de l'absence de cellules musculaires lisses, les vaisseaux tumoraux sont très perméables et permettent le passage dans la circulation de cellules tumorales et donc le développement d'un processus métastatique.
Un des acteurs majeurs de ce phénomène est le VEGF. Ce dernier va agir par l'intermédiaire de récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR par exemple). Afin de bloquer l'angiogenèse tumorale, certaines stratégies sont utilisées, comme les pièges à VEGF ou des inhibiteurs pharmacologiques du récepteur du VEGF (INIB). D'autres, enfin, sont des anticorps monoclonaux humanisés dirigés contre le VEGF (le bévacizumab par exemple). L'efficacité de ces différentes stratégies thérapeutiques a été constatée dans plusieurs essais cliniques.

2. Cibler le VEGF pour inhiber la fixation sur son récepteur

a) Un anticorps ciblant le VEGF : le bévacizumab

Le premier traitement anti-angiogénique à avoir obtenu l'autorisation de mise sur le marché par la FDA (pour « Food Drug Administration »), en 2004, a été le bévacizumab (BVZ). Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF. Le BVZ inhibe la liaison du VEGF à son récepteur et bloque l'activation des voies de signalisation en aval. Il a été initialement approuvé pour le traitement du cancer colorectal métastatique en association avec la chimiothérapie de référence (une association Irinotecan, Fluorouracil, Leucovorin : IFL). Avec l'arrivée du BVZ, c'est la première fois depuis plus de 20 ans qu'un traitement permet d'augmenter de quelques mois la survie des patients atteints d'un cancer colorectal. Ainsi, les données cliniques indiquent que l'association BVZ+IFL augmente la survie sans progression de 4 mois et la survie globale de 5 mois par rapport au traitement IFL seul (Hurwitz et al., 2004). Son utilisation a rapidement été étendue à d'autres types cancers métastatiques. Aujourd'hui, le BVZ est toujours utilisé dans le traitement du cancer colorectal métastatique en première et seconde ligne. Il est indiqué dans le traitement du cancer du rein à cellules claires métastatique en association avec l'IFNα (Escudier et al., 2007). Il est également utilisé, en deuxième ligne, dans le traitement du glioblastome multiforme en association avec l'irinotecan (Friedman et al., 2009; Kreisl et al., 2009) et en première ligne dans le cancer du poumon de type NSCLC (Sandler et al., 2006). Son utilisation est d'avantage controversée dans le traitement du cancer du sein en association avec des dérivés du taxol (Miller et al.,

2007). En général, le BVZ n'est pas efficace en monothérapie. En association avec une chimiothérapie, il augmente de façon significative la survie sans progression. Ces résultats soutiennent l'hypothèse d'une normalisation vasculaire par les anti-VEGFs. L'inhibition de la voie de signalisation du VEGF normalise les vaisseaux sanguins ce qui facilite l'administration de la chimiothérapie au sein de la tumeur et augmente son efficacité (Jain, 2005). Dans le traitement des glioblastomes, le BVZ est toutefois utilisé en monothérapie avec des résultats satisfaisants. Deux études cliniques de phase III montrent que le BVZ en combinaison avec le carboplatine et le paclitaxel augmente la survie sans progression et la survie globale dans le traitement du cancer ovarien (Burger et al., 2011; Perren et al., 2011). Ces résultats ont aboutis à l'approbation du BVZ en Europe dès 2012 et suggèrent une autorisation prochaine du BVZ pour le traitement du cancer ovarien dans le reste du monde.
Malgré des résultats satisfaisants, l'efficacité du BVZ est limitée. Dans la plupart des cas, la survie sans progression est augmentée de quelques mois mais aucune augmentation de la survie globale n'est observée. Ces mauvais résultats peuvent être expliqués par un suivi trop précoce, une puissance statistique insuffisante et une confusion apportée par les effets des traitements utilisés après la progression (Kazazi-Hyseni et al., 2010).

b) Le rapport bénéfice/risque du BVZ

L'utilisation du BVZ peut causer des effets secondaires très importants. Les plus fréquents sont des problèmes de cicatrisation, des saignements, l'apparition d'évènements thromboemboliques, des perforations de l'intestin ou encore une neutropénie (Gressett et Shah, 2009).
Un exemple marquant de la balance entre efficacité et effets secondaires est l'utilisation du BVZ dans le traitement du cancer du sein. Une étude très prometteuse (étude clinique E2100) a reporté que l'utilisation du BVZ en association avec le paclitaxel en première ligne pour le traitement de patientes atteintes un cancer du sein métastatique augmente les taux de réponse et double la survie sans progression (Miller et al., 2007). Cette étude a été très critiquée pour deux raisons ; i) le paclitaxel utilisé seul est très peu efficace ; ii) les patientes traitées par le paclitaxel seul ont reçu en cours d'étude le BVZ. Pourtant, cette étude a accéléré l'autorisation de mise sur le marché, avec une approbation par la FDA dès 2007. Cette autorisation est très controversée et en 2011, seulement trois ans après son approbation, le BVZ est retiré du traitement du cancer du sein métastatique par la FDA aux Etats Unis. Ce retrait se base sur les résultats de deux études cliniques montrant une augmentation de la survie sans progression de seulement 1 à 2 mois (études cliniques AVADO et RIBBON1) et

suggérant une augmentation importante des effets secondaires par rapport à la chimiothérapie seule pouvant entrainer jusqu'à la mort de certains patients (Petrelli et Barni, 2012). Ces deux études soulignent un rapport bénéfice/risque très faible et donc un intérêt très limité en santé publique du BVZ dans cette application, surtout que ces traitements ont des coûts très élevés. En Europe, l'EMEA maintient actuellement, l'utilisation du BVZ en association avec le paclitaxel et la capecitabine dans le traitement du cancer du sein métastatique.

Une méta-analyse réalisée en 2011 et s'appuyant sur les résultats de 16 études cliniques, démontre que le traitement au BVZ est associé avec un nombre plus important de FAEs pour «Fatal Adverse Events» par rapport à la chimiothérapie utilisée seule. Les auteurs reportent qu'environ 2,5% des patients traités avec le BVZ présentent des FAEs ce qui représente une augmentation de 1,5 fois par rapport aux patients traités par la chimiothérapie seule. Les FAEs les plus communs sont des hémorragies (23,5%), des neutropénies entrainant des infections létales (12,2%), les perforations du tractus gastro-intestinal (7,1%) les embolies pulmonaires (5,1%) et des accidents cérébraux (5,1%). L'incidence des FAEs varie de façon significative en fonction du type de tumeur, de la chimiothérapie associée et augmente avec l'augmentation de la dose de BVZ administrée aux patients (Ranpura et al., 2011). Un effort doit être réalisé dans la détection et le traitement rapide des effets secondaires afin de limiter les risques par rapport aux bénéfices déjà limités du BVZ.

Malgré ces problèmes de FAEs, l'efficacité du BVZ dans le traitement des cancers métastatiques a poussé les médecins à tester son efficacité dans d'autres tumeurs. Mais encore une fois les résultats sont très variables. L'utilisation du BVZ dans le traitement des cancers gynécologiques, augmente la survie sans progression mais n'a aucun effet sur la survie globale des patients, a l'exception du cancer ovarien pour lequel l'association BVZ + chimiothérapie augmente la survie sans progression et la survie globale et devient le traitement standard aux Etats-Unis (Burger, 2010). Des résultats négatifs ont été obtenus pour le traitement du cancer colorectal à des stades avancés (Allegra et al., 2011). Ces résultats inconsistants donnent naissance à de nombreuses questions. L'efficacité du BVZ est-elle spécifique d'un type de tumeur ou d'un type de chimiothérapie ? Pourquoi, malgré des résultats précliniques solides et des résultats cliniques précoces prometteurs, l'utilisation du BVZ n'augmente pas la survie globale des patients ? Les réponses à ces questions sont difficiles. L'angiogenèse est un processus complexe nécessitant des boucles de régulation positives et négatives. Il est donc possible que supprimer la signalisation VEGF augmente l'expression du VEGF, entrainant un effet rebond de la croissance tumorale quand la suppression n'est pas continue (Kerbel, 2009). Des études *in vivo* chez la souris ont montré

que seulement 7 jours après l'arrêt du traitement anti-VEGF, la vascularisation tumorale est restaurée alors que si le traitement est poursuivi l'effet est maintenu et les vaisseaux tumoraux restent sensibles (Mancuso et al., 2006a). Différentes données cliniques suggèrent que l'augmentation de la survie sans progression observée est atténuée après l'arrêt du traitement. Cette hypothèse suggère qu'une thérapie à long terme serait plus avantageuse. Les bénéfices du BVZ, sur la survie sans progression, sont perdus après l'arrêt du traitement (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 2005). L'important est donc de trouver le bon compromis entre un traitement à long terme et des effets secondaires trop importants qui supprimerait tout bénéfice sur la survie des patients. Enfin, l'absence d'effet positif sur la survie globale pourrait être expliquée par le fait que le BVZ n'est efficace que chez certains patients alors que les études englobent l'ensemble des patients traités, diminuant la significativité des résultats. Cette sélection est difficile car le nombre de patients deviendrait trop limité pour faire émerger le bénéfice clinique faible. Il est donc indispensable de mettre en évidence des facteurs prédictifs d'efficacité du BVZ afin de sélectionner les patients potentiellement les plus répondeurs. Cela permettrait d'augmenter les bénéfices tout en limitant les effets secondaires.

c) Un hybride VEGFR-1/VEGFR-2 : L'aflibercept

Il s'agit d'une protéine de fusion contenant les domaines extracellulaires du VEGFR-1 et du VEGFR-2, capable de reconnaître le VEGF-A, le VEGF-B et le PlGF. Il a été récemment approuvé par la FDA en association avec une chimiothérapie, en 2ème ligne dans le traitement du cancer colorectal. Cette approbation se base sur une étude clinique de phase III qui a montré une augmentation de la survie sans progression et de la survie globale des patients traités avec l'aflibercept en combinaison avec la chimiothérapie de référence (Van Cutsem et al., 2012b). L'aflibercept a été testé dans d'autres études de phase III. Il n'a pas démontré d'avantage clinique dans le traitement du cancer du poumon de type NSCLC (Ramlau et al., 2012) et de la prostate (Agarwal et al., 2012). Ainsi, les efforts actuels pour améliorer l'utilisation de cette molécule se concentrent sur le traitement du cancer colorectal.

3. Inhiber l'activité tyrosine kinase des récepteurs aux facteurs angiogéniques

Un autre moyen de bloquer l'angiogenèse tumorale est de cibler directement le domaine kinase des récepteurs impliqués dans la régulation de ce processus. Ces inhibiteurs sont de petites molécules mimétiques de l'ATP. Elles diffusent librement à l'intérieur des cellules et entrent en compétition avec l'ATP pour la fixation au domaine intracellulaire des récepteurs.

Cette compétition inhibe l'activation des voies de signalisation en aval des récepteurs cibles. Un grand nombre d'anti-angiogéniques de ce type sont actuellement utilisés en clinique ou en cours de caractérisation dans des études précliniques et cliniques. Tous ces inhibiteurs utilisent le même mécanisme d'action mais les récepteurs cibles, les caractéristiques pharmacocinétiques et les effets secondaires sont très différents d'un inhibiteur à l'autre. Actuellement, les plus utilisés en clinique sont le sunitinib et le sorafenib. Ces deux inhibiteurs ciblent les récepteurs du VEGF, les récepteurs du PDGF et les récepteurs c-KIT, CSF-1R, FLT-3 et RET. En plus de ces récepteurs tyrosine kinase, le sorafenib inhibe les kinases B-Raf et c-Raf.

a) Le sunitinib

Le sunitinib est utilisé en deuxième ligne dans le traitement des GIST pour «Gastro-Intestinal Stromal Tumors» résistants au traitement de référence, le Glivec. Dans une étude de phase III, le sunitinib augmente la survie sans progression à 6,8 mois par rapport à 1,6 mois pour les patients non traités mais n'augmente pas la survie globale des patients (Heinrich et al., 2008). Le sunitinib est également utilisé en première ligne dans le traitement des RCC métastatiques. Dans plusieurs études cliniques, le traitement sunitinib augmente de façon significative le taux de réponse, la survie sans progression et la survie globale des patients par rapport au traitement de référence, l'IFNα (Escudier et al., 2009b; Motzer et al., 2009; Motzer et al., 2007b). Enfin, le sunitinib est utilisé dans le traitement des tumeurs métastatiques neuro-endocrines du pancréas qui ne peuvent pas être éliminées par chirurgie (Raymond et al., 2011). D'autres études cliniques sont en cours pour valider l'efficacité du sunitinib dans le traitement d'autres tumeurs solides.

b) Le sorafenib

L'utilisation du sorafenib est indiquée dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires avancés (Llovet et al., 2008) et en deuxième ligne dans le traitement des RCC métastatiques (Eisen et al., 2008; Escudier et al., 2009a). Dans le traitement des RCC, le bénéfice est plus limité et sans réel avantage en terme de survie globale malgré une augmentation de la survie sans progression (5,5 mois versus 2,8 mois). Il est progressivement éliminé au profit de nouvelles molécules plus spécifiques comme l'axitinib.

c) Les autres molécules

Deux autres inhibiteurs sont également utilisés, en deuxième ligne, dans le traitement des RCC métastatiques, le pazopanib et l'axitinib. Ces inhibiteurs sont un peu plus spécifiques car

ils ne ciblent que les récepteurs du VEGF, du PDGF et le récepteur c-Kit. Le pazopanib permet une augmentation significative de la survie sans progression par rapport à des patients non traités. Ces résultats sont indépendants d'un traitement ou non en première ligne par l'IFNα (Sternberg et al., 2010). L'utilisation de l'axitinib augmente de façon significative la survie sans progression des patients atteints de RCC par rapport au sorafenib. Il représente une option intéressante pour une deuxième ligne de traitement dans les RCC métastatiques (Motzer et al., 2013; Rini et al., 2011). Deux autres inhibiteurs, le vandetanib (Wells et al., 2012) et le cabozantinib (Smith et al., 2013) sont utilisés dans le traitement du cancer avancé ou métastatique de la thyroïde et de la prostate. Le vandetanib cible les récepteurs de VEGF, de l'EGF et le récepteur RET et le cabozantinib plus spécifique ne cible que les récepteurs VEGFR-2 et c-MET. Enfin, deux derniers inhibiteurs spécifiques sont actuellement en cours d'essais cliniques, le linifanib et le tivozanib. Le linifanib est un inhibiteur spécifique des récepteurs du VEGF et du PDGF. Son efficacité est validée en préclinique et dans plusieurs études cliniques de phase II. Cette molécule est efficace dans le traitement des carcinomes hépatocellulaires métastatiques (Toh et al., 2013), en 2ème ou 3ème ligne dans le traitement du cancer du poumon avancé (Tan et al., 2011) et dans le traitement des RCC après l'échec du sunitinib (Tannir et al., 2011). Le tivozanib est un inhibiteur spécifique des récepteurs du VEGF (VEGFR-1, 2 et 3) avec une demi-vie longue et des effets secondaires limités. Son efficacité a déjà été démontrée dans une étude de phase II (Nosov et al., 2012). Il est actuellement en cours d'étude de phase III (étude TIVO-1 : NCT01030783 ; Motzer RJ) dans le traitement des RCC métastatiques en comparaison avec le sorafenib. Cette étude en cours montre une efficacité supérieure au sorafenib. Le traitement est très bien toléré par les patients. Cette étude démontre que l'utilisation d'un inhibiteur des VEGFRs plus spécifique permet d'augmenter l'efficacité en diminuant les effets secondaires. Le tivozanib pourrait être considéré dans le futur, comme la première ligne dans le traitement des RCC métastatiques.

d) Le rapport bénéfice/risque des TKI

L'efficacité de ces inhibiteurs résulte certainement dans leur large champ d'action. Ils interfèrent avec plusieurs voies de signalisation impliquées dans l'angiogenèse et le développement tumoral. La multiplication du nombre de cibles entraine également une augmentation de la quantité d'effets secondaires associés au traitement. Ces inhibiteurs même s'ils sont dans l'ensemble bien tolérés, entrainent des effets secondaires importants dont certains peuvent entrainer jusqu'à la mort des patients. Les plus fréquents sont des problèmes d'insuffisance cardiaque (Kerkela et al., 2009), de thrombose artérielle (Choueiri et al., 2010),

de cicatrisation, d'hémorragie (Je et al., 2009), d'hypertension (Wu et al., 2008) et de dysfonctionnement rénal. Une méta-analyse récente, regroupant les résultats de 10 études cliniques sur le sunitinib, le sorafenib et le pazopanib, démontre une augmentation significative du risque de mortalité sous traitement. Les résultats démontrent une augmentation de plus de 3 fois du nombre de FAEs chez les patients traités par ces inhibiteurs par rapports aux patients des groupes contrôles. Dans cette analyse 79% des décès résultent d'une hémorragie ou de problèmes cardiaques. Cette étude ne remet pas en cause l'utilisation de ces inhibiteurs en clinique mais démontre la nécessité d'un suivi régulier des patients pour anticiper l'apparition de ces FAEs (Schutz et al., 2012).

4. Inhiber les effecteurs en aval dans la voie de signalisation

La protéine mTOR pour «mammalian Target Of Rapamycin» contrôle la croissance cellulaire en modulant le métabolisme, la synthèse protéique et l'autophagie. La protéine mTOR, joue un rôle important dans l'angiogenèse tumorale en régulant l'expression du VEGF dans les cellules endothéliales et les cellules tumorales. Cette régulation s'effectue par l'intermédiaire de la régulation de la traduction du facteur de transcription HIF-1α qui induit l'expression du VEGF et l'angiogenèse tumorale. L'activité clinique anti-tumorale des inhibiteurs de mTOR est donc expliquée par une inhibition de l'angiogenèse (Thomas et al., 2006). Cette voie de signalisation est souvent dérégulée dans les cancers faisant de mTOR une cible thérapeutique intéressante. Des analogues de la rapamycine, le temsirolimus et l'everolimus sont des inhibiteurs allostériques de mTORC-1, un des deux complexes de mTOR. Ces inhibiteurs sont utilisés dans le traitement des RCC métastatiques (Hudes et al., 2007; Motzer et al., 2008; Motzer et al., 2007a), des lymphomes du manteau (Ansell et al., 2011) et des tumeurs pancréatiques neuroendocrines (Javle et al., 2010; Yao et al., 2011). L'efficacité de ces inhibiteurs est limitée. Cela est expliqué par l'inhibition sélective de mTORC-1 mais pas de mTORC-2. Inhiber mTORC-1 et mTORC-2 de façon simultanée pourrait être plus efficace. Ces nouveaux inhibiteurs de la voie mTOR sont actuellement en phase préclinique de développement (Yu K, Cancer Research 2010).

En conclusion, depuis la découverte de l'angiogenèse tumorale, un enthousiasme important existe autour du développement des molécules anti-angiogéniques. Pourtant, seulement une fraction des patients montre réellement un bénéfice. Dans des modèles précliniques un bénéfice à long terme des anti-angiogéniques existe. En clinique, l'augmentation de la survie

globale des patients est souvent limitée. Certains patients deviennent résistants au traitement. D'autres sont réfractaires dès le départ (Bergers et Hanahan, 2008). Des résultats contradictoires existent au sujet du bénéfice des traitements anti-angiogéniques. Dans certains cas, ces traitements favorisent l'invasion et la formation de métastases (Ebos et Kerbel, 2011). Cependant, une normalisation vasculaire soutenue est un moyen efficace de combattre l'échappement tumoral et la formation de métastases (Goel et al., 2011). Une meilleure compréhension des mécanismes contrôlant l'angiogenèse tumorale est indispensable afin d'améliorer l'efficacité des thérapies anti-angiogéniques. Des marqueurs d'efficacité des traitements sont indispensables. Pourtant aucun n'est validé et utilisé en routine pour sélectionner les patients potentiellement répondeurs au traitement (Jain et al., 2009b). Face à cette efficacité modérée des anti-angiogéniques certains proposent des modèles précliniques plus adaptés (Francia et al., 2011) et d'autres étudient les modes de résistances aux traitements (Bergers et Hanahan, 2008; Ebos et Kerbel, 2011).

5. Vers une thérapie personnalisée

L'activation des oncogènes et la dérégulation de l'angiogenèse sont des mécanismes fortement reliés. Des mutations dans les cellules tumorales peuvent moduler la balance entre les facteurs pro et anti-angiogéniques et entrainer une angiogenèse exacerbée. Une étude récente propose que la normalisation du réseau vasculaire, en ciblant les oncogènes, pourrait être plus efficace que des traitements ciblant directement les vaisseaux sanguins. Cibler ces oncogènes permettrait de restaurer une angiogenèse normale et une vascularisation fonctionnelle. Les altérations génétiques sont spécifiques d'une tumeur. Une thérapie ciblée bloquant le programme génétique activé par un oncogène spécifique pourrait aboutir à une thérapie personnalisée des patients (Bottos et Bardelli, 2013).

Dans certains cas, des mutations de la cible de la thérapie entraine une sensibilité à des quantités faibles non toxiques de la drogue, situation rencontrée pour les inhibiteurs de l'EGFR (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004). Dans d'autres cas une mutation d'un régulateur négatif entraine une « addiction » à une voie de signalisation particulière. Cette situation a été décrite dans le cas de mutation du gène *tsc1*, un régulateur de mTOR. Ces mutations entrainent une hypersensibilité aux «rapalogues» dans les ccRCC (Iyer et al., 2012). Ainsi, la recherche de ces mutations permet d'éviter l'administration inutile des inhibiteurs et de personnaliser les traitements.

Molécule Anti-angiogénique	Type d'inhibiteur	Cibles	Indications
Bévacizumab	Anticorps	VEGF-A	mCRC, mRCC, mNSCLC, cancers du sein HER-2 negatifs et de l'ovaire métastatiques, glioblastomes
Aflibercept	Protéine de fusion	VEGF-A VEGF-B PlGF	mCRC
Sorafenib	Inhibiteur tyrosine kinase (TKI)	VEGFR1 et 3 PDGFR KIT RAF FGFR	mRCC et carcinomes hépatocellulaires
Sunitinib	TKI	VEGFRs PDGFRs KIT RET FLT3	mRCC, GIST et tumeurs neuroendocrines du pancréas
Axitinib	TKI	VEGFRs PDGFRs KIT	mRCC
Tivozanib	TKI	VEGFRs	mRCC
Pazopanib	TKI	VEGFRs PDGFRs KIT	mRCC et sarcomes des tissus mous
Vandetanib	TKI	VEGFRs EGFR RET	Cancers médullaires de la thyroide
Cabozantanib	TKI	VEGFR-2 Met	Cancers médullaires de la thyroide
Temsirolimus	Rapalogue	mTOR	RCC
Everolimus	Rapalogue	mTOR	Tumeurs neuroendocrines du pancréas, mRCC, cancer du sein HER-2 negatifs et astrocytomes

Tableau 2 : Les principales molécules anti-angiogéniques utilisées en cancérologie

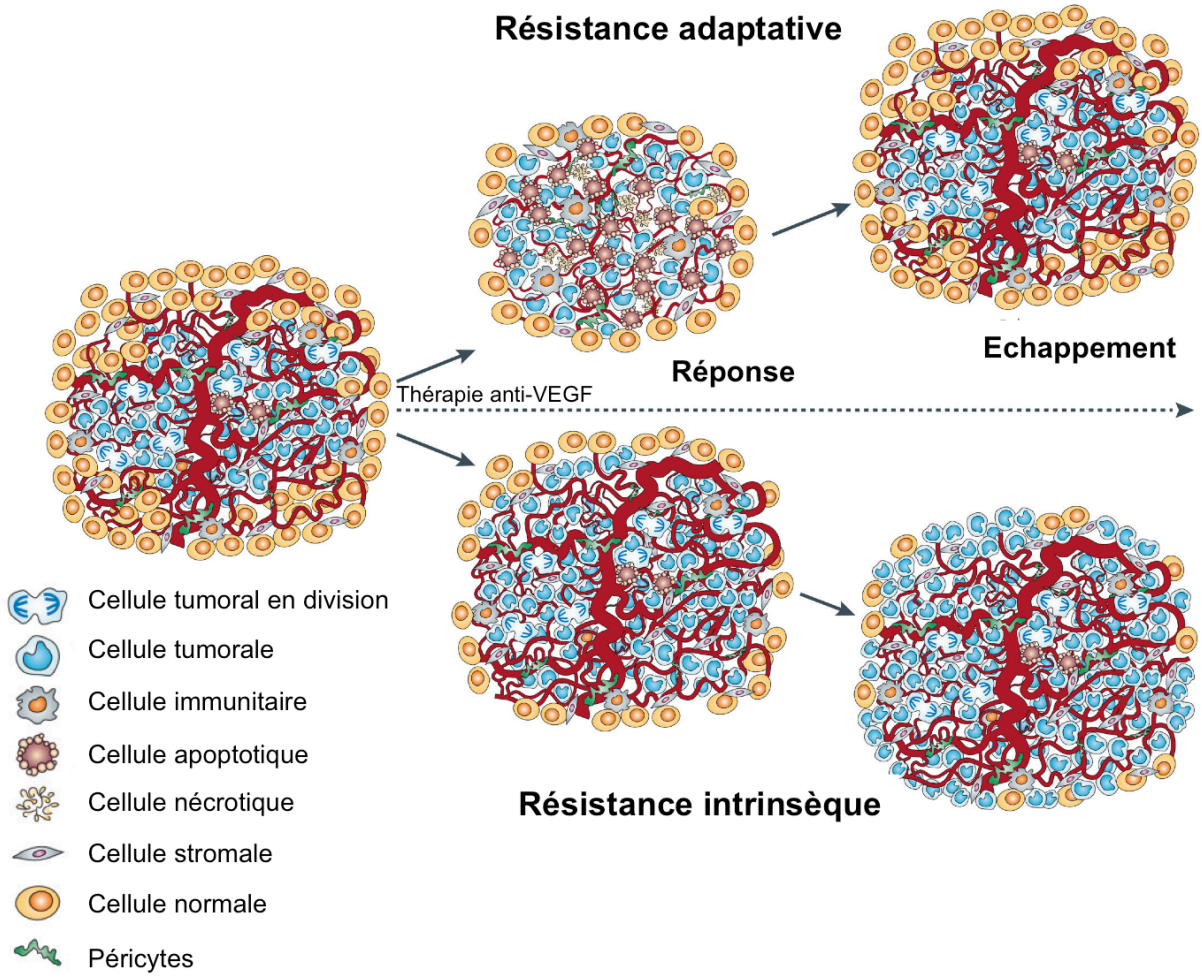
Ce tableau illustre la diversité des molécules anti-angiogéniques actuellement utilisées en cancérologie. Il indique le nom de la molécule, le type d'inhibiteur, les récepteurs ou protéines cibles et les différents cancers dans lesquels ces molécules sont utilisées. *(D'après Sennino B et McDonald DM, Nature Reviews Cancer, 2012)*

PARTIE 5 : Les mécanismes de résistances aux traitements anti-angiogéniques

Les traitements anti-angiogéniques ont un effet rapide et robuste sur la vascularisation tumorale. Ils ralentissent la croissance de différentes tumeurs primaires et la formation de métastases. Cibler le VEGF permet une normalisation des vaisseaux sanguins. Ces inhibiteurs augmentent l'efficacité de certaines chimiothérapies (Bagri et al., 2010; Gerber et Ferrara, 2005). Les bénéfices cliniques sont caractérisés par une augmentation de la survie sans progression dans les cancers avancés du colon, du poumon, du sein, du rein, du pancréas et de l'ovaire. Dans la plupart des cas ces effets ne se répercutent pas ou peu sur l'augmentation de la survie globale des patients. Cette efficacité limitée n'est pas spécifique des molécules anti-angiogéniques. Beaucoup de thérapies anticancéreuses n'ont que très peu d'effet sur la survie globale des patients. La plupart des cancers avancés sont susceptibles d'échapper au traitement. Quand les traitements anti-angiogéniques sont associés à une chimiothérapie, l'échappement peut être lié à l'un des traitements ou à la combinaison des deux molécules. Des études précliniques suggèrent que l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation du VEGF diminue la croissance tumorale mais favorise l'échappement, la progression et la formation de métastases (Ebos et Kerbel, 2011).

Des milliers de patients sont traités par des molécules anti-angiogéniques pour un cancer. L'ensemble de la population de patients montre un effet limité du traitement. Parmi ces patients, certains vont être réfractaires au traitement dès le départ et vont être indifférents aux anti-angiogéniques. Mais la majorité des patients vont répondre puis échapper rapidement au traitement. D'un autre coté, certains patients sont très répondeurs et vivent significativement plus longtemps. Dans la plupart des cas, les tumeurs angiogéniques vont s'adapter à la présence des anti-angiogéniques en échappant à ce blocage thérapeutique de l'angiogenèse (FIG13). Ce concept d'échappement est très différent du concept traditionnel d'acquisition de résistances. Dans la plupart des cas, il ne s'agit pas de l'apparition d'une mutation qui va entrainer une modification de la protéine cible ou du métabolisme de la drogue. L'échappement est un mécanisme indirect, au cours duquel la tumeur va trouver un moyen alternatif de maintenir la croissance tumorale alors que la cible de l'anti-angiogénique reste inhibée.

Ces observations mettent en évidence l'importance de trouver des marqueurs permettant de prédire la réponse et d'anticiper l'apparition de résistances (Jain et al., 2009b; Jubb et Harris,



<u>Figure 13</u> : Les deux modes de résistances aux traitements anti-angiogéniques

La résistance adaptative. Après une phase de réponse initiale la tumeur est capable de s'adapter et d'échapper au blocage thérapeutique. Cette résistance permet la reprise de la croissance et de la progression tumorale.
La résistance intrinsèque. Les conditions préexistantes permettent à la tumeur d'être insensible au traitement. Aucun bénéfice des thérapies anti-angiogéniques n'est observé, la tumeur va progresser sous traitement.
(D'après Bergers G et Hanahan D, Nature Reviews Cancer, 2008)

2010). La progression de la maladie pendant le traitement est attribuée à différents mécanismes pouvant interagir et s'additionner. Nous citerons par exemple, la compensation par des facteurs angiogéniques redondants qui ne sont pas bloqués par les inhibiteurs de la signalisation VEGF, la normalisation vasculaire, la co-option de vaisseaux sanguins normaux à la périphérie de la tumeur, l'augmentation de l'hypoxie intra tumorale, l'activation de voies de signalisation favorisant la transition épithélium-mésenchyme (EMT), l'augmentation des capacités invasives des cellules tumorales, la suppression de la surveillance immunitaire, l'induction de tolérance immune et l'activation de cellules souches cancéreuses. (Bergers et Hanahan, 2008; Giuliano et Pages, 2013; Loges et al., 2010). D'autres mécanismes qui contribuent à la résistance sont proposés. La modification des isoformes majoritaires du VEGF, des changements au sein du complexe NRP-1/VEGFR-2 (Van Cutsem et al., 2012a) et la perte de la dépendance des cellules pour le VEGF via une diminution de l'expression du VEGFR-2 (Arao et al., 2011; Sitohy et al., 2011). Les inhibiteurs des récepteurs à activité tyrosine kinase peuvent être éliminés rapidement (Arrondeau et al., 2012) ou être séquestrés dans les lysosomes (Gotink et al., 2011). Prévenir, diminuer ou reverser la résistance est essentiel pour limiter les effets secondaires et augmenter l'efficacité des traitements. La complexité et la diversité des mécanismes observés font de cet objectif un challenge très important. Nous passerons en revue ici, les principales pistes étudiées pour prévenir ou combattre ces phénomènes de résistances.

1. L'apport de la chimiothérapie

Les chimiothérapies utilisées en combinaison avec les traitements anti-angiogéniques peuvent favoriser l'apparition de résistances mais peuvent permettre de surmonter ces phénomènes de résistance. L'importance d'utiliser le BVZ en association avec une chimiothérapie a largement été démontrée (Kerbel, 2009) mais les bénéfices dépendent du type de chimiothérapie, de la dose utilisée, du plan de traitement et du type de tumeur (Macedo et al., 2012). D'après différentes données précliniques et cliniques, les résultats du BVZ sont améliorés quant il est associé à une dose faible mais continue de chimiothérapie. Le mécanisme d'action étant toujours débattu (Montagna et al., 2012) (Kerbel et al., 2007).

2. L'inhibition de plusieurs facteurs angiogéniques

L'action d'un grand nombre de facteurs de croissance compense l'inhibition de la signalisation VEGF et contribue à l'apparition de résistances au traitement. Ce mécanisme de relais favorise l'angiogenèse tumorale indépendante du VEGF. Nous pouvons citer par

exemple, les angiopoïétines (Huang et al., 2009), le PlGF (Rolny et al., 2011), le FGF (Alessi et al., 2009), CXCL8 (Grepin et al., 2012; Huang et al., 2010) et le PDGF (Cao et Liu, 2007; Ellis et Al-Saleh, 2012; Hutson et al., 2010; Roskoski, 2007) dont différentes études ont montré l'implication dans l'échappement aux thérapies anti-VEGF. Le VEGF-C et le VEGF-D sont également impliqués dans cette résistance. L'inhibition simultanée des deux voies de signalisation, VEGFR-2 et VEGFR-3 est proposée afin de limiter ces résistances et d'améliorer l'efficacité du traitement anti-angiogénique (Sallinen et al., 2009; Tammela et al., 2008). Chez la souris, inhiber la signalisation FGF (Casanovas et al., 2005) ou bloquer Ang-2 (Hashizume et al., 2010) augmente l'efficacité des inhibiteurs du VEGF. Les niveaux plasmatiques de PlGF augmentent chez les patients atteints de cancer colorectal (Willett et al., 2005), de cancer du rein (Rini et al., 2009) ou de glioblastome (Batchelor et al., 2007) traités par des anti-VEGF. L'association d'un anticorps anti-PlGF et du BVZ est actuellement en étude clinique de phase I dans le traitement des glioblastomes et des carcinomes hépatocellulaires. Beaucoup de travail est encore nécessaire pour valider l'efficacité d'inhiber le PlGF dans les cancers réfractaires aux anti-VEGFs. Ces résultats suggèrent que l'inhibition du PlGF, du FGF ou du PDGF pourrait aider à maitriser ces résistances. La diversité des facteurs pouvant prendre le relais du VEGF et favoriser l'angiogenèse est très importante. Le nombre de molécules responsables des phénomènes de résistances observés est immense. La question de la faisabilité et de la pertinence de cette approche à long terme est donc posée.

3. La déstabilisation des vaisseaux sanguins tumoraux

Les vaisseaux sanguins qui persistent après un traitement anti-angiogénique sont plus matures avec un recouvrement plus étanche par les péricytes (Inai et al., 2004). Cela entraine une diminution de la pression interstitielle intra-tumorale. Cette normalisation vasculaire augmente l'efficacité des traitements en favorisant l'accessibilité de la chimiothérapie à la tumeur. Le BVZ entraine un remodelage des vaisseaux sanguins tumoraux et modifie leur perméabilité ce qui augmente l'efficacité de la chimiothérapie associée dans les neuroblastomes (Dickson et al., 2007) et dans le mélanome (Turley et al., 2012). Cette étanchéité limite également l'extravasation des cellules tumorales et la formation de métastases (De Bock et al., 2011). Une étude de phase II suggère qu'un traitement néo-adjuvant au BVZ augmente l'efficacité de la radiothérapie dans le cancer du rectum (Madajewicz et al., 2012; Willett et al., 2007). L'association BVZ / chimiothérapie / radiothérapie est actuellement testée avec succès dans le traitement du cancer du rectum invasif (Poultsides et al., 2009; Willett et al., 2009). Ces résultats nécessitent une confirmation

dans une étude prospective afin de déterminer le bénéfice à long terme de cette association sur la survie des patients.

Cette normalisation vasculaire a également des effets délétères sur l'efficacité des traitements anti-VEGF et sur le développement tumoral. Ces vaisseaux matures permettent la croissance tumorale avec peu ou pas d'angiogenèse (Helfrich et al., 2010). Ces vaisseaux sont résistants à l'inhibition de la signalisation VEGF. La réduction de la vascularisation intra tumorale limite la délivrance de certains médicaments. Dans le cancer du poumon, 5 heures après le traitement au BVZ, une diminution de la perfusion tumorale et de la quantité de docetaxel administré au sein de la tumeur est observée (Van der Veldt et al., 2012). Cette diminution de la vascularisation est compensée dans certains cas par une co-option des vaisseaux sanguins péri-tumoraux par les cellules tumorales invasives. C'est un phénomène commun dans le glioblastome (Holash et al., 1999a) et le cancer du poumon (Pezzella et al., 1997). Il permet la croissance tumorale en absence d'angiogenèse en exploitant les vaisseaux normaux déjà existants. Déstabiliser les vaisseaux sanguins tumoraux est une approche thérapeutique intéressante pour contrer l'apparition des résistances. Cela augmente la sensibilité des vaisseaux sanguins aux traitements anti-VEGF. Une des pistes étudiée est l'inhibition de la signalisation Notch par le blocage la protéine Dll4. Dans des modèles précliniques, l'inhibition de la voie Notch par un inhibiteur des γ-sécrétases, le dibenzazepine ou DBZ, augmente l'efficacité du BVZ (Li et al., 2011). La combinaison BVZ/capecitabine améliore la survie sans progression de patientes avec cancer du sein. Ce résultat est observé uniquement chez les patientes pour lesquelles la protéine Dll4 intra-tumorale est faible ou indétectable (Jubb et al., 2011). Ces résultats suggèrent que la protéine Dll4 est un marqueur prédictif d'efficacité du BVZ dans le traitement du cancer du sein. Des études sont en cours afin de valider l'utilisation d'inhibiteurs de Dll4 pour lutter contre l'apparition de résistances et augmenter l'efficacité des traitements anti-VEGF.

4. L'inhibition du recrutement des cellules immunitaires

Dans des modèles précliniques, l'échappement aux traitements anti-VEGF s'accompagne du recrutement de cellules myéloïdes et autres cellules immunitaires au sein de la tumeur. Ces cellules produisent leurs propres facteurs angiogéniques, contribuant à la suppression de la surveillance immunitaire et favorisant l'apparition de résistances (Allavena et Mantovani, 2012) (Shojaei et Ferrara, 2008). Ces cellules produisent une quantité importante de MMP au sein de la tumeur. Ces MMPs favorisent la dégradation de la matrice extracellulaire et la

déstabilisation des contacts cellule-cellule. Les cellules infiltrantes vont ainsi promouvoir l'invasion des cellules tumorales (Hanahan et Coussens, 2012). Ces protéases sont également responsables de l'activation et/ou de la libération des facteurs de croissance à partir de la matrice extracellulaire.

Certaines tumeurs résistantes augmentent la sécrétion de certaines cytokines qui favorisent le recrutement de cellules myéloïdes et d'autres cellules. Ces cellules induisent l'angiogenèse et la tolérance immunitaire en sécrétant les cytokines suivantes; SDF-1 ou CXCL12, M-CSF et GM-CSF, CXCL8 ou encore CCL28. Dans les cancers avancés du rectum, les niveaux plasmatiques de SDF-1 sont corrélés avec la formation de métastases chez les patients traités au BVZ (Xu et al., 2009). Une étude clinique de phase I en cours dans les glioblastomes vise à évaluer l'efficacité d'associer au traitement BVZ une inhibition de CXCR4, le récepteur de SDF-1. Cette étude permettrait de valider le fait que l'échappement au traitement anti-VEGF peut être prévenu en bloquant le recrutement des cellules myéloïdes au sein de la tumeur. La cytokine M-CSF et son récepteur CSF-1R peuvent également être ciblés afin de limiter le recrutement de cellules myéloïdes. Dans un modèle préclinique de cancer du poumon, l'effet anti-tumoral d'un inhibiteur de VEGFR-2 est amélioré quand il est associé à un inhibiteur de CSF-1R (Priceman et al., 2010) suggérant que l'inhibition de la signalisation CSF-1R peut limiter l'évasion de la tumeur aux traitements anti-angiogéniques.

5. L'inhibition des processus favorisant la progression tumorale

Différentes études réalisées chez la souris ont montré que les traitements anti-VEGF ralentissent la croissance tumorale mais favorisent l'invasion tumorale et la formation de métastases (Ebos et al., 2009; Paez-Ribes et al., 2009). Ces résultats sont très variables et dépendent du type de tumeur, du microenvironnement, du traitement et de la dose utilisée. Ces résultats sont inconsistants suivant les études (Chung et al., 2012). Une analyse des études cliniques visant à caractériser l'efficacité du sunitinib par rapport à l'IFNα a été effectué. Aucune preuve de l'accélération de la maladie sous traitement sunitinib n'a été établie. Le sunitinib n'augmente pas la croissance tumorale et ne réduit pas la survie des patients traités. Cela démontre, encore une fois, que le traitement sunitinib est efficace dans le traitement des RCC métastatiques. Le sunitinib peut être administré aux patients sans risque d'accélérer la croissance tumorale ou la formation de métastases. Les résultats obtenus dans les modèles précliniques ne semblent pas applicables aux patients qui reçoivent du sunitinib en clinique (Blagoev et al., 2013).

a) La voie de signalisation de l'HGF

Des modifications de la signalisation du VEGF influencent d'autres récepteurs et les voies de signalisation en aval. Dans les glioblastomes un traitement anti-angiogénique met en place un dialogue entre les récepteurs du VEGF et le récepteur de l'HGF, le récepteur MET (Lu et al., 2012). L'inhibition du VEGF favorise un phénotype pro-invasif des cellules tumorales chez la souris et chez des patients traités au BVZ. Cet effet passe par l'inhibition d'une phosphatase membranaire PTP-1B qui favorise la phosphorylation de MET et la migration des cellules. Dans ce système, l'inhibition combinée du VEGF et de MET augmente la survie. Les tumeurs avec des niveaux d'expression élevés du récepteur MET sont en général plus agressives avec un pronostic moins favorable (Gherardi et al., 2012). L'activation de MET favorise la transition EMT et l'invasion tumorale (Pennacchietti et al., 2003). L'inhibition de la signalisation VEGF entraine une diminution de l'expression de marqueurs épithéliaux et augmente l'expression de marqueurs mésenchymateux. Dans les glioblastomes, l'expression de la fascine est augmentée après traitement BVZ (Narayana et al., 2009). Dans différents modèles précliniques, cibler l'angiogenèse et la progression tumorale est une approche intéressante. Cette approche prévient l'échappement au traitement anti-VEGF. Dans le cancer pancréatique, le blocage simultané de VEGF et de MET inhibe l'angiogenèse, l'invasion tumorale et la formation de métastases (Sennino et McDonald, 2012; You et al., 2011). Le bénéfice thérapeutique de bloquer le VEGF et le récepteur MET est en cours d'évaluation dans plusieurs essais cliniques. Plusieurs approches sont étudiées. L'association d'un anticorps spécifique de MET, l'onartuzumab avec le BVZ et la chimiothérapie de référence est en cours de phase II dans le cancer du poumon, le cancer du sein et le cancer colorectal. Des inhibiteurs bloquant les deux récepteurs existent également. Le cabozantinib, est actuellement en cours de phase III dans le traitement des cancers de la prostate résistants et métastatiques. Ce composé ciblant le récepteur du VEGF et le récepteur MET est un inhibiteur puissant de l'angiogenèse, de la croissance tumorale, de l'invasion et de la formation de métastases dans différents modèles de tumeurs chez la souris (Yakes et al., 2011). Le foretinib est actuellement en essais de phase II pour le traitement des cancers du rein papillaires.

b) L'hypoxie et le facteur de transcription HIF-1

Les traitements anti-VEGF en bloquant l'angiogenèse tumorale entraine une diminution rapide et importante du réseau vasculaire intra-tumoral. Cette diminution de la vascularisation tumorale entraine une augmentation de l'hypoxie et la stabilisation de HIF-1α. Cette amplification de l'hypoxie contribue à l'apparition de résistances en sélectionnant des cellules tumorales plus agressives capables de survivre dans un environnement pauvre en oxygène (Semenza, 2010). Cibler HIF-1α et l'angiogenèse est une stratégie potentielle pour limiter l'échappement au traitement anti-VEGF. Le topotecan, un inhibiteur de la topoisomérase 1, inhibe la traduction de HIF-1α par un mécanisme indépendant des dommages à l'ADN (Rapisarda et al., 2004). Une faible dose journalière de topotecan en combinaison avec le BVZ, inhibe la prolifération cellulaire, augmente l'apoptose et favorise l'action du BVZ. Dans un modèle de glioblastome l'association BVZ + topotecan limite la croissance tumorale par rapport au traitement BVZ seul (Rapisarda et al., 2009). Des résultats similaires sont observés avec un autre traitement anti-angiogénique, le pazopanib dans un modèle de cancer ovarien (Hashimoto et al., 2010). Un dérivé de cet inhibiteur, l'EZN-2208, est en cours d'évaluation chez des patients atteints de différents types de cancers réfractaires aux traitements de référence. L'hypoxie, via l'accumulation de HIF-1α, augmente l'expression d'un grand nombre de protéines impliquées dans le métabolisme glycolytique, la consommation d'oxygène, la résistance à l'apoptose, l'évasion de système immunitaire, l'angiogenèse, l'invasion et la formation de métastases (Semenza, 2010). Ces protéines sont autant de cibles potentielles pour le traitement des tumeurs résistantes aux anti-angiogéniques ou pour prévenir l'apparition de ces résistances.

6. L'inhibition de l'activation des cellules souches cancéreuses

Un traitement avec le sunitinib ou le BVZ entraine une augmentation de l'hypoxie intra-tumorale dans des xénogreffes de cancer du sein. Cette hypoxie s'accompagne d'une augmentation de la population de cellules souches cancéreuses. Ces cellules limitent l'efficacité des traitements anti-angiogéniques et favorisent l'apparition de résistances ainsi que les récidives. Un traitement combinant anti-angiogéniques avec une drogue ciblant les cellules souches cancéreuses serait une alternative thérapeutique pertinente (Conley et al., 2012).

7. La dormance tumorale

La dormance se caractérise par un arrêt de croissance des cellules tumorales notamment dans des conditions de stress cellulaire ou de défaut en facteurs de croissance (Aguirre-Ghiso, 2007). Ces cellules peuvent rester dans cet état de dormance pendant une période plus ou moins longue. La taille limitée de ces tumeurs les rend cliniquement indétectables. Elles n'évoluent pas ou peu à cause d'un défaut de vascularisation ou d'une suppression immunitaire efficace (Almog, 2010). Les cellules tumorales en dormance se caractérisent par une activité ERK faible mais une activité p38 élevée (Sosa et al., 2011). Leur viabilité à long terme est assurée par l'activation de l'autophagie (Sosa et al., 2013). Les cellules souches cancéreuses peuvent également entrer en dormance (Patel et Chen, 2012). Les tumeurs dormantes se caractérisent par un réseau vasculaire limité et instable ne permettant pas la croissance tumorale. Les traitements anti-angiogéniques pourraient amplifier cet effet. L'expression d'inhibiteurs naturels de l'angiogenèse provoque l'entrée en dormance de différentes tumeurs primaires (Holmgren et al., 1995; O'Reilly et al., 1996). Ainsi, les cellules tumorales pourraient acquérir des résistances pendant la phase de dormance ou entrer en quiescence sous traitement. L'arrêt du traitement favoriserait la prolifération de ces cellules et la progression tumorale. Les cellules en dormance développeraient finalement un phénotype plus agressif en devenant résistantes à la chimiothérapie et/ou à la radiothérapie et favoriseraient ainsi la récurrence et l'évolution de la maladie après l'arrêt du traitement (Naumov et al., 2003).

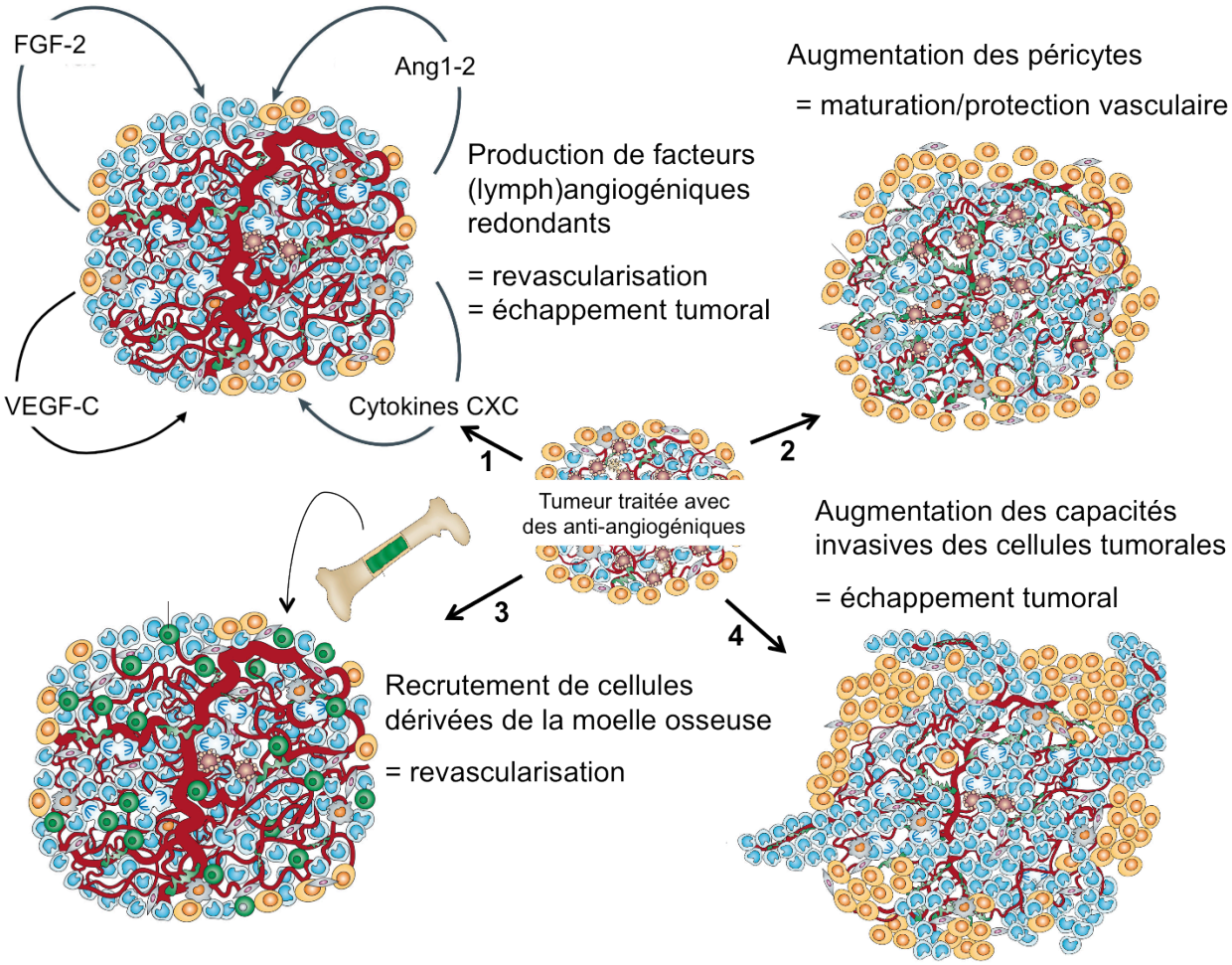
En résumé, il existe quatre mécanismes majeurs d'échappement aux traitements anti-angiogéniques (FIG14) :

- L'activation ou l'augmentation d'une voie de signalisation pro-angiogénique redondante.
- Le recrutement de cellules myéloïdes pro-angiogéniques.
- La stabilisation et l'augmentation de l'intégrité vasculaire via une augmentation du recouvrement par les péricytes qui diminuent l'importance du signal de survie dépendant du VEGF.
- L'augmentation des mécanismes d'invasion et de dissémination métastatique.

Malheureusement certains patients sont insensibles aux traitements anti-angiogéniques dès le début du traitement. Par extrapolation avec ce qui a été décrit pour les résistances acquises les mécanismes de résistances intrinsèques sont les suivants :

- La préexistence de signaux pro-angiogénique redondants.
- La préexistence de cellules inflammatoires infiltrantes qui protègent les vaisseaux.
- L'hypo-vascularité des tumeurs dont la croissance est indépendante de l'angiogenèse.
- Le statut invasif et métastatique préexistant.

La majorité des patients qui décèdent des suites d'un cancer, meurent suite à la formation de métastases (Mehlen et Puisieux, 2006). Cela démontre l'importance de ce phénomène pour le devenir des patients. Dans le cancer colorectal dans lequel la tumeur primaire est généralement éliminée par chirurgie, l'apparition de métastases se produit même sous traitement BVZ et chimiothérapie. Le BVZ augmente la survie sans progression durant la première année de traitement mais la survie n'augmente plus après l'arrêt du traitement (Allegra et al., 2011). Pourtant, la formation de métastases est dépendante de l'angiogenèse tumorale. Pourquoi le BVZ qui bloque l'angiogenèse *in vivo* n'augmente pas de façon significative la survie à long terme des patients ? Ces résultats suggèrent que la durée du traitement est importante et qu'il faudrait poursuivre le traitement BVZ même après progression. Le maintien du traitement BVZ après progression améliore la survie des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique ou d'un cancer du sein (Cartwright et al., 2012; Grothey et al., 2008). Actuellement, bloquer l'angiogenèse et les mécanismes qui contrôlent la progression tumorale semblent être la ligne de conduite à suivre pour le traitement des cancers sensibles aux anti-angiogéniques. Mais il reste toujours des efforts à faire pour mieux comprendre les mécanismes contrôlant l'apparition des résistances afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et surtout des marqueurs prédictifs d'efficacité des différents traitements. Ces marqueurs qui font cruellement défaut actuellement sont pourtant indispensables afin d'identifier les patients potentiellement répondeurs et surtout d'anticiper l'apparition des résistances en cours de traitement.



<u>Figure 14</u> : Les différents types de résistances aux traitements anti- angiogéniques

1. On observe sous traitement une production de facteurs (lymph)-angiogéniques redondants qui vont favoriser la (lymph)-angiogenèse tumorale indépendamment du facteur ciblé par la drogue. Cela permet la reprise de la croissance tumorale et la dissémination métastatique sous traitement. **2.** On observe sous traitement une augmentation du recrutement des péricytes et une maturation vasculaire. Cette normalisation vasculaire favorise la survie des vaisseaux tumoraux et la résistance aux traitements anti-angiogéniques. **3.** On observe sous traitement une augmentation de l'hypoxie intra-tumorale. Cette augmentation induit la surproduction de plusieurs cytokines (VEGF, SDF-1) qui favorise le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse. Ces cellules favorisent la reprise de l'angiogenèse et de la progression tumorale sous traitement. **4.** On observe sous traitement une augmentation des capacités de migration et d'invasion des cellules tumorales. Les cellules tumorales sont alors capables d'échapper au manque d'oxygène et de nutriments. La dissémination de ces cellules favorise la formation de métastases sous traitement. *(D'après Bergers G et Hanahan D, Nature Reviews Cancer, 2008)*

PARTIE 6 : La limitation majeure des anti-angiogéniques : l'absence de marqueurs prédictifs d'efficacité

Presque dix ans après la première autorisation de mise sur le marché pour une molécule anti-angiogénique dans le traitement des cancers, aucun marqueur prédictif d'efficacité n'est définitivement validé. Pourtant l'utilisation des marqueurs prédictifs est indispensable pour une meilleure prise en charge des patients. De façon générale, l'amélioration de la survie globale des patients sous traitement anti-angiogénique est limitée. Mais certains patients répondent mieux que d'autres. Il est donc important de mettre en évidence des marqueurs permettant de sélectionner les patients les plus répondeurs. Ces marqueurs optimiseraient la dose et le plan de traitement de ces drogues. Identifier des marqueurs de résistances au traitement mettrait en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques. Enfin, ils permettraient d'identifier les patients avec un risque important de développer des effets secondaires. D'un point de vue économique, ces marqueurs sont également très importants. Les couts de ces traitements sont très élevés. Pouvoir sélectionner les patients répondeurs avant traitement rationnaliserait les dépenses de santé.

1. Un bon marqueur prédictif

De façon générale, un bon marqueur prédictif doit être facilement mesurable avec une technique peu invasive et doit permettre une évaluation rapide. Le mécanisme ciblé par les traitements anti-angiogéniques est très complexe. La diversité des traitements et la variabilité de la réponse au traitement sont donc très importantes. Ainsi, il est facile d'imaginer la difficulté d'identifier un marqueur prédictif universel qui ne serait sans doute pas suffisant. Pour sélectionner les patients avec une sensibilité plus importante, la clé est l'identification de marqueurs prédictifs de l'efficacité. Bien que certains résultats semblent prometteurs, aucun marqueur n'est utilisé en routine pour sélectionner les patients répondeurs au traitement. Beaucoup d'efforts sont encore nécessaires afin de valider les études précliniques chez l'Homme et sur un grand nombre de patients. Un traitement personnalisé en fonction des prédispositions de chacun est l'objectif à atteindre dans le futur.

2. Marqueurs prédictifs de réponse au BVZ

Beaucoup de facteurs angiogéniques circulants ont été mesurés pour prédire la réponse au traitement. Le plus étudié est sans aucun doute le VEGF. L'augmentation des niveaux plasmatiques ou intra-tumoraux de VEGF est un indicateur de mauvais pronostic. Les données concernant le rôle prédictif des niveaux de VEGF avant ou pendant le traitement sont très hétérogènes.

a) Les facteurs circulants

Certaines études suggèrent que des niveaux élevés de VEGF avant traitement favorise l'action du BVZ mais d'autres ne mettent en évidence aucune corrélation entre les niveaux de VEGF et l'efficacité du traitement. Une méta-analyse sur des patients atteints de cancer colorectal, de cancer du poumon ou de cancer du rein confirme que les niveaux de VEGF avant traitement peuvent servir de marqueurs de mauvais pronostic mais pas de marqueur prédictif de l'efficacité du BVZ (Hegde et al., 2013). Les niveaux d'expression avant traitement du récepteur soluble VEGFR-1 sont inversement corrélés avec la survie des patients traités avec le BVZ ou un autre anti-VEGF dans au moins cinq études indépendantes. De manière générale, les niveaux de base des facteurs angiogéniques circulants ne permettent pas de prédire l'efficacité du traitement BVZ. Les niveaux d'expression des formes courtes de VEGF, comme le VEGF121 semble être un meilleur marqueur prédictif circulant. Les patients atteints de cancer du sein ou de cancer gastrique présentant des niveaux plus élevés de ces formes courtes de VEGF répondent de façon plus efficace au traitement BVZ avec une augmentation significative de la survie sans progression et/ou de la survie globale (Miles et al., 2013; Van Cutsem et al., 2012a).

b) Les cellules endothéliales

L'angiogenèse tumorale induite par le VEGF est en partie dépendante de la mobilisation de cellules endothéliales circulantes ou de progéniteurs endothéliaux. Ces cellules sont attirées au sein de la tumeur en croissance et contribuent à la formation du réseau vasculaire. Des concentrations élevées de ces cellules seraient le reflet d'une angiogenèse active et serviraient de marqueur prédictif aux traitements anti-angiogéniques (Jubb et al., 2011). Les thérapies anti-angiogéniques favorisent le recrutement des ces cellules au sein de la tumeur. Bloquer ce recrutement augmente l'efficacité des traitements (Shaked et al., 2006). Dans le cancer du sein, la viabilité des cellules endothéliales circulantes permet de prédire la survie des patients traités par des molécules anti-angiogéniques (Mancuso et al., 2006b).

Les cellules endothéliales circulantes ou les progéniteurs endothéliaux ont été évalués comme marqueurs prédictifs de réponse au BVZ. Les résultats sont très hétérogènes en fonction du type de cancer. Le nombre d'échantillons analysé est trop faible et nécessite une étude plus importante (Bertolini et al., 2006) afin de valider l'utilisation des cellules endothéliales circulantes comme marqueur prédictif.

c) Les récepteurs du VEGF

Des niveaux d'expression faibles du récepteur VEGFR-1 ou du corécepteur NRP-1 semblent prédire une réponse plus importante au BVZ. Une expression limitée favorise une augmentation de la survie sans progression et/ou une augmentation de la survie globale dans différents types de cancers (Jubb et al., 2011; Lurje et al., 2010; Van Cutsem et al., 2012a).

d) Les cellules myéloïdes

Ces cellules représentent une source importante de facteurs pro-angiogéniques et possèdent une activité immunosuppressive favorisant le développement tumoral (Loges et al., 2010). Quelques études chez l'homme ont étudié l'évolution de l'expression de ces cellules au cours du traitement BVZ. Le traitement augmente l'expression du SDF1 et de son récepteur CXCR4. Il favorise également l'expression de CXCL6 (Xu et al., 2009). Ces résultats suggèrent un lien étroit entre la résistance au traitement BVZ et l'expression intra-tumorale de cellules myéloïdes. Cependant, il semble techniquement difficile d'évaluer la présence de ces cellules ou les marqueurs qu'elles expriment afin d'utiliser ces données en routine pour prédire l'efficacité du BVZ chez les patients.

e) L'imagerie

L'imagerie de la perfusion tissulaire en IRM dynamique (DCE-MRI) permet d'évaluer les modifications de la structure et de la fonctionnalité des vaisseaux sanguins. Cette technique est donc un outil de choix pour évaluer la réponse au traitement BVZ (O'Connor et al., 2012).

f) Les polymorphismes génétiques

Différents polymorphismes des gènes du VEGF, de ses récepteurs et d'autres gènes impliqués dans l'angiogenèse tumorale, comme la cytokine CXCL8 par exemple peuvent être utilisés comme marqueurs pronostics et/ou prédictifs de l'efficacité des traitements anti-angiogéniques dans différents cancers (Jain et al., 2009a).

3. Les marqueurs prédictifs d'efficacité en fonctions des cancers

a) Le cancer colorectal

Dans le cancer colorectal, les niveaux d'expression de CXCL8 sont corrélés avec la réponse des patients au traitement BVZ associé à la chimiothérapie de référence. Le CXCL8 est une cytokine pro-inflammatoire et pro-angiogénique impliquée dans l'angiogenèse tumorale. Des niveaux élevés de cette cytokine avant traitement sont corrélés à une survie sans progression plus faible chez les patients traités (Kopetz et al., 2010). Une autre étude suggère que les niveaux sériques d'Ang-2 constituent un marqueur prédictif du traitement BVZ. Des niveaux faibles d'Ang-2 avant traitement sont corrélés à un meilleur taux de réponse et à une augmentation de la survie sans progression des patients traités BVZ et chimiothérapie (Goede et al., 2010). Plusieurs études ont mis en évidence qu'une quantité faible de cellules endothéliales circulantes favorise l'action des traitements anti-angiogéniques et augmente la survie sans progression et la survie globale des patients traités (Manzoni et al., 2012) (Matsusaka et al., 2011). Certains polymorphismes dans des gènes impliqués dans la régulation de l'angiogenèse sont également corrélés à une réponse positive des patients au BVZ, notamment les gènes codant IL-6, p53, MMP-9, CXCR1 et VEGFR-1 (Hansen et al., 2012). Enfin l'hypertension, un des effets secondaires les plus importants des traitements anti-angiogéniques, est associée à une augmentation de la survie sans progression des patients traités par le BVZ (De Stefano et al., 2011) et peut être considérée comme un marqueur prédictif dans le cancer colorectal métastatique.

b) Le cancer du sein

Le traitement du cancer du sein par des molécules anti-angiogéniques est controversé. Les résultats sont limités et ces traitements ne sont pas une option intéressante pour tous les cancers du sein. L'identification de marqueurs prédictifs d'efficacité des traitements anti-angiogéniques est donc essentielle. Des concentrations sériques faibles de VCAM-1 et d'ELAM-1 (deux molécules d'adhésion favorisant l'interaction entre les cellules immunitaires et les cellules endothéliales) prédisent la réponse clinique des patients au BVZ associé au docetaxel (Baar et al., 2009). Une diminution de l'expression des récepteurs solubles VEGFR-3 et Kit augmente la survie globale des patients traités au sunitinib après échec de la chimiothérapie anthracycline ou taxane (Burstein et al., 2008). Enfin, deux polymorphismes dans le gène du VEGF sont associés à une augmentation de la survie globale des patientes traitées avec l'association BVZ / paclitaxel (Schneider et al., 2008).

c) Les cancers hépatocellulaires

Dans les cancers hépatocellulaires, des niveaux plasmatiques élevés d'Ang-2 (Kaseb et al., 2012) ou des cytokines IL-6 et CXCL8 (Boige et al., 2012) avant traitement sont associés à une survie sans progression et une survie globale plus faible des patients traités avec le BVZ en combinaison avec l'erlotinib, un inhibiteur du récepteur de l'EGF. Dans une étude portant sur le sorafenib, les auteurs ont analysé les niveaux plasmatiques d'un grand nombre de cytokines angiogéniques avant traitement. Plus le nombre de cytokines avec des niveaux élevés augmente plus l'effet thérapeutique du sorafenib diminue (Miyahara et al., 2011).

d) Le cancer de la thyroïde

Le cancer de la thyroïde n'est pas le premier cancer auquel on pense quand on parle de thérapies anti-angiogéniques. Pourtant son développement est très dépendant de l'angiogenèse tumorale. Des niveaux élevés de MMP-2, PTTG, VEGF-C, CXCR4 et de FGF sont des marqueurs potentiels de l'agressivité de ces tumeurs. Les auteurs suggèrent que la combinaison VEGF-C et FGF favorise la progression et la formation de métastases (Liang et al., 2011). L'utilisation de molécules anti-angiogéniques pour le traitement de ces cancers semble donc prometteuse et est en cours d'essais cliniques chez l'homme. Des études permettent d'ores et déjà de mettre en évidence des marqueurs prédictifs potentiels de l'efficacité des traitements anti-angiogéniques. Le CXCL8 est un marqueur de l'efficacité du sunitinib dans des modèles précliniques (Broutin et al., 2011). Des niveaux faibles de VEGF sont associés à une augmentation de la survie sans progression des patients traités au motesanib (Bass et al., 2010). Enfin, chez des patients traités au sunitinib ou au sorafenib, les niveaux de thyroglobuline sont corrélés avec la réponse au traitement suggérant son utilisation potentielle comme marqueur prédictif de réponse (Marotta et al., 2013).

e) Le cancer du rein

Pour le traitement du cancer du rein, là encore, aucun marqueur n'est actuellement utilisé en routine en clinique. Pourtant, plus de 70% des patients ont une maladie localisée mais un tiers des patients rechute avec l'apparition de métastases après néphrectomie. Ce constat démontre l'importance de trouver des marqueurs prédictifs d'efficacité et de résistance au traitement. Il semble plus intéressant d'analyser la signature globale des facteurs angiogéniques circulants pour évaluer le bénéfice potentiel du sorafenib (Zurita et al., 2012) et du pazopanib (Tran et al., 2012) dans le traitement des RCC métastatiques. Des études génétiques suggèrent que certains polymorphismes peuvent augmenter le risque de développer un RCC (Purdue et al., 2011). Deux polymorphismes dans le gène de la cytokine CXCL8 sont associés avec une

diminution de la survie sans progression des patients traités par le pazopanib (Xu et al., 2011). La cytokine CXCL8 pourrait être impliquée dans la résistance des RCCs au traitement sunitinib (Huang et al., 2010). Un polymorphisme dans le gène du VEGFR-3 et du CYP3A5*1 est associé à une réduction de la survie sans progression des patients traités au sunitinib (Garcia-Donas et al., 2011). L'hétérogénéité de ces tumeurs entraine une variabilité de réponse importante. Les polymorphismes du gène CXCL8 ne sont pas retrouvés dans cette étude ce qui suggère l'importance de valider ces différents marqueurs dans des études regroupant un nombre de patients plus important.

En conclusion, de nombreuses pistes de facteurs prédictifs d'efficacité des traitements anti-angiogéniques sont actuellement à l'étude. Ces facteurs sont très variables en fonction du type de traitement, du type de cancers et des patients. Les efforts doivent être poursuivis afin de valider l'utilisation de ces marqueurs en clinique et de permettre une évaluation simple et rapide de l'efficacité d'un traitement avant de le prescrire aux patients.

PARTIE 7 : Les formes anti-angiogéniques du VEGF : de la découverte à la polémique

Dans la continuité du chapitre précédent sur les résistances aux traitements anti-angiogénique, nous ne pouvons pas passer à coté des formes anti-angiogéniques du VEGF. Jusqu'en 2002, l'activité de ce facteur de croissance des cellules endothéliales était exclusivement restreinte à une activité pro-angiogénique. Pourtant des formes de VEGF présentant une activité anti-angiogénique existent et la présence de ces formes au sein de la tumeur pourrait expliquer, au moins en partie, l'échec du BVZ chez certains patients. Le BVZ reconnaît avec la même affinité les formes pro- et anti-angiogéniques du VEGF ce qui pourrait limiter son action sur les formes pro-angiogéniques et bloquer l'effet positif du VEGF anti-angiogénique sur l'inhibition de l'angiogenèse (Varey et al., 2008).

1. Mais à quoi correspondent ces formes anti angiogéniques ?

Malgré un nombre considérable d'études menées sur le VEGF et son activité pro-angiogénique, très peu de choses sont connues sur la régulation de son épissage alternatif. C'est donc par hasard qu'en 2002, le Dr Bates DO et son équipe découvrent une nouvelle sous famille de VEGF résultant d'un épissage alternatif au sein du dernier exon du gène. A l'époque, l'équipe étudiait les niveaux d'expression du VEGF148 dans les RCCs par rapport

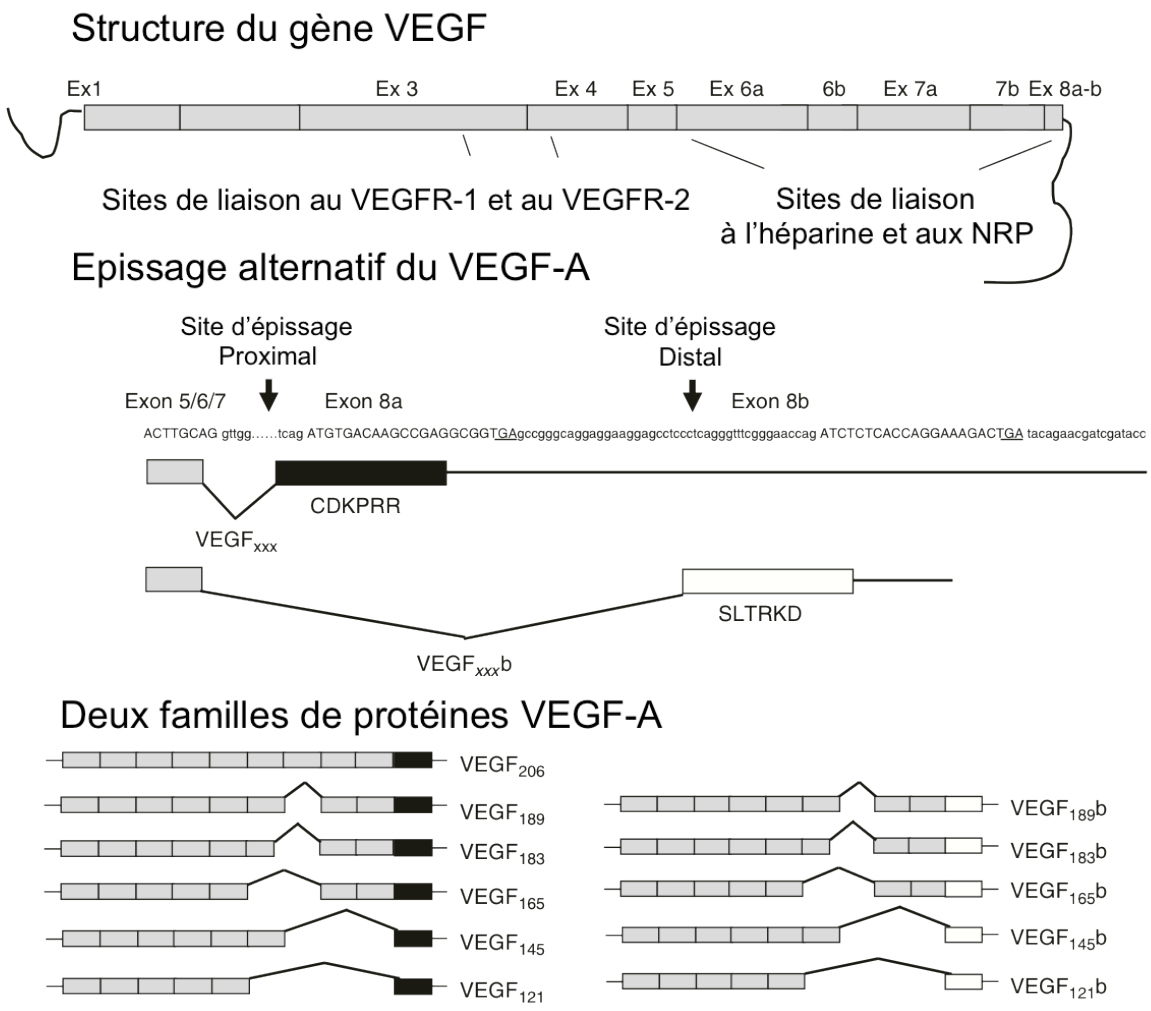
au rein normal. Après séquençage, ils se sont rendus compte qu'il s'agissait en réalité d'une forme inconnue d'épissage alternatif du VEGF165 qu'ils ont appelée le VEGF165b.

a) L'activité anti-angiogénique du VEGF165b

Après cette découverte dans le rein, l'expression de cette forme a été étendue à un grand nombre d'autres organes, avec des rapports VEGF165/VEGF165b, très différents d'un tissu à l'autre. L'expression du VEGF165b est diminuée dans les RCC par rapport au rein normal. Dans cette étude, 17/18 échantillons de rein normal expriment du VEGF165b alors que seulement 4/18 échantillons tumoraux en expriment. Le VEGF165b inhibe la prolifération, la migration et la vasodilatation de cellules endothéliales induites par le VEGF165 (Bates et al., 2002). Le VEGF165b inhibe la signalisation induite par le VEGF165 en jouant le rôle d'inhibiteur compétitif pour la fixation sur le récepteur VEGFR-2. Le VEGF165b inhibe l'angiogenèse induite par le VEGF165 *in vivo* et inhibe la croissance de différents types tumoraux chez la souris (Rennel et al., 2008) (Varey et al., 2008; Woolard et al., 2004).

b) La structure de ces formes anti-angiogéniques

Le VEGF165b ne diffère du VEGF165 qu'au niveau des six derniers acides aminés de la partie C-terminale de la protéine. Ces deux formes résultent d'un épissage alternatif au sein du dernier exon du gène. Cet exon, l'exon 8, peut être séparé en deux parties: la partie 8a et la partie 8b. Les protéines issues de cet épissage alternatif sont quasi identiques. Seuls les 6 derniers acides aminés de la protéine sont différents. Les formes comprenant la partie 8a se terminent par la séquence peptidique CDKPRR et sont notées VEGFxxx, alors que les formes contenant la partie 8b se terminent par la séquence SLTRKD et sont notées VEGFxxxb, avec xxx correspondant au nombre d'acides aminés de la protéine (Bates et al., 2002). Les formes VEGFxxx correspondent aux formes déjà connues et pro-angiogéniques du VEGF. La première forme de VEGFxxxb à avoir été identifiée est le VEGF165b mais par la suite la plupart des formes de VEGFxxx ont été associées à leur fausse jumelle xxxb. Les six acides aminés codés par l'exon 8b confèrent aux isoformes de VEGFxxxb des propriétés radicalement différentes de celles du VEGFxxx. Les altérations majeures sont la perte du résidu cystéine et le remplacement des deux arginines par une lysine et un acide aspartique. Ces différences altèrent de façon profonde la structure, la liaison au récepteur et la fonction du VEGFxxxb. Elles n'altèrent pas la capacité du VEGF165b à se fixer sur le récepteur VEGFR-2 et à entrainer sa dimérisation (FIG15).



<u>Figure 15</u> : Les isoformes anti-angiogéniques du VEGF : le VEGFxxxb

Le gène du VEGF contient 8 exons. Les sites pour la liaison aux récepteurs se retrouvent dans les exons 3 et 4 et ceux pour la liaison à l'héparine et à aux neuropilines dans les exons 6, 7 et 8a. L'épissage alternatif de la partie C-terminale génère de types d'isoformes : le VEGFxxx et le VEGFxxxb. L'utilisation du site d'épissage distal génère les formes VEGFxxx alors que l'utilisation du site d'épissage proximal génère les formes VEGFxxxb. Cet épissage alternatif donne naissance à deux familles de protéines qui ne diffèrent que dans leur partie C-terminale et qui possèdent des propriétés opposées. *(D'après Rennel ES, B J Cancer, 2009)*

Cependant, les changements de conformation nécessaires au repositionnement des kinases et à l'autophosphorylation du récepteur ne sont pas totalement efficaces (Harper et Bates, 2008; Kawamura et al., 2008). L'activation des voies de signalisation en aval du récepteur n'est pas optimale. Les formes de VEGFxxxb vont donc jouer le rôle d'inhibiteurs compétitifs en se liant sur le récepteur, empêchant ainsi la fixation du VEGFxxx. Cette fixation n'induit pas l'activation des voies de signalisation en aval du récepteur et n'entraîne pas les effets physiologiques du VEGF. Ainsi, le VEGF165b inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales induites par le VEGF165. *In vivo,* la sur-expression par les cellules tumorales de cette forme limite la croissance tumorale. L'administration de VEGF165b inhibe le développement de tumeurs chez la souris (Rennel et al., 2008). Ces formes de VEGFxxxb possèdent donc une activité anti-angiogénique par rapport à leurs homologues VEGFxxx qui exercent une forte activité angiogénique *in vitro* et *in vivo*. L'ensemble de ces résultats suggère que la manipulation de l'épissage alternatif du VEGF pourrait constituer une approche thérapeutique intéressante dans le traitement des cancers (Rennel et al., 2009).

c) La régulation du ratio VEGFxxx/VEGFxxxb

Dans la plupart des cellules primaires, comme les podocytes, les cellules pigmentées de la rétine et les cellules épithéliales du colon, l'expression du VEGFxxxb prédomine. A l'inverse dans les cellules de mélanome, de carcinome colorectal et de cancer du foie, les isoformes VEGFxxx représentent la majorité du VEGF. Dans les cellules épithéliales normales, le VEGF165b représente environ 75% du VEGF total. Une étude de 2008 démontre l'importance des facteurs de croissance et des facteurs d'épissage dans la régulation du ratio VEGF pro- versus anti-angiogénique. Un traitement à l'IGF et au TNFα favorise l'expression du VEGFxxx alors qu'un traitement au TGFβ favorise l'expression du VEGFxxxb. De plus, les facteurs d'épissage SF2/ASF et SRp40 favorise les formes pro-angiogéniques et le facteur SRp55 favorise les formes anti-angiogéniques (Nowak et al., 2008). Une modification de l'expression de ces facteurs de croissance ou des facteurs d'épissages impliqués dans la régulation du ratio VEGFxxx/VEGFxxxb peut constituer une approche thérapeutique intéressante dans le traitement des cancers (FIG16).

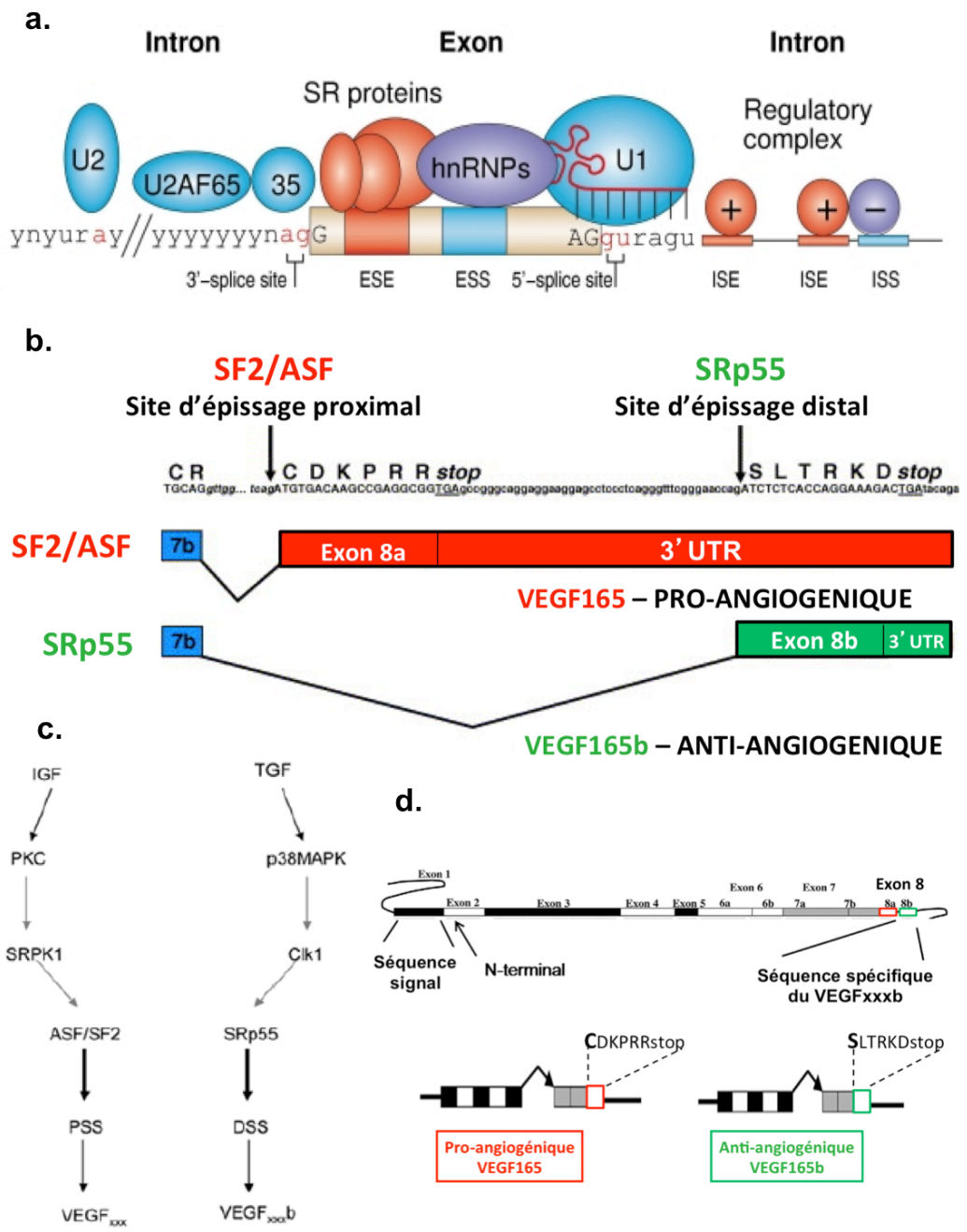


Figure 16 : La régulation de l'épissage alternatif du VEGF

a. Les facteurs SR se les lient au spliceosome (complexe protéique responsable de l'épissage alternatif) pour réguler l'épissage alternatif. **b.** Dans les cellules normales, les facteurs SR impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif du VEGF sont SF2/ASF et SRp55. Le premier favorise l'épissage proximal et l'expression du VEGFxxx, pro-angiogénique. Le deuxième favorise l'épissage distal et l'expression du VEGFxxxb, anti-angiogénique. **c.** Dans les cellules normales, l'expression des facteurs SR est régulée par les facteurs de croissance. Ces facteurs de croissance régulent l'activité des protéines kinases (SRPK1 et Clk1) qui régulent l'expression de SF2/ASF et SRp55, par phosphorylation. **c.** Après épissage seulement les 6 derniers acides-aminés de la protéine sont différents. *(D'après Pagani F et Baralle FE, Nat Rev Genetics, 2004 ; Harper S et Bates D, Nat Rev Cancer, 2008)*

2. Les isoformes anti-angiogéniques du VEGF : la polémique

Deux articles récents viennent alimenter une polémique autour de ces formes anti-angiogéniques. Le premier démontre que les isoformes VEGF121b et 165b ne sont pas anti-angiogéniques mais plus faiblement angiogéniques que les isoformes de VEGFxxx. Dans cette étude, des protéines recombinantes VEGF121b et 165b induisent la phosphorylation du récepteur du VEGF et des kinases ERK et stimulent la prolifération de cellules endothéliales. Ces isoformes stimulent également l'angiogenèse et la croissance tumorale *in vivo*. Les niveaux de VEGFxxxb sont augmentés dans le cancer du sein. Les auteurs de cet article suggèrent l'utilisation potentielle de ces isoformes en thérapie anti-cancéreuse dans le traitement du cancer du sein (Catena et al., 2010). Dans le second article polémique, les auteurs posent la question de savoir si ces isoformes de VEGFxxxb existent réellement dans des conditions physiologiques. En effet, ils indiquent qu'ils n'arrivent pas à amplifier les isoformes de VEGFxxxb dans les cellules ou les tissus murins ou humains testés selon les techniques décrites par Bates, DO et ses collaborateurs. Ainsi, ils soulignent l'importance de clarifier la biologie du VEGFxxxb, l'existence de ces isoformes, leur niveau d'expression et leur importance biologique dans la régulation de l'angiogenèse (Harris et al., 2012).

3. Le ratio VEGFxxx/VEGFxxxb : un marqueur prédictif de réponse au BVZ ?

En plein cœur de cette polémique grandissante sur les isoformes anti-angiogéniques du VEGF, un article de l'équipe de DO. Bates met en évidence une association entre les variants d'épissage du VEGF et la survie sans progression des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique et traités pas BVZ. Les patients atteints d'un cancer colorectal avec une tumeur exprimant des niveaux faibles de VEGF165b répondent de façon plus efficace au traitement de référence, le BVZ associé au FOLFOX, avec une survie sans progression plus importante par rapport à des patients qui expriment des niveaux plus élevés de VEGF165b. Ces résultats suggèrent qu'un rapport VEGF165b/VEGF total faible pourrait être un marqueur prédictif d'efficacité du traitement BVZ+FOLFOX dans le cancer colorectal (Bates et al., 2012).

PARTIE 8 : Le cancer du rein : un modèle de choix pour l'étude des thérapies anti-angiogéniques

1. Description de ces cancers

Le cancer du rein ou RCC pour « Renal Cell Carcinoma » représente actuellement environ 3% de l'ensemble des cancers (Jemal et al., 2010). Ce cancer asymptomatique est souvent détecté à un stade avancé de façon fortuite lors d'un examen de routine. La prise en charge initiale est toujours (si possible) la chirurgie avec l'élimination de la tumeur primaire. Si celle-ci est trop importante une néphrectomie totale est réalisée. Le traitement utilisé par la suite permet de traiter les métastases. Il existe plusieurs types histologiques de cancers en fonction de l'aspect anatomo-pathologique des coupes de tumeur. Plus de 80% des cancers du rein sont des cancers du rein à cellules claires (d'après l'aspect du cytoplasme qui apparaît clair du fait de la quantité important de glycogène, ccRCC). Environ 10 à 15% sont de sous type papillaire et 5-10% de sous type chromophobe. Plusieurs aspects génétiques déterminent les formes familiales ou sporadiques de RCC. Nous considèrerons pour la suite uniquement les ccRCC.

Dans la plupart des ccRCC, le gène codant la protéine VHL est muté. Dans ces tumeurs le facteur de transcription HIF-1α est donc stabilisé. Dans des conditions d'oxygénation normales pVHL induit l'hydroxylation de HIF-1α et sa dégradation par le protéasome. A l'inverse, dans des conditions hypoxiques, le facteur HIF-1α est stabilisé. Dans le cas d'une mutation de pVHL, HIF-1 est activé de façon constitutive et les gènes induits par HIF-1 sont surexprimés. C'est donc le cas du VEGF, du PDGF et du TGFα qui sont des facteurs majeurs favorisant le développement des ccRCC. Ces facteurs de croissance sont très fortement exprimés dans les cellules de ccRCC. Ces molécules favorisent l'angiogenèse tumorale. Ainsi, les ccRCC sont des tumeurs richement vascularisées. Cette situation génétique donne un rationnel important en faveur de l'utilisation de thérapies anti-angiogéniques. Le développement des thérapies anti-angiogéniques dans le traitement des ccRCC est d'autant plus important que ces tumeurs sont résistantes à la radiothérapie et répondent très peu aux chimiothérapies classiques.

L'activité de HIF est fortement associée au développement tumoral des RCCs. Dans ces tumeurs, les deux isoformes HIF-1α et HIF-2α ont des rôles bien distincts. En particuliers elles régulent de façon différentielle l'activité de l'oncogène c-Myc.

Dans les RCCs, HIF-1α inhibe l'activité de c-Myc. A l'inverse, HIF-2α potentialise les effets transcriptionnels et la prolifération induite par c-Myc (Gordan et al., 2007a; Mandriota et al., 2002. Dans les ccRCC, 70% des tumeurs présente une perte d'expression de la protéine pVHL. Parmi ces tumeurs certaines expriment seulement HIF-2α et d'autres expriment HIF-1a et HIF-2a. Dans les cellules qui n'expriment que HIF-2α, l'activité de c-Myc, la prolifération et la croissance tumorale sont augmentées (Gordan et al., 2007; Raval et al., 2005). L'isoforme HIF-2α est nécessaire et suffisante pour induire la croissance des tumeurs pVHL déficientes *in vivo* et l'inhibition de HIF-2α permet de réduire la croissance des RCCs (Kondo et al., 2003; Maranchie et al., 2002). Une délétion de HIF-2α est observée dans 40% des RCCs. L'expression de HIF-1α limite la croissance des RCCs alors que son inhibition favorise le développement tumoral. L'isoforme HIF-2α est donc l'oncogène principal dans les RCCs (Shen et al., 2011).

2. La prise en charge thérapeutique des RCC

Le seul traitement efficace avant le développement des thérapies anti-angiogéniques était l'utilisation de cytokines immunitaires: IL-2 ou IFNα. Ce dernier a été identifié comme un inhibiteur puissant de l'angiogenèse. Les effets anti-angiogéniques de l'IFNα sont attribués à une diminution de l'expression génique de la cytokine CXCL8 et du VEGF et une inhibition du FGF dans les cellules tumorales. Mais l'IFNα a également une action directe sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales. De plus, un traitement IFNα entraine une augmentation de l'expression de plusieurs régulateurs négatifs de l'angiogenèse ce qui suggère une amplification potentielle de son activité anti-angiogénique (Indraccolo, 2010). Pendant plus de 30 ans l'immunothérapie était le seul traitement pour les RCC métastatiques. Pourtant l'efficacité de ce traitement est très limitée avec seulement 10-15% de réponses objectives et le traitement est mal toléré (Cornu et al., 2008). Plusieurs études ont montré que la durée de vie des patients est significativement augmentée après néphrectomie avant le traitement par immunothérapie (Zini et al., 2009). Dans les RCC, les sites privilégiés des métastases sont les os et le cerveau (Bianchi et al., 2012). L'élimination par chirurgie des métastases augmente également le pronostic vital des patients (Russo, 2010). Historiquement, la médiane de survie des patients avec un ccRCC métastatique était de 10 mois (Motzer et al., 1999). L'arrivée des thérapies ciblées a complètement transformée le pronostic vital et considérablement améliorée la prise en charge de cette pathologie. L'utilisation en première ligne de ces thérapies permet d'augmenter la survie sans progression et/ou la survie globale

des patients (Escudier et Kataja, 2010; Motzer et al., 2009).

3. Les thérapies anti-angiogéniques dans le traitement des RCC

Quatre molécules sont actuellement utilisées en première ligne dans le traitement des ccRCC. Le sunitinib, le pazopanib, le BVZ en association avec l'IFNα et le temsirolimus. Trois autres molécules sont disponibles pour la deuxième ligne ou les suivantes, l'everolimus, l'axitinib et la sorafenib. D'autres molécules ou d'autres schémas de traitement sont en cours d'essais cliniques.

En se basant sur les différentes études cliniques de phase III, la séquence optimale de traitement pour les patients avec des RCCs à cellules claires ou non, serait le sunitinib en première ligne, suivi de l'axitinib puis de l'everolimus. Peu d'études cliniques étudient la suite des traitements à effectuer après l'échec des trois premières lignes. La meilleure alternative semble être une quatrième ligne sorafenib ou un nouveau traitement sunitinib. Ces recommandations ne peuvent cependant servir que d'indications. Les traitements doivent être adaptés pour chaque patient. La question se pose aujourd'hui de la place de la chirurgie dans la prise en charge des ccRCC. Les données cliniques montrent que la chirurgie est toujours importante mais la séquence idéale de traitement entre chirurgie et thérapie ciblée reste encore à définir. Les cancérologues ont actuellement six lignes de traitements différents pour la prise en charge des RCC métastatiques dont l'efficacité à été validée dans différentes études cliniques. Le sorafenib (Escudier et al., 2009a), le sunitinib (Motzer et al., 2007b), le BVZ associé à l'IFN α (Escudier et al., 2007; Rini et al., 2008), le pazopanib (Sternberg et al., 2010), le temsirolimus (Hudes et al., 2007; Motzer et al., 2007a) et enfin l'everolimus (Motzer et al., 2008).

Le BVZ, anticorps monoclonal anti-VEGF, en association avec l'IFNα a été approuvé en 2009 pour le traitement des ccRCC métastatiques. Cette indication se base sur deux études cliniques montrant l'efficacité de cette association par rapport à un traitement placebo ou un traitement IFNα seul. Dans les deux cas le traitement BVZ + IFNα augmente la survie sans progression respectivement de cinq et de trois mois par rapport au traitement contrôle mais n'augmente pas la survie globale des patients (Escudier et al., 2010).

Le sorafenib est un inhibiteur de plusieurs récepteurs à activité tyrosine kinase. Il a été approuvé dès 2005 dans le traitement des ccRCC métastatiques après des études cliniques montrant une augmentation de la survie sans progression et de la survie globale de quelques mois dans les groupes traités sorafenib par rapport aux groupes contrôles.

Le sunitinib est le même type de molécule que le sorafenib mais n'a été approuvé qu'en 2007.

Les résultats des études cliniques montrent une augmentation du taux de réponse (30%), de la survie sans progression (6 mois) et de la survie globale (6 mois) des patients traités au sunitinib par rapport aux patients du groupe contrôle.

Le pazopanib est un inhibiteur plus spécifique de récepteurs à activité tyrosine kinase impliqués dans la régulation de l'angiogenèse tumorale. Il a été approuvé pour le traitement des ccRCC avancés en 2009 suite à une étude clinique montrant que le pazopanib augmente la survie sans progression de cinq mois par rapport aux patients du groupe contrôle.

Le temsirolimus et l'everolimus sont deux inhibiteurs de mTOR qui ont été approuvés dans le traitement des ccRCC métastatiques respectivement en 2007 et en 2009. L'everolimus est un traitement de deuxième ligne quand les patients ne répondent plus au sunitinib ou au sorafenib. Ces deux inhibiteurs augmentent la survie sans progression des patients par rapports aux patients du groupe contrôle. Dans tous les cas les réponses complètes sont rares, une proportion significative des patients est réfractaire au traitement et les mécanismes de résistances ne sont pas connus.

4. Un rôle majeur des corécepteurs NRP dans les ccRCC

a) Les NRPs et l'angiogenèse tumorale

Le VEGF est le facteur pro-angiogénique majeur dans la régulation de l'angiogenèse tumorale. Il induit la prolifération, la survie, la migration et la perméabilité des cellules endothéliales (Ferrara et al., 2003). La création et le maintien d'une vascularisation intra-tumorale favorise la croissance des tumeurs et la formation de métastases. La fonction pro-angiogénique du VEGF est assurée en majorité par sa liaison au récepteur VEGFR-2. L'activation des voies PI3-K/Akt et PLCγ/ERK est responsable de la survie et de la prolifération induite par le VEGF. L'activation de la migration, de l'invasion et de l'organisation en réseau vasculaire par le VEGF nécessite l'interaction avec le corécepteur du VEGFR-2, la neuropiline (Pan et al., 2007). Ce récepteur a été décrit à l'origine dans le système nerveux. Deux isoformes existent: NRP-1 et NRP-2. La localisation et les ligands de ces deux isoformes diffèrent. NRP-1 est localisé à la surface des cellules endothéliales artérielles alors que NRP-2 est exprimé dans l'endothélium veineux et lymphatique. Ces récepteurs possèdent plusieurs types de ligands dont la famille des semaphorines et du VEGF. Nous nous focaliserons sur l'étude du rôle des NRPs comme corécepteurs des récepteurs du VEGF et de leur implication dans l'angiogenèse tumorale. NRP-1 interagit avec le VEGF, le VEGF-B, le VEGF-E et le PlGF. NRP-2 est spécifique du VEGF, du VEGF-C et du VEGF-D. Ce patron d'expression et d'agonistes spécifiques permettent des rôles physiologiques distincts de ces deux récepteurs.

La présence des NRPs a également été démontrée dans les cellules cancéreuses. Des niveaux élevés de NRP-1 sont exprimés dans de nombreux cancers. L'expression de NRP-1 est corrélée avec l'agressivité tumorale et la survie des patients suggérant un rôle important dans la progression tumorale (Ellis, 2006). NRP-1 participe à la signalisation autocrine dépendant du VEGF165 favorisant la croissance de cancers du sein (Bachelder et al., 2001). Différentes études précliniques démontrent un rôle essentiel de NRP-1 dans la prolifération, la migration et l'invasion de différents types de cellules tumorales (Beck et al., 2011; Cao et al., 2008; Hamerlik et al., 2012; Hong et al., 2007). L'utilisation d'un anticorps spécifique de NRP-1 en association avec un anticorps anti-VEGF est plus efficace pour inhiber la croissance tumorale dans plusieurs modèles précliniques (Pan et al., 2007). Ces résultats suggèrent que NRP-1 est une cible thérapeutique intéressante dans le traitement des cancers. Un inhibiteur pharmacologique a été développé: l'EG00229. Il bloque l'interaction entre VEGF165 et NRP-1 et inhibe l'activation du récepteurs VEGFR-2 et la migration cellulaire *in vitro*. Son effet anti-tumoral serait attribué à une augmentation de l'efficacité de certaines chimiothérapies comme le paclitaxel et le 5-fluorouracil sur les cellules tumorales (Jarvis et al., 2010). Une meilleure compréhension de la contribution de NRP-1 dans la régulation de l'angiogenèse tumorale est importante pour favoriser le développement de nouvelles molécules thérapeutiques dans le traitement des cancers.

b) Un rôle prépondérant dans la croissance tumorale des ccRCCs

La plupart des cellules tumorales de ccRCC n'expriment pas les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2. Par contre l'ARNm de NRP-1 est présent dans plusieurs de ces lignées. Dans les cellules de ccRCC l'expression de la protéine NRP-1 est augmentée par rapport à des cellules épithéliales rénales normales. Les niveaux d'expression augmentent avec l'agressivité des cellules tumorales. Ces résultats suggèrent un rôle prépondérant de NRP-1 dans le développement tumoral des ccRCCs. L'activité de NRP-1 passe par l'activation de la voie PI3K/Akt. Dans les cellules de ccRCCs l'inhibition de NRP-1 n'entraine aucune modification de la prolifération et de la survie des cellules. Par contre, cette inhibition diminue de façon significative les capacités de migration et d'invasion des cellules. Cette diminution s'accompagne d'une diminution de l'expression de MMP-9 et de l'activité de la protéine Rac1. Ces résultats suggèrent que NRP-1 régule la migration et l'invasion des RCCs via l'activation des MMP-9 et de la protéine Rac1. Dans des modèles murins, l'inhibition de NRP-1 dans les cellules réduit de plus de 80% la croissance tumorale par rapport à des cellules normales où l'expression de NRP-1 n'est pas inhibée. Ces résultats spectaculaires

confirment le rôle majeur de NRP-1 dans la croissance des ccRCCs. L'inhibition entraine une augmentation de l'expression de marqueurs épithéliaux, comme la cadhérine et une diminution de marqueurs mésenchymateux, comme SNAIL et α-SMA. Ainsi, l'inhibition de NRP-1 favoriserait la différenciation des cellules tumorales. Les auteurs vont plus loin en montrant que l'inhibition de NRP-1 réduit la signalisation sonic hedghog (shh) en diminuant l'expression de p63 (Cao et al., 2008). Ils suggèrent donc un modèle du rôle de NRP-1 dans les RCCs. Une forte expression de NRP-1 dans les cellules tumorales induit l'activation de la voie de signalisation Akt. Cette activation favorise l'expression de deltaNp63alpha qui augmente la signalisation shh. Cette voie permet le maintien d'un état non différencié au sein de la tumeur. Ainsi, l'inhibition de NRP-1, en bloquant cette voie, favorise la mise en place d'un phénotype épithélial mature. Cibler NRP-1 dans les ccRCCs pourrait contrer les effets des cellules souches cancéreuses présentes au sein de la tumeur et responsables d'un grand nombre de récidives tumorales. Les mêmes auteurs montrent que le VEGF sécrété par les cellules ccRCC exerce une boucle autocrine de prolifération via NRP-1. Ce mécanisme dépend de la voie de signalisation RAS (Cao et al., 2012b). Dans ce contexte la croissance tumorale induite par le VEGF est indépendante de l'angiogenèse. NRP-2 exprimé à la surface des cellules ccRCC interagit avec l'intégrine α-5 sur les cellules endothéliales ce qui permet leur extravasation et donc la dissémination métastatique (Cao et al., 2013).

En conclusion, l'expression quasi exclusive à la surface des cellules de ccRCC des NRPs et leur rôle dans la croissance tumorale font de ces corécepteurs une cible thérapeutique de choix dans le traitement des ccRCCs. Combiner l'utilisation des anti-VEGFs avec l'inhibition des NRPs est une perspective intéressante dans l'amélioration de l'efficacité de la prise en charge thérapeutique des ccRCCs.

OBJECTIFS

OBJECTIFS

Nos objectifs découlent d'un constat clinique sans appel. Même si l'arrivée sur le marché des anti-angiogéniques a révolutionné la prise en charge des ccRCCs, la plupart des patients traités par des anti-angiogéniques progressent sous traitement et certains patients sont mêmes réfractaires au traitement dès le départ.

Notre objectif initial était d'établir un modèle préclinique nous permettant de confirmer ces résultats dans un modèle murin de ccRCCs humains. Des souris nude sont injectées, en sous-cutané, avec des cellules humaines de ccRCC et traitées avec un anti-angiogénique de référence, le BVZ. A l'aide de ce modèle mimant la phase de progression observée chez les patients nos objectifs ont été d'identifier les mécanismes favorisant l'échappement tumoral sous traitement anti-angiogénique.

Différents mécanismes sont déjà décrits pour expliquer les résistances observées sous traitement anti-angiogénique. Un de nos objectifs est de vérifier si ces mécanismes généraux s'appliquent dans le traitement des ccRCCs et/ou si des mécanismes spécifiques de ce type de tumeur peuvent être mis en évidence.

Identifier les mécanismes mis en jeu nous permettrait d'anticiper sur l'apparition des résistances et d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients atteints de ccRCCs, qui reste malgré beaucoup de progrès encore très limitée.

Les traitements anti-angiogéniques sont les seuls traitements efficaces pour le traitement des ccRCCs. Les molécules disponibles, déjà utilisées ou en cours d'essai clinique, sont nombreuses. Cependant, la plupart de ces molécules cible le VEGF et ses récepteurs ou des intermédiaires en aval dans la voie de signalisation. La mise en évidence des mécanismes de résistance nous permettrait également d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement des ccRCCs.

Enfin, cette étude devrait nous permettre d'identifier des marqueurs pronostics et prédictifs d'efficacité des traitements anti-angiogéniques dans les ccRCCs. Ces derniers sont indispensables pour faciliter les choix thérapeutiques des cliniciens et d'anticiper sur l'apparition de résistances.

A plus long terme, ces marqueurs pourraient permettre aux cliniciens de favoriser la prise en charge personnalisée des patients atteints de ccRCC.

RESULTATS

ARTICLE 1

ARTICLE 1

Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines.

Grepin R*, Guyot M*, Jacquin M, Durivault J, Chamorey E, Sudaka A, Serdjebi C, Lacarelle B, Scoazec JY, Negrier S, Simonnet H, Pagès G.

* Co-auteurs

Article publié dans le journal Oncogene

1. Contexte scientifique et objectif

Le cancer du rein à cellules claires (ccRCC) est un cancer richement vascularisé. Dans la plupart des cas ces tumeurs présentent des mutations dans le gène von Hippel-Lindau qui entraîne une surexpression du facteur de croissance des cellules endothéliales : le VEGF. Pour cette raison, les ccRCC sont des cibles idéales pour les traitements anti-angiogéniques, et en particuliers le bévacizumab (BVZ), un anticorps monoclonal humanisé ciblant le VEGF. Le BVZ est actuellement un des traitements de référence dans la prise en charge du cancer du rein métastatique au coté d'autres traitements anti-angiogéniques ciblant entre autre l'activité des récepteurs du VEGF.

Pourtant, de façon surprenante, aucune étude préclinique n'a validé l'efficacité du BVZ dans un modèle de ccRCC. De plus, malgré la relevance dans ce type de cancer, son utilisation dans le traitement des ccRCC métastatiques n'a été acceptée que tardivement, trois ans après sa première utilisation dans le traitement du cancer du colon. Il existe plusieurs hypothèses pouvant expliquer ces contradictions. Les essais n'ont pas été publiés car non concluant et/ou la faible incidence des ccRCC et donc le faible intérêt financier associé n'ont intéressé que très tardivement les laboratoires pharmaceutiques.

De plus, dans les expériences menées chez la souris les doses utilisées de BVZ sont extrêmement variables et surtout nettement supérieures à celles administrées chez l'homme. Par exemple, dans leurs études, l'équipe du Pr Ferrara utilise une dose de 600µg/souris par semaine (30 mg/kg pour une souris de 20 g) contre une recommandation chez l'homme de 10 mg/kg toutes les deux semaines donc une dose six fois supérieure. Pourtant, les données de pharmacocinétique sont quasi identiques entre l'homme et la souris avec un temps de demi-vie terminal supérieur à une semaine.

Enfin, bien que les RCCs semblent un cas idéal justifiant l'utilisation du BVZ, certains patients sont réfractaires au traitement dès le début du traitement et d'autres développent des résistances en cours de traitement.

Pour toutes ces raisons notre objectif était de redéfinir un modèle murin pertinent de ccRCC à partir duquel nous pouvions tester l'efficacité du BVZ. Nous pensions qu'un modèle animal nous permettrait de comprendre l'apparition de phénomènes de résistances afin d'anticiper l'échec du BVZ et réagir en conséquence pour améliorer la prise en charge des patients et limiter les effets secondaires. Ainsi, nous avons mis en place un modèle murin, avec injection sous-cutanée de cellules humaines de ccRCC et traitement au BVZ (7.5mg/kg) une ou deux fois par semaine.

3. Résultats

De façon surprenante, nous observons que dans notre modèle murin, l'utilisation d'une dose de BVZ comparable à celle utilisée chez l'homme, accélère la croissance tumorale de façon significative par rapport au contrôle non traité. Comme dans la plupart des études cliniques décrites les doses utilisées sont deux fois supérieures à celles utilisées dans notre étude. Nous avons décidé de répéter l'expérience en traitant les souris deux fois par semaine. Dans ces conditions l'augmentation de la taille tumorale par rapport au contrôle est encore plus marquée. Nous pensons que le modèle mis en place mime la phase de progression observée dans la plupart des patients traités par BVZ.

a) Hypothèse de normalisation vasculaire

Une des hypothèses du mode d'action des anti-angiogéniques est la normalisation vasculaire.

En diminuant les niveaux de VEGF intra tumoraux, la vascularisation tumorale anarchique à tendance à être normalisée. La pression intra tumorale est diminuée par les anti-angiogéniques. Ainsi, la normalisation des vaisseaux sanguins augmenterait l'efficacité des chimiothérapies en favorisant leur administration au niveau de la tumeur. Notre modèle animal a permis d'étudier cette hypothèse.

Les ccRCC sont des tumeurs résistantes à de nombreuses chimio thérapies, la seule qui a montré un effet bénéfique en clinique est l'IFNα. Chez l'homme, le BVZ n'est jamais utilisé seul dans le traitement des ccRCCs. La chimiothérapie de référence utilisée en combinaison avec le BVZ est l'IFNα. Dans notre modèle préclinique, malgré la maturation des vaisseaux sous traitement BVZ, l'ajout d'une chimiothérapie, le paclitaxel, n'apporte aucun bénéfice par rapport au BVZ seul. Pourtant, le paclitaxel est efficace *in vitro*. Il inhibe la prolifération des

cellules de ccRCC. La critique de cette méthodologie est que nous n'avons pas utilisé la chimiothérapie de référence utilisée dans les ccRCC. Cette expérience a été réalisée à postériori. La combinaison IFNα+BVZ n'entraine pas de diminution significative de la croissance tumorale par rapport au BVZ seul. Ces résultats sont cohérents avec ceux observés chez l'homme puisque l'association BVZ+ IFNα augmente la survie sans progression que de quelques mois et n'a aucun effet sur la survie globale. Dans notre travail, nous avons utilisé le paclitaxel pour plusieurs raisons. Pour apporter une solution novatrice et potentiellement plus efficace pour le traitement des ccRCC. Le paclitaxel est déjà utilisé en combinaison avec le BVZ dans le cancer du sein, il est très efficace en culture sur les cellules de RCC et son mode d'action est très différent du BVZ. En stabilisant les microtubules, le paclitaxel inhibe la prolifération et la migration cellulaire et induit l'apoptose. Ainsi, la combinaison paclitaxel/BVZ pouvait diminuer de manière spectaculaire la croissance tumorale. Pourtant, malgré la normalisation vasculaire observée dans notre modèle le paclitaxel n'a aucun effet potentialisateur. Une critique importante concerne l'utilisation de PBS en traitement contrôle plutôt que des anticorps non relevant pour comparer avec les effets du BVZ. Conservons-nous l'effet pro-tumoral du BVZ si la référence de croissance tumorale est différente? Nous avons effectivement testé ce point dans des expériences *in vivo* ultérieures. Dans ces expériences, la différence entre les courbes de croissance BVZ et IgG contrôles est moins marquée qu'avec le contrôle PBS mais toujours significative. Ainsi, pour les expériences à venir ce contrôle sera privilégié.

Les cellules tumorales sont la source majeure de VEGF au sein de la tumeur mais le stroma est également responsable d'une production importante. Le BVZ cible spécifiquement le VEGF humain. Dans notre modèle de xénogreffe chez la souris, il cible le VEGF produit par les cellules tumorales humaines mais n'aura aucun effet sur le VEGF produit par les cellules de souris. Chez l'homme, le BVZ est efficace sur les deux sources de VEGF. Pour être plus proche de ce qui se passe chez l'homme, il faudrait dans notre modèle bloquer à la fois le VEGF humain et le VEGF de souris. Il serait donc intéressant de mesurer les taux intra-tumoraux de VEGF murin après les différents traitements effectués. Le kit de mesure que nous avons utilisé détecte le VEGF humain et murin. Aucune différence de quantité de VEGF n'a pu être mesurée alors que nous nous attendions à une diminution de la concentration de VEGF en présence de BVZ. Ceci suggère une compensation de production de VEGF par les cellules murines. Une telle compensation a déjà été montrée dans le cas de traitement sunitinib (Ebos et al., 2007). Des niveaux élevés de VEGF murin pourraient expliquer au moins en partie l'augmentation de la croissance tumorale sous traitement BVZ. Enfin, il serait

intéressant d'utiliser dans notre modèle un anticorps ciblant à la fois le VEGF humain et le VEGF de souris afin de vérifier si l'accélération de la croissance tumorale observée sous traitement BVZ est maintenue.

Le microenvironnement tumoral est très important pour le développement de la tumeur, la formation de métastases et l'apparition des résistances. Une injection orthotopique des cellules au niveau de la capsule rénale aurait peut être engendrée des résultats radicalement différents. La prise tumorale aurait certainement été plus rapide par rapport à la greffe sous cutanée pour laquelle il faut attendre 40 jours avant d'observer une tumeur et commencer le traitement. Il serait intéressant de connaître l'effet du BVZ dans ces conditions.

Une injection sous-cutanée ne permet pas de voir apparaître des métastases. Pourtant chez l'homme les anti-angiogéniques sont indiqués dans le traitement des ccRCC métastatiques et pour la plupart des patients, la tumeur primaire est éliminée par chirurgie avant tout traitement. Dans ce cas, l'injection des cellules dans la veine de la queue pour promouvoir la formation de métastases permettrait d'avoir des conditions se rapprochant plus des conditions de l'utilisation du BVZ en clinique. Un autre type d'approche est l'élimination de la tumeur primaire avant de débuter le traitement. Cette technique favorise l'apparition de métastases.

La seule chimiothérapie efficace dans le traitement des RCCs est l'IFNα ce qui suggère un rôle important de la réponse immunitaire dans le développement des ccRCCs. En utilisant des souris nude nous éliminons la plupart des effets du système immunitaire sur la tumeur et passons peut être à coté d'un mécanisme important. L'utilisation de modèle de cellules de ccRCC syngéniques, les cellules RENCA dans les souris BALB/C constituerait des expériences complémentaires importantes. Enfin, un traitement à plus long terme ou avec des doses plus élevées auraient peut être eu des effets positifs sur la croissance tumorale.

b) La lymphangiogenèse

En parallèle de la normalisation des vaisseaux sanguins, nous observons l'apparition de vaisseaux lymphatiques sous traitement BVZ. Ces vaisseaux sont absents dans les tumeurs contrôles. Cela s'accompagne d'une augmentation de l'expression intra tumorale de VEGF-C, facteur de croissance majeur des cellules endothéliales lymphatiques. Une étude a montré que la surexpression de VEGF-C, dans un modèle de carcinome de la peau, stimule l'extension du réseau lymphatique favorisant la dissémination des cellules tumorales et la formation des métastases (Hirakawa et al., 2007). Deux études publiées en 2009 ont montré que le traitement avec un autre anti-angiogénique, le sunitinib, favorise l'invasion tumorale et la formation de métastases dans des modèles murins de cancer du pancréas, de cancer du sein et

de glioblastome (Ebos et al., 2009; Paez-Ribes et al., 2009). Les hypothèses et les conclusions amenées par ces deux équipes sont différentes mais complémentaires. L'équipe de Paez-Ribes propose une réponse adaptative des cellules tumorales à la destruction des vaisseaux et à l'hypoxie induite par les anti-angiogéniques alors que l'équipe d'Ebos propose une modification du microenvironnement tumoral. Cette modification favorise la dissémination métastatique et augmente la sensibilité des organes qui deviennent plus permissifs à la formation des métastases. Nos résultats suggèrent que cette dissémination serait facilitée par l'extension du réseau lymphatique induit sous traitement anti-angiogénique. Une observation similaire a été réalisée dans le cas de modèles expérimentaux de glioblastomes traités par le BVZ (Grau et al., 2011).

Ainsi, une combinaison de traitements anti-angiogéniques avec des agents bloquant le VEGF-C ou son récepteur VEGFR3 limiterait la dissémination métastatique et donc la progression de la maladie. Des études menées chez la souris ont montré que cibler la voie VEGF-C/VEGFR3 inhibe la lymphangiogenèse tumorale, l'invasion et la dissémination métastatique (Achen et al., 2006; Achen et Stacker, 2008; Wissmann and Detmar, 2006). Il existe des facteurs régulateurs communs entre angiogenèse et lymphangiogenèse. Le VEGF et le FGF-2 peuvent réguler la lymphangiogenèse et le VEGF-C peut réguler l'angiogenèse. Ainsi, inhiber ces mécanismes de façon isolée peut s'avérer insuffisant. Depuis janvier 2012, une étude clinique multicentrique de phase I est en cours pour étudier l'effet d'un anticorps spécifique du VEGF-C, le VGX-100, seul ou en combinaison avec le BVZ dans le traitement de tumeurs solides à un stade avancé ou métastatique Cet anticorps est efficace, dans des modèles murins de cancers de la prostate, colorectaux, ovariens et de glioblastomes, seul ou en combinaison avec d'autres agents anti-angiogéniques ou chimiothérapeutiques (Les résultats sur le VGX-100 ont été présenté par le Dr Lee Rosen au 15ème Symposium International sur les thérapies anti-angiogénique à San Diego en février 2013 et à l'ASCO à Chicago en mai 2013). Les niveaux d'expression de VEGF-C ou VEGF-D sont significativement corrélés avec la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques et au pronostic vital des patients atteints de cancer colorectal suggérant l'utilisation de VEGF-C comme facteur pronostique dans le cancer colorectal (Hu et al., 2007b; Lin et al., 2011). Enfin, les niveaux de VEGF-C sont augmentés chez les patients atteints de cancer colorectal lors de la phase de progression de la maladie sous traitement BVZ / FOLFIRI suggérant, comme dans notre étude, l'importance du VEGF-C dans l'échappement au BVZ (Lieu CH et al., 2010 ; Sun, 2012). Ces résultats montrent l'importance du VEGF-C et de la lymphangiogenèse dans le développement tumoral et comme cibles thérapeutiques potentielles dans différents types de

tumeurs, concept à confirmer dans les ccRCC. Pour cela, nos résultats préliminaires montrent que le BVZ induit *in vitro* une augmentation de la sécrétion de VEGF-C par les cellules modèles que nous utilisons (786-O). Des cellules 786-O qui sur-expriment le VEGF-C de façon inductible ont été générées pour confirmer nos hypothèses. L'équipe de Grau et al, a aussi montré que le BVZ stimule l'expression de VEGF-C et D par des cellules de glioblastomes. Le traitement au BVZ augmente la capacité des cellules tumorales et des cellules endothéliales à répondre à une stimulation par le VEGF-C ou le VEGF-D. Ces résultats suggèrent que le BVZ entraine des modifications dans les cellules endothéliales et tumorales pouvant être à l'origine des phénomènes de résistance observés en cours de traitement (Grau et al., 2011). Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires afin de valider le VEGF-C comme marqueur prédictif de résistance au BVZ et comme cible thérapeutique dans les ccRCC.

c) Sélection in vivo de cellules tumorales plus agressives

Les cellules issues de tumeurs traitées BVZ ont des capacités de prolifération et d'invasion en matrigel accrues par rapport aux cellules issues de tumeurs traitées PBS. Ces résultats suggèrent que le BVZ permet la sélection *in vivo* de cellules plus agressives. Un crible affymétrix a mis en évidence une diminution de l'expression de l'ARNm de la phosphatase membranaire « Protein Tyrosine Phosphatase Receptor kappa (PTPRκ)» dans les tumeurs traitées BVZ par rapport aux tumeurs contrôles. L'expression de PTPRκ est induite par le TGFβ, un régulateur négatif de la croissance cellulaire (Flavell et al., 2008). Son expression est également fortement augmentée par la densité cellulaire ce qui suggère un rôle de cette protéine dans les mécanismes de régulation de l'interaction cellule-cellule, de l'adhésion et des mécanismes associés comme la prolifération cellulaire, l'invasion tumorale et la formation de métastases. Ces informations suggèrent que PTPRκ est un gène suppresseur de tumeur. Cette phosphatase régule entre autres, la phosphorylation de l'EGFR. La voie de signalisation EGF/EGFR est connue pour stimuler la prolifération et la migration cellulaire. Le traitement BVZ entraîne la diminution de l'expression de PTPRk, qui entraîne la diminution de la phosphorylation de ses récepteurs cibles, dont l'EGFR. Ce lien PTPRκ/EGFR expliquerait en parti l'augmentation de la prolifération et des capacités d'invasion des cellules isolées des tumeurs traitées BVZ via une activation constitutive des voies de signalisation ERK et AKT activées en aval de l'EGFR. Le BVZ induit la sélection de cellules indépendantes du VEGF pour leur prolifération et leur migration via une amplification d'autres voies de signalisation impliquées dans la régulation de la prolifération

cellulaire. Ce phénomène serait intrinsèquement lié à l'apparition des résistances au BVZ en cours de traitement. Ces résultats suggèrent l'efficacité potentielle de l'utilisation d'un inhibiteur de la voie EGFR (gefitinib ou erlotinib déjà utilisés en clinique pour le traitement de cancers du poumon et des voies aéro-digestives supérieures) en combinaison avec un anti-angiogénique ou lorsque le traitement anti-angiogénique devient inefficace. Des résultats préliminaires nous suggèrent que dans un modèle murin de ccRCC la combinaison BVZ/IFN-a/erlotinib inhibe de façon signification la croissance tumorale par rapport à la combinaison BVZ/ IFNα. Ces résultats valident l'importance de la voie EGF/EGFR dans la croissance des tumeurs ccRCC résistantes au BVZ. La phosphatase PTPRκ déphosphoryle également d'autres récepteurs comme le récepteur du HGF, c-MET dont l'activité est fortement associée à la croissance tumorale et la dissémination métastatique et pour lequel des inhibiteurs en essais cliniques sont disponibles. De plus, l'évaluation de l'expression de cette phosphatase avant ou en cours du traitement permettrait de mettre en évidence des patients potentiellement réfractaire au BVZ et d'anticiper sur l'apparition éventuelle de résistances au traitement en cours. Des résultats préliminaires ont mis en évidence que le traitement par le BVZ *in vitro* induit une diminution de l'expression de PTPRκ et de VEGF-C (ARNm et protéines) dans les cellules 786-O. Un lien entre l'amplification de la voie de signalisation de l'EGF/EGFR et une augmentation de l'expression de VEGF-C dans les cellules de mélanomes a été mis en évidence. L'expression de VEGF-C est associée à une augmentation de la lymphangiogenèse et la formation de métastases dans les ganglions lymphatiques (Bracher et al., 2013). Ces résultats suggèrent un lien étroit entre le traitement BVZ, la diminution de la phosphatase PTPRκ, la signalisation EGF/EGFR, l'augmentation des capacités prolifératives et migratoires des cellules tumorales et l'augmentation de la lymphangiogenèse via la production de VEGF-C par les cellules tumorales. De plus, la diminution de l'expression de PTPRκ est corrélée à une diminution de la survie sans progression et de la survie globale. *In vitro*, l'inhibition de PTPRκ favorise la prolifération, l'adhésion, la migration et l'invasion des cellules de cancer du sein (Sun et al., 2013). Ces résultats suggèrent que PTPRκ est un suppresseur de tumeur dans le cancer du sein. Des résultats similaires ont été obtenus dans les cellules de mélanomes pour lesquelles PTPRκ inhibe la croissance et la migration cellulaire via l'inhibition de la signalisation β-caténine (Novellino et al., 2008). Le rôle de PTPRκ en tant que marqueur pronostic de survie dans le ccRCC complémenterait notre étude. Différentes populations cellulaires issues de patients atteints de ccRCC à des grades différents ont été obtenues à partir d'échantillons tumoraux fraichement prélevés. Ces cellules

représentent des outils d'étude pertinents du rôle de PTPRκ. D'après notre hypothèse, les niveaux de PTPRκ devraient être corrélés avec l'agressivité ou le grade tumoral. Des cellules 786-O qui sur-expriment PTPRκ ou un shRNA spécifique de PTPRκ de façon inductible ont été générées. Ces cellules nous permettront de confirmer l'importance de PTPRκ pour la prolifération, l'adhésion et la migration des cellules de ccRCC *in vitro*. Utilisées dans un modèle murin, ces cellules nous permettront d'évaluer le rôle de PTPRκ dans le développement tumoral et la formation de métastases.

d) La redondance angiogénique

C'est l'une des premières hypothèses qui est apparue avec les phénomènes de résistance aux traitements anti-angiogéniques. Cette hypothèse stipule que la résistance est associée à une sécrétion de facteurs angiogéniques redondants venant prendre le relais du VEGF, bloqué par le BVZ. L'angiogenèse tumorale devient indépendante du VEGF. Nous avons observé une augmentation de l'expression d'une cytokine pro-angiogénique, IL-8/CXCL8, dans les tumeurs traitées BVZ par rapport aux tumeurs contrôles. L'utilisation combinée d'un anticorps anti-CXCL8 et du BVZ inhibe au moins en partie les effets néfastes du BVZ sur la croissance tumorale. Cette cytokine dont le rôle dans la progression tumorale a largement été établi semble être une nouvelle cible thérapeutique pertinente. Facilement dosable dans le plasma, elle serait un marqueur prédictif de l'efficacité du traitement BVZ. Une étude récente stipule que CXCL8 est un médiateur de la résistance au traitement anti-angiogénique par sunitinib dans le cancer du rein (Huang et al., 2010). Ce travail montre que les niveaux plasmatiques de CXCL8 augmentent dans les souris résistantes au sunitinib. Les niveaux de CXCL8 intra-tumoraux sont plus importants dans les patients non répondeurs au sunitinib. Dans ce système, l'utilisation d'un anticorps anti-CXCL8 re-sensibilise les tumeurs résistantes au sunitinib alors que ces anticorps n'ont aucun effet sur des cellules naïves. Après un traitement sunitinib et donc une inhibition prolongée de la voie de signalisation VEGF/VEGFR, l'angiogenèse dépendante du VEGF devient dépendante de CXCL8. Ces résultats suggèrent que CXCL8 est un facteur prédictif de l'efficacité du sunitinib. En combinaison avec nos résultats, cela renforce l'utilisation potentielle d'un traitement anti-CXCL8 en combinaison avec le BVZ dans le traitement des ccRCC.

4. Conclusion et perspectives

Ce travail nous a permis de définir un modèle murin de ccRCC dans lequel nous avons évalué l'efficacité du BVZ. Dans notre étude, le BVZ accélère la croissance tumorale. Cette observation ne remet pas en cause l'utilisation du BVZ en clinique puisque ce traitement présente des effets thérapeutiques évidents. Cependant, nos expériences semblent représenter un modèle de la phase d'échappement observée chez les patients. Ce travail nous a permis de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques et des marqueurs prédictifs de réponse au traitement BVZ dans les RCC. La lymphangiogenèse, la cytokine CXCL8 ainsi que la voie de signalisation EGF/EGFR sont autant de pistes d'étude pertinentes. Notre travail actuel porte sur les mécanismes moléculaires modulant l'expression de PTPRκ et VEGF-C. Nous vérifions également si les résultats obtenus avec le BVZ sont extrapolables à d'autres traitements anti-angiogéniques (sunitinib, sorafenib, axitinib). Le mécanisme que nous avons mis en évidence expliquerait notamment les effets pro-métastatiques du traitement sunitinib (Ebos et al., 2009) (Paez-Ribes et al., 2009). Un autre mécanisme proche a été décrit sous traitement par BVZ. Celui-ci fait intervenir une autre protéine tyrosine phosphatase membranaire PTP-1B et implique entre autre un relai entre le VEGFR-2 et le récepteur MET (Lu et al., 2012) dans des modèles de glioblastomes. Notre étude et celle de Lu et al mettent donc en évidence un rôle prépondérant des tyrosines phosphatases membranaires dans les mécanismes de résistance aux traitements anti-angiogéniques.

Oncogene (2012) 31, 1683–1694
© 2012 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 0950-9232/12
www.nature.com/onc

ORIGINAL ARTICLE

Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines

R Grepin[1,8], M Guyot[1,8], M Jacquin[1], J Durivault[1], E Chamorey[2,3], A Sudaka[2,3], C Serdjebi[4], B Lacarelle[4], J-Y Scoazec[5], S Negrier[6], H Simonnet[7] and G Pages[1]

[1]*University of Nice Sophia Antipolis, UMR CNRS 6543, Nice, France;* [2]*Centre Antoine Lacassagne, Department of Statistic (EC), Nice, France;* [3]*Centre Antoine Lacassagne, Department of Anatomo-pathology (AS), Nice, France;* [4]*Université de Marseille UFR Pharmacie, Laboratoire de Pharmacocinétique, Marseille, France;* [5]*INSERM UMR S865, IFR62, Faculty Laennec, Lyon, France;* [6]*Centre Léon Bérard, Lyon, France and* [7]*UMR 5201, Faculté de Médecine Grange Blanche, Lille, France*

The anti-VEGF targeted antibody bevacizumab (BVZ) has been approved for treating renal cell carcinomas (RCCs). Although BVZ increases the progression-free survival of patients with metastatic RCC, the effect on overall survival is poor. To gain insight into the limited efficacy of BVZ on overall survival, we analyzed patient samples of RCC for angiogenic factors that may participate in escape from anti-VEGF therapy. Our study shows that the level of vascular endothelial growth factor (VEGF) in tumors was increased compared with normal tissue. The level of interleukin-8/CXCL8, a pro-angiogenic member of the CXCL family of cytokines, was also increased in tumors. These observations gave us a good reason to analyze the combined effects of BVZ and anti-CXCL8 antibodies on tumor growth. Surprisingly, we report that BVZ accelerates the growth of RCC in nude mice with *in vivo* selection of tumor cells with an increased growth capacity. Downregulation of receptor tyrosine phosphatase-κ, a phosphatase implicated in EGF receptor regulation, may partly explain this phenomenon. Modification of the vascular network and development of lymphatic vessels through VEGF-C production and compensatory production of pro-angiogenic CXCL cytokines were also observed. The apparent normalization of the vascular network prompted us to associate BVZ with the chemotherapeutic agent paclitaxel. While efficient *in vitro*, paclitaxel did not reverse the anti-VEGF effects *in vivo*. Anti-CXCL8-targeting antibodies were promising as they decreased intra-tumor VEGF production; decreased the pro-angiogenic CXCL/anti-angiogenic CXCL ratio and did not induce lymphangiogenesis. These observations hold clinical implication as they highlight putative markers implicated in escape from BVZ treatment. They also recommend proceeding with caution in the use of anti-VEGF therapy alone for treatment of RCC.
Oncogene (2012) **31,** 1683–1694; doi:10.1038/onc.2011.360; published online 12 September 2011

Correspondence: Dr G Pages, IBDC UMR CNRS, 6543, University of Nice Sophia Antipolis, Centre Antoine Lacassagne, 33 Avenue de Valombrose, Nice 06189, France.
E-mail: gpages@unice.fr
[8]These authors contributed equally to this work.
Received 21 August 2010; revised 13 July 2011; accepted 14 July 2011; published online 12 September 2011

Keywords: angiogenesis; bevacizumab; CXCL cytokines; VEGF

Introduction

Clear cell renal cell carcinomas (RgCC) are vascularized tumors that arise because of mutations in the von Hippel–Lindau gene that cause an overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF). Hence RCC should be one of the most responsive tumors to anti-angiogenic therapy. This hypothesis has stimulated competition in the field of cancer therapy and the development of anti-angiogenic molecules that have obtained approval for treatment of patients with RCC. Bevacizumab (BVZ), a humanized monoclonal antibody targeting VEGF, in association with interferon-α, has obtained FDA approval for treatment (Escudier *et al*., 2007). Despite the increased time to progression for all treatments, no enduring efficacy in terms of overall survival has been observed, especially in the pivotal AVOREN study that compared the efficacy of interferon-α versus interferon-α plus BVZ (Escudier *et al*., 2010). The defenders of this strategy argue that it is too early to have a global overview of the benefits of the treatment and highlight a real clinical benefit, although this is usually measured in months. The limited effectiveness raises an economic issue, given the high cost of treatment with BVZ. Moreover, some recent papers describe a new phenomenon called treatment evasion and the selection of more aggressive cells with increased metastasis potential in the case of treatment with tyrosine kinase inhibitors targeting tyrosine kinase receptors implicated in angiogenesis (Ebos *et al*., 2009; Paez-Ribes *et al*., 2009). Evasion of treatment could arise through different mechanisms, including angiogenic redundancy (Kerbel, 2008) or inefficacy, owing to the presence of anti-angiogenic forms of VEGF called VEGFxxxb, which result from alternative splicing of the VEGF pre mRNA. XXX corresponds to the number of the amino acid of the protein and includes the forms 121, 145, 165, 189 and 206 (Harper and Bates, 2008). The pro-angiogenic forms of VEGF will be referred to

as VEGFxxx and the anti-angiogenic forms will be referred to as VEGFxxxb in the text.

The aim of our study was to gain insight into the absence of persistent effects of BVZ alone (Yang *et al*., 2003). Our hypothesis states that this could be due to the production of redundant angiogenic cytokines. Hence, we have focused on the targeting of VEGF and the cytokines of the CXCL family that have angiogenic and anti-angiogenic potency depending on the presence or absence of the amino-acid triplet ELR in their protein sequence (ELR + CXCL (1, 2, 3, 5, 6, 7, 8) have pro-angiogenic properties, whereas ELR−CXCL (4, 9, 10) have anti-angiogenic properties) (Vandercappellen *et al*., 2008), as these cytokines may have prognostic value in breast cancer (Bieche *et al*., 2007). ELR + CXCL stimulate their G-protein-coupled receptors CXCR-1 and CXCR-2, which leads to the activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway (Vandercappellen *et al*., 2008). The pro-inflammatory chemokine CXCL8, also referred to as interleukin-8, promotes angiogenesis, tumorigenesis and metastasis. It is overexpressed in many tumors, including RCC (Mestas *et al*., 2005). Moreover, the Ras-dependent secretion of CXCL8 enhances tumor progression by promoting neo-vascularization (Sparmann and Bar-Sagi, 2004). Downregulation of the tumor-suppressor gene, ING4, leads to increased CXCL8 expression but not VEGFxxx expression, which correlated with increased tumor growth and vascular density (Garkavtsev *et al*., 2004). Hence, tumor cells may use diverse pro-angiogenic chemokines to mediate angiogenesis and to promote tumor progression. The goal of our study was to highlight new therapeutic targets implicated in anti-angiogenic treatment evasion.

Results

Establishment of an angiogenic profile for human RCC tumors

Cytokines that regulate the angiogenic balance, including members of the CXCL cytokine family, the pro- and anti-angiogenic forms of VEGF (respectively, VEGFxxx and VEGFxxxb, there is no ELISA test recognizing specifically the different forms of VEGFxxx and VEGFxxxb), and factors implicated in the growth of pericytes and lymphatic vessels were measured in normal and tumor samples of clear cell carcinoma samples from 51 patients with RCC. The tumor hemoglobin content served as an indicator of tissue vascularization. An increase in the hemoglobin content in tumor tissues compared with the control was noted (Table 1). Of the different ELR + CXCL cytokines investigated only CXCL8 was increased in tumor tissues as compared with the control. VEGFxxx were also more abundant in tumors as compared with control tissue. The ELR + CXCL cytokines, CXCL3, 5 and 7, were reduced in tumor samples along with PDGFbb and the lymphangiogenic cytokine VEGF-D. VEGFxxxb, CXCL9 and CXCL10 were also decreased significantly.

VEGF blockade accelerates the growth of xenografted RCC cells

We hypothesized that the lack of a persistent effect of BVZ in patients was due to the concomitant presence of VEGF and additional angiogenic cytokines. The results in Table 1 are in favor of this hypothesis particularly for the ELR + CXCL cytokines as they can induce

Table 1 Hemoglobin content and establishment of an angiogenic profile of RCC

A	*Normal tissue*		*Tumor tissue*		P-*value*
	Mean	*Range*	*Mean*	*Range*	
Hemoglobin (mg/ml/μg protein)					
	329	39–1109	1283	56–10750	0.0001
VEGF family members (pg/mg protein)					
VEGFxxx	1625	155–4643	2305	111–4852	0.0006
VEGFxxxb	377	0–681	154	63–390	2.10^{-15}
VEGF-C	222	121–321	198	112–283	0.37
VEGF-D	450	351–549	14	0–35	0.0001
PDGF family member (pg/mg protein)					
PDGF-bb	579	518–640	409	355–463	0.0001
CXCL family members (pg/mg protein)					
CXCL1	95	0–272	104	4–934	0.356
CXCL2	185	161–209	172	105–240	0.36
CXCL3	55	40–69	3	0–7	0.0001
CXCL4	8292	848–25 000	9740	604–90 614	0.275
CXCL5	314	276–352	168	129–206	0.0001
CXCL7	2961	763–7202	2324	337–7853	0.02
CXCL8	199	0–860	365	0–2744	0.05
CXCL9	513	348–679	111	35–188	0.0001
CXCL10	1451	1228–1674	784	539–1029	0.0001

Abbreviations: RCC, renal cell carcinoma; VEGF, vascular endothelial growth factor.
The hemoglobin (Hg) and cytokine levels in samples were measured by a colorimetric assay and ELISA assays, respectively. The intra-tumor levels of Hg and cytokines were compared with normal adjacent tissues ($n = 51$).

endothelial cell chemotaxis and proliferation (Vandercappellen *et al*., 2008). Among ELR + CXCL, CXCL8 was present in greater amounts in tumor tissues. We observed that different human RCC cells secrete VEGF and CXCL8 (Figure 1a). The proportion of both cytokines was in favor of VEGFxxx in 786-O, RCC-4 and Caki-2 cells, a situation comparable to that observed in human tumor samples. RCC-4 cells were not chosen because they do not form tumors in mice. For this reason we focused on 786-O cells for *in vivo* experiments. Others members of the CXCL family were also secreted by 786-O cells, including CXCL1, 2, 3 and 5 (Figure 1b). BVZ treatment trapped secreted VEGF, as expected, but resulted in increased CXCL8 production. This result suggested production of alternative angiogenic factors by tumor cells. In this context, CXCL8 seemed to be a good candidate to compensate for the loss of VEGF associated with treatment with BVZ. The effect of BVZ on the production of CXCL8 was tested in the different RCC cell lines. Production of CXCL8 does not exceed an upper limit of 0.6 ± 0.1 ng/ml/10^6 cells. If the basal levels are below this limit, BVZ increased the production of CXCL8, which reaches this threshold. If the basal levels are around this threshold, CXCL8 production is equivalent in the presence or absence of BVZ after a short or chronic exposure. Under the same conditions, the levels of VEGF increased with time and BVZ remains effective even after a long time of culture (Supplementary Figure 1). Nevertheless, of all the ELR + CXCL, which are equally expressed or more expressed in tumor tissues as compared with normal tissues (CXCL1, 2, 3, 8), CXCL8 remains the most highly produced by the RCC cells. Decreased production of CXCL8 by short-hairpin RNA (sh-RNA) reduces cell proliferation, whereas high doses of CXCL8 stimulate cell proliferation suggesting that an autocrine CXCL8 loop is involved in the proliferation of 786-O cells (Supplementary Figure 2). These results provided the rationale for testing the impact of blocking VEGF and/or CXCL8 on the development of xenografted tumors. Anti-CXCL7 or anti-CXCL4 was not chosen because they were not produced by RCC cell lines in culture. Anti-CXCL1 was not chosen because the level of CXCL1 was not modified in response to BVZ and the rate of production was low compared with CXCL8 (Figure 1b and Mestas *et al*. (2005)). Thus 786-O^{LUC+} cells were used to evaluate the incidence of tumor cell growth *in vivo* following treatment. We noted that BVZ (7.5 mg/kg/week, a dose corresponding to the amounts adminis-

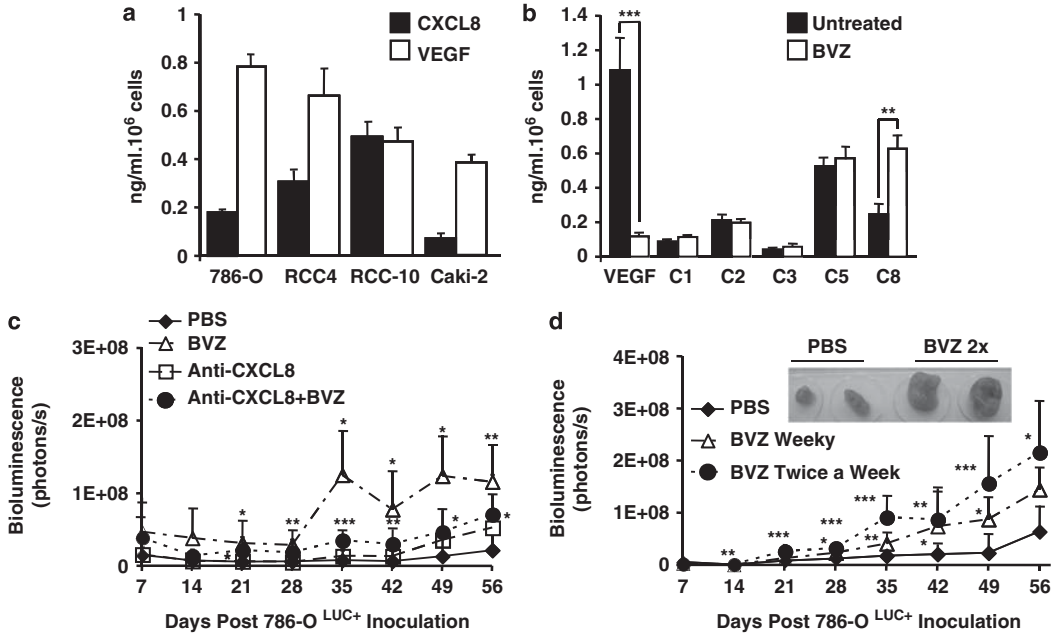


Figure 1 VEGF blockade increases 786-O xenograft tumor growth and modulates cytokine levels. (**a**) 10^6 RCC cells were cultured for 24 h in fresh medium. VEGF and CXCL8 were quantified in cell supernatants by ELISA. The data are presented as the means ± s.d. (**b**) 10^6 786-O cells were treated or not for 24 h with 500 ng/ml BVZ. The amounts of VEGF, CXCL1, 2, 3, 5 and 8 present in the cell supernatants were detected by ELISA. The data are presented as the means ± s.d. Statistical differences are presented: $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$. (**c**) 3.10^6 786-O^{LUC+} cells were subcutaneously injected into nude mice ($n=7$ per group). Seven days after injection, all mice developed tumors and were treated weekly with PBS for the control or 7.5 mg/kg BVZ and/or the anti-CXCL8 antibody (2 mg/kg). Bioluminescence was measured weekly as described under Materials and methods. The data are presented as the means ± s.d. Statistical differences between the size of tumors of control and treated mice are presented: $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$. (**d**) BVZ treatment induced dose-dependent tumor growth. Seven days after injection of 786-O^{LUC+} cells, tumors became visible and mice ($n=10$ per group) were treated weekly or twice a week with 7.5 mg/kg BVZ. The data are presented as the means ± s.d. Statistical differences between the size of control and treated tumors are presented: $^{*}P<0.05$; $^{**}P<0.01$; $^{***}P<0.001$. Images of representative tumors issued from PBS or BVZ-treated mice are shown.

tered to patients) resulted in accelerated tumor growth (Figure 1c). Mice treated with anti-CXCL8 antibodies (2 mg/kg/week) (Sparmann and Bar-Sagi, 2004) showed growth of tumors equivalent to that in placebo-treated mice. The presence of anti-CXCL8 antibodies partially inhibited the accelerated tumor growth induced by BVZ treatment. As in most preclinical studies the BVZ concentration was twice the amount of that we used, the experiments were repeated with a single or a double BVZ dose. During the first few days after BVZ treatment, we observed a dose-dependent increase in tumor growth (Figure 1d). These results were not dependent on the cell line, because an equivalent BVZ-dependent increase in tumor growth was observed with RCC-10 and Caki-2 cells (tumors generated with Caki-2 cells grew very rapidly in the presence of BVZ; Supplementary Figure 3).

Decreased tumor blood vessel density but increased tumor lymphatic vessel density in BVZ-treated animals

Sections of tumors from all treatment groups were stained for CD31/αSMA and LYVE-1 to study the tumor vasculature and the lymphatic network, respectively (Figure 2). The vessel density and the number of vessels covered with α-smooth muscle actin (αSMA)-labeled cells and their diameters were quantified (Supplementary Figure 4A). The vascular network (CD31 labeling) was anarchic in placebo-treated tumors. A lower blood vessel density with coverage of vessels with αSMA-labeled cells was observed in BVZ-treated tumors. The effect was more striking if a double dose of BVZ was used, yielding larger vessel lumens and a statistically significant increase in hemoglobin content (mean 334 ± 104 mg/ml/μg protein in control tumors versus 380 ± 189 mg/ml/μg protein for tumors treated with BVZ once a week ($P = 0.1$); 406 ± 64 mg/ml/μg protein for tumors treated with BVZ twice a week ($P = 0.048$)). A decrease in vessel density was also observed in anti-CXCL8-treated tumors, with no modification in the intra-tumor hemoglobin content (302 ± 155 mg/ml/μg). However, the number of vessels with αSMA-labeled cell coverage was not modified significantly as compared with the control conditions. Following BVZ plus anti-CXCL8 combined treatment, the total vessel number had a tendency to decrease and the number of vessels covered with αSMA-labeled cells had a tendency to increase, but these modifications were not statistically significant. Nevertheless, the intra-tumor hemoglobin content was decreased significantly (179 ± 42 mg/ml/μg ($P = 0.0012$)). Supplementary Figure 5 also shows the differences in the tumor vasculature of mice treated with phosphate-buffered saline (PBS) or BVZ. Hematoxylin–eosin–safran labeling also shows

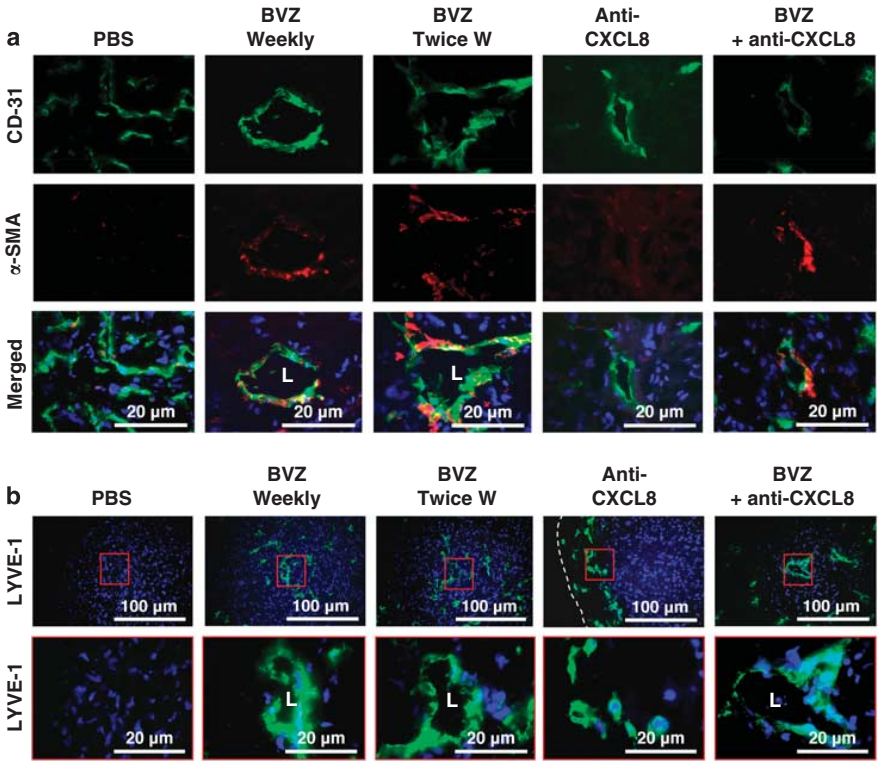


Figure 2 BVZ treatment decreases blood vessel density and increases lymphatic vessel density. (**a**) The tumor vasculature in each experimental group was detected by CD31 (endothelial cells, green) and αSMA immuno-staining (pericytes, red). Tumor sections were counterstained with 4′,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (nucleus, blue). The presence of large lumens (L) was indicated. Dashed white lines delimit the tumor edge. (**b**) LYVE-1 immuno-staining (green) revealed the LECs. Nuclei are stained with DAPI (blue). Lymphatic vessels with lumens (L) were indicated.

that large vessels containing red blood cells are only present in tumors treated with BVZ.

LYVE-1 labeling, a marker of lymphatic endothelial cells (LECs) (Oliver and Srinivasan, 2010), was almost nonexistent in control tumors. Following anti-CXCL8 treatment, only a few LYVE-1-labeled cells were observed at the tumor periphery but no signal was detected in the core of the tumors. However, a single or a double BVZ dose induced the accumulation of LYVE-1-labeled cells in the center of tumors (Figure 2b). BVZ/anti-CXCL8-treated tumors showed LYVE-1-labeled cells both at the periphery and in the core of tumors. Organization of LYVE-1-labeled cells to putatively formed lumens was also observed following BVZ or anti-CXCL8/BVZ combined treatment but not following anti-CXCL8 treatment alone.

Paclitaxel does not prevent the tumor growth-promoting effects of BVZ

RCC are poly-chemo-resistant tumors and only interferon-α increases progression-free survival for approximately 3 months. The results given in Figure 2 prompted us to test the hypothesis of Jain (2005) in which anti-angiogenic therapy normalizes the vascular network, allowing better accessibility of chemotherapeutic agents to tumor cells. Interferon-α treatment gave rise to debilitating side effects in patients and did not alter the production of CXCL cytokines by 786-O cells. Hence, we tested paclitaxel as an alternative chemotherapy in combination with the different anti-angiogenic compounds. As BVZ could have a beneficial effect through vascular normalization, we associated it with a putatively more efficient and tolerable therapeutic agent. The rationale for using paclitaxel is based on the fact that BVZ/paclitaxel treatment has obtained FDA approval for treating metastatic breast cancer and that paclitaxel is better tolerated than interferon-α. 786-O cells were sensitive to paclitaxel (Figure 3a). CXCL8 was increased with paclitaxel treatment (Figure 3b), which is probably linked to an increase in CXCL8 gene transcription and CXCL8 mRNA stability (Supplementary Figure 6). Such an increase in CXCL8 provided the rationale for testing paclitaxel/BVZ/anti-CXCL8 combined treatment *in vivo*. Paclitaxel treatment had a modest effect on the growth of 786-O tumors (Figure 3c). The different antibodies used in combination did not provide any therapeutic advantage. On the contrary, BVZ (7.5 mg/kg once a week) still accelerated tumor growth. The treatment that induced the most aggressive phenotype was BVZ plus paclitaxel. However, anti-CXCL8 still reduced the effect of BVZ on tumor growth. A reduction in the anarchic vessel network was observed with the different treatments (Supplementary Figure 7A). Whatever the associated treatment, the presence of paclitaxel resulted in a reduction in the blood vessel density, with an increased number of vessels covered with αSMA-labeled cells (Supplementary Figure 4B). A significant increase in intra-tumor hemoglobin content was observed for the following associations: paclitaxel + BVZ

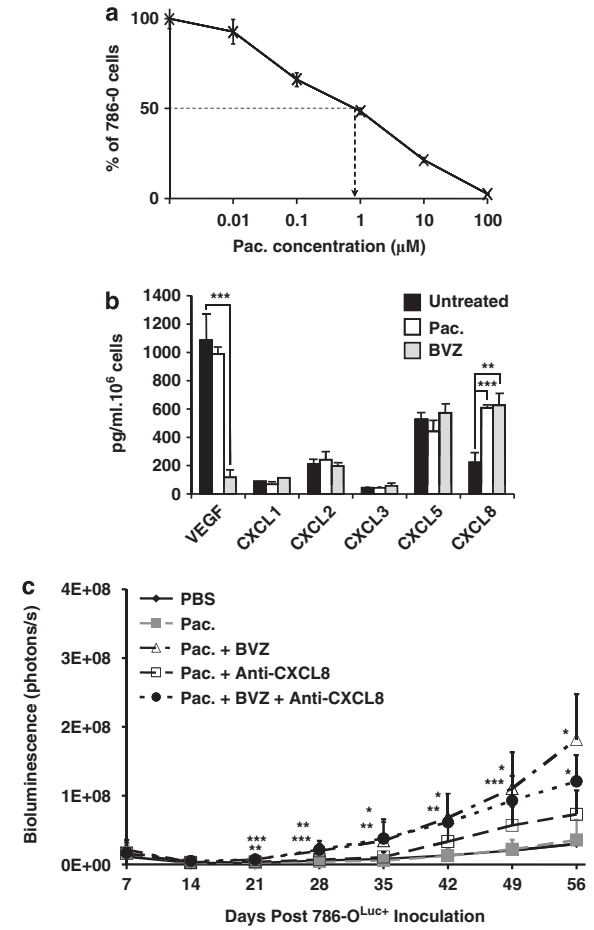


Figure 3 Paclitaxel does not prevent anti-VEGF-induced tumor growth. (**a**) Paclitaxel (Pac.) affects RCC cell growth in a dose-dependent manner: Paclitaxel IC_{50} on 786-O was determined by using MTT assay. The data are presented as the means ± s.d. ($n = 3$) (**b**) Paclitaxel (Pac.) and BVZ affect the angiogenic profile of 786-O cells: Cells were treated for 24 h with 1 μM paclitaxel or 500 ng/ml BVZ. The data are presented as the means ± s.d. ($n = 3$): $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$. (**c**) 786-O^{LUC+} cells were inoculated into nude mice as described above. Tumor growth in response to paclitaxel (Pac.) and BVZ and/or anti-CXCL8 was still accelerated. The data are presented as the means ± s.d. ($n = 10$). Statistical differences to the untreated tumors are shown: $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$.

(473 ± 134 mg/ml/μg ($P = 0.05$)), paclitaxel + anti-CXCL8 (704 ± 259 mg/ml/μg ($P = 0.003$)) and paclitaxel + BVZ + anti-CXCL8 (594 ± 122 mg/ml/μg ($P = 0.001$)), suggesting an increase in tumor perfusion.

Anti-VEGF and/or anti-CXCL8 treatment in combination or not with paclitaxel modifies the tumors' angiogenic profile

We have established an impact of anti-VEGF and/or anti-CXCL8 treatment, associated or not with paclitaxel, on the ratio of cytokines of the CXCL and VEGF families. To focus on mechanisms of adaptation to anti-angiogenic therapies in 786-O cells *in vivo*, we used antibodies specifically recognizing the human

forms of these different cytokines. Table 2 summarizes the results of the expression of the different cytokines tested and the level of hemoglobin. BVZ did not significantly modify the amount of intra-tumor VEGFxxx, but BVZ once a week induced a significant increase in the VEGFxxxb isoforms. Anti-VEGF treatment resulted in the compensatory production of CXCL8, as also observed in 786-O cells *in vitro* (Figure 1b). BVZ treatment also resulted in the increased production of CXCL1 and 2, whereas it did not affect production in culture conditions (compare Figure 1b and Table 2). BVZ decreased CXCL4 and CXCL7 production irrespective of the dose, but only low doses of BVZ increased the production of CXCL10. Anti-CXCL8 decreased the intra-tumor amounts of CXCL8 as expected and modified the angiogenic profile through a decrease in the intra-tumor amounts of CXCL1, 2, 4 and 5, and through an increase in CXCL10. Surprisingly, anti-CXCL8 reduced the intra-tumor amounts of VEGF. Whereas the double treatment resulted in a decrease in the amount of CXCL1, 2, 4 and 5, and an increase in VEGFxxxb, the amount of intra-tumor VEGF was not modified and CXCL10 was almost undetectable. Increased numbers of lymphatic vessels in BVZ-treated tumors prompted us to test for modification in the levels of VEGF-C and D, the main growth factors implicated in lymphangiogenesis. Whereas the VEGF-D level remained unchanged irrespective of the treatment, an increase in VEGF-C was observed in tumors of treated mice depending on the dose of BVZ. By contrast, VEGF-C levels were lowered by anti-CXCL8 treatment even in the presence of BVZ.

The data show striking differences in the global angiogenic profiles when paclitaxel is associated with anti-angiogenic treatments. Paclitaxel had no major effect on intra-tumor cytokine expression except for inhibition of VEGF-C production. However, major changes were observed when paclitaxel was combined with anti-angiogenic treatments as compared with anti-angiogenic treatment alone. Association of BVZ and/or anti-CXCL8 increased the amount of VEGFxxx in the tumors. VEGFxxxb was not affected by the paclitaxel and paclitaxel/BVZ treatments but was decreased by the paclitaxel/anti-CXCL8 treatment and the triple combination. Moreover, when combined with paclitaxel, anti-CXCL8 antibodies no longer change the intra-tumor amount of CXCL1, 2, 4, 8 and 10, and the effects on CXCL5 were modest compared with anti-CXCL8 treatment alone. Surprisingly, CXCL7 was significantly decreased by the paclitaxel/anti-CXCL8 or the paclitaxel/BVZ/anti-CXCL8 combination. The triple treatment almost completely disrupted the tendency to reduce the 'pro-angiogenic factors,' including VEGFxxx, CXCL1 and 2, and to increase the 'anti-angiogenic factors,' including VEGFxxxb. The combination of the three treatments induced the compensatory production of CXCL1, 2 and 8, and the lack of increased production of CXCL10, which is concordant with the increased hemoglobin content of the tumors. Paclitaxel alone or in association with the other treatments reduced VEGF-C production. However, the reduction in VEGF-C production was not associated with a diminished lymphatic vessel number especially when paclitaxel was associated with BVZ or in the triple combination (Supplementary Figure 4B). This result was not due to the compensatory production of the other lymphangiogenic factor VEGF-D.

Tumor-derived 786-O cells that resist BVZ therapy show an increased growth capacity

As BVZ accelerated tumor growth, we hypothesized that tumor cells acquire intrinsic phenotypic properties upon selection pressure *in vivo*. Hence, we examined

Table 2 Overview of the angiogenic profile of mice tumors following treatment

TREATMENT	*VEGF*			*ELR+ CXCL*					*ELR-CXCL*		*Hg*
	xxx	xxxb	C	1	2	5	7	8	4	10	
PBS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
BVZ W	id	125	110	id	120	id	80	210	80	180	id
BVZ BW	id	115	120	110	130	id	70	150	80	10	122
Anti-CXCL8	50	id	50	15	20	10	id	20	15	1200	id
BVZ + Anti-CXCL 8	id	120	40	20	25	15	id	115	15	10	53
PAC	id	id	25	id	id	id	id	id	id	id	id
PAC + BVZ W	160	id	10	id	id	id	id	id	id	id	142
PAC + Anti-CXCL8	115	80	5	id	id	80	30	id	id	id	210
PAC +BVZ W + Anti-CXCL8	130	80	15	120	110	80	50	220	id	id	178

Abbreviation: VEGF, vascular endothelial growth factor.
The percentage expression of the different cytokines and the hemoglobin (Hg) content of the tumors following treatment are shown. The reference values (100%) correspond to the intra-tumor content of the tumors of PBS-treated mice. Only statistically significant values are shown. Any decrease in Hg, VEGFxxx and ELR + CXCL is considered to be of good prognosis and is presented on a white background. Any increase in VEGFxxxb or CXCL10 is also considered to be of good prognosis and is also presented on a white background. Conversely, any increase in Hg, VEGFxxx or ELR + CXCL is considered to be of poor prognosis and is presented on a black background. No change is noted as 'i.d.,' and is given on a gray background. CXCL4 is a marker of poor prognosis if it exceeds a certain threshold in human tumors. Hence, the amount of CXCL4 above the value of control tumors is considered to be a marker of poor prognosis and appears on a black background, whereas the amount below this value is considered to be of good prognosis and appears on a white background.

their proliferation capacity after extraction from tumors. As expected, cells selected from four independent control tumors showed an increased growth capacity when compared with the parental cells. Cells isolated from four independent anti-CXCL8-treated tumors show growth curves almost equivalent to initial cells, whereas cells from four independent double-treated tumors grow like cells from control tumors. Cells isolated from four independent BVZ-treated tumors showed an even more robust growth capacity when compared with cells from vehicle-treated tumors (Figure 4a). This result indicates that BVZ contributes to the *in vivo* selection of more aggressive cells with increased growth potential. An Affymetrix screening

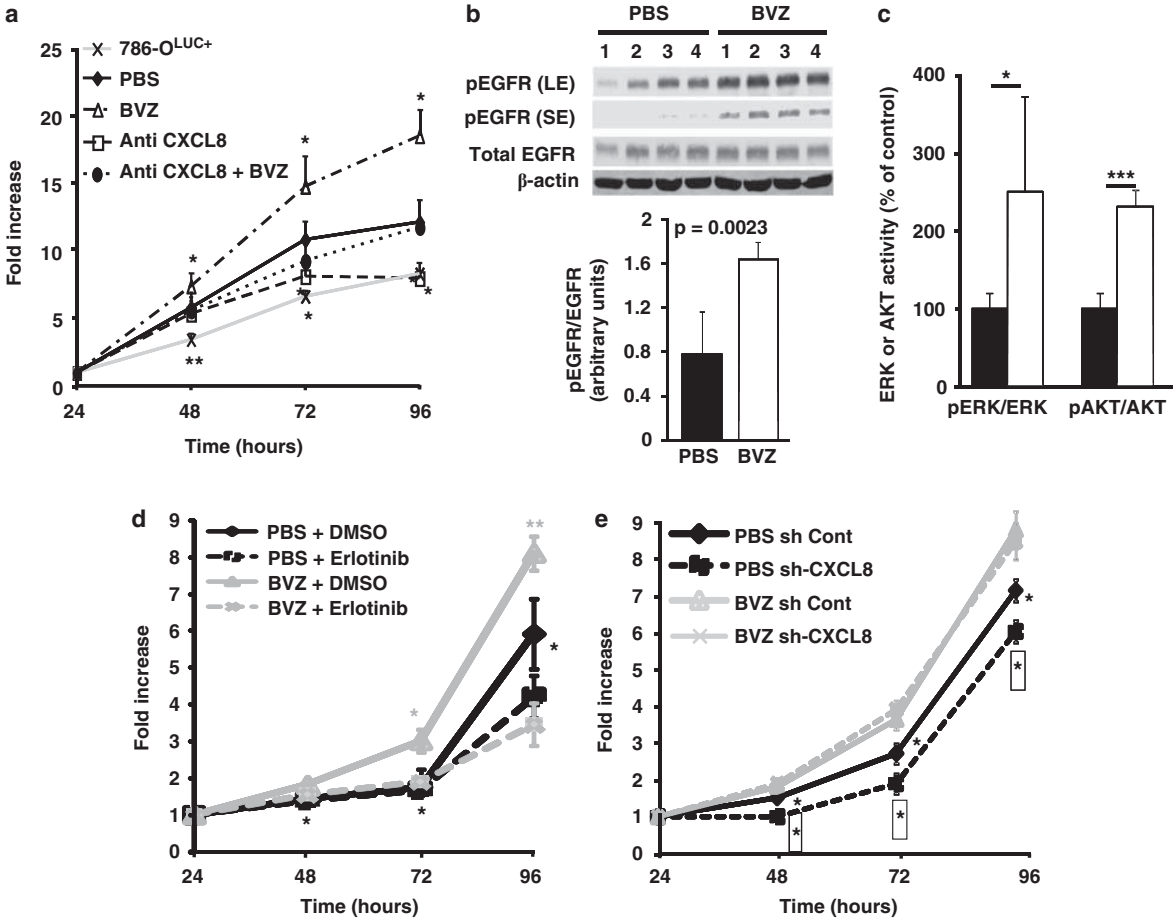


Figure 4 Increased growth capacity of 786-O^{LUC+} cells from tumors of mice treated with BVZ. (**a**) The proliferative capacity of tumor-derived cells (cells isolated from four independent tumors for each group) was tested by using MTT assay. The data are presented as the mean fold increase ± s.d. Statistical differences in the fold increase of tumor cells isolated from PBS-treated mice were taken as reference values. *$P<0.05$; **$P<0.01$ compared with cells of control PBS-treated mice. (**b**) Cells from four independent PBS or BVZ-treated tumors were tested for the presence of active form of EGF receptor (pEGFR). As some signals were saturated, two independent exposures of the films have been shown (LE, long exposure; SE, short exposure). Total EGFR and actin have been shown as loading control. A quantification of the blot and a statistical analysis of the results are also shown. (**c**) Cells from four independent PBS- or BVZ-treated tumors were tested for ERK and AKT activities by western blotting using antibodies directed against the phosphorylated forms of the proteins. The graphs represent the ratio of phosphorylated ERKs or AKT to non-phosphorylated ERKs or AKT. ERK and AKT activities in cells from PBS-treated tumors are considered as the reference values (100%). Statistical differences are indicated (*$P<0.05$; ***$P<0.001$). (**d**) The proliferative capacity of tumor-derived cells (cells isolated from four independent tumors for each group) was tested by using MTT assay in the absence or presence of 10 μM erlotinib. The data are presented as the mean fold increase ± s.d. The black asterisks indicate statistical significance in the fold increase between cells from PBS- or BVZ-treated tumors. The gray asterisks indicate statistical differences in the fold increase in the absence or presence of erlotinib for BVZ cells. No statistically significant differences have been obtained for control cells in the absence or presence of erlotinib. *$P<0.05$; **$P<0.01$. (**e**) Cells from two independent PBS- or BVZ-treated tumors were transduced with lentivirus expressing a control or an sh-RNA targeting CXCL8 (A: clone ID: TRCN0000058029; Sigma, France). Cell populations were obtained after selection with puromycin (5 μg/ml). The proliferative capacity of these cells was tested by MTT assay. The data are presented as the mean fold increase ± s.d. The black asterisks indicate a statistically significant difference in the fold increase between cells isolated from control or BVZ-treated tumors. The boxed black asterisks indicate a statistically significant difference in the fold increase of cells from PBS-treated tumors transduced with control or CXCL8-targeted sh-RNA. No statistically significant differences were observed for cells from BVZ-treated tumors transduced with control or CXCL8-targeted sh-RNA. *$P<0.05$.

has revealed that of the 113 differentially expressed genes between cells from control or BVZ-treated tumors, expression of the receptor tyrosine phosphatase-κ was reduced significantly (about a factor of 2, confirmed by quantitative reverse transcription–PCR ($P<0.01$)). This phosphatase is known to decrease the level of phosphorylation of the EGF receptor (EGFR) on a tyrosine residue involved in receptor activity (Tyr-1068) (Xu *et al*., 2005). Figure 4b clearly shows that, whereas the levels of EGFR were equivalent in cells from control or BVZ-treated tumors, the phosphorylation levels on Tyr-1068 were significantly upregulated in cells from BVZ-treated tumors. Increased EGFR activity correlates with increased ERK and AKT activities (Figure 4c), a result, which is consistent with their ability to proliferate faster (Figure 4a). Whereas a pharmacological inhibitor of the EGFR (erlotinib/Tarceva) (Quatrale *et al*., 2011) has minor effects on the proliferation of control cells that do not reach statistical significance, it strongly inhibits the proliferation of cells from BVZ-treated tumors, suggesting that these cells have become dependent on this signaling pathway for their growth (Figure 4d). In order to address the role of autocrine CXCL8 in the proliferation of cells from control or BVZ-treated tumors, cells from two independent control or BVZ-treated tumors were transduced with lentivirus expressing a control sh-RNA or an sh-RNA targeting CXCL8 (sh-CXCL8-A used in Supplementary Figure 2). This CXCL8-targeting sh-RNA induced a 90% decrease of CXCL8 production in both cell types. As shown in Figure 4e, whereas sh-CXCL8-A slows down the proliferation of cells from control tumors, it has no effect on cells from BVZ-treated tumors, suggesting that these last cells have acquired independence from CXCL8 for their proliferation after a long-term selection pressure *in vivo* using BVZ. The amounts of CXCL8 produced by the two cell types are equivalent and could not explain this phenomenon. These results suggest that anti-CXCL8 antibodies cannot inhibit the growth of resistant cells selected during treatment with BVZ.

Discussion

Anti-VEGF therapy leads to decreased tumor growth in models of xenografted cells in nude mice. Such preclinical studies were determinant in authorizing the use of BVZ in association with chemotherapy in different types of human cancers. Surprisingly, FDA approval for use of BVZ for treatment of RCC was given 3 years after approval for colon cancers, although anti-VEGF therapy was in theory designed to treat such tumors. Our results are intriguing as BVZ increases the progression-free survival of patients with RCC when associated with interferon-α (Escudier *et al*., 2007). Despite a positive tendency, no improvement in overall survival was described in the pivotal AVOREN study comparing the effect of interferon-α versus interferon-α + BVZ for the treatment of RCC (Escudier *et al*., 2010). We hypothesize that the transient response obtained in patients is related to an initial decrease in tumor burden followed by selection of more aggressive cells. Such transient beneficial effects were not observed in our experiments as the 786-O, RCC-10 or Caki-2 cells had probably undergone selective mechanisms during the laboratory culture conditions that prompted them to react immediately to BVZ. These artificial conditions putatively mimic the progression phase observed by clinicians when patients became refractory to treatment with BVZ. When considering our results we need to remain cautious that they do not undermine the positive effects of BVZ in patients. However, they could help identify markers predictive of no response and reveal possible new therapeutic targets. The mechanisms implicated in BVZ-induced tumor growth are probably numerous and we only highlight some of them. First of all, we did not observe modifications in the intra-tumor amount of human VEGFxxx. ELISA kits recognizing human and mouse VEGF, and ELISA kits specific for human forms produced similar results, which suggests a compensatory increase in the expression of VEGFxxx by 786-O cells in the tumor context.

We also observed a modification in the production of tumor CXCL8, which is considered as marker of breast cancer aggressiveness (Bieche *et al*., 2007). Moreover, CXCL8 could indirectly stimulate VEGF production by 786-O cells as they express the CXCR-2 receptor (Mestas *et al*., 2005). Stimulation of CXCR-2 induces the activation of the ERK pathway, which could stimulate VEGF gene transcription and increase VEGF mRNA stability (Milanini *et al*., 1998; Essafi-Benkhadir *et al*., 2007).Increased production of CXCL *in vitro* or in the tumor context following BVZ treatment may be explained by a direct action of VEGFxxx on 786-O cells. This result suggests that RCC cells should express the VEGF receptor(s). The tested RCC cell lines do not express VEGF-R1 and R2 but express neuropilin-1 (Cao *et al*., 2008), which may induce cell signaling in response to VEGFxxx. Hence, co-expression of neuropilin-1 and VEGFxxx by RCC cells creates an autocrine loop, which stimulates the phosphatidylinositol-3-OH kinase kinase/AKT pathway (Cao *et al*., 2008). Inhibition of this pathway leads to CXCL induction by an unknown mechanism. BVZ could also have a specific action on cells attracted to the tumor microenvironment (Xu *et al*., 2009). This assumption was tempting in the case of CXCL4 and 7, which are not produced by 786-O cells in culture. We speculated that cells attracted to the tumor microenvironment secrete signaling molecules that affect the production of cytokines by tumor cells. A decrease in CXCL7 was of good prognosis as it maintains an undifferentiated metanephric mesenchyme and induces cell invasion (Levashova *et al*., 2007). A decrease in CXCL4 was *a priori*, of bad prognosis as it has anti-angiogenic properties. However, its role as a marker of good or bad prognosis varies depending on the tumor type (increased levels suggest good prognosis for hematological tumors (Kim *et al*., 2008) and bad prognosis for solid tumors (Cervi *et al*., 2008)). Our experiments showed that BVZ induced the selection

of cells with increased growth capacities, suggesting rapid *in vivo* selection of aggressive tumor cells following anti-angiogenic treatment (Ebos *et al*., 2009; Paez-Ribes *et al*., 2009). We have determined that cells from BVZ-treated tumors have downregulated the expression of receptor tyrosine phosphatase-κ, a phosphatase implicated in EGFR activation (Xu *et al*., 2005). This result suggests that evasion from BVZ treatment could be related to increased EGFR activation. They could also explain the efficiency of a combination of BVZ with anti-EGFR inhibitors in a phase-I/II trial for RCC (Hainsworth *et al*., 2007b), in a phase-II trial for carcinomas of unknown primary site (Hainsworth *et al*., 2007a), in phase-I/II trials for squamous cell carcinoma of the head and neck (Cohen *et al*., 2009), and in a phase-II clinical trial for the treatment of unresectable biliary cancers (Lubner *et al*., 2010). Cascone *et al*. (2011) have also recently reported an upregulation of stromal EGFR in mouse xenograft models of angiogenesis inhibitor-resistant human lung adenocarcinoma.

Although the number of patient samples that we tested was small, an increase in the amount of intra-tumor CXCL8 was observed. Hence, CXCL8 represented an interesting therapeutic target as its inhibition reduced the growth and vascularization of melanoma (Xie, 2001) or ovarian cancers (Merritt *et al*., 2008). Anti-CXCL8 antibodies did not reduce the tumor size, but they decreased the production of VEGFxxx, CXCL1 and 8, which are increased in the plasma of RCC patients (Mestas *et al*., 2005). Anti-CXCL8 also reduced CXCL4 levels considered as markers of poor prognosis (Cervi *et al*., 2008). However, CXCL7 was not affected. The mechanism affecting the differential targeting of CXCL1, 4, 8 and 7 needs to be further investigated. However, Pillai *et al*. (2006) described that stromal-derived 'activities' were required for optimal expression of CXCL7 by monocytes. We can assume that these 'activities' induce the expression of CXCL7 by tumor cells *in vivo*. They are not blocked by anti-CXCL8 but by BVZ. The best strategy would be to concomitantly target all of these cytokines or their common receptors CXCR-1 and CXCR-2. An inhibitor of CXCR-1 and CXCR-2, repertaxin, currently in clinical trials for inflammatory diseases, could be more effective than BVZ (Bertini *et al*., 2004). The increased amounts of VEGFxxxb following BVZ treatment suggested that it would be more pertinent to target only the pro-angiogenic members of VEGF. This hypothesis is supported by the presence of the VEGFxxxb isoforms in 70% of the tested tumors. This result could motivate the development of specific antibodies targeting the pro-angiogenic forms of VEGF. The theory developed by Jain (2005) stipulating that anti-VEGF treatments normalize the vascular network and induce better accessibility to chemotherapeutic agents was appealing and was put forward after the disappointment provoked by the inefficacy of anti-VEGF/CXCL8 therapy. However, our results suggest that Jain's theory is not applicable in this case as paclitaxel, which induces cell death *in vitro*, was not efficacious *in vivo* and tumor growth was still observed when combined with BVZ. A significant increase in intra-tumor hemoglobin content and a decrease in intra-tumor carbonic anhydrase-IX were observed in the paclitaxel + BVZ-treated tumors (Supplementary Figure 8). These results suggest a normalization of the vascular network and a decrease in tumor hypoxia. However, identical levels of paclitaxel were detected in both tumor types (mean paclitaxel concentrations were 429 ± 64 and 396 ± 52 ng/l, respectively, in tumors after treatment with paclitaxel and paclitaxel plus BVZ ($P = 0.535$)) suggesting that intra-tumor delivery of paclitaxel reached a maximum level that cannot be improved by normalization of the vascular network. Different hypotheses could account for the inefficacy of the double treatment: Hypothesis 1: Secretion of signaling molecules into the tumor micro-environment such as CXCL8 (Ginestier *et al*., 2010). This hypothesis is supported by the fact that paclitaxel stimulates CXCL8 production at least transiently by a transcriptional and post-transcriptional mechanism (Supplementary Figure 6); Hypothesis 2: Paclitaxel stimulates the more efficient selection of resistant tumor cells *in vivo*. This second hypothesis is supported by experiments presented in Supplementary Figure 8 showing that cells derived from paclitaxel/BVZ-treated tumors have increased their capacity of proliferation as compared with cells from placebo-treated tumors; Hypothesis 3: A more complex and multi-causal nature of resistance *in vivo* that involves transiently CXCL8 and becomes independent of this cytokine in the long term. We clearly favor this third hypothesis as Supplementary Figure 8B shows that cells from placebo or cells from the triple-treated tumors proliferate equivalently. The results presented in Supplementary Figure 8 also suggest that anti-CXCL8 antibodies have limited the selection of highly proliferative cells *in vivo* induced by the combination of BVZ plus paclitaxel. However, cells from the double- or triple-treated tumors have become insensitive to the presence of anti-CXCL8 antibodies like cells from tumors treated with BVZ alone. Recent experiments (Ebos *et al*., 2009; Paez-Ribes *et al*., 2009) have shown that anti-angiogenic therapies accelerate tumor dissemination and metastasis. Our results offer a possible explanation for such effects in the context of BVZ treatment as we observed substantial development of the lymphatic network with increased VEGF-C production (Oliver and Srinivasan, 2010). The increased production of VEGF-C by tumor cells may depend on their stimulation by hyaluronan produced by tumor-associated fibroblasts (Kubota *et al*., 2009). LYVE-1-positive cells were still present in the core of the tumor following BVZ/anti-CXCL8 or BVZ/anti-CXCL8/paclitaxel, although VEGF-C was significantly reduced (Figure 2b; Table 2 and Supplementary Figure 4B). Under these two conditions, the intra-tumor levels of VEGFxxx are not affected or increased, respectively. This suggests that VEGFxxx could induce lymphangiogenesis only when it reaches a certain threshold (Oliver and Srinivasan, 2010). Lymphangiogenic growth factors may also be produced by tumor-associated macrophages (Joyce and Pollard, 2009) but cannot be detected by our

Table 3 Score index of the different treatments and markers implicated in tumor growth, vascularization and dissemination

	Tumor growth	*VEGF*			*Hemoglobin*	*Lyve-staining*	*Vessels with αSMA labeled cells*	*ELR+CXCL*					*ELR-CXCL*		*Good prognostic markers*	*Bad prognostic markers*	*Score*
		XXX	XXXb	C				1	2	5	7	8	4	10			
PBS (reference)	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
BVZ Weekly	–	=	+	–	=	–	–	–	–	–	+	–	+	+	4 on 14	8 on 14	–4
BVZ Twice a week	–	=	+	–	–	–	–	–	–	=	+	–	+	–	3 on 14	9 on 14	–6
Anti-CXCL8	=	+	=	+	=	–	=	+	+	+	=	+	+	+	8 on 14	1 on 14	7
BVZ + Anti-CXCL8	–	=	+	+	+	–	–	+	+	+	=	–	+	–	7 on 14	5 on 14	2
Pac.	=	=	=	+	=	–	–	=	=	=	=	=	=	=	1 on 14	2 on 14	–1
Pac. + BVZ	–	–	=	+	–	–	–	=	=	=	=	=	=	=	1 on 14	5 on 14	–4
Pac. + Anti-CXCL8	=	+	–	+	–	–	=	=	=	+	+	=	=	=	3 on 14	4 on 14	–1
Pac. + BVZ + Anti-CXCL8	–	–	–	+	–	–	–	–	–	+	+	–	=	=	3 on 14	9 on 14	–6

Abbreviation: VEGF, vascular endothelial growth factor.
A (−) event is considered as a factor that participates in tumor growth, vascularization or dissemination, whereas a (+) event participates in reduced growth, vascularization and dissemination. A (=) event is considered as a factor that has no effect. The number of good or bad prognostic markers is shown. Anti-CXCL 8 treatment produced the best score (7) with the highest number of good prognostic indicators (8/14), whereas BVZ twice a week and the paclitaxel/BVZ/anti-CXCL8 combinations produced the worst score (−6). The paclitaxel and paclitaxel/BVZ treatments produced the smallest number of good prognostic markers, and BVZ twice a week and the triple treatments produced the highest number of bad prognostic markers.
The white color indicates the best score and the black color the worst score. The gray color indicates intermediate scores.

antibodies against the human forms. The presence of cells positive for LYVE-1 in the absence of lymphangiogenic growth factors could also be explained by vascular endothelial cell reprogramming in LECs through Prox-1-dependent expression. Prox-1 is an early-acting instructive factor in mammalian LEC differentiation (Oliver and Srinivasan, 2010). Simply switching off Prox-1 expression induces a dedifferentiation reprogramming cascade leading to the reacquisition of the vascular endothelial cell status (Oliver and Srinivasan, 2010). Conversely, interleukin -3 induces Prox-1 expression leading to the LEC differentiation of vascular endothelial cells (Oliver and Srinivasan, 2010). Thus, cytokines produced in the tumor microenvironment following anti-angiogenic treatments could promote the differentiation of vascular endothelial cells into LECs.

Table 3 attempts to score the benefits and adverse effects of the different treatments used in our study. The best score (7) was obtained with anti-CXCL8 treatment, which is consistent with the results of Huang *et al*. (2010) and Kopetz *et al*. (2010), whereas the worst score (−6) was assigned to treatment with BVZ twice weekly or to treatment with paclitaxel/BVZ/anti-CXCL8. Although treatment with anti-CXCL8 is apparently the best, VEGFxxxb and CXCL7, two markers involved in the prognosis of RCC, were not affected by anti-CXCL8 antibodies.

In conclusion, our results should prompt the development of therapies targeting CXCL1, 4, 7 and 8, or VEGF-C. It would be interesting to test their association with BVZ if VEGFxxxb is no longer present or with antibodies specifically targeting the VEGFxxx forms.

Materials and methods

Human kidney samples
RCC samples and a normal tissue counterpart were obtained with informed consent from patients after radical nephrectomy. This study analyzed tumors from 51 patients with a median age at diagnosis of 62 years (range: 37– 82 years). Two percent of tumors were classified as grade-I, 29% as grade-II, 45% as grade-III and 24% as grade-IV according to Führman classification. Thirty-seven percent of the patients deceased less than 2 years after diagnosis. None of the patients were treated with anti-angiogenic drugs.

Cell lines
786-O^{LUC+}, RCC-10^{LUC+} and Caki-2^{LUC+} cells were obtained by lentiviral transduction (pLenti6/V5-D-TOPO; Invitrogen, Villebon sur Yvette, France) and blasticidin selection (10 μg/ml). The concentration of paclitaxel, which reduces tumor cell growth, was assessed by using the 3-[4,5-dimethylthiazol- 2yl]-diphenyltetrazolium bromide (MTT) colorimetric assay (Sigma, Lyon, France) according to the manufacturer's instructions.

Antibodies
The following antibodies were used for western blot experiments: Anti-phospho-ERK-1 and 2 antibody (Sigma, St Louis, MO, USA); anti-phospho-Akt, and anti-Akt, EGF receptor and phospho-EGF receptor (Tyr-1068) (Cell Signaling, Cambridge, UK); anti-ERKs and anti-pVHL (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and anti-CAIX (Bayer Health Care, Lyon, France).

Drugs
The anti-human CXCL8 antibody (MAB208; R&D Systems Europe, Lille, France), paclitaxel (Taxol; Bristol-Myers Squibb, Rueil-Malmaison, France) and BVZ (Avastin;

Roche/Genentech, Indianapolis, IN, USA) were diluted with PBS and injected intra-peritoneally. PBS was injected into the control group. BVZ (7.5 mg/kg) was injected once or twice a week. Anti-human CXCL8 (2 mg/kg) was injected as already described (Sparmann and Bar-Sagi, 2004). Erlotinib/Tarceva was obtained from Roche (Meylan, France)

Tumor xenograft formation and size evaluation
786-O^{LUC+}, RCC-10^{LUC+} or Caki-2^{LUC+} cells (3×10^6 cells) were injected subcutaneously into the flank of 5-week-old nude (nu/nu) female mice (Janvier, Saint Berthevin, France). Bioluminescence was quantified by using an *in vivo* Imaging System (IVIS; Caliper LifeSciences, Villepinte, France) according to the manufacturer's instructions. Tumor volume was determined in parallel by using a caliper. There was a linear relationship between bioluminescence values and tumor volumes. Tumor fragments were trypsinized overnight at 37 °C and dissociated tumors cells were suspended in the cell culture medium used for 786-O^{LUC+} cells.

Immunofluorescence experiments
Tumor sections were handled as described previously (Essafi-Benkhadir *et al*., 2007). Sections were incubated with anti-mouse LYVE-1 polyclonal (Ab 14817, 1:200; Abcam, Cambridge, MA, USA) or monoclonal anti-α-smooth muscle actin Sigma (A2547, 1:1000; Sigma, France), and rat monoclonal anti-mouse CD31 (clone MEC 13.3, 1:1000; BD Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA) antibodies. Vessel density and the number of vessels covered by αSMA-labeled cells were evaluated by using the ImageJ program. Several double-blind counts were performed.

Measurement of hemoglobin and cytokines
Frozen tumor tissues were lysed in cell extraction buffer (Biosource, Villebon sur Yvette, Belgium). The intra-tumor hemoglobin content was measured by using the Drabkin reagent kit 525 (Sigma, France). CXCL cytokines, PDGFbb, human and mouse VEGFxxx were measured by using PeproTech ELISA kits according to the manufacturer's recommendations (PeproTech, Neuilly-sur-Seine, France). VEGF-C and VEGFxxxb were measured by using Human DuoSet ELISA kits, and VEGF-D was measured by using the Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Plasmid transfection
The luciferase 3′-untranslated region (UTR)-CXCL8 and CXCL8 promoter/luciferase constructs were transfected into 786-O cells with Lipofectamine-2000 (Invitrogen), according to the manufacturer's recommendations. Four hours after transfection BVZ was added (or not) to the cell culture medium at a concentration of 500 ng/ml. Luciferase assays were performed as described previously (Essafi-Benkhadir *et al*., 2007).

Paclitaxel assay in tumors
A 200-μg weight of frozen tumor slice was transferred to a glass tube prior to liquid–liquid extraction with ethyl ether. The supernatants were collected after centrifugation, nitrogen-dried and analyzed by high-performance liquid chromatography (HPLC)–UV after reconstitution with the mobile phase. The mobile phase consisted of ammonium acetate buffer (32 mM, pH 5) and acetonitrile (53:47, v:v). Docetaxel was used as an internal standard. The analytes were separated by using a 5-μm, 250 × 4.6-mm, C18 Nucleosil column (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) with a 1.8-ml/min flow rate. Detection was set at 227 nm by using the Alliance HPLC system (Waters, Saint Quentin, France). Statistical analysis was performed by using the Sigma-stat software (Jandel, Erkrath, Germany).

Statistical analysis
Statistical analyses were two-sided and were performed by using R-2.5.0 for Windows. Statistical comparisons were performed by using χ^2-test or Fisher exact test for qualitative data, Student's *t*-test or Wilcoxon test for quantitative data, and log-rank test for censored data.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

We thank Dr Marc Colombel (patients' informed consent), Dr Jean Claude Chambard (lentivirus expressing the luciferase gene), Dr Elodie Delaplanche (biopsy management), Dr Florence Mège-Lechevallier (anatomo-pathology determination), Ms Cendrine Dubaud (animal studies) and Dr M Christiane Brahimi-Horn (careful reading of the manuscript). *Financial support*: Contract VEGFIL from the National Institute of Cancer (INCA), the French Association for Cancer Research (ARC, contract no. 4932) and Roche France.

References

Bertini R, Allegretti M, Bizzarri C, Moriconi A, Locati M, Zampella G *et al*. (2004). Noncompetitive allosteric inhibitors of the inflammatory chemokine receptors CXCR1 and CXCR2: prevention of reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 11791–11796.

Bieche I, Chavey C, Andrieu C, Busson M, Vacher S, Le Corre L *et al*. (2007). CXC chemokines located in the 4q21 region are upregulated in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* **14**: 1039–1052.

Cao Y, Wang L, Nandy D, Zhang Y, Basu A, Radisky D *et al*. (2008). Neuropilin-1 upholds dedifferentiation and propagation phenotypes of renal cell carcinoma cells by activating Akt and sonic hedgehog axes. *Cancer Res* **68**: 8667–8672.

Cascone T, Herynk MH, Xu L, Du Z, Kadara H, Nilsson MB *et al*. (2011). Upregulated stromal EGFR and vascular remodeling in mouse xenograft models of angiogenesis inhibitor-resistant human lung adenocarcinoma. *J Clin Invest* **121**: 1313–1328.

Cervi D, Yip TT, Bhattacharya N, Podust VN, Peterson J, Abou-Slaybi A *et al*. (2008). Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth. *Blood* **111**: 1201–1207.

Cohen EE, Davis DW, Karrison TG, Seiwert TY, Wong SJ, Nattam S *et al*. (2009). Erlotinib and bevacizumab in patients with recurrent or metastatic squamous-cell carcinoma of the head and neck: a phase I/II study. *Lancet Oncol* **10**: 247–257.

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.

Escudier B, Bellmunt J, Negrier S, Bajetta E, Melichar B, Bracarda S *et al*. (2010). Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. *J Clin Oncol* **28**: 2144–2150.

Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C *et al*. (2007). Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet* **370**: 2103–2111.

Essafi-Benkhadir K, Onesto C, Stebe E, Moroni C, Pages G. (2007). Tristetraprolin inhibits Ras-dependent tumor vascularization by inducing vascular endothelial growth factor mRNA degradation. *Mol Biol Cell* **18**: 4648–4658.

Garkavtsev I, Kozin SV, Chernova O, Xu L, Winkler F, Brown E *et al*. (2004). The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. *Nature* **428**: 328–332.

Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M *et al*. (2010). CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells *in vitro* and in xenografts. *J Clin Invest* **120**: 485–497.

Hainsworth JD, Spigel DR, Farley C, Thompson DS, Shipley DL, Greco FA. (2007a). Phase II trial of bevacizumab and erlotinib in carcinomas of unknown primary site: the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol* **25**: 1747–1752.

Hainsworth JD, Spigel DR, Sosman JA, Burris 3rd HA, Farley C, Cucullu H *et al*. (2007b). Treatment of advanced renal cell carcinoma with the combination bevacizumab/erlotinib/imatinib: a phase I/II trial. *Clin Genitourin Cancer* **5**: 427–432.

Harper SJ, Bates DO. (2008). VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer* **8**: 880–887.

Huang D, Ding Y, Zhou M, Rini BI, Petillo D, Qian CN *et al*. (2010). Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. *Cancer Res* **70**: 1063–1071.

Jain RK. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science* **307**: 58–62.

Joyce JA, Pollard JW. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* **9**: 239–252.

Kerbel RS. (2008). Tumor angiogenesis. *N Engl J Med* **358**: 2039–2049.

Kim JY, Song HJ, Lim HJ, Shin MG, Kim JS, Kim HJ *et al*. (2008). Platelet factor-4 is an indicator of blood count recovery in acute myeloid leukemia patients in complete remission. *Mol Cell Proteomics* **7**: 431–441.

Kopetz S, Hoff PM, Morris JS, Wolff RA, Eng C, Glover KY *et al*. (2010). Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. *J Clin Oncol* **28**: 453–459.

Kubota Y, Takubo K, Shimizu T, Ohno H, Kishi K, Shibuya M *et al*. (2009). M-CSF inhibition selectively targets pathological angiogenesis and lymphangiogenesis. *J Exp Med* **206**: 1089–1102.

Levashova ZB, Sharma N, Timofeeva OA, Dome JS, Perantoni AO. (2007). ELR + −CXC chemokines and their receptors in early metanephric development. *J Am Soc Nephrol* **18**: 2359–2370.

Lubner SJ, Mahoney MR, Kolesar JL, Loconte NK, Kim GP, Pitot HC *et al*. (2010). Report of a multicenter phase II trial testing a combination of biweekly bevacizumab and daily erlotinib in patients with unresectable biliary cancer: a phase II Consortium study. *J Clin Oncol* **28**: 3491–3497.

Merritt WM, Lin YG, Spannuth WA, Fletcher MS, Kamat AA, Han LY *et al*. (2008). Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth. *J Natl Cancer Inst* **100**: 359–372.

Mestas J, Burdick MD, Reckamp K, Pantuck A, Figlin RA, Strieter RM. (2005). The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. *J Immunol* **175**: 5351–5357.

Milanini J, Vinals F, Pouysségur J, Pagès G. (1998). p42/p44 MAP kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. *J Biol Chem* **273**: 18165–18172.

Oliver G, Srinivasan RS. (2010). Endothelial cell plasticity: how to become and remain a lymphatic endothelial cell. *Development* **137**: 363–372.

Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Vinals F *et al*. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* **15**: 220–231.

Pillai MM, Iwata M, Awaya N, Graf L, Torok-Storb B. (2006). Monocyte-derived CXCL7 peptides in the marrow microenvironment. *Blood* **107**: 3520–3526.

Quatrale AE, Porcelli L, Silvestris N, Colucci G, Angelo A, Azzariti A. (2011). EGFR tyrosine kinases inhibitors in cancer treatment: *in vitro* and *in vivo* evidence. *Front Biosci* **16**: 1962–1972.

Sparmann A, Bar-Sagi D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. *Cancer Cell* **6**: 447–458.

Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. (2008). The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer Lett* **267**: 226–244.

Xie K. (2001). Interleukin-8 and human cancer biology. *Cytokine Growth Factor Rev* **12**: 375–391.

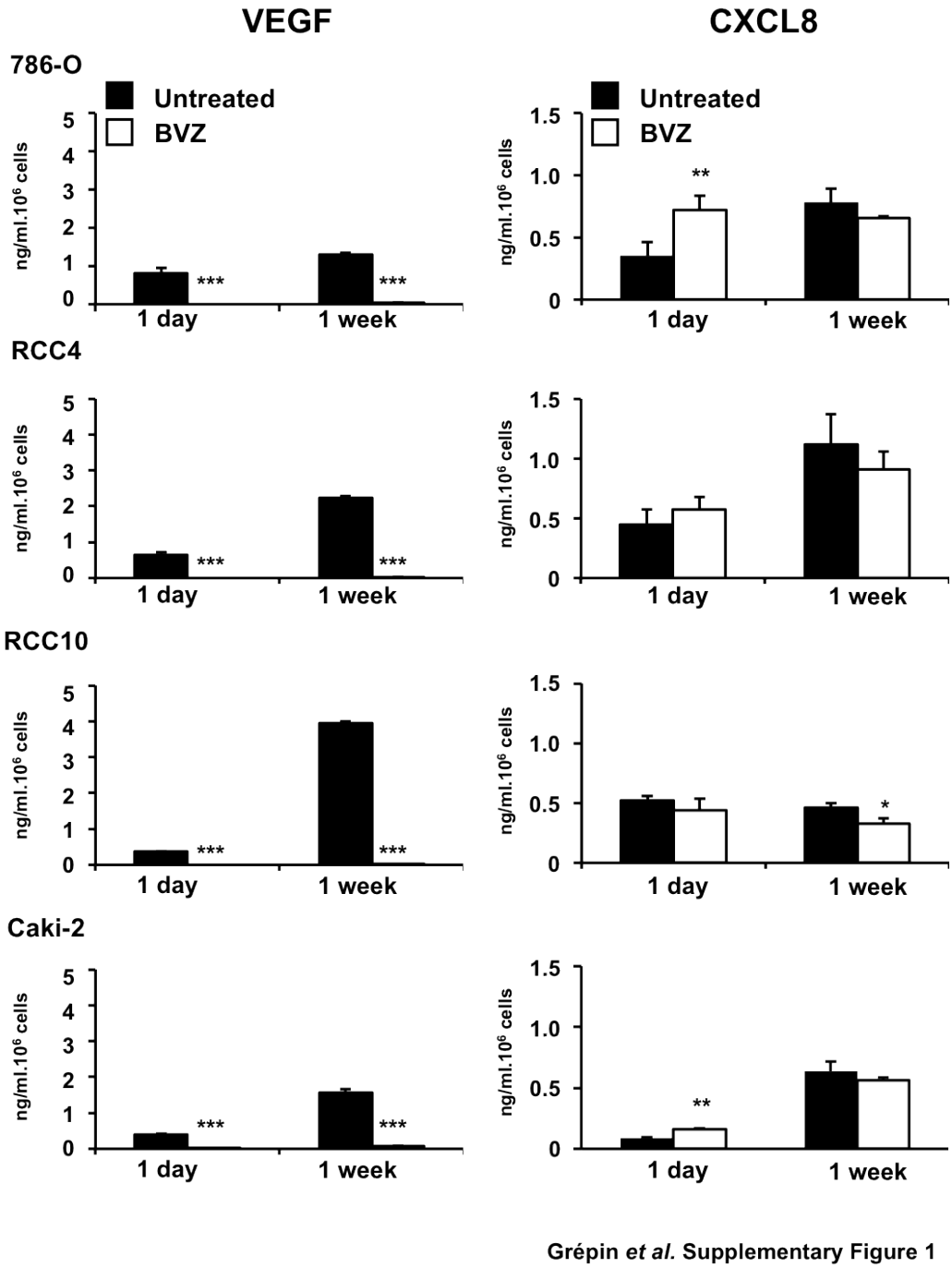
Xu L, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Chung DC, Lauwers GY *et al*. (2009). Direct evidence that bevacizumab, an anti-VEGF antibody, up-regulates SDF1alpha, CXCR4, CXCL6, and neuropilin 1 in tumors from patients with rectal cancer. *Cancer Res* **69**: 7905–7910.

Xu Y, Tan LJ, Grachtchouk V, Voorhees JJ, Fisher GJ. (2005). Receptor-type protein-tyrosine phosphatase-kappa regulates epidermal growth factor receptor function. *J Biol Chem* **280**: 42694–42700.

Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL *et al*. (2003). A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med* **349**: 427–434.

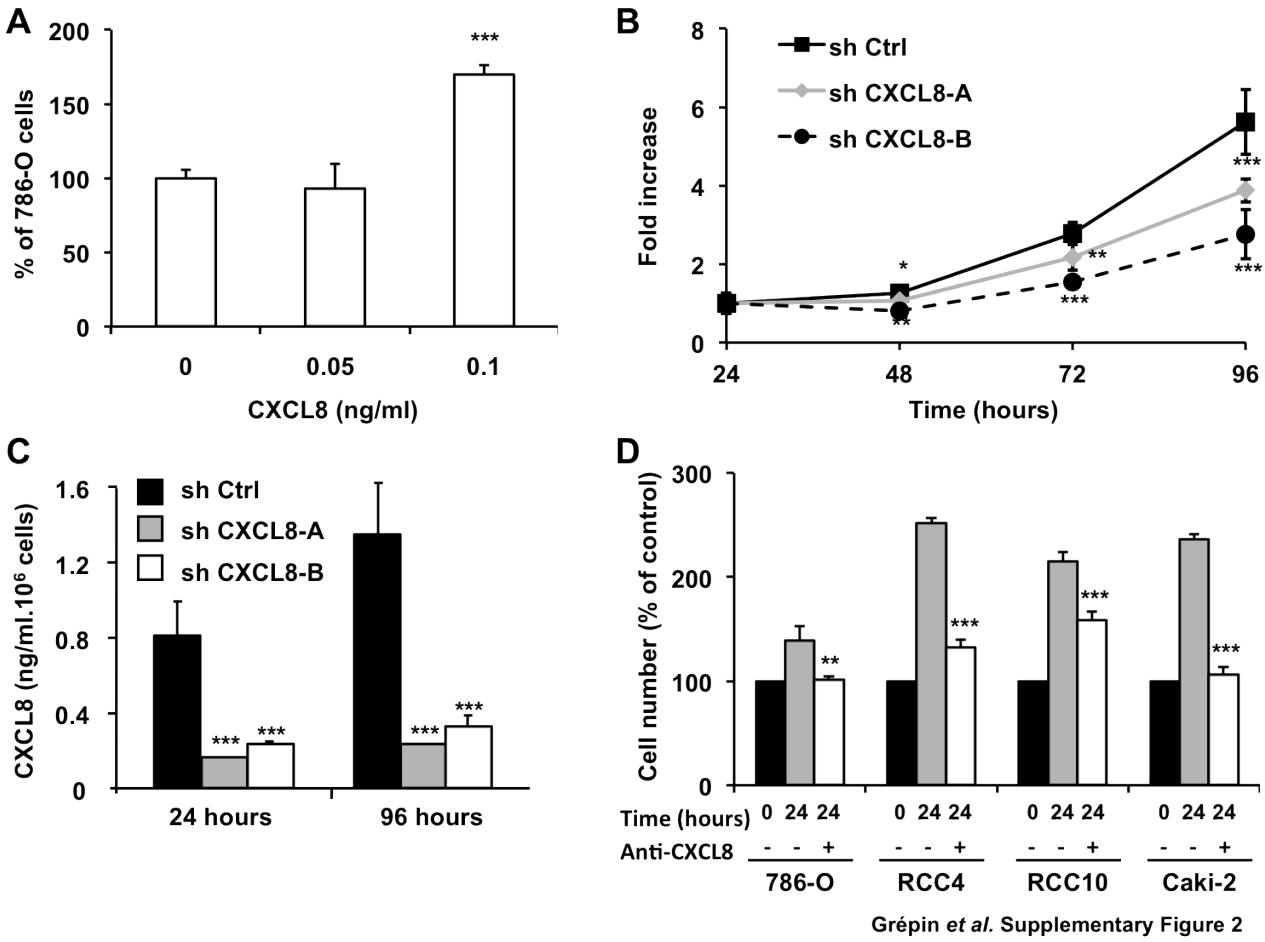
Supplementary Information accompanies the paper on the Oncogene website (http://www.nature.com/onc)

FIGURES SUPPLEMENTAIRES



Supplementary figure 1: Figure 1: Effect of BVZ on the production of VEGF and CXCL8 by different RCC cells

RCC cells were treated or not for 24 h or one week with 500 ng/ml of BVZ. The amounts of VEGF and CXCL8 present in cell supernatants were detected with an ELISA. Data are presented as the mean ± SD. Statistical differences are presented $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$.



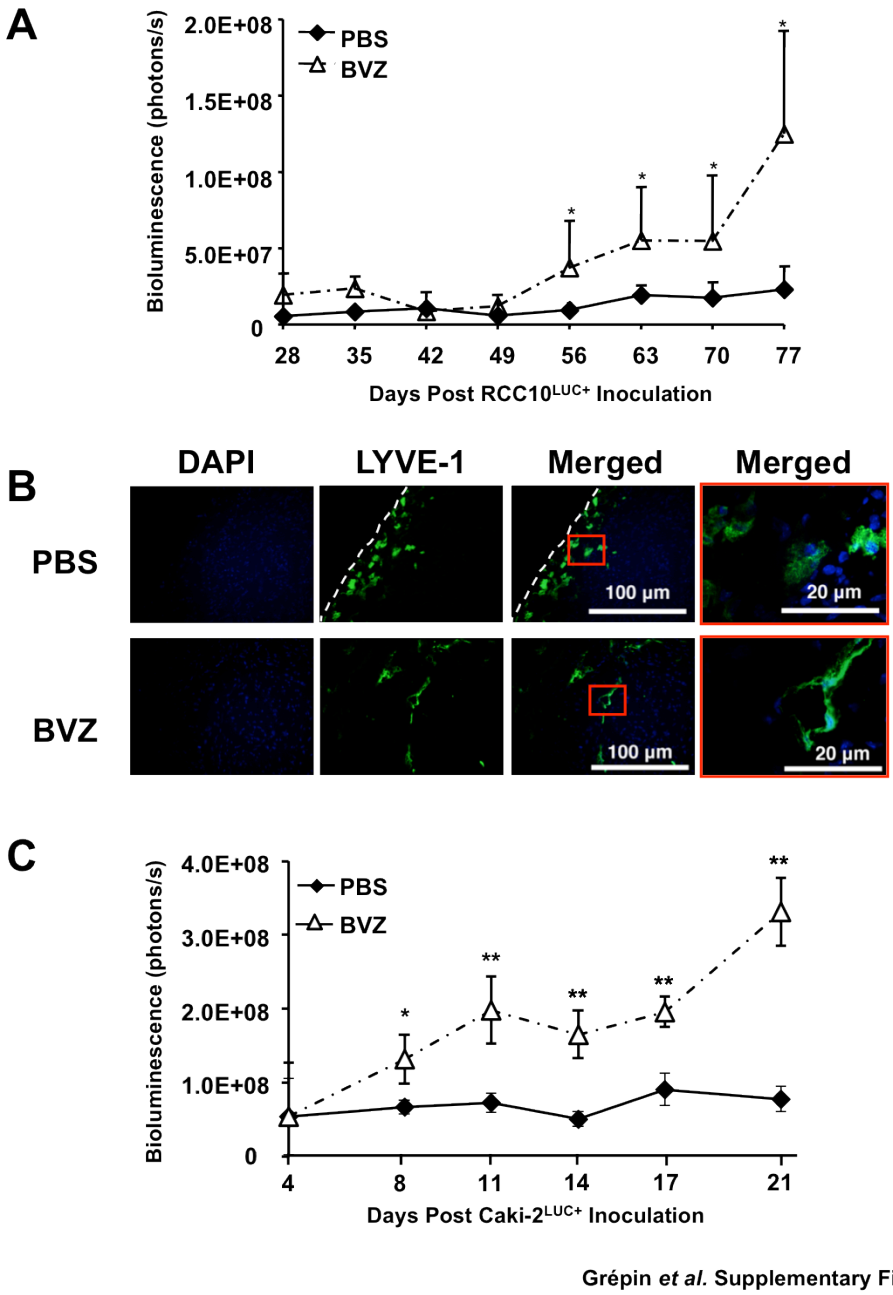
Supplementary figure 2: CXCL8 exerts an autocrine loop on 786-O cells

(A) 786-O cells were serum deprived for 24 h then stimulated with CXCL8 (50 or 100 ng/ml) for 24 h. The percentage of cells has been evaluated with MTT assays and was plotted ± SEM. The condition without any treatment is considered as the reference value (100 %). These data represent the mean ± SEM of four independent experiments. (***) represent *p* value < 0.001.

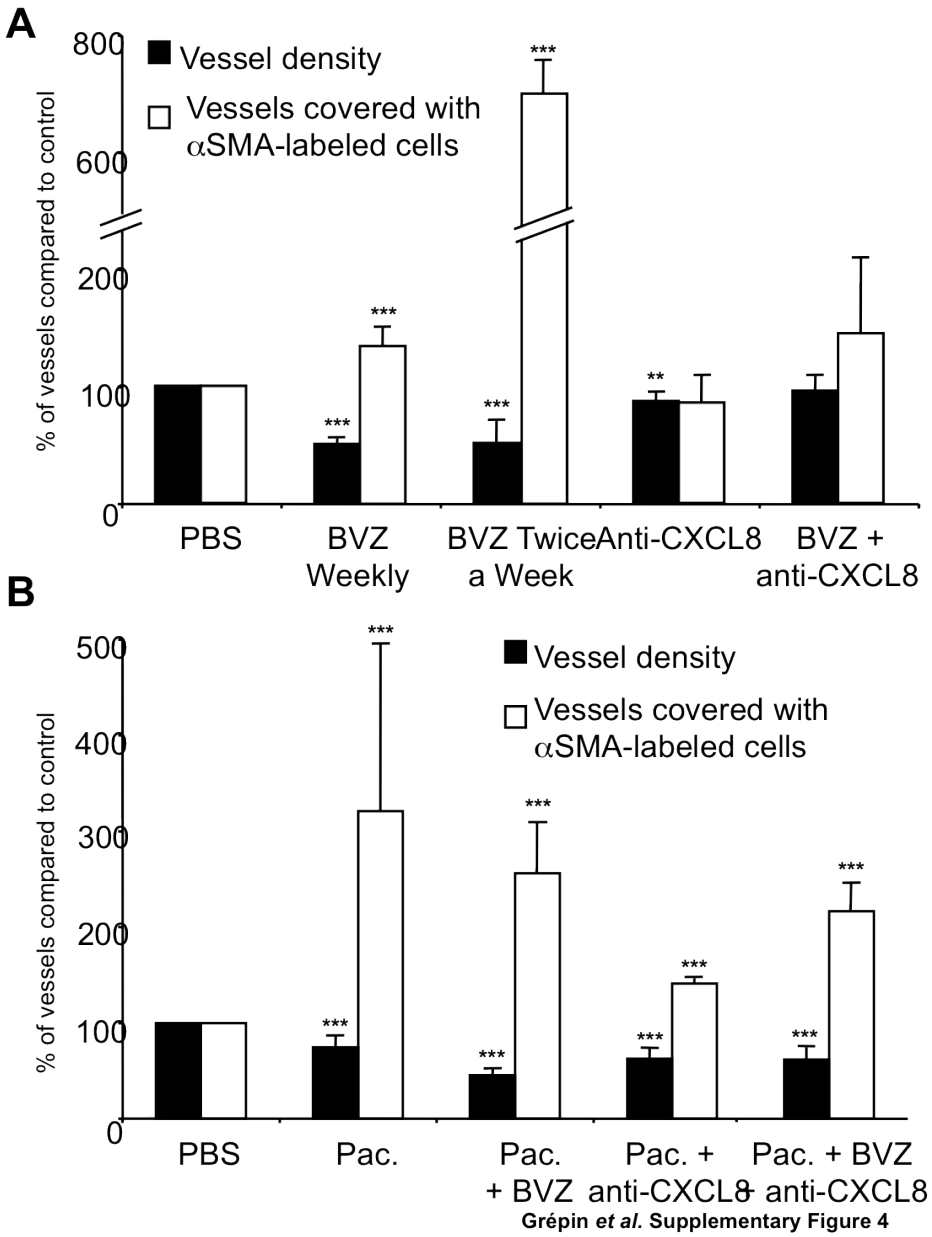
(B) 786-O cells were transduced with lentivirus expressing control or two independent sh-RNA targeting CXCL8 (A: Clone ID: NM_000584.2-285s1c1; B: Clone ID; NM_000584.2281s1c1, Sigma, France). Cell populations were obtained after selection with puromycin (5 mg/ml). The proliferative capacity of these cells was tested using the MTT assay. Data are presented as the mean fold increase ± SD. Statistical differences in the fold increase of tumor cells isolated from control sh-RNA-transduced cells were taken as reference values. *p<0.05; **p <0.01, ***p< 0.001 compared to cells of control PBS-treated mice.

(C) 10^6 of the indicated cells were cultured for 24 h in fresh medium. CXCL8 were quantified in cell supernatants using an ELISA. Data are presented as the mean ± SD (***p< 0.001).

(D) RCC cells were serum deprived and incubated in presence or absence of anti-CXCL8 antibodies (500 ng/ml). Their proliferative capacity was tested using the MTT assay after 24h of incubation. Statistical differences are indicated (* p<0.05; **p< 0.01).



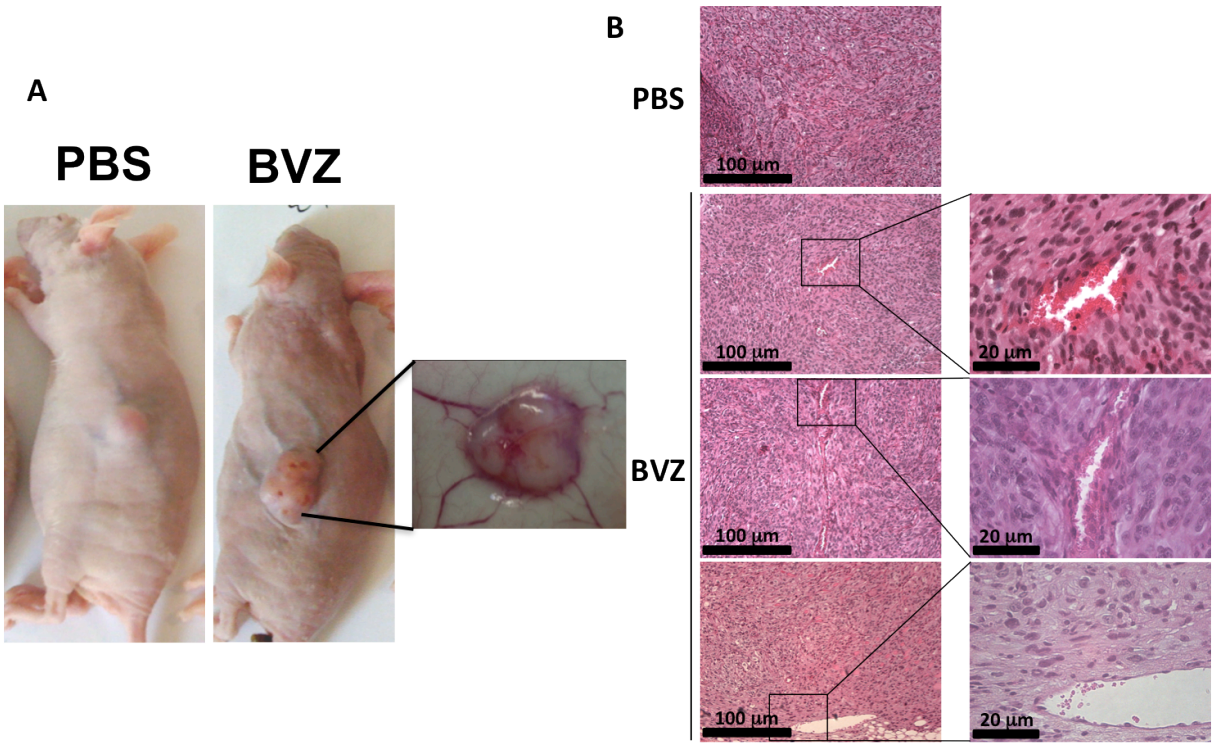
Supplementary figure 3: BVZ accelerates RCC-10 and Caki-2 xenograft tumor growth
(A) 310^6 RCC-10^{LUC+} cells were subcutaneously inoculated in nude mice (n = 10 per group). Seven days after inoculation, all mice developed tumors and were treated weekly with PBS for the control or 150 µg BVZ. Bioluminescence was measured weekly as described in the experimental procedure. Data are presented as mean ± SD. Statistical differences between the size of control and treated tumors are presented: *p<0.05.
(B) LYVE-1 immuno-staining (green) revealed the lymphatic network. Nuclei are stained with DAPI (blue). Lymphatic vessels with lumens (L) were observed in the centre and near the periphery of BVZ-treated tumors.
(C) 310^6 Caki-2^{LUC+} cells were subcutaneously inoculated in nude mice (n = 10 per group). Seven days after inoculation, all mice developed tumors and were treated weekly with PBS for the control or 150 µg BVZ. Bioluminescence was measured weekly as described in the experimental procedure. Data are presented as mean ± SD. Statistical differences between the size of control and treated tumors are presented: *p<0.05; **p <0.01.



Supplementary figure 4: BVZ and paclitaxel effects on the vasculature of tumors.
The tumor vasculature in each experimental group (control, BVZ weekly or bi-weekly, anti-CXCL 8, BVZ plus anti-CXCL8, paclitaxel, paclitaxel plus BVZ, paclitaxel plus anti-CXCL 8 and paclitaxel plus BVZ plus anti-CXCL 8) was evaluated by CD31 immuno-staining and coverage of the vessels using anti-αSMA antibody as presented on figure 2 and supplementary figure 4. Vascular density (vessels/mm^2) and the number of vessels covered by aSMA labelled cells were determined by using the Image J program. Both parameters, determined in placebo treated tumors were considered as the reference value (100%). Quantification (means ± SD) resulted from analysis of four independent tumors and considered at least ten fields for each tumour. Statistically significant differences are indicated: *p<0.05; **p <0.01; ***p <0.001.

(A) Quantification of the experimental groups presented on figure 2

(B) Quantification of the experimental groups presented on supplementary figure 4.

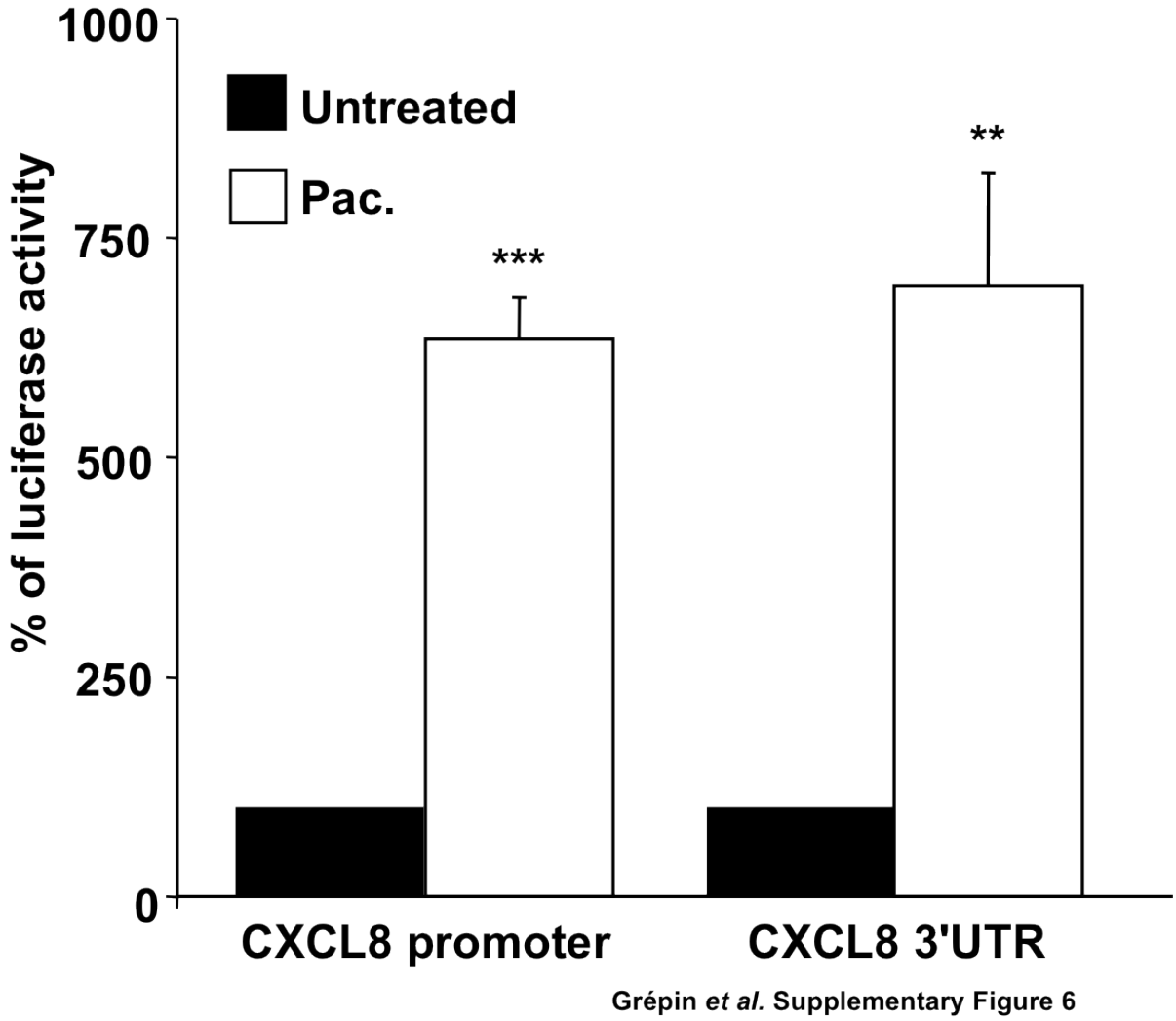


Grépin *et al.* Supplementary Figure 5

Supplementary figure 5: BVZ treatment results in an improved tumor perfusion

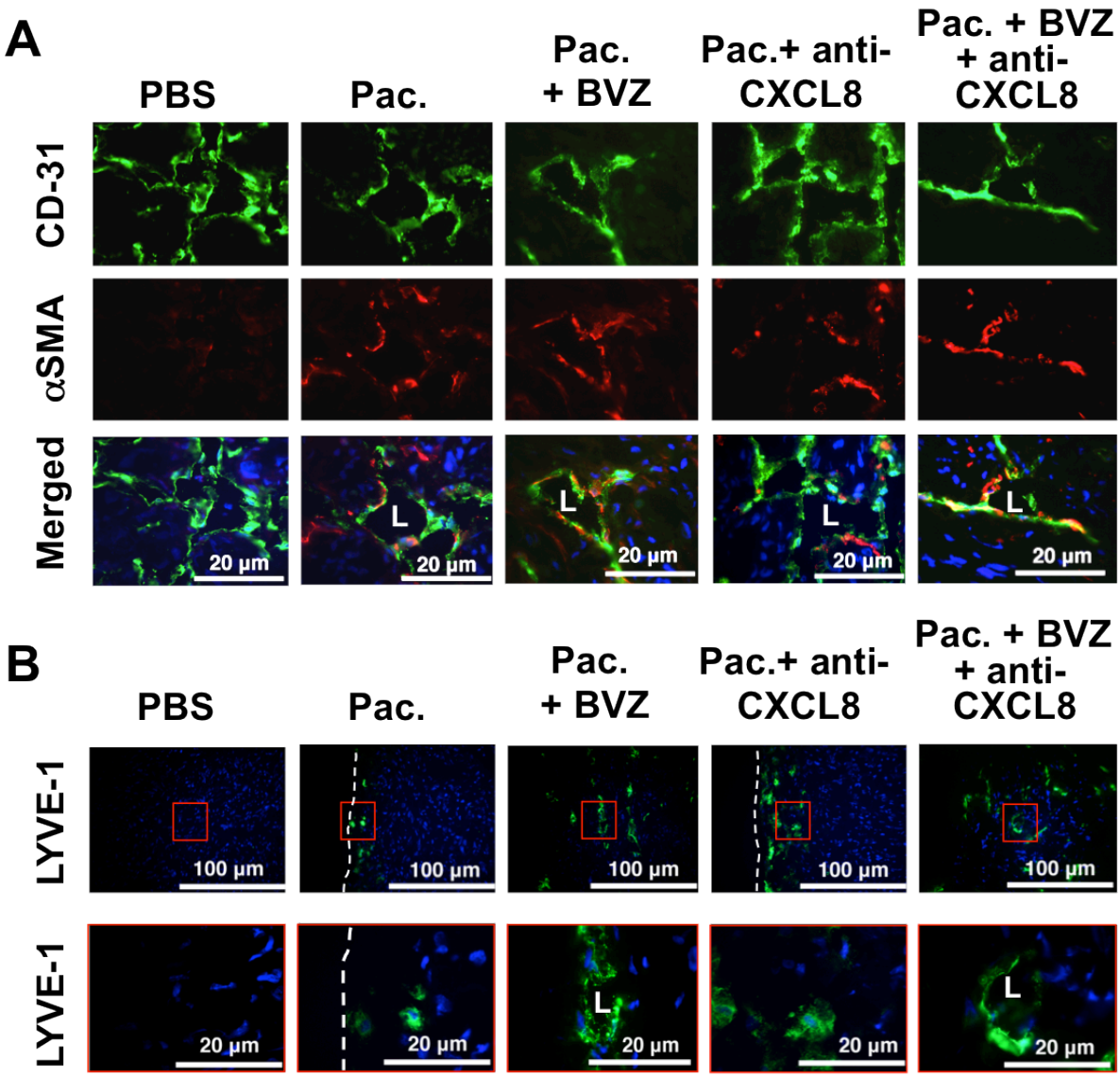
(A) Differences in tumor vasculature of mice treated with PBS or BVZ.

(B) Sections of tumors from PBS or BVZ-treated mice were labelled with hematoxylin and eosin. Ten fields by tumors (PBS or BVZ-treated) have been analyzed. Of these, no enlarged vessels containing blood cells have been observed in the control tumors. Representative images are shown in the figure.



Supplementary figure 6: Paclitaxel increases CXCL8 gene transcription and mRNA stability

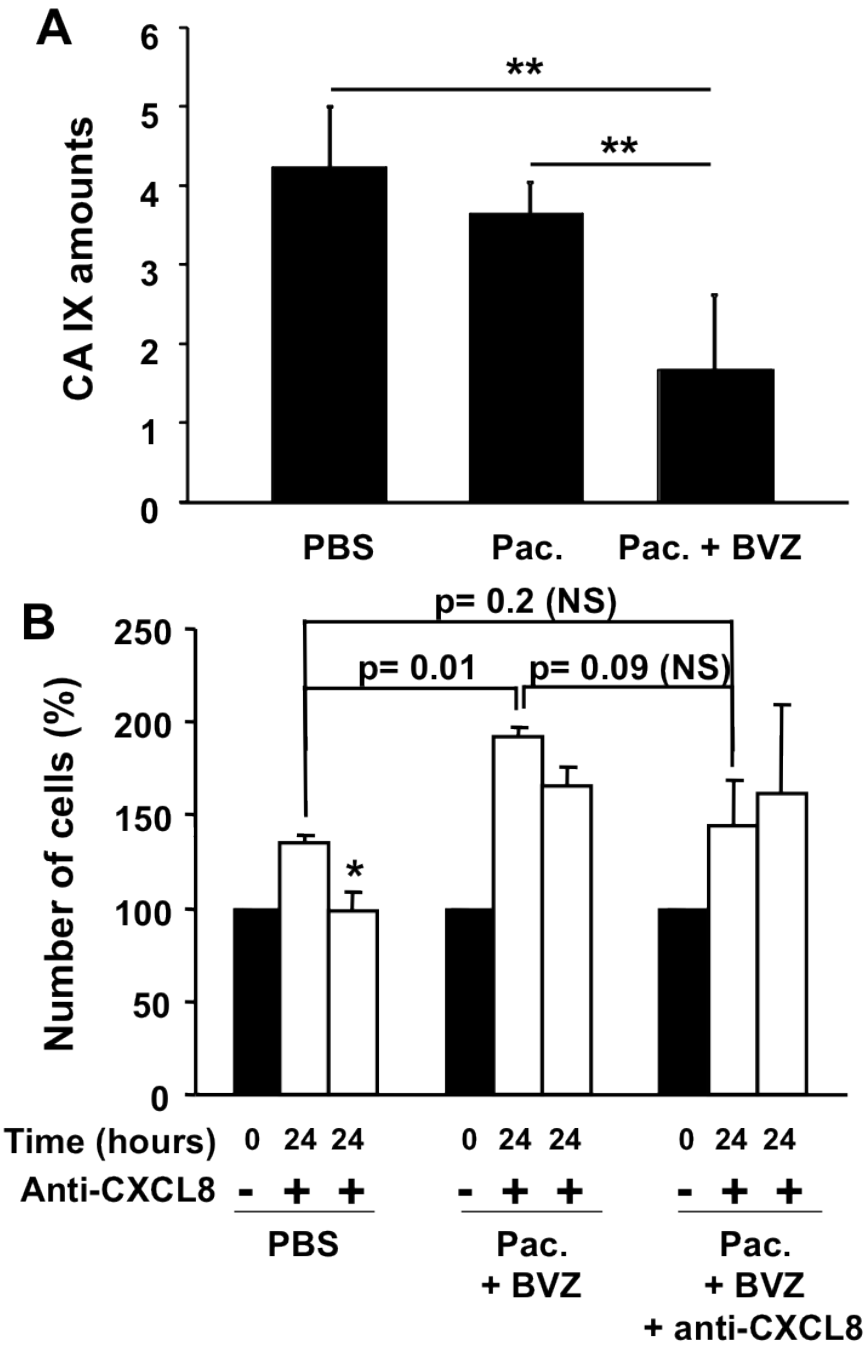
786-O cells were transfected with CXCL8 minimal promoter (Sparmann, and Bar-Sagi, 2004) or 3'UTR luciferase reporter genes. This last vector was obtained by inserting the region corresponding to the CXCL8 3' UTR obtained by PCR on 786-O genomic DNA instead of the corresponding VEGF 3'UTR region in the already described TK luc vector (Essafi-Benkhadir, K. et al, 2007). Cells were treated with 1 μM of paclitaxel for 24 hours. Luciferase activity was measured and reported as the percentage of activity compared to the untreated condition. n = 3; data are presented as mean ± SD. Statistically significant differences are shown: $^{**}p < 0.01$; $^{***}p < 0.001$.



Supplementary figure 7: Paclitaxel treatment modifies tumor vascularization but do not affect lymphangiogenesis

(A) Vessels and α-smooth muscle actin (αSMA) were detected using anti-CD31 antibody immuno-staining (green) and anti-αSMA antibody (red) respectively. Tumor sections were counterstained with DAPI (blue).

(B) The lymphatic network was stained using anti LYVE-1 antibody and nuclei were stained with DAPI (blue). Lymphatic vessels with lumens (L) were observed in the centre and near the periphery of paclitaxel plus BVZ-treated tumors.



Grépin *et al.* Supplementary Figure 8

Supplementary figure 8: Decreased in hypoxia of tumors treated with paclitaxel plus BVZ. Increased growth capacity of 786-O^{LUC+} cells derived from these tumors

(A) Tumor extracts from four independent PBS, paclitaxel or paclitaxel + BVZ treated tumors were tested for the presence of carbonic anhydrase IX by western blot. Total ERK is used as a loading control for normalization. Statistical differences are indicated (**$p< 0.01$).

(B) Cells from four independent PBS, BVZ + Paclitaxel or BVZ + Paclitaxel + Anti-CXCL8-treated tumors were serum deprived and incubated in presence or absence of anti-CXCL8 antibodies (500 ng/ml). Their proliferative capacity was tested using the MTT assay after 24 h of incubation. Statistical differences are indicated. (NS: non-significant).

ARTICLE 2

ARTICLE 2

The CXCL7/CXCR1, 2, axis is a key driver in the growth of clear cell renal cell carcinoma

Renaud GREPIN*, Mélanie GUYOT*, Marina BONCOMPAGNI, Damien AMBROSETTI, Emmanuel CHAMOREY, Jean-Yves SCOAZEC, Sylvie NEGRIER, Hélène SIMONNET and Gilles PAGES.

* Co-auteurs

Article soumis dans le journal Cancer Research

1. Contexte scientifique et objectif

La majorité des cancers du rein à cellules claires présentent une mutation du gène von Hippel Lindau. Cette mutation entraine la surexpression du VEGF. Ce facteur de croissance est responsable de l'induction de l'angiogenèse tumorale. Les ccRCC sont des tumeurs richement vascularisées. Pour cette raison, les traitements de référence sont des anti-angiogéniques. Ces molécules ciblent le VEGF, ses récepteurs ou les effecteurs en aval. Malgré un rationnel fort en faveur de l'utilisation des anti-angiogéniques dans le traitement des ccRCC, certains patients sont réfractaires aux traitements ou développent des résistances. Ces résistances favorisent la progression de la maladie et aboutissent au décès du patient. Ces tumeurs sont réfractaires à la radiothérapie et à différentes chimiothérapies classiques utilisées pour traiter d'autres tumeurs. Afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints de ccRCC il est indispensable de trouver de nouvelles cibles thérapeutiques. Ces cibles thérapeutiques permettraient d'améliorer les traitements déjà existants ou de développer de nouvelles molécules thérapeutiques.

Comme nous l'avons décrit en introduction, il existe un lien étroit entre inflammation et cancer. Les cytokines inflammatoires CXCL et leurs récepteurs (CXCR1 et 2) sont impliqués dans le développement et la progression de différents types de cancer (Vinader et Afarinkia, 2012; Zhu et al., 2012). Ces cytokines ont un rôle prépondérant dans la régulation de l'angiogenèse tumorale. Cependant, très peu d'études valident l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation CXCL/CXCR dans le traitement des cancers. Chez les patients atteints de ccRCC, les niveaux plasmatiques et intra-tumoraux de plusieurs cytokines pro-angiogéniques sont élevés. Dans un modèle murin syngénique de ccRCC, la croissance

tumorale est diminuée dans les souris déficientes pour le récepteur CXCR2 par rapport aux souris contrôles. Cette diminution est due à une inhibition de l'angiogenèse et une augmentation de la nécrose tumorale. En absence de CXCR2, les tumeurs ont un potentiel métastatique réduit. Ces résultats suggèrent l'importance de l'axe CXCL/CXCR2 dans le développement tumoral des RCC (Mestas et al., 2005). Les mêmes résultats ont été obtenus avec un modèle murin syngénique de cancer du poumon (Keane et al., 2004). Ces études n'apportent aucune information sur la cytokine CXCL7 et son rôle dans ces mécanismes. Nous ne savons pas si elle n'a pas été étudiée ou si les résultats obtenus n'étaient pas concluants.

Les récepteurs CXCR sont exprimés à la surface des cellules endothéliales et sont activés par les cytokines CXCL qui sont de puissants facteurs pro-angiogéniques et qui favorisent la croissance tumorale. Ces récepteurs sont également exprimés à la surface des cellules tumorales mais leur rôle est très débattu. *In vitro,* ils favorisent la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Luppi et al., 2007; Zhu et al., 2004) et favorisent l'échappement à l'apoptose induite par le stress (Maxwell et al., 2007). Des inhibiteurs de CXCR2 inhibent la croissance tumorale. Leur mode d'action n'est pas très clair. La balance entre une action via l'inhibition de l'angiogenèse et/ou une action directe sur les cellules tumorales reste à clarifier. Des résultats à première vue contradictoires montrent un rôle de l'expression de CXCR2 dans la sénescence induite par les oncogènes. Une déplétion de CXCR2 empêche les cellules d'entrer en sénescence en réponse à un stimulus oncogénique. Ce résultat suggère que le récepteur CXCR2 agit comme un suppresseur de tumeur (Acosta et al., 2008). Cependant, les cellules en sénescence possèdent un secrétome particuliers favorisant la prolifération des cellules tumorales adjacentes et donc le développement de la tumeur et la dissémination métastatique. Ces résultats reflètent la complexité de ces mécanismes. Le récepteur CXCR2 aurait un rôle pro- ou anti-angiogénique en fonction du type de tumeur et du stade de la maladie. Cela nous montre la nécessité d'approfondir notre connaissance de cette voie afin de la cibler le plus efficacement possible dans les cancers.

Dans notre article publié en 2012, nous avons mis en évidence que l'utilisation d'un anticorps dirigé contre la cytokine CXCL8 inhibe la croissance tumorale de cellules de ccRCC humaines chez la souris nude et limite les effets néfastes du BVZ sur ces tumeurs. Nous avons choisi de poursuivre la caractérisation de cette famille de cytokine et d'évaluer son rôle dans le développement des ccRCCs. Pour cela, nous avons dosé ces différentes cytokines dans des

ccRCC humains. Grâce à ces dosages, nous avons validé l'importance de cet axe dans le développement des ccRCC. Nous avons identifié des facteurs pronostics potentiels limitant la survie des patients atteints de ccRCC. De plus, cette étude nous a permis de mettre en évidence une nouvelle cible thérapeutique pertinente dans le traitement des ccRCC.

2. Résultats

Parmi l'ensemble des cytokines analysées, les cytokines CXCL1 et CXCL7 ont été identifiés comme facteurs pronostiques dans une analyse univariée mais seul CXCL7 apparait comme marqueur pronostique de survie indépendant, de la présence de métastases au diagnostic et du grade de Furhman, connus comme facteurs de mauvais pronostic dans les ccRCC. Des niveaux élevés de CXCL7 dans les tumeurs des patients sont fortement corrélés à un mauvais pronostic vital chez ces patients (p=0,0023). CXCL8, pourtant identifié dans l'étude précédente, n'est pas corrélé avec la survie de façon significative, dans l'analyse univariée (p=0,08). L'association de niveaux élevés de ces trois cytokines est inversement corrélée à la survie des patients. Des niveaux élevés d'une seule, de deux ou de trois de ces cytokines augmentent le risque de mortalité chez des patients atteints de ccRCC métastatiques. Ces résultats suggèrent que l'association de niveaux élevés de ces trois cytokines pourrait constituer un marqueur pronostique intéressant dans les ccRCC.

Des résultats contradictoires existent sur les niveaux de CXCL7 dans le plasma de patients atteints de différents cancers. Les niveaux plasmatiques de CXCL7 augmentent chez des patients atteints de cancer du poumon par rapport à des personnes à risques mais sains (Lee et al., 2011). Ce dosage permettrait une identification précoce du cancer du poumon. De plus, les niveaux de CXCL7 diminuent après chirurgie chez les patients atteints de cancer du poumon (Yee et al., 2009). La cytokine CXCL7 est considérée comme un marqueur de détection précoce du cancer du poumon. A l'inverse, une diminution des niveaux plasmatiques de CXCL7 est observée chez des patients atteints de cancer du pancréas par rapport à des donneurs sains (Matsubara et al., 2011). Ces études proposent CXCL7 comme bio marqueur tumoral mais aucune n'explore le rôle de cette cytokine comme cible thérapeutique dans le traitement des cancers. Des cellules de cancer du sein sur-exprimant la cytokine CXCL7 ou le récepteur CXCR2 possèdent des capacités invasives supérieures par rapport aux cellules contrôles (Tang et al., 2008). La surexpression de CXCL7 dans des cellules de cancer du sein entraine une augmentation des capacités invasives de ces cellules via une augmentation de l'expression du VEGF-C et du VEGF-D. Comme nous l'avons déjà

évoqué ces facteurs de croissance jouent un rôle important dans la dissémination métastatique *in vivo*. Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'axe CXCR2/CXCL7 permettrait de limiter l'invasion et la dissémination métastatique dans le cancer du sein (Yu et al., 2010). Dans le cancer du sein, les cellules mésenchymateuses dérivées de la moelle osseuse et infiltrant la tumeur accélèrent la croissance tumorale. Un dialogue se crée entre ces cellules et les cellules tumorales pour augmenter la proportion de cellules souches cancéreuses. Les cytokines favorisant ce dialogue et la progression tumorale sont l'IL-6 et le CXCL7 (Liu et al., 2011). Ces résultats nous ont poussés à étudier le rôle de l'axe CXCR2/CXCL7 dans le développement des ccRCC.

Dans notre modèle murin de ccRCC, bloquer CXCL7 à l'aide d'un anticorps spécifique inhibe de façon très significative la croissance des tumeurs. A l'inverse la surexpression de CXCL7 dans les cellules tumorales accélère considérablement la croissance des cellules *in vitro* et le développement tumoral *in vivo*. Ces deux expériences suggèrent un rôle important de la cytokine CXCL7 dans la croissance et le développement des ccRCC. Contrairement à ce qui était attendu compte tenu du rôle de ces cytokines dans l'angiogenèse tumorale, l'effet de CXCL7 ou de l'anticorps bloquant passe par une modification des capacités prolifératives des cellules et semble indépendant de l'angiogenèse.

De façon intéressante, l'expression de CXCL7 est augmentée *in vivo* dans les cellules de ccRCC. Cette augmentation est liée à une surproduction d'IL-1β au sein de la tumeur. *In vivo*, l'expression d'IL-1β est assurée par le stroma et les cellules tumorales elles-mêmes. Les cellules tumorales qui ne produisent pas de CXCL7 *in vitro* se mettent à secréter du CXCL7 sous stimulation IL-1β. *In vivo*, l'augmentation de l'expression de CXCL7 au sein de la tumeur peut également être associée à une production de cette cytokine par les cellules stromales. Des macrophages en co-culture avec des cellules de cancer du sein montrent une surexpression d'IL-1β (90%) qui s'accompagne d'une augmentation de l'expression de différentes cytokines inflammatoires et angiogéniques, dont CXCL7 (Stewart et al., 2012). Dans le cancer du poumon de type NSCLC, l'IL-1β augmente l'expression de plusieurs cytokines CXC, en particuliers CXCL5 et CXCL8 (Sun et al., 2008). Ces résultats renforcent notre hypothèse sur le lien entre l'expression d'IL-1β et l'expression de CXCL7 au sein de la tumeur.

La cytokine CXCL7 est également appelée NAP-2 (pour « neutrophil-activating protein-2 »). C'est une protéine produite sous la forme d'un précurseur PBP (pour « platelet basic protein »). Ce précurseur est ensuite clivé par les MMP2 et 9 ou la cathepsine G pour donner les formes matures, NAP-2, CTAP-III (pour « Connective tissue Activating Protein III ») et β−TG (pour « beta-ThromboGulin »). L'expression de NAP-2 peut être induite par l'IL-1β (Kruidenier et al., 2006). Les cellules 786-O expriment des niveaux faibles d'IL-1β et de MMP (Chuang et al., 2008). Ces résultats expliquent, au moins en partie, pourquoi les niveaux de CXCL7 produits par les cellules 786-O sont indétectables. *In vitro*, le traitement des cellules 786-O par de l'IL-1β est suffisant pour rendre la production de CXCL7 détectable en PCR et en ELISA suggérant que les niveaux d'IL-1β sont limitant dans ces cellules. De façon intéressante, une autre lignée de ccRCC plus agressives que les 786-O, les cellules A498, expriment des niveaux de base nettement supérieurs d'IL1-β et de MMP2. Dans ces cellules, l'expression de CXCL7 devrait être supérieure par rapport aux cellules 786-O. Nous venons de recevoir les cellules A498 au laboratoire et pour vérifier cette hypothèse nous avons mesuré les niveaux de CXCL7. Les cellules A498 possèdent en ARNm des niveaux de CXCL7 deux fois supérieurs aux cellules 786-O. Il faudrait maintenant vérifier si cette augmentation d'un facteur deux en ARNm est suffisante pour permettre la sécrétion de CXCL7 par les cellules. Cela nous permettrait de valider notre hypothèse. L'expression d'IL-1β pourrait donc constituer un marqueur d'agressivité des cellules RCC en régulant la production de CXCL7 par ces cellules. *In vivo*, l'IL-1β et les MMP apportées de façon exogène par les cellules stromales infiltrant la tumeur amplifient la production de CXCL7 et favorisent le développement tumoral. Dans notre système, la cytokine CXCL7 semble majoritaire. Bloquer uniquement CXCL7 inhibe complètement la croissance tumorale alors que bloquer CXCL8 apporte un bénéfice plus limité. Pourtant d'autres cytokines CXC sont exprimées par les ccRCC. Par exemple, les cytokines CXCL1 et CXCL3 sont deux autres cytokines pro-angiogéniques majeures beaucoup plus étudiées que CXCL7. Dans notre modèle, cibler ces cytokines n'a qu'un effet limité sur la croissance tumorale. Il faut noter que les anticorps ciblant CXCL1, 3 ou 8 ne reconnaissent pas CXCL7. Ces résultats renforcent le rôle prépondérant de la cytokine CXCL7 dans le développement des ccRCC.

Cependant, le rôle pronostique de l'association de ces différentes cytokines vient renforcer l'idée selon laquelle cibler une seule de ces cytokines pourrait ne pas être suffisant pour limiter efficacement la croissance tumorale. Au contraire, il serait intéressant de pouvoir

cibler CXCL1, 7 et 8 en même temps. En collaboration avec l'équipe du Dr Pierres à Marseille nous avons généré des anticorps pan-CXCL, ciblant les cytokines CXCL1, 2, 3, 7 et 8. Des analyses BIACORE nous ont permis de vérifier que ces anticorps ont une affinité comparable voire supérieure à des anticorps commerciaux spécifiques de chacune des cytokines. Ces anticorps diminuent les niveaux intra-tumoraux des cytokines cibles et inhibent significativement la croissance tumorale de ccRCC chez la souris. Ces anticorps sont également efficaces dans un autre modèle d'angiogenèse *in vivo.* L'utilisation de ces anticorps réduit de façon efficace l'angiogenèse et la taille des lésions observées après brulure de choroïde de rat au laser. Un brevet sur ces anticorps vient d'être déposé (Brevet N°69922). Son intitulé est : « Anti- CXCL1, anti-CXCL7 and anti-CXCL8 antibodies and their applications ».

La cytokine CXCL7, comme les autres cytokines de la famille CXCL ELR+ joue son rôle en se liant aux récepteurs CXCR1 et CXCR2. Ces récepteurs sont les seuls récepteurs connus pour CXCL7 (Vandercappellen et al., 2008). Pour montrer que l'effet de CXCL7 observé dans les RCC passe effectivement par ces récepteurs une des expériences à réaliser serait de bloquer l'activité des récepteurs CXCR1 et CXCR2 et de montrer que l'effet de la surexpression de CXCL7 dans les cellules RCC est perdu.

Un autre moyen de cibler la voie CXCL7/CXCR1-2 est donc de bloquer l'activité de ces récepteurs. Plusieurs études ont déjà montré que cibler ces récepteurs limite la croissance de différents types de cancer et de limite la formation de métastases. Une étude récente, sur le cancer du sein, fait l'hypothèse que l'axe CXCL/CXCR est en parti responsable des phénomènes de résistances observés en cours de traitement. En effet, l'inhibition du récepteur CXCR2 à l'aide d'un shRNA, augmente la sensibilité des cellules de cancer du sein au paclitaxel (chimiothérapie de référence dans le traitement du cancer du sein) *in vitro* et *in vivo*, dans un modèle murin syngénique. L'inhibition de CXCR2 en combinaison avec le paclitaxel diminue la densité micro vasculaire intra-tumorale et limite la formation spontanée de métastases pulmonaires. Ces résultats démontrent un rôle du récepteur CXCR2 dans les phénomènes de résistance à la chimiothérapie observés dans le cancer du sein et suggèrent que bloquer CXCR2 en parallèle de la chimiothérapie pourrait limiter l'apparition de résistances (Sharma et al., 2013). Une autre étude portant sur le cancer du pancréas montre qu'une inhibition de l'activité du récepteur CXCR2 diminue les capacités prolifératives des cellules cancéreuses pancréatiques et inhibe la croissance tumorale de xénogreffes pancréatiques dans des souris immunodéficiences.

Ces résultats suggèrent une nouvelle fois la pertinence de cibler le récepteur CXCR2 dans le traitement des cancers et en particuliers dans le cancer du pancréas (Wang et al., 2013b).

Les résultats obtenus avec la cytokine CXCL7 suggèrent l'existence d'une boucle autocrine dans les ccRCC. Les cellules de ccRCC expriment les récepteurs CXCR1 et CXCR2 et *in vivo* l'utilisation d'un inhibiteur des récepteurs CXCR1 et 2, le SB225002, inhibe de façon efficace la croissance tumorale. Cet inhibiteur agit sur les cellules tumorales et les cellules endothéliales. Son utilisation diminue la prolifération et induit l'apoptose des cellules tumorales *in vitro* et *in vivo*. Une étude récente étudiant les effets du SB225002 dans les cellules de cancers ovariens démontre un effet pro-apoptotique dépendant de p53 ou une catastrophe mitotique indépendante de p53 via une inhibition de Chk1 et une augmentation de Cdk (Du et al., 2013). Une autre piste d'explication des effets du SB225002 est apportée en montrant que ce composé possède une activité déstabilisatrice des microtubules via une hyper phosphorylation de Bcl2 et de Bclxl, une suppression de la polymérisation des microtubules et un arrêt en pro-métaphase. L'effet apoptotique du SB225002 semble dépendant du type cellulaire (Goda et al., 2013). L'ensemble de notre travail valide l'importance de l'axe CXCL7/CXCR2 dans le développement des ccRCC chez la souris.

Contrairement au ciblage de CXCL7 qui n'a aucun effet sur l'angiogenèse, bloquer les récepteurs induit une diminution de l'expression de plusieurs facteurs pro-angiogéniques (CXCL1, CXCL2, CXCL8 et du VEGF) et une augmentation de l'expression de la cytokine anti-angiogénique CXCL4. En aval de ces récepteurs, la fixation du ligand entraîne l'activation des voies ERK et AKT. L'inhibition de l'activité des récepteurs diminue l'activation de ces voies de signalisation et explique au moins en partie la diminution de l'expression des cytokines observée sous traitement SB225002. Par contre expliquer l'augmentation de CXCL4 est beaucoup plus difficile à première vue. En parallèle, une diminution de la densité vasculaire intratumorale, expliquée au moins en partie par l'effet antiprolifératif et pro-apoptotique du SB225002 sur les cellules endothéliales a été observé. Nos résultats suggèrent que l'inhibition de CXCR1/CXCR2 inhibe l'angiogenèse et la prolifération des ccRCC.

3. Conclusion et perspectives

L'implication des cytokines CXCL et de leurs récepteurs CXCR1 et CXCR2 dans le cancer a largement été étudiée. Dans notre modèle, l'axe CXCL7/CXCR1, CXCR2 semble être très important et largement impliqué dans le développement tumoral des ccRCC. Parmi l'ensemble des cytokines de la famille CXCL impliquées dans l'angiogenèse et la croissance tumorale CXCL7 est la moins étudiée. Pourtant dans les ccRCC, le rôle de cette cytokine semble prépondérant. Nos résultats suggèrent que cette cytokine et ses récepteurs pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques intéressantes dans le traitement des ccRCC métastatiques après l'échec des thérapies standard. L'inhibition de CXCL7 aux pourrait améliorer l'efficacité des anti-VEGFs et limiter l'apparition de résistances. Du travail est encore nécessaire afin de valider définitivement le rôle de CXCL7 comme marqueur pronostique et prédictif de l'efficacité des thérapies anti-angiogéniques dans les ccRCC.

Nous sommes actuellement associés à un essai clinique multicentrique portant sur des sujets atteints de ccRCC métastatiques traités au sunitinib. Le but de cette étude est de doser différentes cytokines angiogéniques dans le sérum des patients avant traitement et au cours des différents cycles de traitement. L'analyse des données cliniques des patients et de l'évolution des niveaux de CXCL7 au cours du traitement permettrait de déterminer si la cytokine CXCL7 est un marqueur prédictif de l'efficacité du traitement au sunitinib. Cela permettrait aux cliniciens de sélectionner les patients potentiellement les plus répondeurs au traitement et d'anticiper sur l'apparition éventuelle de résistances en cours de traitement.

Enfin, nous souhaitons tester l'efficacité potentielle d'une immunisation prophylactique anti-CXCL sur la croissance de ccRCC dans un modèle syngénique de RCCs.

The CXCL7/CXCR1/2 axis is a key driver in the growth of clear cell renal cell carcinoma

Renaud GREPIN[2]§, Mélanie GUYOT[1]§, Marina BONCOMPAGNI[1], Damien AMBROSETTI[1,3], Emmanuel CHAMOREY[4], Jean-Yves SCOAZEC[5], Sylvie NEGRIER[5], Hélène SIMONNET[5] and Gilles PAGES[1¤].

1 University of Nice Sophia Antipolis, UMR CNRS 7284/U INSERM 1081 (gpages@unice.fr, mguyot@unice.fr, boncompagni.marina@yahoo.fr)

2 Centre Scientifique de Monaco (rgrepin@centrescientifique.mc)

3 University of Nice Sophia Antipolis, Nice University Hospital, anatomo pathology department (damien.ambrosetti@yahoo.com)

4 Centre Antoine Lacassagne, Statistics Department (emmanuel.chamorey@nice.unicancer.fr)

5 University Lyon 1, Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon, UMR CNRS 5286/U INSERM 1052 (sylvie.negrier@lyon.unicancer.fr, jean-yves.scoazec@chu-lyon.fr, simonnet@univ-lyon1.fr)

¤ Corresponding author: Tel : +33 4 92 03 12 31; Fax : +33 4 92 03 12 35; email gpages@unice.fr

§ RG and MG contributed equally to this work

Running title: CXCL7 role in clear cell renal cell carcinoma

The authors disclose no potential conflicts of interest

ABSTRACT

Mutations in the von Hippel-Lindau gene lead to over-expression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and abnormal angiogenesis in clear cell renal cell carcinomas (ccRCC). Although VEGF is over-expressed in these tumors, analysis of patients' tumor samples showed that its expression did not correlate with overall survival. Here we show that the pro-angiogenic/pro-inflammatory cytokine CXCL7 is an independent prognostic factor for overall survival. While anti-CXCL7 specific antibodies strongly reduced the growth of ccRCC tumors in nude mice, conditional over-expression of CXCL7 accelerated tumor development. CXCL7 promoted cell proliferation both in vivo and in vitro. Expression of CXCL7 is induced by interleukin-1 ® (IΛ–1 ®), in vitro. ccRCC cells normally secrete low amounts of CXCL7 but there is high amounts in tumors due to a high level of IL-1 ®. A competitive pharmacological inhibitor of CXCL7 receptors, CXCR1 and CXCR2 (SB225002) inhibited ccRCC and endothelial cell proliferation and tumor growth. Because CXCR1 and CXCR2 are present on endothelial and ccRCC cells, its inhibition affects, in parallel, the tumor vasculature and the proliferation of tumor cells. These results highlight the CXCL7/CXCR1/CXCR2 axis as a pertinent target for the treatment of ccRCC.

INTRODUCTION

Mutations in the von Hippel-Lindau gene cause over-expression of VEGF, resulting in ccRCC to be one of the most vascularized tumors. Theoretically, ccRCC should be highly responsive to anti-VEGF therapy. Bevacizumab (BVZ), a humanized monoclonal antibody targeting VEGF, in association with interferon-alpha (interferon-α), has obtained approval from the American Food and Drug Agency for treatment (1). Despite the increased time to progression, the pivotal AVOREN study that compared the efficacy of interferon-α versus interferon-α plus BVZ (2) showed that BVZ did not improve overall survival. However, a more detailed analysis of the results showed that some patients were high responders to treatment with prolonged survival while the treatment was inefficient in others patients, in which metastatic dissemination was observed. Moreover, a recent meta-analysis showed that BVZ in combination with chemotherapy induced fatal adverse events (3). Our recent study also highlighted unexpected ccRCC enhanced growth in mice treated with BVZ (4). We and others have also demonstrated a very important role for CXCL cytokines in the development

of ccRCC progression, in particular CXCL8 (5). This suggested that ccRCC express a high amount of VEGF and others pro-angiogenic cytokines that play a key role when the VEGF/VEGFR axis is inhibited by either antibodies targeting VEGF or inhibitors targeting their tyrosine kinase receptors.

Cytokines of the CXCL family have angiogenic or anti-angiogenic potency depending on the presence or absence of the amino acid triplet ELR in their protein sequence (ELR+CXCL (1-3, 5-8) have pro-angiogenic properties whereas ELR-CXCL (4, 9, 10) have anti-angiogenic properties) (6). ELR+CXCL mediate their effect through their G-protein-coupled receptors CXCR-1 and CXCR-2, which leads to activation of the ERK and PI3 kinase pathways (6). The pro-inflammatory chemokine CXCL8 also named interleukin-8 promotes angiogenesis, tumorigenesis and metastasis and it is over-expressed in many tumors including ccRCC (7).

Moreover, Ras-dependent secretion of CXCL8 enhanced tumor progression by promoting neo-vascularisation (8). The CXCR2/CXCL8 axis was also described as a survival pathway for prostate (9), ovarian (10), brain (11) and skin cancers (12). Moreover, CXCR1 blockade inhibited the growth of human breast cancer stem cells (13). CXCL8 is not the only ELR+CXCL cytokine implicated in cancer progression as CXCL1 was shown to be important for the proliferation of oesophageal (14) and melanoma cancer cells (15). CXCL7 is also implicated in the development of the lymphatic network through the regulation of VEGF- C and VEGF-D, two major growth factors for lymphatic endothelial cells (16). The role of CXCL cytokines is not restricted to solid tumors since CXCL4 and CXCL7 are markers of advanced disease for myelodysplasic syndromes (17). Hence, the ELR+CXCL/CXCR1, 2 axis is a key component implicated in tumor development. However, the meaning of co-expression in the same cell of CXCR and CXCL is controversial since this autocrine pathway can drive both senescence (18) and tumor development (13). This discrepancy can be explained by differential expression during tumor progression. CXCR expression may be beneficial during tumorigenesis since it drives senescence. However, its expression during the late stages accelerates tumor growth because stimulation of CXCR induces activation of ERKs, a major signaling pathway implicated in cell proliferation (19). The goal of our study was to investigate the major CXCL implicated in ccRCC aggressiveness and to evaluate the potential of these cytokines and their receptors CXCR1/2 as potent therapeutic targets.

MATERIALS AND METHODS

Human kidney samples The clinical characteristics of the patients and angiogenic profile of the normal and tumor tissues were described previously (4).

Cell lines and molecular biology 786-O (CRL 1932), Caki-2 (HTB-47), and ACHN (CRL 1611) cells were from American Type Culture. RCC10 were a kind gift from WH Kaelin (Dana Farber Cancer Institute). 786- OLUC+, RCC-10LUC+ and ACHNLUC+ cells were obtained by lentiviral transduction (pLenti6/V5-D-TOPO, Invitrogen, France) and blasticidin selection (10 ⌈γ/μλ) (4). Tumor 1 was a non-metastatic pT3b, Fuhrman grade 2 tumor, tumor 2 was a non metastatic pT3a, Fuhrman grade 4 tumor and tumor 3 was a metastatic pT3a Fuhrman grade 4 tumor. Tumor fragments following surgery were treated with collagenase overnight at 37°C and/or mechanically disaggregated with scalpels. Tumor cells were suspended in cell culture medium specific for renal cells (PromoCell, Heidelberg Germany). Further experiments were performed after passage ten when the cell line was established. Reverse transcription reactions were performed as described (20). PCR analysis of CXCR2 expression was performed with the following oligonucleotides; Forward primer 5'-ATGGAAGATTTTAACATGGAG-3'; reverse primer 5'-GAGAGTAGTGGAAGTGTGCC-3'.

Antibodies The following antibodies were used for immunoblotting or immunohistochemistry respectively: anti-phospho ERK 1, 2 antibody (pERK, Sigma St Louis, MO), anti-phospho AKT (pAKT), anti-AKT, anti-ERKs, (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-PARP (Cell Signaling, Cambridge, UK) and anti-CAIX (Bayer Health Care, Lyon France). The CD31 antibody was a rat monoclonal anti-mouse CD31 (clone MEC 13.3, 1:1000, BD Pharmingen).

Drugs The anti-human CXCL7 antibodies (Peprotech, France) were diluted in PBS and injected intra-peritoneally (5mg/kg), as described (8). PBS was injected into the control group. SB225002 was synthesized by the Chemistry Department of the University of Nice as previously described (21) (Dr Rachid Benhida).

Tumor xenograft formation and size evaluation 786-OLUC+, RCC-10LUC+ or ACHNLUC+ cells (3.106 to 10.106 cells) were injected subcutaneously into the flanks of 5-week-old nude (nu/nu) female mice (Janvier, France). Bioluminescence was quantified using

the In Vivo Imaging System (IVIS, Perkin Elmer, France) according to the manufacturer's instructions. Tumor volume (v = L x l2 x 0.52 (22)) was determined in parallel using a caliper. There was a linear relationship between values for bioluminescence and the tumor volume.

Immunohistochemistry Tumor sections were handled as described previously (23). Sections were incubated with rat monoclonal anti-mouse CD31 (clone MEC 13.3, BD Pharmingen) or monoclonal anti-human CXCR2 (clone 48311 R&D systems) antibodies. Vessel density was evaluated using the Image J program. Three double-blind counts were performed.

Measurement of hemoglobin and cytokines Frozen tumor tissues were lysed in cell extraction buffer (Biosource, Belgium). The intra- tumor hemoglobin content was measured using a Drabkin reagent kit 525 (Sigma, France). CXCL cytokines, FGF, human and mouse VEGF were measured using PeproTech ELISA kits according to the manufacturer's recommendations (PeproTech, Neuilly-sur-Seine, France).VEGF-C was measured using the Human DuoSet ELISA kits, VEGF-D using the Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, Minneapolis, USA).

Statistical analysis Statistical analyses were two-sided and were performed using R-2.12.2 for Windows. Statistical comparisons were performed using the Chi-2 test or Fisher exact test for qualitative data, the Student t-test or Wilcoxon test for quantitative data and the Log-Rank test for censored data.

RESULTS

CXCL7 is an independent prognostic factor for overall survival of ccRCC patients

Previously, we utilized immunoassay to determine cytokines that regulate the angiogenic balance in 51 ccRCC patient samples and their normal tissue counterpart (4). To investigate whether these cytokines were associated with patient outcome, we measured the correlation between the overall patient survival and the intra-tumoral levels of the different cytokines. In total, 22 patients (43%) died during the follow-up period. It is noteworthy that patients who exhibited CXCL7 levels superior to the first quartile (1152 pg/mg) had a significantly higher death rate (Fig. 1A). Univariate analysis showed that CXCL7 expression was a poor prognostic factor for overall survival (p = 0.0015, Supplementary Table S1). Furthermore, metastasis at diagnosis and the Fuhrman grade, which are both known to be poor prognostic factors for patient's outcome, also correlated significantly with overall survival (p = <10-3

and 0.001). Unexpectedly, the levels of the pro-angiogenic forms of VEGF (Levels of total VEGF (V) minus the levels of the anti-angiogenic form of VEGF (Vb) (24)) did not significantly correlated with survival ($p = 0.26$ and $p = 0.49$) (Supplementary Table S1). These prognostic factors (level of CXCL7, metastasis at diagnosis and the Fuhrman grade) were then analyzed in a multivariate Cox regression model on overall survival (Supplementary Table S2). CXCL7 expression was identified as an independent prognostic parameter for overall survival ($p = 0.014$). Similar results were obtained for metastasis at diagnosis and the Fuhrman grade with respect to overall survival ($p = 0.0005$ and 0.007; Supplementary Table S2).

CXCL7 blockade decreases the growth of ccRCC xenograft tumors The results described above prompted us to test the potential of CXCL7 as a new therapeutic target for the development of ccRCC. For this purpose, we analyzed expression of CXCL7 in the conditioned medium of different model cell lines of ccRCC including 786-O, RCC-10, ACHN and Caki-2. These cell lines have been extensively for their mutations in the von Hippel-Lindau protein, which lead to constitutive expression of the hypoxia-inducible factor 1 ⟨ or 2 ⟨ (HIF-1α or 2α) (25). These cell lines only produced levels of CXCL7 which are at the lower limit of the detection threshold. However, human CXCL7 (ELISA tests specific of human CXCL7 were used) was present in tumors generated from 786-O cells in nude mice in a range comparable to what was detected in human samples (mean 2000 pg/mg protein) (4), suggesting that "factors" produced in the tumor's microenvironment stimulate the production of CXCL7 by tumor cells. This result was in agreement with the data of Pillai et al who described that stromal-derived "activities" were required for optimal expression of CXCL7 by monocytes (26). These results provided the rationale for testing the impact of blocking human CXCL7 on the development of ccRCC xenografted tumors. Thus, 786-OLUC+ cells were monitored by luminescence to evaluate the growth of tumors in vivo following treatment. Mice developed tumors seven days after cell injections and tumors remained latent for 40 days before developing exponentially. In contrast, when anti-CXCL7 antibodies were administered 40 days after the injection of 786-O cells, tumors remained latent for as long as 70 days (Fig. 1C and D). The effect of anti-CXCL7 antibodies was also tested on ccRCC generated with two others independent ccRCC cell lines (RCC-10 and ACHN) with equivalent results (Supplementary Fig. S1).

Anti-CXCL7 antibodies do not alter the angiogenic profile of ccRCC tumors in nude mice but

modify their growthCXCL7 stimulates endothelial cell proliferation and angiogenesis via activation of two G- protein coupled receptors, CXCR1 and CXCR2 (6). However, as tumor cells may express abnormal levels of CXCR1 and CXCR2, we hypothesized that anti-CXCL7 antibodies may have anti-angiogenic and anti-proliferative properties. First, we evaluated the production of angiogenic cytokines in tumors of placebo or anti-CXCL7 treated mice. As expected, anti- CXCL7 antibodies decreased CXCL7 levels within the tumors. However, they did not affect the production of other major angiogenic cytokines including VEGF and CXCL8 (Fig. 2A). Tumor vascularization, assessed by measuring intra-tumor haemoglobin levels, was not affected by anti-CXCL7 treatment (Fig. 2B). To gain a more precise evaluation of vascularization we also analyzed the network of blood and lymphatic vessels. Again, no clear differences were noted for the anti-CXCL7 treatment. Hence, we hypothesized that the anti- CXCL7 treatment might affect the proliferation of tumor cells. To test this hypothesis, we first evaluated two major signaling pathways implicated in cell proliferation, the MAP Kinase/ERK and PI3 Kinase pathways. ERK and AKT activities were significantly down- regulated in mice treated with anti-CXCL7 antibodies (Fig. 2C) and the tumors also showed a decreased number of Ki67 labeled cells (Fig. 2D). No major signs of apoptosis (assessed by poly-ADP ribose polymerase (PARP) cleavage) were detected in tumor samples. Carbonic anhydrase 9 (CAIX) is a major target of the hypoxia-inducible factor and has been extensively studied as a marker of hypoxia (27). A significant decrease in CAIX protein levels was observed in tumors of anti-CXCL7 treated mice (Fig.2E) suggesting that anti-CXCL7 treatment decreases cell proliferation and therefore limits the development of hypoxic zones that have been correlated with the selection of more aggressive cells (28).

Over-expression of CXCL7 accelerates the growth of ccRCC xenograft tumors in nude miceTo definitively demonstrate the pro-tumor growth effect of CXCL7, we generated 786-O cells over-expressing CXCL7. Control 786-O cells produced levels of CXCL7 at the limit of the detection threshold of ELISA tests (50 pg/ml/24 hours/106 cells) (Fig. 3A). The level of CXCL7 in the media of 786-O cells transduced with a CXCL7-expressing lentivirus was superior to 1 ng/ml/24 hours/106 cells. Over-expression resulted in accelerated cell proliferation, reinforcing the concept of an autocrine proliferation loop driven by CXCL7 (Fig. 3B and 3C). Over-expression of CXCL7 resulted in accelerated tumor growth in xenografts onto the flanks of nude mice (Fig. 3D). Since tumors obtained with CXCL7 over- expressing cells were too big, mice were sacrificed for ethical purposes. Therefore extensive comparison of control and “CXCL7” tumors by immuno-histochemistry was impossible because of the

small size of control tumors. Only ELISA tests and Western blotting were possible. High levels of CXCL7 were detected in the plasma and the tumors (Fig. 3E). No modifications of other potent angiogenic factors- VEGF, CXCL8- were detected. The presence of equal haemoglobin content also suggests that the difference in tumor growth was not dependent on angiogenesis (Fig. 3F). Increased proliferating capabilities were noted by testing ERK and AKT activity (significant increase for ERK and a tendency to increase AKT activity) which almost mirrored the results obtained by blocking CXCL7 strongly suggesting that CXCL7 accelerates tumor cell proliferation in vivo (Fig. 3G).

Regulation of expression of CXCL7 by tumor cells in vitro and in vivoWe analysed the discrepancy between CXCL7 production in cell lines and in tumor xenografts. CXCL7 is produced as a precursor protein platelet basic protein (PBP) which is then cleaved to give the connective tissue-activating peptide III (CTAP-III) and the β- thromboglobulin-antigen (βTG-Ag). βTG-Ag maturates to generate active neutrophil activated peptide 2 (NAP-2)/CXCL7 (29). PBP expression could be stimulated by interleukin 1 ® (IL-1β) in colon carcinoma cell lines (29). IL-1β induces PBP/CXCL7 mRNA expression in 786-O cells (Fig. 4A). ELISA tests specific for the mature CXCL7 form show that IL-1β also stimulates the production of the mature protein (Fig. 4B). The discrepant results between in vitro and in vivo experiments were explained by the fact that tumors generated in nude mice produced IL-1β (mean 550 pg/ml/mg protein range 50-2000, n=15). Equivalent amounts of IL-1β were detected in the samples of the cohort of patients (mean 500 pg/ml/mg protein). In both experimental and human tumors CXCL7 levels correlates with IL-1β levels. Moreover, cathepsin G and metallo-protease (MMP), the two proteases described as PTB maturating proteins (29-30) are active in 786-O cells and probably participate in PBP maturation. Anti-CXCL7 antibodies alone inhibit cell proliferation in the absence of IL-1β suggesting that even if CXCL7 is produced at low level it participates in an autocrine proliferation loop in 786-O cells. Even in conditions of exponential proliferation in the presence of serum, IL-1β stimulates 786-O cell proliferation (Fig. 4C). The pro-proliferative effects of IL-1β are removed by anti-CXCL7 antibodies suggesting that growth is stimulated by IL-1β induction of a CXCL7-dependent autocrine feed-back loop.

Aberrant expression of CXCR1 and CXCR2 by ccRCC cells The experiments described above suggested that CXCL7 exerts an autocrine proliferation loop via its receptors CXCR1 and CXCR2 (6). To verify our hypothesis, we determined by qRT-PCR the expression of

CXCR1 and CXCR2 in different ccRCC cell lines. CXCR1 and CXCR2 were expressed in cell lines and in cells derived from independent fresh human ccRCC tumor samples in comparison to human micro-vascular endothelial cells (HMVEC) as a positive control (31) (Fig. 5A). The functionality and the role of CXCR1 and CXCR2 expressed by ccRCC cells on proliferation was determined through the use of SB225002, a competitive inhibitor of CXCR1 and CXCR2, which has been described in the context of inflammatory pathologies and tumor development (13, 32). SB225002 reduced 786-O cells accumulation in a dose- and time-dependent manner (Fig. 5C). SB225002 also significantly inhibited accumulation of ccRCC cells derived from fresh human ccRCC tumors (Fig. 5D) and accumulation of HMVEC (Supplementary Fig. S2A). SB225002 inhibited ERK and AKT activities in a dose dependent manner (Fig. 5D) and induced PARP cleavage (Fig. 5E) in 786- O cells and HMVEC (Supplementary Fig. S2B and S2C) suggesting a combined inhibition of proliferation and induction of apoptosis. Moreover SB225002 inhibited the production of pro- angiogenic cytokines including VEGF, CXCL1 and CXCL8 in a dose-dependent manner (Supplementary Fig. S3). These results strongly suggest that CXCR1/CXCR2 inhibitors could have potent anti-tumor growth effects in ccRCC since they concomitantly inhibit cell proliferation, induce apoptosis of tumor and inhibit endothelial cells and expression of pro- angiogenic factors by tumor cells.

Inhibition of CXCR1 and CXCR2 prevents ccRCC tumor growth in nude mice The results presented above suggest that CXCR1 and CXCR2 play a central role in ccRCC development. Hence, we predicted that inhibition of abnormally expressed CXCRs in tumor cells should efficiently inhibit tumor growth. Indeed, SB225002 inhibited tumor growth in nude mice (Fig. 6A), suggesting that CXCR1 and CXCR2 may represent therapeutic targets for ccRCC. SB225002 effect inhibited ERK and AKT activity, indicating that, at least part of the SB225002 on tumor growth was the result of decreased cell proliferation (Fig. 6B). Ki67 labelling confirmed the inhibitory effect of SB225002 on tumor cell proliferation (Fig. 6C). An increase in the size of the necrotic zones which is likely due to the SB225002-dependent induction of apoptosis observed in vitro was also detected (Fig. 6D). We then evaluated the angiogenic profile of the tumors of control or SB225002-treated mice. Although SB225002 had no significant effect on intra-tumor hemoglobin levels, it significantly decreased the levels of CXCL1 ($p = 0.05$) and CXCL2 ($p = 0.006$), two ELR+CXCL involved in CXCR2 activation and those of FGF involved in stromal cell growth ($p=0.03$). We also observed a decrease in VEGF production ($p = 0.04$) and a non-statistically drop in CXCL8 ($p = 0.06$).

Intra-tumoral CXCL7 was equivalent in control and SB225002-treated mice. The statistically significant increase in CXCL4 ($p = 0.007$), an anti-angiogenic member of the CXCL cytokine family also favored the anti-angiogenic effect of SB225002 (Fig. 6E). CD31 labeling (Fig. 6F) confirmed the decrease in blood vessel density. HES staining highlighted the presence of numerous blood vessels in the core of control tumors while only a few big vessels were observed at the periphery of tumors of SB225002-treated mice (Supplementary Fig. S4). These results further confirmed the decrease in vessel density which is probably correlated with decreased proliferation and increased apoptosis of endothelial cells. Hence, our results strongly suggest that CXCR1/CXCR2 inhibitors simultaneously decrease angiogenesis and the proliferation of ccRCC and thus they might be considered as potent therapeutic agents for such cancers.

DISCUSSION

Anti-inflammatory drugs like aspirin reduce the incidence of cancers (33-35). This feature reflects the fact that inflammation drives different mechanisms involved in tumor growth and dissemination including proliferation of tumor cells, angiogenesis and metastasis (36). These mechanisms are, in part, driven by secreted molecules such as ELR+CXCL cytokines, which play a key role in tumor development and invasion. Although they were first described to be produced by inflammatory cells notably neutrophils, they are also secreted by other cell types including tumor cells of different origin and endothelial cells (6). Their receptors CXCR1 and CXCR2 are also not restricted to neutrophils with expression in both endothelial and tumor cells (13-14, 18, 37).

Three questions arise from our finding: 1) Are the levels of ELR+CXCL cytokines easily assayed on samples obtained from patients in a minimally invasive way? 2) If yes, can they represent new therapeutic targets? 3) If this latter hypothesis is true, is it better to target specifically ELR+CXCL or their receptors? Our study begins to answer these questions although we have to be cautious because some of our experiments constitute a preclinical approach. Analysis of patient samples has clearly shown that CXCL7 represents a strong independent prognostic marker of tumor aggressiveness. The quantification of its intrinsic level allowed determination of a specific threshold for pejorative outcome. This quantitative parameter is of interest to clinicians who need reproducible methods that can be included in clinical practice. The fact that it is an independent prognostic marker may orientate clinicians' treatment strategies for patients with a priori good prognosis according to clinical parameters.

CXCL7 is probably the least investigated cytokine of the ELR+CXCL family in the context of cancer development. Only a few articles describe its role as a marker of advanced disease in myelodysplastic syndromes (17), in malignant pancreatic diseases (38) and in breast cancers (39). In breast cancers, CXCL7 also promoted tumor cell dissemination since it induced expression of VEGF-C and VEGF-D, two mediators in the development of lymphatic vessels (16). We and others have recently published that targeting CXCL8, another member of the ELR+CXCL family, inhibits the growth of 786-O xenografts (4-5). However, anti-CXCL7 antibodies block tumor growth while anti-CXCL8 antibodies only slow-down tumor growth highlighting CXCL7 as a more relevant target. Moreover, CXCL8 does not appear as a prognostic marker of survival in uni or multivariate analysis in the cohort of patients that we analyzed ($p = 0.49$). Among all the other ELR+CXCL cytokines we analyzed in our cohort of patients, only CXCL1 appears as a marker of poor prognosis in univariate analysis but fails to reach statistical significance in multivariate analysis ($p = 0.017$ and $p = 0.06$ respectively). Like for anti-CXCL8 antibodies, anti-CXCL1 antibodies alone only slow-down tumor growth. Anti-CXCL1 (not shown) or anti-CXCL8 (4) antibodies did not decrease the intra- tumoral levels of CXCL7. These results probably explain their weaker effects on tumor growth.

Discrepancies between basal production of CXCL7 by ccRCC cells in vitro and secretion in vivo were intriguing. Although active factors produced by stromal cells have already been suspected to stimulate CXCL7 production (26), the role of IL-1β suggests the contribution of cytokines produced by inflammatory cells in the tumor context to favor CXCL7 production by cancer cells. Maturation towards the active NAP-2/CXCL7 is then mediated by metalloproteinases (MMPs) like in colon tumor cells or epithelial cells from patients with colitis (29) or by cathepsin G present at the surface of neutrophils (30). Hence, our results strongly suggest that in addition to hematopoietic cells, epithelial cells have the ability to produce mature cytokines, which serve as chemo-attractants for neutrophils or macrophages to maintain the inflammatory context within the tumors. Moreover IL-1β was shown to be produced by ccRCC cells with a high malignancy potential and to participate in the epithelial-mesenchymal transition (40). Our experiments suggest that IL-1β promotes tumor cell proliferation via CXCL7 production and enhances tumor aggressiveness.Before the development of anti-angiogenic therapies the prognosis of metastatic ccRCC was poor. Although they have revolutionized the treatment of this pathology, the benefit in terms of overall survival is either null or measured in months (2, 41). This has been putatively linked to the heterogeneity of ccRCC as evaluated by multi-region sequencing (42). Consequently,

there is an urgent need to identify predictive markers of outcome for these expensive therapies or alternative therapeutic targets must be found in case of evasion to anti- angiogenic agents. These points are essential to reduce the health cost but more importantly to limit the number of patients developing adverse events (3-4). Beyond the role as prognostic markers CXCL cytokines could also be considered as predictive markers of response to anti- angiogenic therapies, not only in ccRCC but also in other cancer types, as we suggested recently (4, 20). A clinical assay aimed at correlating the plasma level of CXCL cytokines and the response to sunitinib in metastatic ccRCC patients is currently ongoing.

Our study questions the use of specific antibodies against CXCL7 or of CXCR1/CXCR2 inhibitors. When taking into consideration the development of inflammatory zones during the first phases of tumor development, we hypothesized that targeting specifically CXCL7 could be a good choice and would probably be a less aggressive treatment with limited side effects. Moreover, expression of CXCR1/CXCR2 might represent a "protective barrier" for cancer development through induction of senescence (18). However, the most aggressive forms of ccRCC apparently use the CXCR1/CXCR2 pathway to drive an autocrine proliferation loop. This more aggressive tumor is characterized by an active inflammatory component and angiogenesis dependent on cytokines secreted by tumor and inflammatory cells. Then, an inhibitor of CXCR1/CXCR2 might target at the same time tumor, endothelial and inflammatory cells thereby limiting tumor cell proliferation, angiogenesis and inflammation. However, in tumor treated by SB225002 we did not observed a decrease of CXCL7 levels probably because SB225002 enhances IL-1β-dependent CXCL7 expression by an as yet unknown mechanism (Supplementary Fig. S5). In conclusion, our study provides the framework for new therapeutic approaches targeting ccRCC subsequent to the failure of the "gold standard" anti-angiogenic treatment sunitinib. Validation of CXCL7 as a relevant prognostic/predictive marker of response to standard therapy in a larger, independent cohort of patients must now be performed to extend our results.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Marc Colombel (patients' informed consent), Dr Jean Claude Chambard (lentivirus expressing the luciferase gene), Dr Elodie Delaplanche (biopsies management), Dr Florence Mège-Lechevallier (pathologic analyses), Mr Jacky Paput (animal studies) and Dr Scott Parks (editorial assistance). Financial support: Contract VEGFIL from the National Institute of Cancer (INCA), the French Association for Cancer Research (ARC), the

Fondation de France, the Conseil Général des Alpes Maritimes, Roche France and The "Association pour la Recherche sur les Tumeurs du Rein (ARTuR)".

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. Lancet. 2007;370:2103-11.

2. Escudier B, Bellmunt J, Negrier S, Bajetta E, Melichar B, Bracarda S, et al. Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. J Clin Oncol. 2010;28:2144-50.

3. Ranpura V, Hapani S, Wu S. Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. JAMA. 2011;305:487-94.

4. Grepin R, Guyot M, Jacquin M, Durivault J, Chamorey E, Sudaka A, et al. Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. Oncogene. 2012;31:1683-94.

5. Huang D, Ding Y, Zhou M, Rini BI, Petillo D, Qian CN, et al. Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. Cancer Res. 2010;70:1063-71.

6. Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. Cancer Lett. 2008;267:226-44.

7. Mestas J, Burdick MD, Reckamp K, Pantuck A, Figlin RA, Strieter RM. The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. J Immunol. 2005;175:5351-7.

8. Sparmann A, Bar-Sagi D. Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. Cancer Cell. 2004;6:447-58.

9. Maxwell PJ, Gallagher R, Seaton A, Wilson C, Scullin P, Pettigrew J, et al. HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. Oncogene. 2007;26:7333-45.

10. Merritt WM, Lin YG, Spannuth WA, Fletcher MS, Kamat AA, Han LY, et al. Effect of interleukin-8 gene silencing with liposome-encapsulated small interfering RNA on ovarian cancer cell growth. J Natl Cancer Inst. 2008;100:359-72.

11. Brat DJ, Bellail AC, Van Meir EG. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. Neuro Oncol. 2005;7:122-33.

12. Payne AS, Cornelius LA. The role of chemokines in melanoma tumor growth and metastasis. J Invest Dermatol. 2002;118:915-22.

13. Ginestier C, Liu S, Diebel ME, Korkaya H, Luo M, Brown M, et al. CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. J Clin Invest. 2010;120:485-97.

14. Wang B, Hendricks DT, Wamunyokoli F, Parker MI. A growth-related oncogene/CXC chemokine receptor 2 autocrine loop contributes to cellular proliferation in esophageal cancer. Cancer Res. 2006;66:3071-7.

15. Botton T, Puissant A, Cheli Y, Tomic T, Giuliano S, Fajas L, et al. Ciglitazone negatively regulates CXCL1 signaling through MITF to suppress melanoma growth. Cell Death Differ. 2011;18:109-21.

16. Yu M, Berk R, Kosir MA. CXCL7-Mediated Stimulation of Lymphangiogenic Factors VEGF-C, VEGF-D in Human Breast Cancer Cells. J Oncol. 2010;2010:939407.

17. Aivado M, Spentzos D, Germing U, Alterovitz G, Meng XY, Grall F, et al. Serum proteome profiling detects myelodysplastic syndromes and identifies CXC chemokine ligands 4 and 7 as markers for advanced disease. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:1307-12.

18. Acosta JC, O'Loghlen A, Banito A, Guijarro MV, Augert A, Raguz S, et al. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. Cell. 2008;133:1006-18.

19. Shyamala V, Khoja H. Interleukin-8 receptors R1 and R2 activate mitogen-activated protein kinases and induce c-fos, independent of Ras and Raf-1 in Chinese hamster ovary cells. Biochemistry. 1998;37:15918-24.

20. Bourcier C, Griseri P, Grepin R, Bertolotto C, Mazure N, Pages G. Constitutive ERK activity induces downregulation of tristetraprolin, a major protein controlling interleukin8/CXCL8 mRNA stability in melanoma cells. Am J Physiol Cell Physiol. 2011;301:C609-18.

21. White JR, Lee JM, Young PR, Hertzberg RP, Jurewicz AJ, Chaikin MA, et al. Identification of a potent, selective non-peptide CXCR2 antagonist that inhibits interleukin-8-induced neutrophil migration. J Biol Chem. 1998;273:10095-8.

22. Auerbach R, Morrissey LW, Sidky YA. Regional differences in the incidence and growth of mouse tumors following intradermal or subcutaneous inoculation. Cancer Res. 1978;38:1739-44.

23. Essafi-Benkhadir K, Onesto C, Stebe E, Moroni C, Pages G. Tristetraprolin inhibits Ras- dependent tumor vascularization by inducing vascular endothelial growth factor mRNA degradation. Mol Biol Cell. 2007;18:4648-58.

24. Harper SJ, Bates DO. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? Nat Rev Cancer. 2008;8:880-7.

25. Shinojima T, Oya M, Takayanagi A, Mizuno R, Shimizu N, Murai M. Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2alpha. Carcinogenesis. 2007;28:529-36.

26. Pillai MM, Iwata M, Awaya N, Graf L, Torok-Storb B. Monocyte-derived CXCL7 peptides in the marrow microenvironment. Blood. 2006;107:3520-6.

27. Loncaster JA, Harris AL, Davidson SE, Logue JP, Hunter RD, Wycoff CC, et al. Carbonic anhydrase (CA IX) expression, a potential new intrinsic marker of hypoxia: correlations with tumor oxygen measurements and prognosis in locally advanced carcinoma of the cervix. Cancer Res. 2001;61:6394-9.

28. Chapman JD, Engelhardt EL, Stobbe CC, Schneider RF, Hanks GE. Measuring hypoxia and predicting tumor radioresistance with nuclear medicine assays. Radiother Oncol. 1998;46:229-37.

29. Kruidenier L, MacDonald TT, Collins JE, Pender SL, Sanderson IR. Myofibroblast matrix metalloproteinases activate the neutrophil chemoattractant CXCL7 from intestinal epithelial cells. Gastroenterology. 2006;130:127-36.

30. Schiemann F, Grimm TA, Hoch J, Gross R, Lindner B, Petersen F, et al. Mast cells and neutrophils proteolytically activate chemokine precursor CTAP-III and are subject to counterregulation by PF-4 through inhibition of chymase and cathepsin G. Blood. 2006;107:2234-42.

31. Salcedo R, Resau JH, Halverson D, Hudson EA, Dambach M, Powell D, et al. Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. Faseb J. 2000;14:2055-64.

32. Braber S, Overbeek SA, Koelink PJ, Henricks PA, Zaman GJ, Garssen J, et al. CXCR2 antagonists block the N-Ac-PGP-induced neutrophil influx in the airways of mice, but not the production of the chemokine CXCL1. Eur J Pharmacol. 2011;668:443-9.

33. Chan AT, Giovannucci EL, Meyerhardt JA, Schernhammer ES, Wu K, Fuchs CS. Aspirin dose and duration of use and risk of colorectal cancer in men. Gastroenterology. 2008;134:21-8.

34. Langley RE, Burdett S, Tierney JF, Cafferty F, Parmar MK, Venning G. Aspirin and cancer: has aspirin been overlooked as an adjuvant therapy? Br J Cancer. 2011;105:1107- 13.

35. Yiannakopoulou E. Modulation of Lymphangiogenesis: A New Target for Aspirin and Other Nonsteroidal Anti-inflammatory Agents? A Systematic Review. J Clin Pharmacol. 2011.

36. Lazennec G, Richmond A. Chemokines and chemokine receptors: new insights into cancer-related inflammation. Trends Mol Med. 2010;16:133-44.

37. Rubie C, Kollmar O, Frick VO, Wagner M, Brittner B, Graber S, et al. Differential CXC receptor expression in colorectal carcinomas. Scand J Immunol. 2008;68:635-44.

38. Frick VO, Rubie C, Wagner M, Graeber S, Grimm H, Kopp B, et al. Enhanced ENA-78 and IL-8 expression in patients with malignant pancreatic diseases. Pancreatology. 2008;8:488-97.

39. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. Cancer Res. 2011;71:614-24.

40. Chuang MJ, Sun KH, Tang SJ, Deng MW, Wu YH, Sung JS, et al. Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. Cancer Sci. 2008;99:905-13.

41. Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Oudard S, et al. Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol. 2009;27:3584-90.

42. Gerlinger M, Rowan AJ, Horswell S, Larkin J, Endesfelder D, Gronroos E, et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med. 2012;366:883-92.

FIGURES

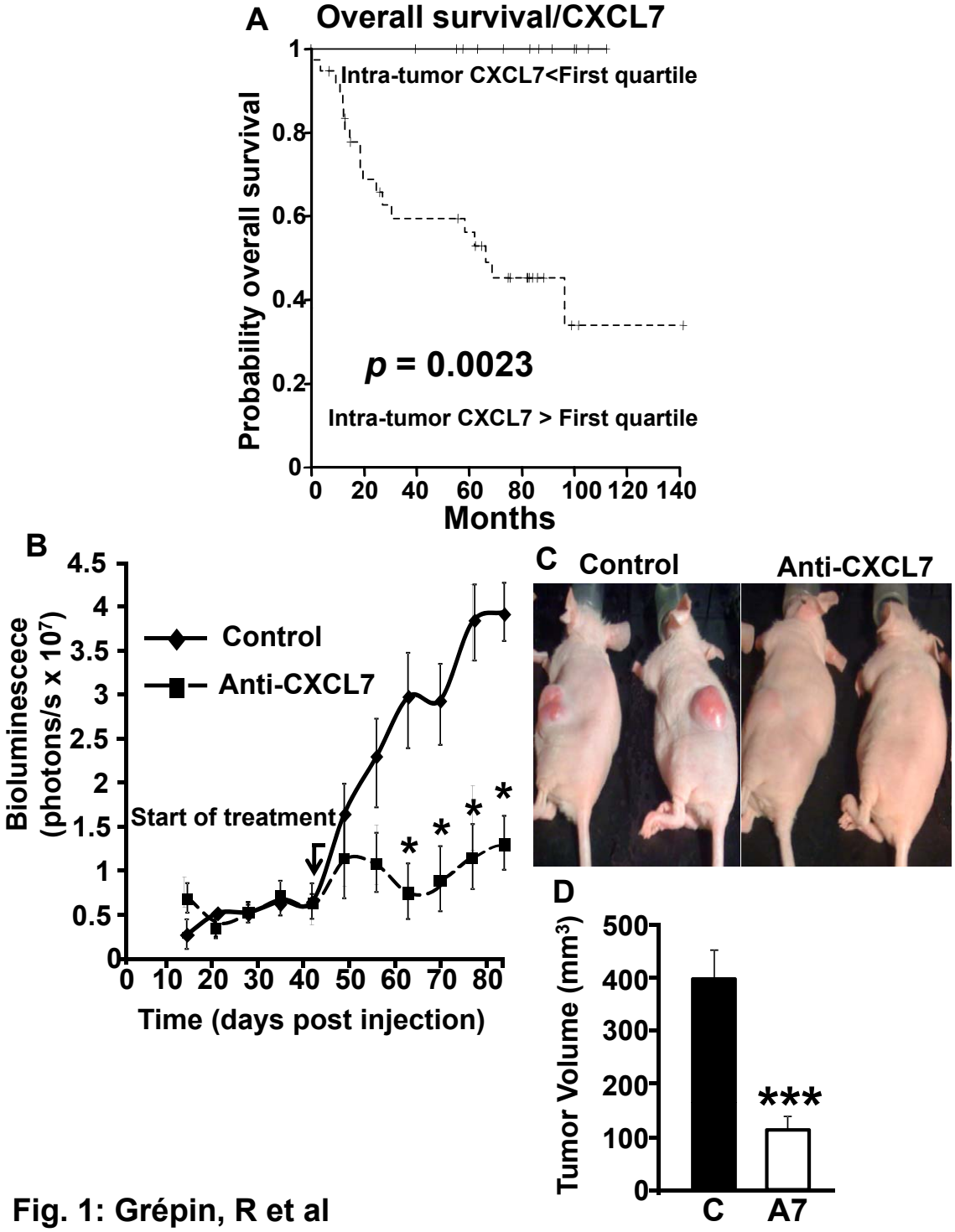


Fig. 1: Grépin, R et al

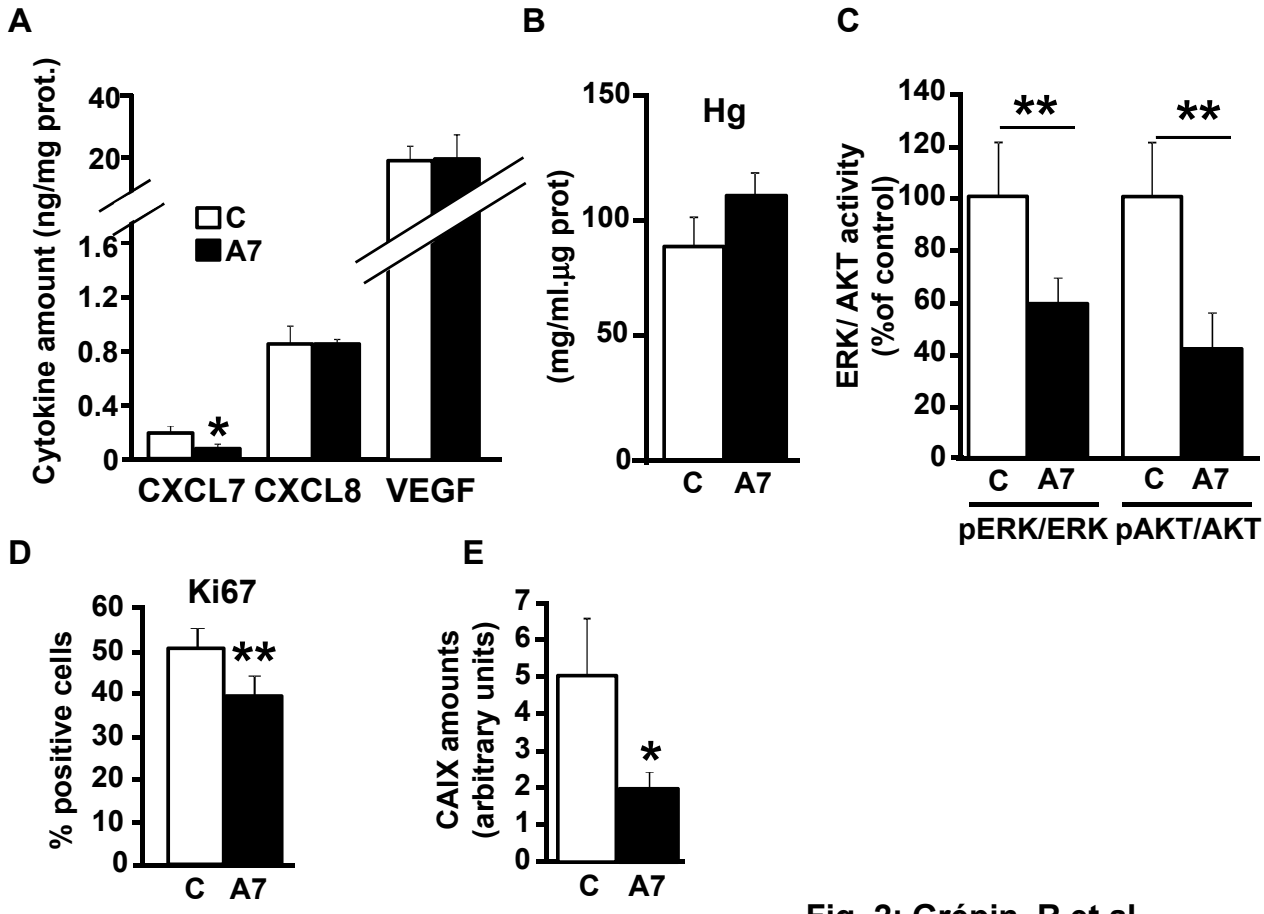


Fig. 2: Grépin, R et al

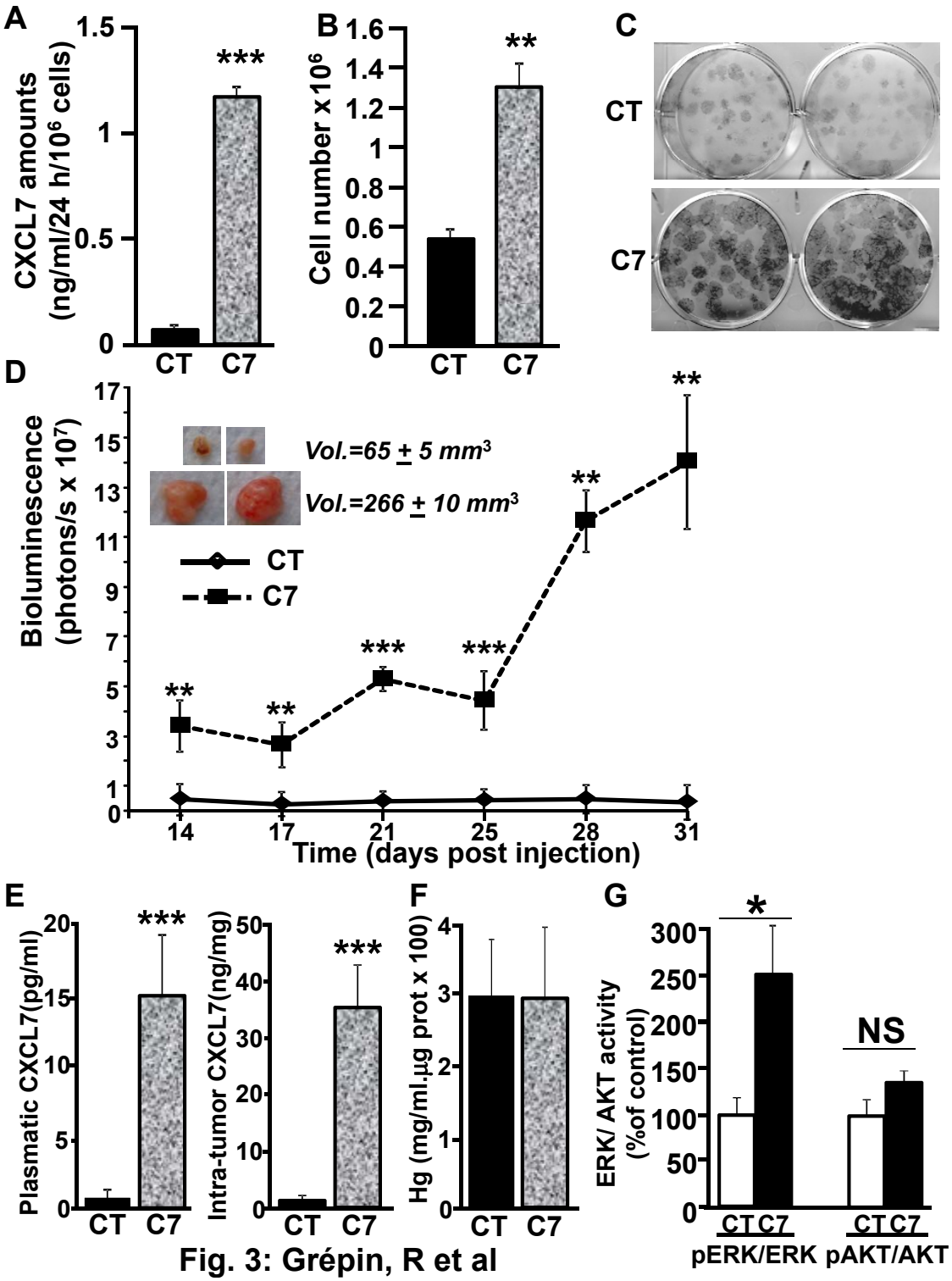


Fig. 3: Grépin, R et al

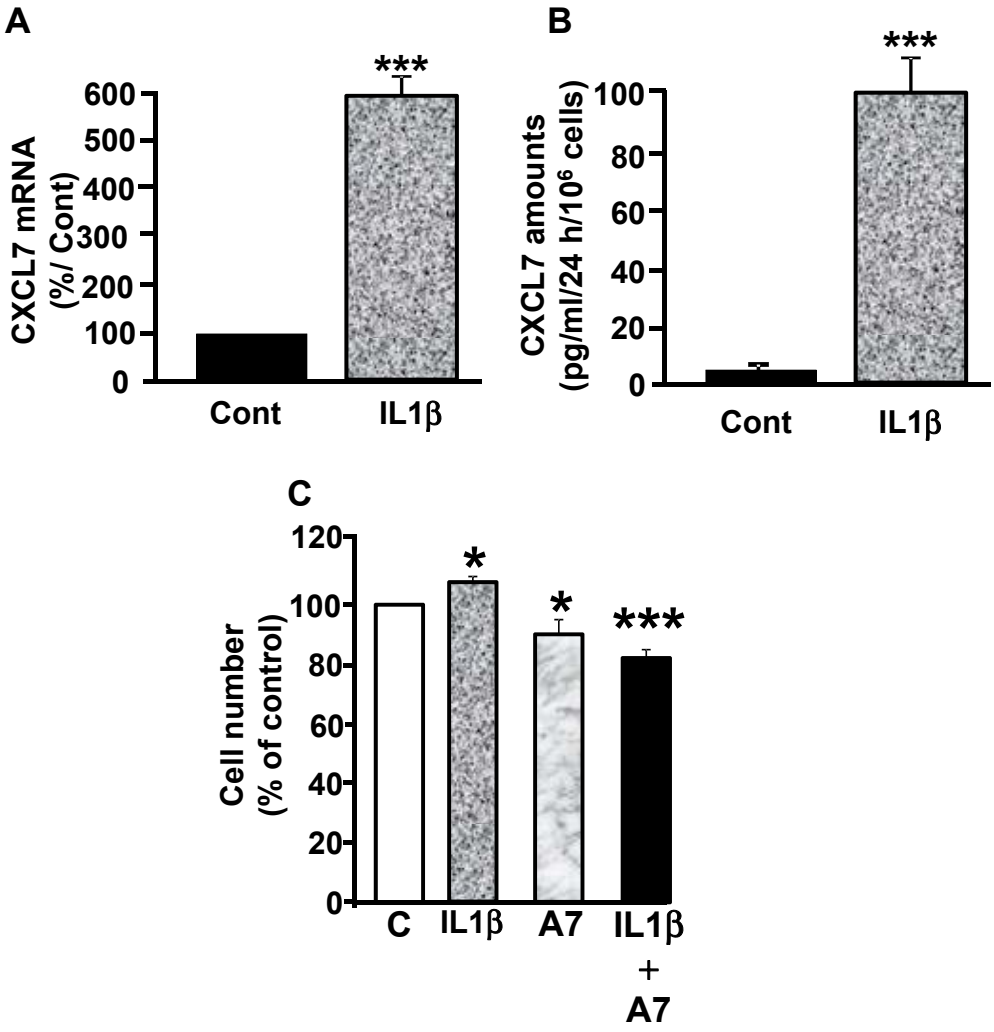


Fig. 4: Grépin, R et al

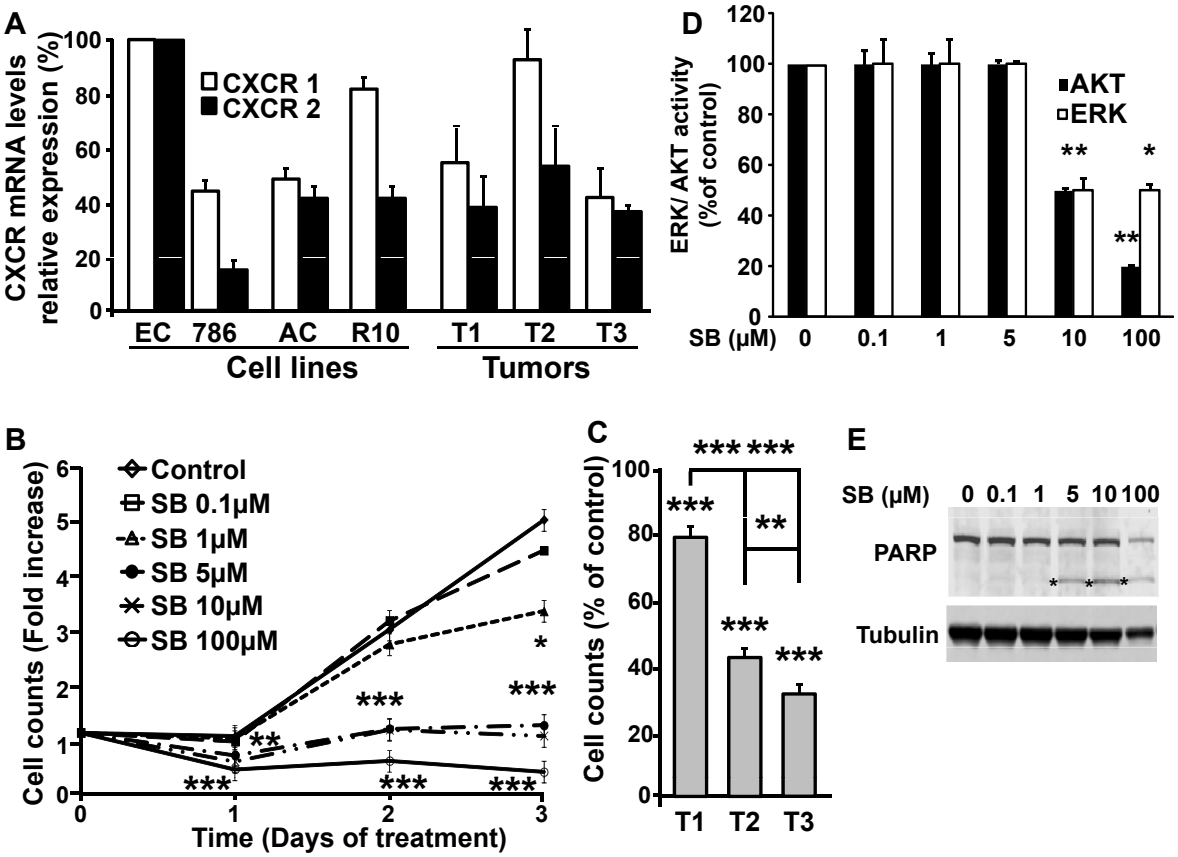


Fig. 5: Grépin, R et al

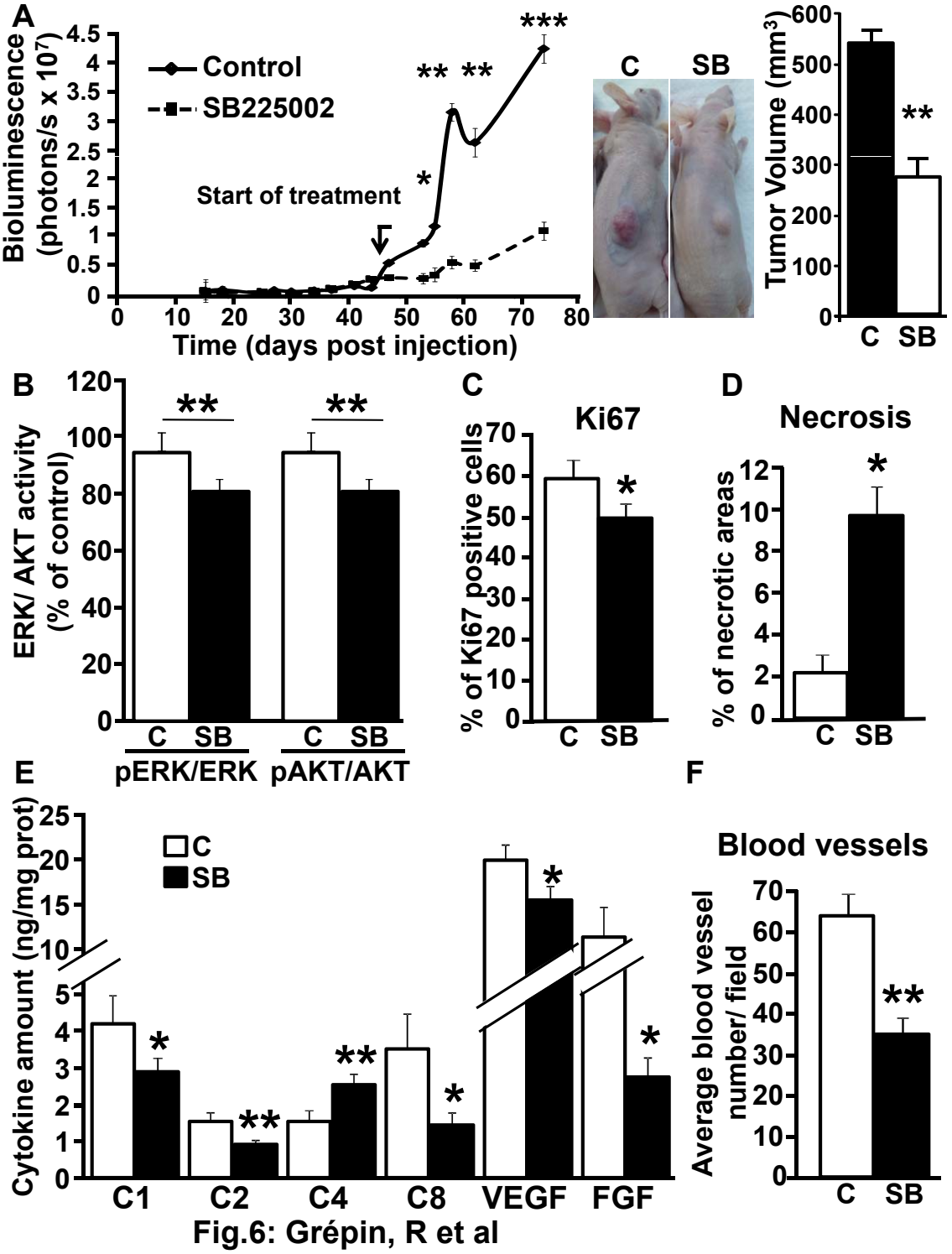


Fig.6: Grépin, R et al

FIGURE LEGENDS

Fig. 1: Kaplan-Meier analysis of overall survival of patients with renal cell carcinoma and role of CXCL7 blockade for 786-O xenograft tumor growth

(A) Correlation of overall survival with baseline levels of CXCL7 (first quartile value 1152 pg/mg protein). Overall survival was calculated from patient subgroups with baseline levels of CXCL7 that were less or greater than the first quartile value.

(B) 3.10^6 786-O^{LUC+} cells were subcutaneously injected into nude mice (n = 7 per group). When the tumor volume was approximately 100 mm^3, mice were treated intra-peritoneally once per week with irrelevant IgG (control) or with 15 mg/kg of the anti-CXCL7 antibodies (anti-CXCL7). Bioluminescence was measured weekly as described previously (4). Results are presented as the mean ± SD. Statistical differences between the size of tumors of control and treated mice are presented: *p<0.05.

(C) Representative images of tumor-bearing mice.

(D) Mean tumor volume ± SD at the end of experiment; *** p< 0.001

Fig. 2: Anti-CXCL7 antibodies decrease the proliferation index and promote tumor necrosis.

(A) Specificity of the anti-CXCL7 (A7) antibodies. Intra-tumor content of CXCL7, CXCL8 and VEGF in tumor extracts of mice treated with A7. Statistical differences are presented: *p<0.05.

(B) The intra-tumoral amount of hemoglobin (Hg) which gives a global read out of the blood supply is not affected by anti-CXCL7 antibodies.

(C) Tumor extracts from control (C) or A7-treated mice were tested for ERK and AKT activities by immunoblotting using antibodies directed against the phosphorylated and non phosphorylated forms of the proteins. The graphs show the ratio of phosphorylated

ERKs or AKT to non phosphorylated ERKs or AKT, respectively. The ERK and AKT activities from tumor extracts of PBS-treated mice were considered as the reference values (100 %). Statistical differences: ** $p<0.01$.

(D) The percentage of Ki67 labeled cells in control and A7-treated tumors is shown. Statistical differences are indicated: **p< 0.01.

(E) CAIX was detected in tumor extracts from control (C) or A7-treated mice by immunoblotting and normalized to the tubulin content. Statistical significance is shown; *$p<0.05$.

Fig. 3: Expression of CXCL7 accelerates tumor growth.

(A) 3.10^5 control 786-O cells (CT) or 786-O cells expressing CXCL7 (C7) were plated at time 0. Secreted CXCL7 during 48 hours was determined by ELISA in the conditioned medium. Results are the mean ± SD of three independent experiments. Statistical significance of the results is shown; *** p <0.001.

(B) 3.10^5 control 786-O cells (CT) or 786-O cells expressing CXCL7 (C7) were plated at time 0. The mean cell counts ± SD after 48 hours of culture was given. Statistical significance of the results is shown; ** p< 0.01.

(C) Clonogenic assay with control 786-O cells (CT) or 786-O cells expressing CXCL7 (C7) following ten days of culture.

(D) 3.10^6 control 786-O^{LUC+} cells (CT) or 3.10^6 786-O^{LUC+} cells expressing CXCL7 (C7) were subcutaneously injected into nude mice (n = 7 per group). Bioluminescence was measured weekly. Data are presented as the mean ± SD. Statistical differences between the size of tumors of control and treated mice are presented: *$p<0.05$; **$p<0.01$.

(E) Intra-tumoral and plasmatic CXCL7 was measured by ELISA test

(F) The intra-tumoral amount of hemoglobin (Hg) that gives a global read out of the blood supply is not affected.

(G) Tumor extracts from control (CT) or tumors overexpressing CXCL7 (C7) were tested for ERK and AKT activities by immunoblotting using antibodies directed against the phosphorylated and non phosphorylated forms of the proteins. The graphs show the ratio of phosphorylated ERKs or AKT to non phosphorylated ERKs or AKT, respectively. The ERK and AKT activities from control tumor extracts were considered as the reference values (100 %). Statistical differences: ** $p<0.01$.

Fig. 4: Interleukin 1 β (IL-1 β) induces CXCL7 expression in 786-O cells

(A) Exponentially growing786-O cells were treated with 10 ng/ml IL-1 β for 24 hours. CXCL7 expression was tested by qPCR.

(B) Exponentially growing 786-O cells were treated with 10 ng/ml IL-1 β for 24 hours. Secreted CXCL7 during 24 hours was determined by ELISA in the conditioned medium. Results are the mean ± SD of three independent experiments. Statistical significance of the results is shown; *** $p<0.001$.

(C) The proliferative capacity of exponentially growing 786-O cells in the presence of 10 ng/ml IL-1β (IL1β), anti-CXCL7 (A7), and IL-1β + anti-CXCL7 antibodies (IL1β+A7) was tested using the MTT assay following 48 hours of treatment. The values obtained for untreated cells were taken as the reference values (100 %). Statistical significances of the results compared to untreated cells are indicated; *$p<0.05$; ***$p < 0.001$.

Fig. 5: Expression of CXCR1 and CRCX2 in ccRCC cells; effects of a pharmacological inhibitor of CXCR1 and CXCR2 (SB225002) on ccRCC cell proliferation

(A) Different ccRCC cell lines were tested for the presence of CXCR1 and CXCR2 mRNA by quantitative PCR in human micro-vascular endothelial (EC), 786-O (786), ACHN, (AC) and RCC10 (R10) cells. The presence of the receptors was also tested in cell lines established from fresh tumors (T1, T2, T3).

(B) The proliferative capacity of 786-O cells in the presence of increasing concentrations of SB225002 was tested using the MTT assay. Data are the mean fold increase ± SD. The fold increase of untreated cells was taken as the reference value for statistics. Statistical significances of the results compared to untreated cells are indicated; *p<0.05; **p <0.01; ***p < 0.001.

(C) The proliferative capacity of cells established from fresh tumors was measured as described above. The percent of inhibition of proliferation using 5 µM SB225002 compared to untreated cells is plotted. **p <0.01; ***p < 0.001.

(D) 786-O cells incubated with the indicated amounts of SB225002 were tested for ERK and AKT activities as indicated above. Statistical differences: * p< 0.05; ** p<0.01.

(E) 786-O cells incubated with varying amounts of SB225002 were tested for the presence of cleaved forms of PARP indicated by an asterisk. Tubulin is shown as a loading control.

Fig. 6: SB225002 inhibits tumor growth by inhibiting cell proliferation, increasing necrosis and decreasing angiogenesis

(A) *Left*: 3.10^6 786-O^{LUC+} cells were subcutaneously injected into nude mice (n = 10 per group). Fifteen days after injection, all mice developed tumors and were treated three times a week with PBS or with 200 µg of SB225002. Bioluminescence was measured weekly as described (4). Data are the mean ± SD. Statistical differences between the

luminescence of tumors of control and treated mice are presented. Statistical significance of the results is shown: *p<0.05; **p<0.01.

Middle: Representative images of the tumor-bearing mice.

Right: Average volume ± SD and statistical analysis: **p< 0.01.

(B) Control (C) and SB225002 (SB)-treated mice tumors were tested for ERK and AKT activity by immunoblotting using antibodies directed against the phosphorylated and non phosphorylated forms of the proteins. The histograms show the ratio of phosphorylated ERKs or AKT to non phosphorylated ERKs or AKT. The ERK and AKT activities in control tumors were considered as the reference values (100 %). Statistical differences are: **p< 0.01.

(C) Ki67 labeling was performed on control and SB225002-treated tumor sections. The percentage of Ki67 labeled cells in control and SB225002-treated tumors was shown. Statistical differences are indicated: **p< 0.01.

(D) Delimitation of necrotic zones was performed after HES staining of tumor slices. The histograms give the ratio of the area of necrotic zones/total area of three independent tumors: *p<0.05.

(E) The presence of pro-angiogenic CXCL1 (C1), CXCL2 (C2), CXCL8 (C8), VEGF and anti-angiogenic CXCL4 (C4) cytokines and fibroblast growth factor (FGF), for stromal cells, was tested by ELISA in tumor extracts of control and SB225002-treated mice tumors . Data are the mean ± SD. Statistical significant differences: *p <0.05; **p <0.01.

(F) The tumor vasculature in the two experimental groups (control, SB225002-treated) was evaluated by immunostaining for CD31. Quantification of the vascular density (number of vessels per field ± SD) resulted from analysis of four independent tumors and at least ten fields for each tumor were examined. Statistically significant difference: **p <0.01.

FIGURES SUPPLEMENTAIRES

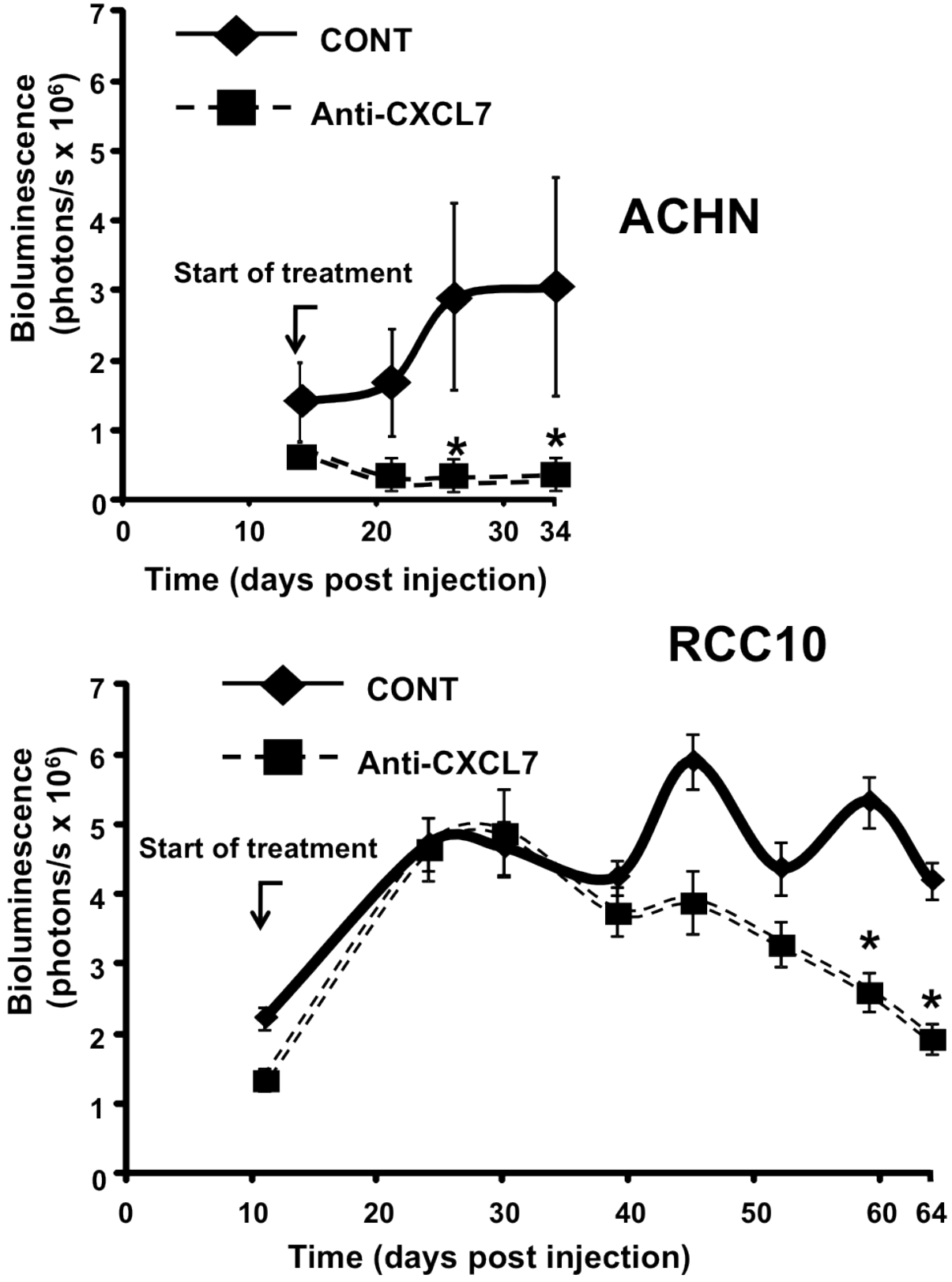


Fig. S1: Grépin, R et al

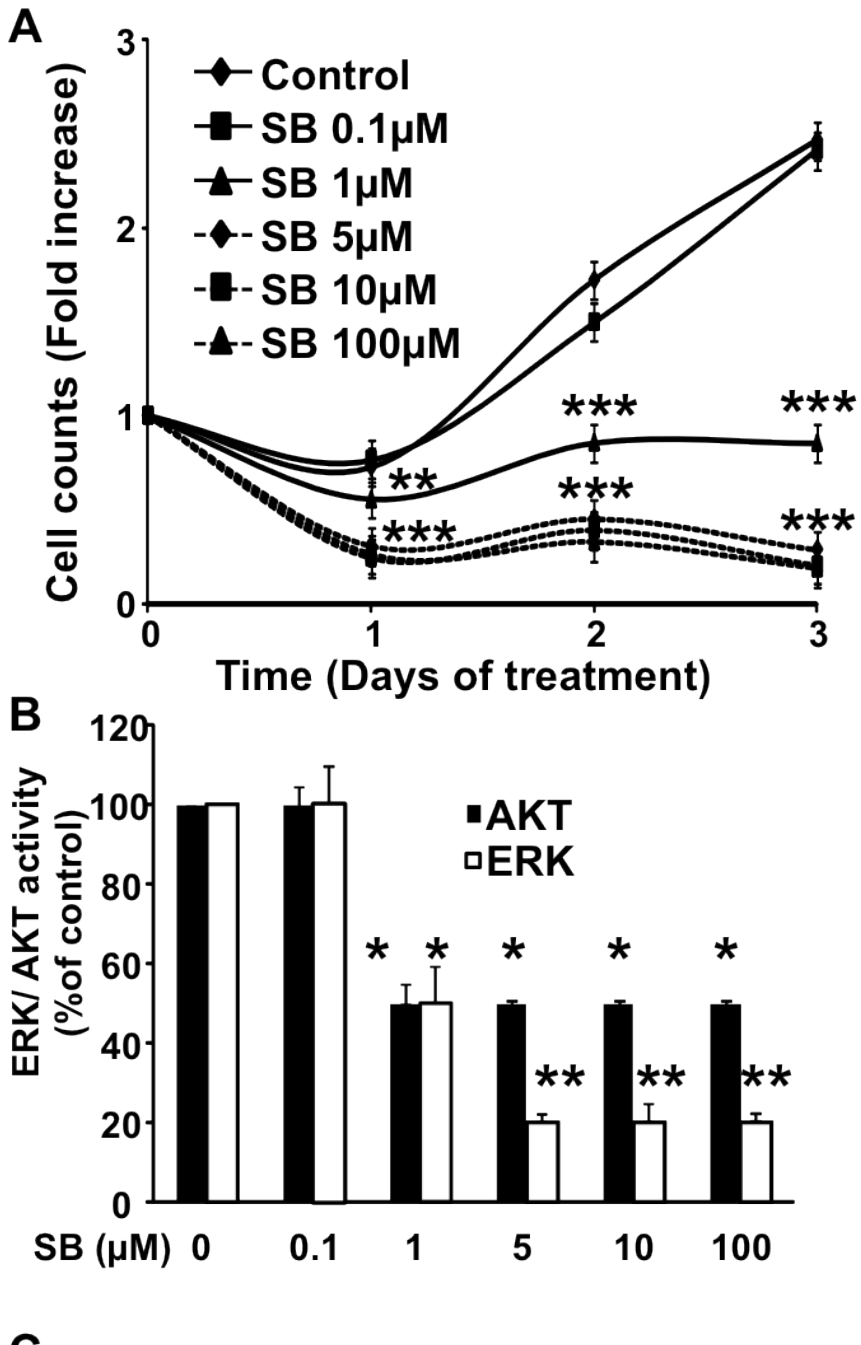


Fig. S2: Grépin, R et al

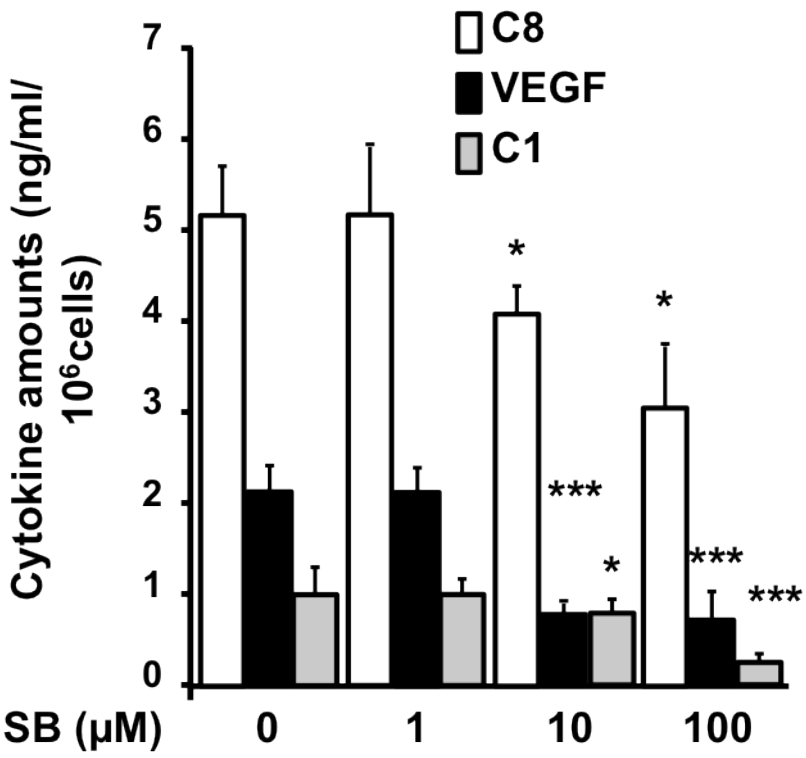


Fig. S3: Grépin, R et al

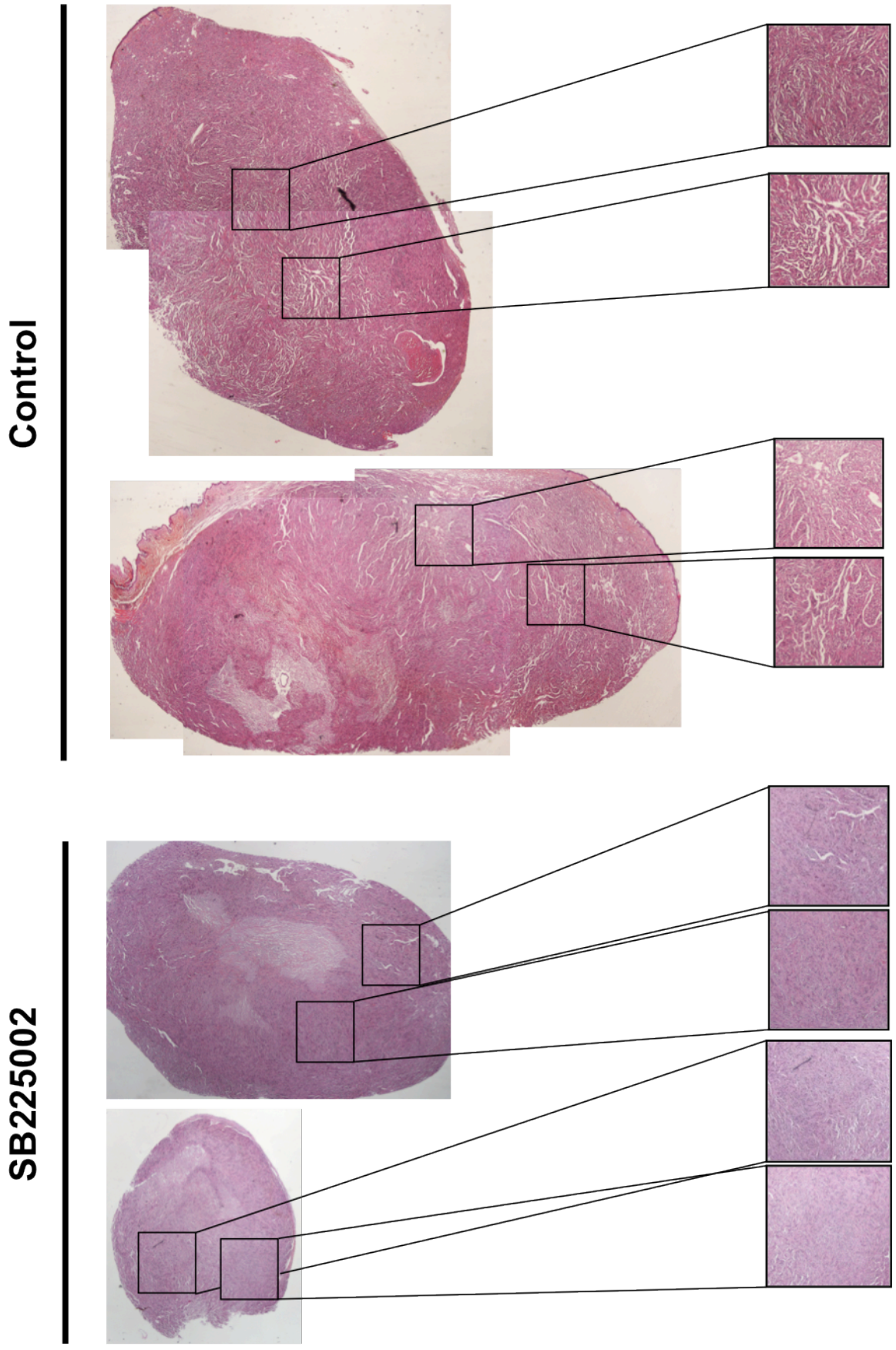


Fig. S4: Grépin, R et al

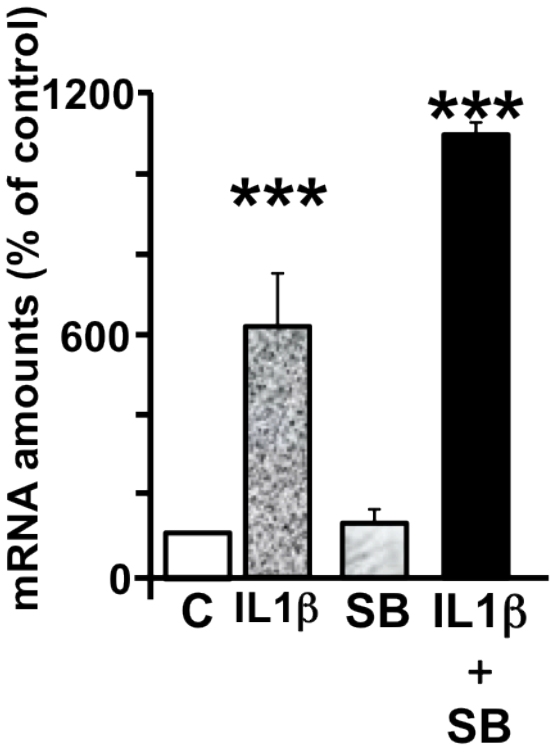


Fig. S5: Grépin, R et al

Table S1: Clinical and biological parameters and univariate analysis of patients

Variable	Description	HR [95%CI]	Log-Rank
Clinical parameters			
Age	Per year	1.03 [0.97-1.1]	0.29
Sex	Male	1	0.33
	Female	0.55 [0.16-1.9]	-
Previous Cancer	No	1	0.61
	Yes	1.50 [0.33-6.4]	-
Metastasis at diagnosis	No	1	$<10^{-3}$
	Yes	6.4 [2.5-17]	-
Fuhrman stage (group)	1/2	1	0.001
	3/4	7.80 [1.8-34]	-
Biological parameters			
VEGF (V-Vb)	Per Unit	1 [0.99-1]	0.26
CXCL7	Per Unit	20.20 [3.12-130.5]	0.0015

Table S2: Clinical and biological parameters and multivariate analysis of patients

Variable	Description	HR [95%CI]	Log-Rank
Clinical parameters			
Metastasis at diagnosis	No	1	0.0005
	Yes	8.09 [2.52-26]	-
Fuhrman stage (group)	1/2	1	0.007
	3/4	7.84 [1.74-35.18]	-
Biological parameters			
CXCL7	Per Unit	8.46 [1.53-46.62]	0.014

LEGENDES DES FIGURES SUPPLEMENTAIRES

Materials and methods

Generation of lentivirus allowing expression of CXCL7

The CXCL7 cDNA of the pSPORT6 plasmid (Invitrogen) was amplified by PCR (oligo forward: 5'-ATGAGCCTCAGACTTGATACC-3; Reverse: 5'-TAATCAGCAGATTCATCACC-3') and cloned into the plenti4/TO/V5 plasmid (Invitrogen) for production of lentivirus. After antibiotic selection with puromycin a total population was obtained.

Fig. S1: CXCL7 antibodies inhibit tumor growth of two other independent models of ccRCC.

(A) 3.10^6 $ACHN^{LUC+}$ cells were subcutaneously injected into nude mice (n = 10 per group). Fifteen days after injection all mice developed tumors and were treated weekly with either PBS (Control) or with 15 mg/kg anti-CXCL7 antibodies. Bioluminescence was measured weekly as described (1). Data are the mean ± SD. Statistical differences between the size of tumors of control and treated mice are presented: *p<0.05.

(B) 3.10^6 $RCC10^{LUC+}$ cells were subcutaneously injected into nude mice (n = 10 per group). Fifteen days after injection all mice developed tumors and were treated weekly with PBS (Control) or with 15 mg/kg anti-CXCL7 antibodies. Bioluminescence was measured weekly as described above. Data are presented as the mean ± SD. Statistical differences between the size of tumors of control and treated mice are presented: *p<0.05.

Fig. S2: SB225002 inhibits proliferation and induces apoptosis of human microvascular endothelial cells (HMVEC)

(A) The proliferative capacity of HMVEC in the presence of increasing concentrations of SB225002 was tested using the MTT assay. Data are the mean fold increase ± SD. The fold increase of untreated cells was taken as the reference values. Statistical significances of the results compared to untreated cells are indicated; ***p < 0.001.

(B) HMVEC incubated with the indicated amounts of SB225002 were tested for ERK and AKT activities by immunoblotting using antibodies directed against the phosphorylated and non phosphorylated forms of the proteins. The graphs show the ratio of

phosphorylated ERKs or AKT to non phosphorylated ERKs or AKT, respectively. The ERK and AKT activities from untreated cells were considered as the reference values (100 %). Statistical differences: Statistical differences: * p< 0.05; ** *p*<0.01.

(C) HMVEC incubated with the indicated amounts of SB225002 were tested for the presence of cleaved forms of PARP indicated by an asterisk. Tubulin is shown as a loading control.

Fig. S3: SB225002 decreased the production of pro-angiogenic CXCL cytokines

The amount of CXCL8 (C8) VEGF and CXCL1 (C1) was evaluated by ELISA in the conditioned medium of cells incubated for 24 hours in the presence of increasing concentrations of SB225002. Data are the mean ± SD. Statistical differences were **p* <0.05; ****p* <0.001.

Fig. S4: SB225002 decreased the number of blood vessels

Sections of tumors from PBS or SB225002 treated mice were labeled with **hematoxylin** and **eosin.** Ten fields per tumor (PBS or SB225002 treated) were analyzed. Representative images are shown. Zones with vessels are enlarged.

Fig. S5: SB225002 increased IL-1β-dependent CXCL7 expression

Exponentially growing786-O cells were treated or not with 10 ng/ml IL-1 β for 24 hours in the presence or absence of SB225002 (5 μM). CXCL7 expression was tested by qPCR. ****p* <0.001.

Reference

1. Grepin R, Guyot M, Jacquin M, Durivault J, Chamorey E, Sudaka A, et al. Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. Oncogene. 2012;31:1683-94.

ARTICLE 3

ARTICLE 3

Specific immunization against the amino-acid sequence corresponding to the pro-angogenesis forms of VEGF strongly decreases tumor development.

Guyot M., Grépin R. and Pagès G.

Article en cours d'écriture

1. Contexte scientifique et objectif

La découverte de l'angiogenèse et le développement des thérapies anti-angiogéniques associées ont révolutionné la prise en charge thérapeutique de nombreux cancers. Pourtant, il reste encore beaucoup d'efforts à réaliser et de connaissances à approfondir pour améliorer les traitements existants ou en développer des nouveaux plus efficaces. Bloquer le VEGF ou ses récepteurs qui est pourtant la voie de signalisation majeure impliquée dans le développement de l'angiogenèse tumorale ne semble pas suffisant. Un niveau de complexité supplémentaire dans la famille du VEGF est apparu récemment avec la découverte des variants anti-angiogéniques du VEGF. Depuis 2002, le VEGF n'est plus restreint à une activité pro-angiogénique. La sous famille de VEGFxxxb possède une activité anti-angiogénique *in vitro* et *in vivo*. Dans notre article publié en 2012, nous avons montré que les niveaux de VEGF165b sont en général diminués dans la tumeur par rapport au tissu sain. Nous avons mis en évidence que dans 20% des ccRCC testés les niveaux de VEGF165b sont élevés par rapport au tissu normal (Grepin et al., 2012). La présence de VEGF165b dans les tumeurs pourrait expliquer au moins en partie pourquoi certains patients ne répondent pas au BVZ ou développent des résistances en cours de traitement. En effet, le VEGF165b se lie au BVZ avec la même affinité que les formes pro-angiogéniques et inhibe l'activité du BVZ dans le traitement du cancer colorectal (Varey et al., 2008). L'expression de ces formes anti-angiogéniques chez les patients pourrait prédire l'échec des thérapies anti-VEGF. Dans ces tumeurs, les niveaux d'expression du VEGF élevés sont corrélés à un taux de survie faible (Bukowski et al., 2007). Les traitements de référence sont des anti-angiogéniques. Ils ciblent le VEGF, ses récepteurs ou des effecteurs en aval. Pourtant, le VEGF n'a pas de valeur prédictive de l'efficacité des anti-angiogéniques dans les RCC (Jubb et Harris, 2010). La présence des formes anti-angiogéniques peut expliquer ce paradoxe. Les outils de détection actuels ne permettent pas de détecter spécifiquement ces deux formes. Le développement

d'anticorps spécifiques des formes pro-angiogéniques est un enjeu de taille. Ce type d'anticorps permettrait de tester si l'expression des formes pro-angiogéniques permet de prédire l'efficacité des traitements anti-angiogéniques chez les patients. Cibler uniquement ces formes de VEGF serait plus pertinent pour limiter l'angiogenèse et la croissance tumorale.

Notre objectif est donc de valider l'efficacité potentielle d'un anticorps spécifique des formes pro-angiogéniques du VEGF dans le traitement des RCC. Pour cela nous avons mis en place deux stratégies distinctes chez la souris.

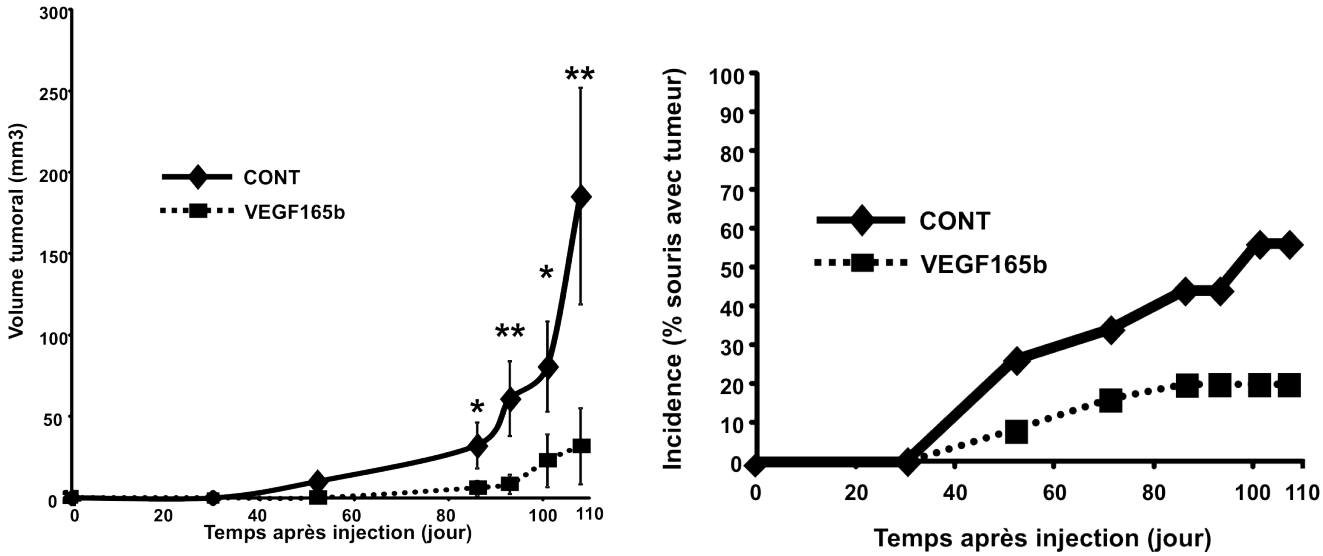
La première est une **stratégie prophylactique**. Cela consiste en une immunisation des souris avec un peptide spécifique du VEGF pro-angiogénique. Cette immunisation permet la production d'anticorps spécifiques de ces formes avant l'injection des cellules tumorales. Cette stratégie nous permettra de savoir si des anticorps spécifiques du VEGF pro-angiogénique limitent la prise et ralentissent la croissance tumorale.

La deuxième est une **stratégie thérapeutique**. Les tumeurs en place chez la souris sont traitées avec des anticorps spécifiques des formes pro-angiogéniques. Cette stratégie nous permettra de valider l'avantage de ces anticorps spécifiques par rapport au BVZ dans le traitement des ccRCC voire d'autres tumeurs pour lesquelles le BVZ montre un effet limité.
Le choix de la vaccination prophylactique se base sur plusieurs articles montrant l'efficacité de ce type de stratégies en thérapie anticancéreuse expérimentale chez la souris. Un article qui a fait sensation à sa publication démontre l'efficacité de ce type de stratégie prophylactique dans le traitement du cancer du sein (Jaini et al., 2010). La cible est l'alpha-lactalbumine, une protéine spécifiquement exprimée durant la lactation et surexprimée dans la majorité des cancers du sein. Une vaccination contre cette protéine permet de développer une protection et un effet thérapeutique dans différents modèles murins de cancers du sein. Cette technique est délicate à mettre en place car les antigènes tumoraux sont souvent des variations de protéines du soi. L'utilisation d'un vaccin contre ces protéines peut entrainer des maladies auto-immunes. Le choix de l'antigène est donc extrêmement important. Celui-ci doit avoir une expression très restreinte chez l'adulte afin de limiter au maximum les problèmes d'auto-immunité. Mais il doit aussi être surexprimé dans les tumeurs ciblées. Le VEGF réuni ces critères et semble constituer un antigène de choix pour un traitement prophylactique des tumeurs fortement angiogéniques. L'immunisation anti-VEGF a montré des résultats intéressants dans le traitement du cancer du colon (Rad et al., 2007), du mélanome (Morera et

al., 2008), du cancer ovarien (Wang et al., 2010) et du cancer du sein (Kaumaya et Foy, 2012). Le mode d'immunisation est très différent d'un article à l'autre mais les résultats sont dans tous les cas très encourageants. Ces résultats nous ont poussés à tester l'efficacité potentielle de cette stratégie dans les ccRCC. L'originalité de notre approche est d'utiliser pour l'immunisation un peptide spécifique du VEGF pro-angiogénique. Nous avons donc choisi le peptide CDKPRR spécifique du VEGFxxx et seule différence avec les isoformes de VEGFxxxb. Dans ces dernières, ce peptide est remplacé par les acides aminés SLTRKD. L'immunisation avec un peptide de 6 acides-aminés ne permet pas la mise en place d'anticorps spécifiques. Pour s'assurer d'une production d'anticorps efficace nous avons utilisé pour l'immunisation la construction suivante: **GST**-CDKPRR**PP**CDKPRR.

2. Résultats

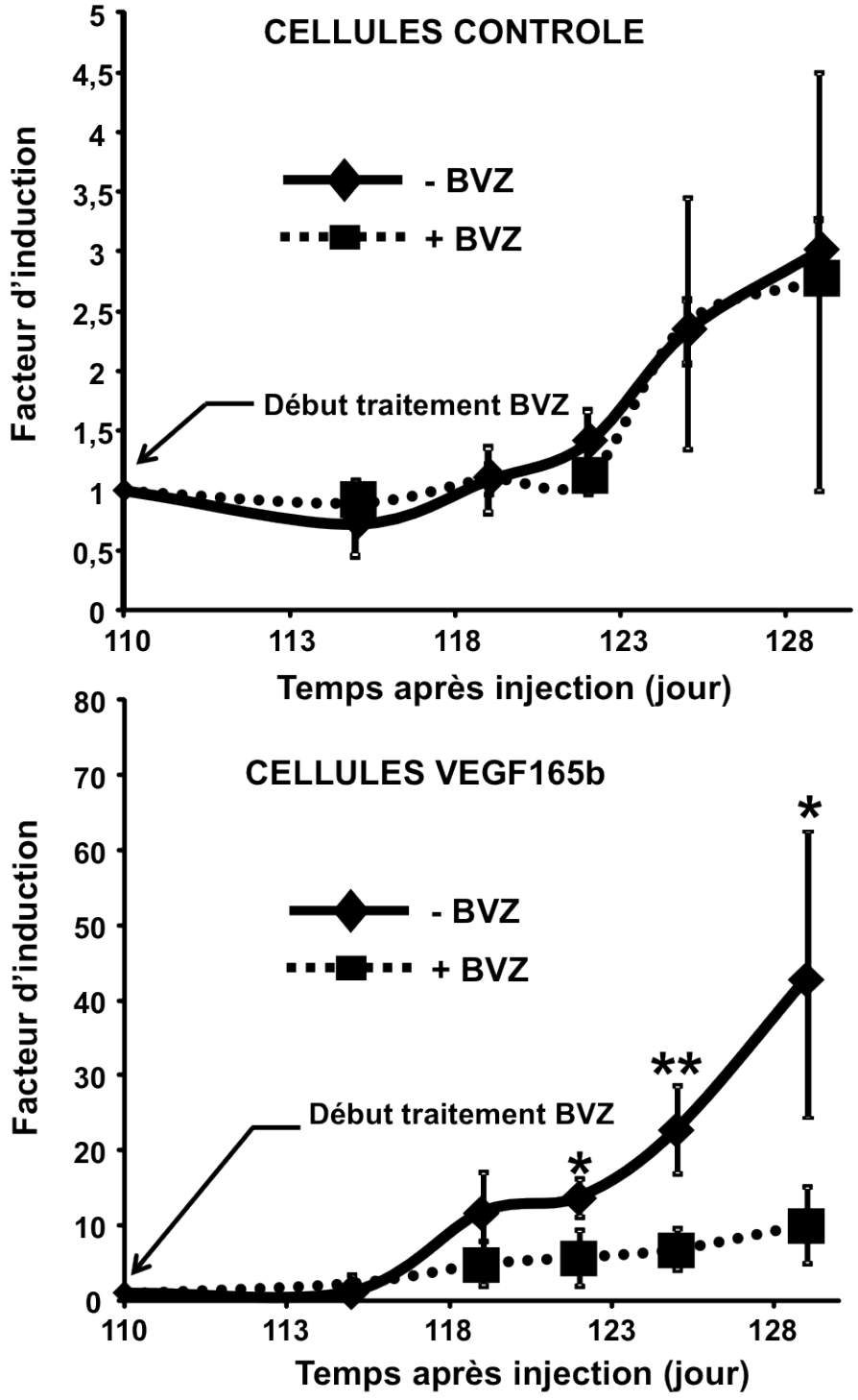
Dans un premier temps, nous avons vérifié la pertinence d'utiliser un anticorps spécifique des formes pro-angiogénique par rapport au BVZ dans le traitement des ccRCC. Nous savons qu'une proportion des patients atteints de ccRCC possède des niveaux intra-tumoraux élevés de VEG165b ce qui pourrait inhiber l'efficacité du BVZ d'après les travaux de Bates et son équipe (Varey et al., 2008). Nous avons généré des cellules 786-O qui sur-expriment de façon inductible le VEGF165b. *In vitro,* ces cellules produisent jusqu'à 15O fois plus de VEGF165b et possèdent des capacités prolifératives identiques à celles des cellules 786-O contrôles dans lesquelles nous ne détectons aucune expression de VEGF165b. Nous avons utilisé ces cellules dans un modèle de xénogreffes et nous avons pu valider que l'incidence et la croissance tumorale de ces cellules sont largement diminuées par rapport à des cellules 786-O contrôles (FIG1). *In vivo,* l'expression du VEGF165b réduit l'agressivité et la capacité des cellules 786-O à former des tumeurs. Un traitement au BVZ, sur ces tumeurs sur-exprimant le VEGF165b, montre des résultats surprenants. Alors qu'aucun effet du BVZ n'est observé sur la croissance des tumeurs contrôle (tailles déjà trop importantes pour voir un effet pro-tumoral du BVZ), le traitement BVZ limite la croissance des tumeurs sur-exprimant le VEGF165b. Comme nous l'avons déjà évoqué, le BVZ reconnaît avec la même affinité les formes pro- et anti-angiogéniques du VEGF. Dans les tumeurs de la prostate, l'expression du VEGF165b inhibe l'activité du BVZ (Varey et al., 2008). Nos résultats suggèrent que dans les ccRCC, l'expression du VEGF165b réduit le développement tumoral et n'empêche pas l'action du BVZ. Au contraire, la présence du VEGF165b potentialise l'action du BVZ. Dans ces tumeurs l'action du BVZ et l'expression du VEGF165b limite la croissance tumorale (FIG2).



a. **b.**

<u>Figure 1</u> : Effet de la sur-expression du VEGF165b sur la tumorigénicité *in vivo* des cellules 786-0

Dans cette expérience, 5 millions de cellules 786-0-CT ou 786-0-VEGF165b sont injectées en sous-cutané dans des souris nude. L'expression du VEGF165b est induite par l'administration de doxicycline dans l'eau de boisson des animaux. La taille des tumeurs (a) et l'incidence tumorale (b) sont évaluées pendant plus de trois mois. La sur-expression du VEGF165b réduit de façon significative le nombre et la taille des tumeurs 786-0.



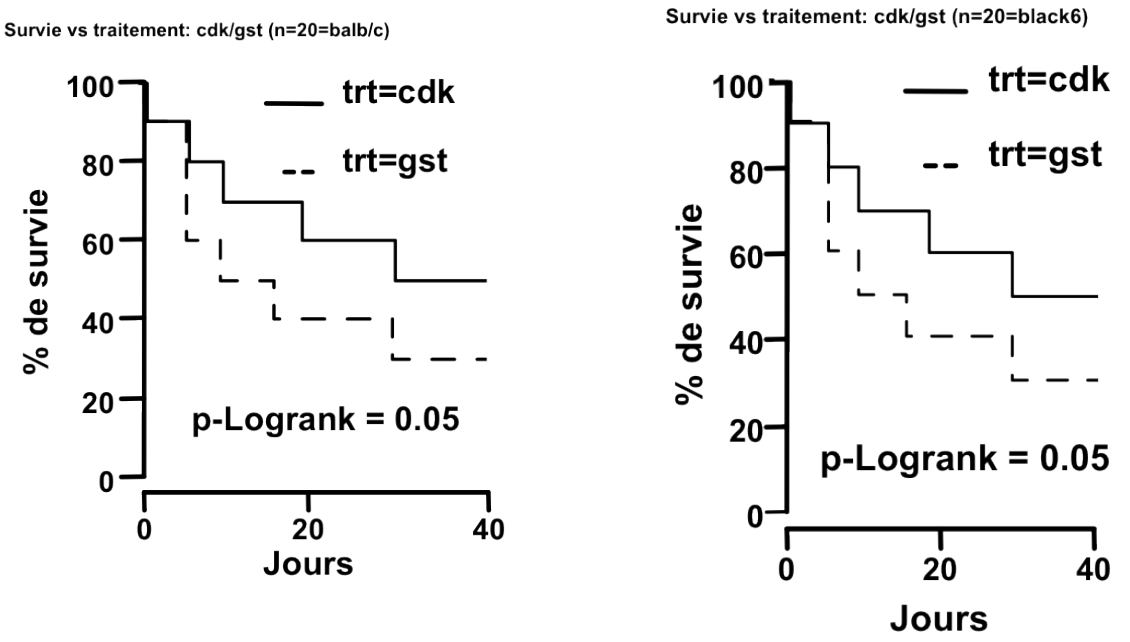
<u>Figure 2</u> : Effet de la sur-expression du VEGF165b sur l'efficacité du traitement BVZ

Les souris décrites dans la figure 1 ont été traitées deux fois par semaine avec du BVZ (150µg par souris **+BVZ**) ou des IgG contrôles **(- BVZ)**. L'évolution de la taille tumorale en fonction du traitement est évaluée chaque semaine pendant trois semaines. Le traitement BVZ n'a aucun effet sur la croissance tumorale des cellules contrôle (en haut) mais il limite de façon significative la croissance des cellules sur-exprimant le VEGF165b (en bas).

L'immunisation prophylactique des souris avec le peptide spécifique du VEGF pro-angiogénique entraine un décalage dans l'apparition des tumeurs par rapport aux souris immunisées avec la GST seule. Nous avons validé l'efficacité de notre immunisation dans deux modèles syngéniques de cancers différents: le mélanome et le cancer du rein, deux types de tumeurs très vascularisées et dont le développement est très dépendant de l'angiogenèse. Dans ces deux modèles, la survie des souris immunisées avec le peptide CDKPRR est significativement augmentée par rapport aux souris immunisées avec la GST seule. En conclusion, une vaccination contre les formes pro-angiogéniques du VEGF réduit efficacement la prise et la croissance tumorale dans des modèles de tumeurs (FIG3).

Nous avons ensuite récupéré les sera des souris immunisées et validé par test ELISA la présence d'anticorps spécifiques du VEGF pro-angiogénique. Nous avons utilisé ces sera purifiés pour traiter des xénogreffes de cellules de ccRCC humaines chez la souris nude. Contrairement aux IgG purifiées des souris immunisées avec la GST et surtout au traitement BVZ, les IgG purifiées à partir de souris immunisées avec GST-CDKPRRPPCDKPRR bloquent significativement la croissance tumorale. Ces résultats valident l'utilisation d'anticorps spécifiques du VEGF pro-angiogénique dans le traitement des ccRCC (FIG4). Nous avons mesuré l'expression de l'ARNm de la phosphatase PTPRκ dans les cellules issues de ces tumeurs. Nous avons confirmé une diminution de 30% de l'expression sous traitement BVZ. De façon intéressante, aucune diminution significative n'a été observée sous traitement CDK. Ces résultats renforcent l'importance potentielle de PTPRκ dans les mécanismes de résistance au BVZ.

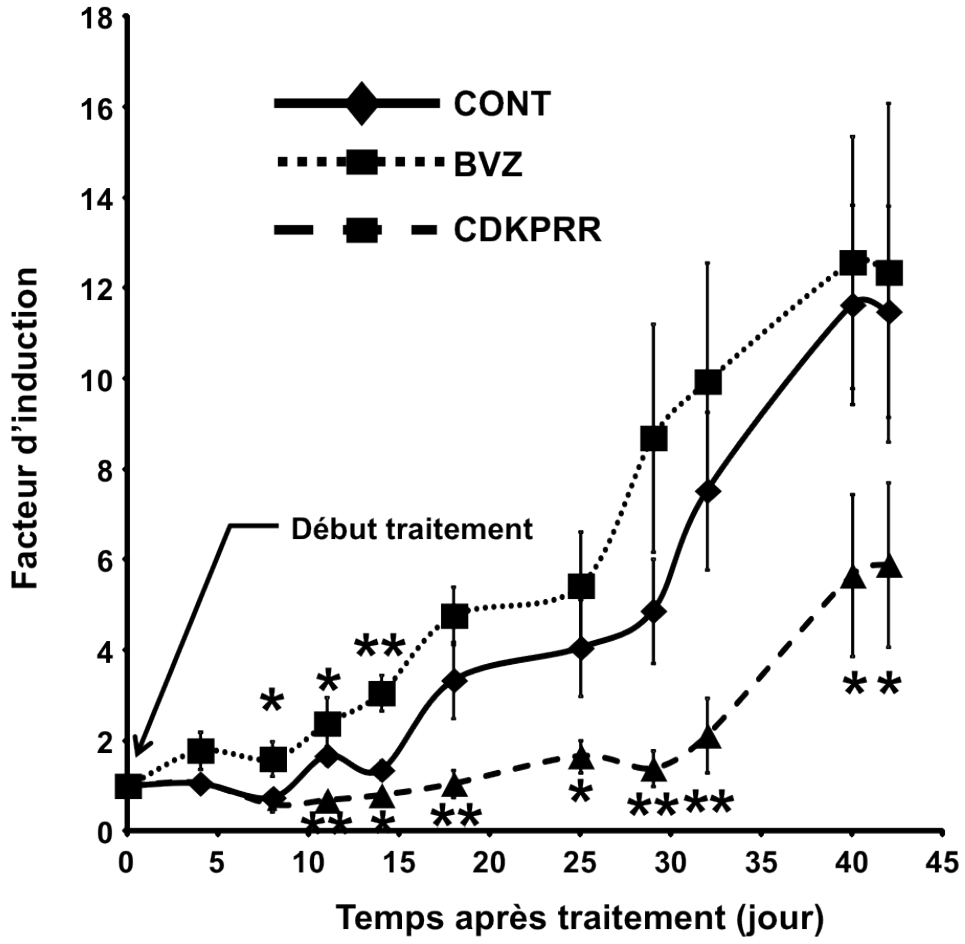
Ces résultats très spectaculaires nous ont encouragés à développer un anticorps monoclonal spécifique des formes pro-angiogénique. Nous avons obtenu un anticorps monoclonal spécifique du VEGF pro-angiogénique. Cet anticorps inhibe la phosphorylation des ERK induite par le VEGF165 dans des cellules endothéliales. Malheureusement, contrairement aux résultats obtenus avec le sérum des souris immunisées, *in vivo* cet anticorps n'apporte aucun avantage par rapport au BVZ (non montré). Le point important à noter est que le plan de traitement diffère entre les deux expériences. Dans la première, le traitement a été administré une semaine après l'injection des cellules tumorales alors que dans la deuxième le traitement a été administré qu'une fois les tumeurs établies c'est à dire plus d'un mois après l'injection des cellules tumorales. Dans notre modèle, l'inhibition du VEGFxxx n'est efficace qu'a un stade précoce du développement tumoral, quand la néovascularisation n'est pas encore établie



a. **b.**

Figure 3 : Comparaison de la survie des souris immunisées GST ou GST-CDKPRR

Dans ces expériences des souris Balb/C **(a)** ou C57/Bl6 **(b)** ont été immunisées par le peptide GST ou GST-CDKPRR toutes les semaines pendant 2 mois avant l'injection des cellules tumorales. Le protocole d'immunisation consiste en une première immunisation en présence d'adjuvant complet de Freund (50µg par souris en intra-péritonéal) suivie d'une deuxième immunisation avec la même de peptide dose en présence d'adjuvant incomplet de Freund puis d'une troisième avec la même dose mais sans adjuvant. Pour les immunisations suivantes (sans adjuvant) la dose est divisée par deux chaque semaine. Une semaine après la dernière immunisation 100000 cellules RENCA **(a)** ou B16 **(b)** sont injectées en sous-cutané. La survie des souris est mesurée toutes les semaines pendant plus d'un mois. Les résultats sont présentés sous la forme d'une analyse de Kaplan-Meier. Dans deux modèles cellulaires indépendants, l'immunisation GST-CDKPRR augmente de façon significative la survie des souris par rapport à une immunisation contrôle GST.



<u>Figure 4</u> : Effet d'un traitement spécifique des formes pro-angiogéniques du VEGF

Le sérum des souris immunisées décrites dans la figure 3, a été récupéré à la fin de l'expérience. Les IgG ont ensuite été purifiés sur protéine G. Ces anticorps purifiés **CONT** (immunisé GST) ou **CDKPRR** (immunisé GST-CDKPRR) ont ensuite été utilisés pour traités des souris nude après injection de 5 millions de cellules 786-O. L'effet des anticorps spécifiques est comparé à celui du **BVZ**. Une mesure du volume tumoral est effectuée toutes les semaines pendant plus d'un mois. L'inhibition spécifique des formes pro-angiogéniques du VEGF limite la croissance tumorale des RCCs.

complètement. Après ce stade, quand la vascularisation tumorale est largement établie, bloquer le VEGF avec le BVZ ou uniquement les formes pro-angiogéniques du VEGF ne permet pas d'inhiber la croissance tumorale. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans le cas d'une immunisation prophylactique. D'après ces résultats, les traitements anti-VEGF limitent la prise et le développement tumoral précoce mais n'ont aucun effet sur la croissance tumorale des RCCs. Dans le traitement des RCCs, les anti-angiogéniques sont donnés exclusivement à des patients présentant une maladie métastatique. Ces résultats pourraient expliquer, au moins en partie, l'efficacité limitée de ces thérapies dans le traitement du cancer du rein.

L'expression des formes anti-angiogéniques de VEGF est importante afin d'évaluer l'efficacité d'un traitement anti-angiogénique. Dans le cancer colorectal, le BVZ prolonge la survie des patients. L'augmentation de la survie sans progression est plus importante chez les patients présentant des niveaux d'expression de VEGF165b faibles (Bates et al., 2012). L'expression du VEGF165b est donc un facteur prédictif de l'efficacité du BVZ dans le traitement du cancer colorectal. Un grand nombre de cellules tumorales sur-expriment le VEGF. Dans ces cellules, il serait intéressant de manipuler l'épissage alternatif ou la stabilité de des isoformes anti-angiogéniques afin de favoriser leur expression par rapport aux formes pro-angiogéniques. Cela permettrait de réduire l'angiogenèse tumorale. Dans des tumeurs très vascularisées comme les ccRCC, réduire l'angiogenèse tumorale permet d'inhiber la croissance tumorale et la formation de métastases.

3. Conclusion et perspectives

L'épissage alternatif des ARNm est un mécanisme moléculaire complexe est extrêmement régulé qui augmente la diversité protéique. A partir d'un même gène et après épissage alternatif plusieurs protéines avec des structures et des fonctions différentes sont générées. Certains nucléotides sont très conservés au début (site donneur d'épissage) et à la fin (site accepteur d'épissage) des introns et entre 20 et 50 bases en amont du site accepteur (le site de branchement). Il existe des séquences consensus pour ces différents domaines plus ou moins conservées. Le spliceosome, le complexe protéique responsable de l'épissage est composé de cinq petites ribonucléoprotéines appelées snRNP (U1-U5) et de deux protéines associées (U2AF et SF1). L'épissage et en particuliers le spliceosome ont un rôle important dans la progression tumorale. Il est considéré comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans les thérapies anticancéreuses (Bonnal et al., 2012). En plus de ces séquences consensus,

des séquences régulatrices de l'ARN pré-messager proches des introns ou des exons modulent l'épissage alternatif. Ces séquences peuvent amplifier (ESE ou ISE pour « Exonic/Introning Splicing Enhancer ») ou limiter (ESS/ISS pour « Exonic/Introning Splicing Silencer ») l'épissage (Fairbrother et al., 2002; Schaal et Maniatis, 1999a, b). La famille des protéines SR est également responsable de la régulation de l'épissage alternatif (Zhong et al., 2009). Ces protéines possèdent également un rôle dans la régulation de l'export nucléaire, de la stabilité et de la qualité des ARNs et de la traduction (Huang et Steitz, 2005). Ces protéines possèdent une structure commune avec des séquences de fixation à l'ARN et un domaine SR riche en sérine et arginine. L'activité de ces protéines est régulée par la phosphorylation sur les résidus sérine. Les kinases ClK, ERK, SRPK1-2 et PKB/AKT phosphorylent les facteurs SR et régulent leur activité (Edmond et al., 2011b; Ghosh et Adams, 2011; Lin et al., 2005; Misteli et al., 1998). Comme le spliceosome, les protéines SR jouent un rôle important dans le développement des cancers et constituent une cible thérapeutique intéressante (Edmond et al., 2011a).

Dans les cellules épithéliales normales, l'épissage du VEGF est régulé par plusieurs facteurs SR. En particuliers, le facteur SF2/ASF favorise les formes pro-angiogéniques. A l'inverse l'expression des isoformes VEGFxxxb est induite par les facteurs SRp40 et SRp55. Le facteur SF2/ASF a un rôle pro-tumoral en favorisant l'angiogenèse tumorale. A l'inverse les facteurs SRp40 et SRp55 ont plutôt un rôle anti-tumoral en limitant l'angiogenèse. L'épissage alternatif est fortement dérégulé dans les cancers. Son rôle dans la production d'oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs a beaucoup été étudié (Klinck et al., 2008; Venables, 2004; Venables et al., 2008). Le facteur SF2/ASF est surexprimé dans plusieurs cancers, en particuliers les cancers du colon, du poumon et du sein et son expression est suffisante pour induire la transformation de cellules normales (Karni et al., 2007). Le facteur d'épissage SF2/ASF est considéré comme un oncogène et une cible thérapeutique potentielle dans les cancers. Dans cette étude, les auteurs décrivent le rôle de SF2/ASF sur la prolifération et l'apoptose mais aucune expérience n'évalue l'influence de ce facteur sur l'angiogenèse. De façon intéressante, l'expression du facteur SRp55 est augmentée dans le cancer du colon et le cancer du poumon. La surexpression de ce facteur dans des cellules épithéliales pulmonaires favorise la prolifération, l'inhibition de l'apoptose et la tumorigenèse *in vivo*. A l'inverse l'inhibition de SRp55 dans les cellules de cancers du colon et du poumon réduit le développement tumoral. Ces résultats suggèrent que dans les tumeurs du colon et du poumon le facteur SRp55 est considéré comme un oncogène. Dans ces tumeurs, inhiber l'expression

de SRp55 pourrait limiter le développement tumoral (Cohen-Eliav et al., 2013). Cette étude démontre la complexité de la régulation de l'épissage alternatif. Les mêmes facteurs SR pouvant avoir une action pro- ou anti-tumorale en fonction du type de tumeur. Très peu d'études décrivent la régulation de l'épissage VEGFxxx vs VEGFxxxb dans les cellules tumorales. Dans un modèle de cancer du poumon, le facteur d'épissage SC35 et le facteur de transcription E2F1 régulent l'expression du ratio VEGFxxx/VEGFxxxb. Ces facteurs limitent la néo-angiogenèse tumorale. Ils sont importants pour la croissance tumorale et la réponse aux traitements anti-angiogéniques (Merdzhanova et al., 2010). Dans une étude portant sur les tumeurs de Wilms' les auteurs démontrent un lien étroit entre l'inhibition du gène WT1 et l'angiogenèse tumorale. WT1 inhibe l'expression de la kinase SRPK1. Cette kinase phosphoryle le facteur SF2/ASF et favorise son activité. Dans les tumeurs de Wilms' la mutation du gène WT1 favorise l'activité de la kinase SRPK1. Le facteur SF2/ASF est donc phosphorylé et actif. Il augmente l'expression du VEGFxxx au détriment du VEGFxxxb et favorise un phénotype pro-angiogénique. La restauration d'un gène WT1 sauvage, l'inhibition de SRPK1 ou SF2/ASF prévient l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* et limite la croissance tumorale (Amin et al., 2011). Dans les ccRCC, l'expression de plusieurs facteurs régulant l'épissage alternatif est dérégulée par rapport au tissu normal. L'expression pouvant être augmentée ou diminuée selon les cas. Cette modification d'expression perturbe l'épissage alternatif de plusieurs gènes impliqués dans la régulation de la prolifération et de l'apoptose. Cette altération peut être directement corrélée à la progression tumorale. Encore une fois, l'influence sur l'expression du VEGF et sur l'angiogenèse tumorale n'a pas été étudiée (Piekielko-Witkowska et al., 2010). Les changements d'expression des facteurs SR ou autres facteurs régulant l'épissage alternatif peuvent constituer un marqueur tumoral. Ces facteurs sont des cibles thérapeutiques potentielles dans les ccRCC. L'inhibition de facteurs d'épissage a été testée avec succès dans les cellules cancéreuses. Cette inhibition entraine l'apoptose dans les cellules tumorales mais pas dans les cellules normales (Patry et al., 2003). Nous disposons au laboratoire de différentes lignées de ccRCC d'agressivité croissante. Dans ces lignées, l'expression d'SF2/ASF est corrélée avec l'agressivité des cellules. L'expression d'SF2/ASF est plus faible dans les cellules RCC4 que dans les cellules 786-O et RCC10. Les deux dernières lignées forment des tumeurs chez la souris alors que les cellules RCC4 qui sont moins agressives n'en forment pas. Le facteur SF2/ASF peut être considéré comme un marqueur d'agressivité dans les ccRCC. De plus, nous avons à notre disposition une cohorte de patients atteints de ccRCC. Dans la plupart des cas les niveaux d'expression de SF2/ASF sont augmentés dans la partie tumorale par rapport au tissu normal adjacent (FIG5).

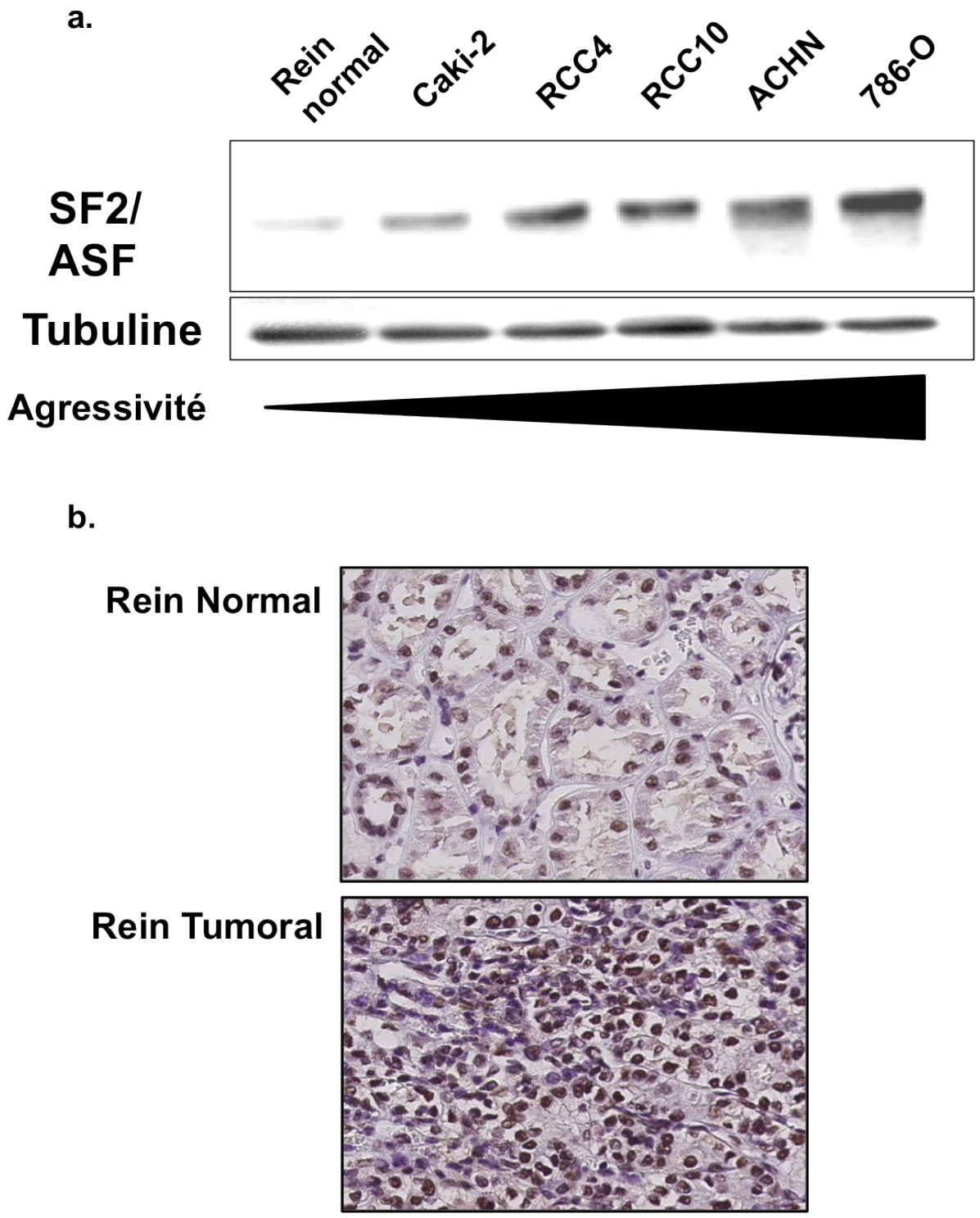


Figure 5 : L'expression du facteur SF2/ASF est corrélée avec l'agressivité tumorale

a. Western Blot montrant l'augmentation de l'expression du facteur d'épissage SF2/ASF en fonction de l'augmentation de l'agressivité des cellules tumorales humaines de RCC. **b.** Immunohistochimie sur des coupes de tissu humain montrant l'augmentation de l'expression du facteur d'épissage SF2/ASF dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain.

Ces résultats suggèrent l'utilisation potentielle du facteur d'épissage SF2/ASF comme bio-marqueur tumoral dans les ccRCC. Pour l'instant, nous n'avons pas pu valider dans les ccRCC le lien entre l'expression d'SF2/ASF et l'épissage du VEGF. Nous avons mis en évidence, dans les cellules 786-O, qu'SF2/ASF se fixe sur la séquence du VEGF. En particuliers, il interagit au niveau d'une séquence de 44 bases de l'ARNm du VEGF.

Cette séquence spécifique des formes pro-angiogéniques régule la stabilité de l'ARNm VEGF (FIG6). Dans des cellules normales, l'ARNm du VEGFxxxb est plus stable que l'ARNm du VEGFxxx. Cette séquence de 44 bases induit l'instabilité du VEGFxxx dans les cellules normales. Ces résultats suggèrent que le facteur d'épissage SF2/ASF pourrait réguler la stabilité de l'ARNm du VEGF. Ce facteur d'épissage régule la stabilité de l'ARNm de PKCl-1. Cette protéine est capable d'interagir avec la protéine kinase C. Ces résultats suggèrent que le facteur SF2/ASF et peut être d'autres facteurs SR régulent l'expression de différents gènes chez les vertébrés en agissant sur l'épissage mais également la stabilité des ARNm (Lemaire et al., 2002). Un des objectifs du laboratoire est d'étudier ce nouveau rôle des facteurs SR et surtout d'SF2/ASF dans la régulation de la stabilité de l'ARNm du VEGF dans les cellules tumorales de ccRCC. Le rôle d'SF2/ASF est avant tout de réguler l'épissage alternatif. Pourtant dans les cellules de ccRCC, l'utilisation d'un shRNA spécifique d'SF2/ASF ou la surexpression de SRp55 ou de SC35 ne modifie pas l'épissage alternatif du VEGF en faveur du VEGFxxxb. Dans ces cellules, modifier l'expression de ces facteurs SR ne semble pas moduler le ratio VEGFxxx/VEGFxxxb. Plusieurs hypothèses expliquant ces résultats sont à considérer. Dans les ccRCC, les facteurs impliqués sont différents. Les conditions d'inhibition et de surexpression ne sont pas optimales et ne nous permettent pas de visualiser des modifications de l'expression des formes de VEGF. Le facteur SF2/ASF est fortement exprimé dans les ccRCC. Un des objectifs de l'équipe est de valider le rôle de ce facteur dans la régulation du ratio VEGFxxx/VEGFxxxb dans les ccRCC. Si SF2/ASF augmente l'expression des formes pro-angiogéniques et régule le ratio VEGFxxx/VEGFxxxb, son inhibition pourrait constituer une nouvelle approche thérapeutique dans le traitement des ccRCC. Cette approche visant à manipuler l'épissage du VEGF semble prometteuse pour moduler l'angiogenèse et limiter la croissance tumorale (Rennel et al., 2009). Nous avons obtenu au laboratoire des cellules 786-O dont l'inhibition de l'expression de SF2/ASF est inductible à la doxicycline. Dans un modèle *in vivo,* ces cellules devraient nous permettre de valider le rôle du facteur SF2/ASF dans la croissance tumorale des ccRCC et d'évaluer l'impact de cette inhibition sur l'angiogenèse tumorale. Comme nous venons de le décrire, il

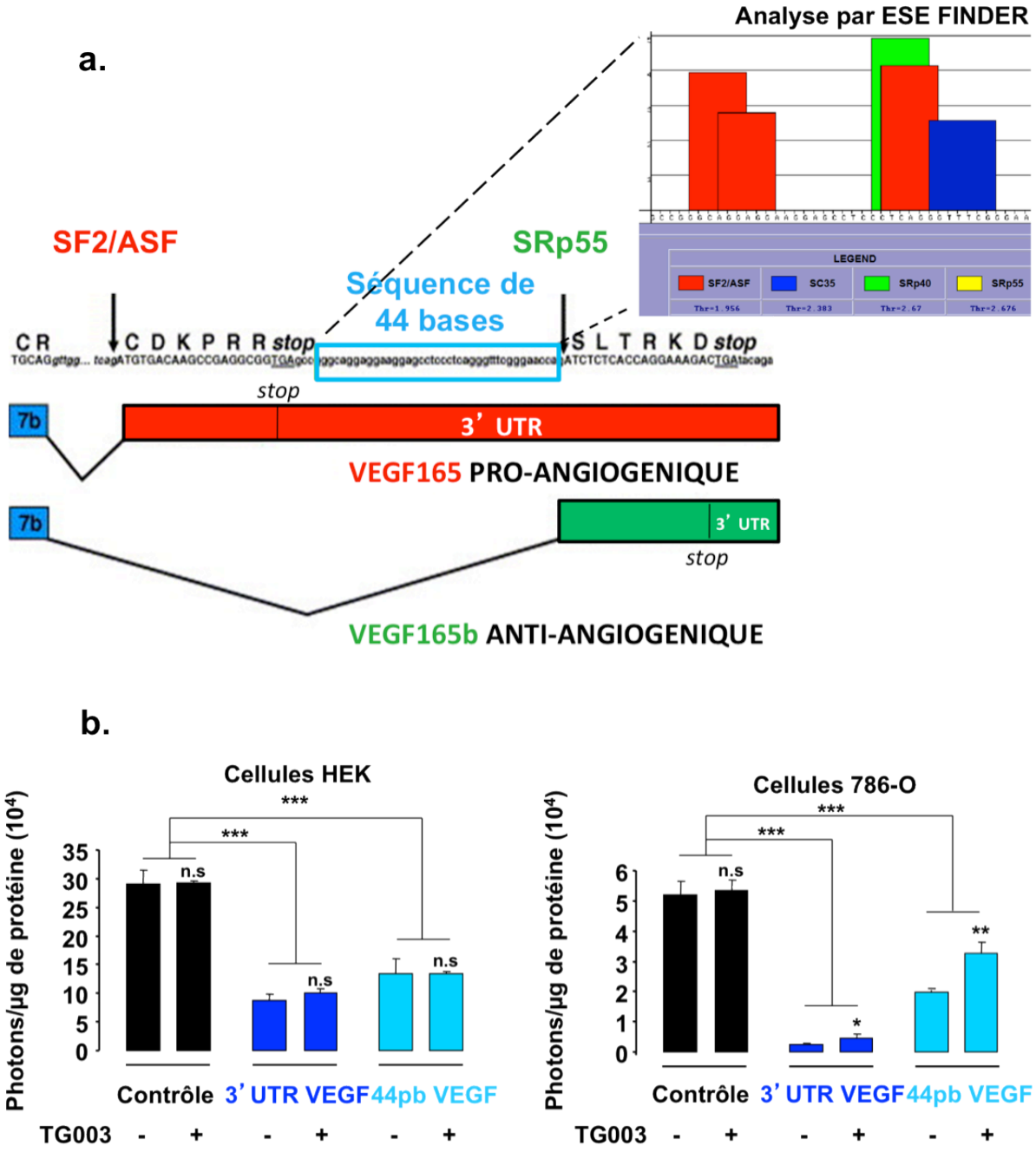


Figure 6 : La séquence de 44 bases spécifique du VEGFxxx régule la stabilité du VEGF

a. Représentation schématique de la séquence de 44 bases présente dans l'ARNm du VEGF165 mais se retrouvant dans le 3'UTR du VEGF165b. D'après le logiciel informatique ESE Finder les facteurs SRp55 et SF2/ASF peuvent se fixer sur cette séquence. **b.** Essais luciférase comparant l'effet du 3'UTR complet et de cette séquence de 44 bases sur la stabilité de la luciférase. Cette séquence de 44 bases déstabilise la luciférase dans les cellules normales et cancéreuses. Dans les cellules tumorales, un traitement au TG003 capable d'inhiber l'activité du facteur SF2/ASF inhibe partiellement l'effet déstabilisateur de la séquence de 44 bases.

existe des séquences consensus au sein de l'ARNm permettant la régulation de l'épissage alternatif. L'analyse de ces séquences au niveau des exons 8a et 8b du gène du VEGF suggère que l'épissage aboutissant à la formation des isoformes VEGFxxx est largement plus favorable que celui permettant l'expression des isoformes VEGFxxxb. Le site accepteur d'épissage est consensus à plus de 90% devant l'exon 8a alors qu'il l'est à moins de 30% devant l'exon 8b.
Ces observations suggèrent que d'un point de vue structural, l'expression du VEGFxxx est plus favorable que celle du VEGFxxxb.

Un des objectifs du laboratoire est de confirmer cette hypothèse en modifiant ces séquences régulatrices en amont des deux exons. Ces modifications devraient permettre d'inverser le ratio VEGFxxx/VEGFxxxb et de favoriser l'expression des formes anti-angiogéniques. Enfin, une dernière approche utilisée au laboratoire pour réguler le ratio VEGFxxx/VEGFxxxb est la technologie des TALEN. Par l'utilisation des TALEN générés par la société Cellectis, nous forçons les cellules à n'exprimer que le VEGFxxxb. Cette approche est la seule actuellement disponible pour forcer l'expression de VEGFxxxb dans des cellules tumorales de ccRCC en absence de toutes autres formes de VEGF. L'angiogenèse tumorale dans les ccRCC est dépendante du VEGF. *In vivo*, ces cellules devraient avoir une agressivité réduite par rapport aux cellules 786-O contrôles. Cette diminution d'agressivité devrait être associée à une diminution de l'angiogenèse tumorale. Cela nous permettrait de valider définitivement le rôle de la balance VEGFxxx/VEGFxxxb dans le développement des ccRCC. Ces cellules nous permettraient également de confirmer les travaux de Bates sur l'influence de l'expression des formes de VEGFxxxb sur l'efficacité des thérapies anti-angiogénique sur un autre modèle tumoral.

DISCUSSION GENERALE

DISCUSSION GENERALE

De l'amélioration des traitements anti-angiogéniques…

… Vers une thérapie personnalisée !!!

D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, le cancer est aujourd'hui la première cause de mortalité en France et dans le monde. En 2008, cela représentait 12,7 millions de personnes diagnostiquées et 7,6 millions de décès. D'après une étude publiée en 2012 dans la revue « The Lancet Oncology », l'incidence des cancers devrait augmenter de 75% d'ici à 2030 et de plus de 90% dans les pays les plus pauvres (Bray et al., 2012). Un des enjeux majeurs est d'améliorer les traitements et la prise en charge thérapeutique des patients. Beaucoup de traitements n'ont que des effets limités sur la survie avec souvent des effets secondaires très importants. L'apparition des thérapies ciblées a révolutionné le traitement des cancers mais avec elles, comme dans le cas des thérapies conventionnelles, sont apparus les problèmes de résistances aux traitements.

Déjà, 40 ans que Judah Folkman a introduit le concept des traitements anti-angiogéniques dans les cancers. Aujourd'hui, ces molécules sont considérées comme un des traitements anti-cancéreux de référence. Différentes molécules sont utilisées dans un grand nombre de cancers. La plupart de ces molécules ciblent le VEGF ou sa voie de signalisation. Plus d'une centaine d'études cliniques sont en cours pour évaluer l'efficacité de douzaines de nouvelles molécules anti-angiogéniques ciblant ou non le VEGF. Comme pour les autres thérapies ciblées, l'apparition de résistances est un frein à l'efficacité de ces molécules et réduit considérablement l'espérance de vie espérée des patients. Malheureusement pour ces traitements très peu de marqueurs prédictifs d'efficacité sont disponibles et utilisables en clinique pour choisir les patients les plus répondeurs, anticiper les éventuelles résistances et adapter rapidement les traitements. L'enjeu majeur est de comprendre pourquoi la majorité des patients arrêtent de répondre en cours de traitement ou sont réfractaires dès le départ et comment peut-on contrebalancer ces limitations. Beaucoup de mécanismes pouvant expliquer ces résistances sont évoqués et mettent en avant que malgré 20 ans d'essais cliniques très prometteurs, le bénéfice clinique des traitements anti-angiogéniques reste très limité. Même si la majorité des patients progresse sous traitement il faut noté que certains patients sont très répondeurs aux thérapies anti-angiogéniques. Des cas de réponse complète au traitement et de

rémission de la maladie sont observés (Cella et al., 2008; Chowdhury et al., 2013; Kedhi et al., 2010; Mesters et al., 2001. Même si la survie globale n'est pas toujours augmentée, dans certains cas, la qualité de vie des patients est considérablement augmentée ce qui n'est pas négligeable en cancérologie (Nagpal et al., 2011; Nielsen et al., 2010; Syrios et al., 2013).

Un enjeu de taille : la mise en évidence de marqueurs prédictifs d'efficacité

Malgré un grand nombre de molécules anti-angiogéniques disponibles pour le traitement des ccRCCs, l'amélioration de la durée de vie des patients traités est très faible. Pourtant, l'apport des anti-angiogéniques dans ces cancers n'est pas négligeable car très peu d'autres alternatives thérapeutiques sont efficaces. L'enjeu actuel est donc de comprendre pourquoi certains patients progressent sous traitement et pourquoi d'autres sont réfractaires aux anti-angiogéniques dès le début du traitement. La priorité actuellement est de définir des marqueurs prédictifs d'efficacité afin d'optimiser la prise en charge des patients.

L'ensemble de notre travail nous permet d'envisager de nouveaux marqueurs prédictifs d'efficacité et de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans le traitement du cancer du rein. Même si ce type de cancers ne représente que 2% de l'ensemble des cancers l'enjeu est de taille car la prise en charge thérapeutique des patients est très limitée. Ces tumeurs sont résistantes à la radiothérapie et aux principales chimiothérapies. Les traitements anti-angiogéniques ont considérablement amélioré la prise en charge thérapeutique des patients. Cependant le rapport bénéfices/risques de ces traitements est très faible. Ils augmentent la survie sans progression de quelques mois mais souvent n'augmentent pas la survie globale des patients et les effets secondaires sont importants. Enfin, certains patients sont réfractaires au traitement dès le départ. Pour les patients sensibles, une phase de réponse objective est observée mais très souvent suivie par l'apparition de résistances. Notre modèle mimant cette phase d'échappement tumoral nous permet d'étudier les mécanismes mis en place lors de cette résistance. C'est un outil de choix pour identifier les altérations pouvant survenir sous traitement et favoriser l'apparition des résistances. Nous avons mis en évidence différentes altérations, au sein de la tumeur et du microenvironnement tumoral, sous traitement BVZ. Selon moi, les résultats les plus prometteurs et pouvant expliquer les résistances observées en clinique sous traitement BVZ sont :

1. L'augmentation de l'expression de plusieurs cytokines CXC pro-angiogéniques dont CXCL7 et CXCL8
2. L'augmentation de la lymphangiogenèse tumorale via la surexpression du VEGF-C
3. L'activation de voies de signalisation alternatives impliquées dans la survie, la prolifération et la migration cellulaire via l'inhibition de la phosphatase membranaire, PTPRκ

Ces résultats nous permettent de proposer de nouveaux marqueurs qui pourraient potentiellement prédire l'efficacité du traitement BVZ et d'anticiper sur l'apparition des résistances dans les ccRCCs. Par exemple, il serait envisageable de mesurer les taux plasmatiques des cytokines CXCL7, CXCL8 et du VEGF-C avant traitement et en cours de traitement. Tester l'expression de PTPRκ et l'activation des voies de signalisation en aval (EGFR ou MET) dans les cellules tumorales circulantes permettrait d'optimiser les traitements. Ces mesures dont la simplicité et la rapidité de mise en œuvre doivent être évaluées, permettraient de déterminer la réponse des patients au BVZ et d'adapter rapidement les traitements en fonction des résultats obtenus. Il reste maintenant à valider cliniquement l'utilisation des ces molécules en tant que marqueurs prédictifs voire comme cibles thérapeutiques dans le traitement des ccRCC. Le manque d'efficacité du BVZ fait que son utilisation dans les ccRCC est progressivement abandonnée au profit du sunitinib qui est maintenant le traitement de référence. La facilité d'administration et le cout ont évidemment été pris en compte (hospitalisation en hôpital de jour et perfusion pour le BVZ versus traitement per os pour le sunitinib). Ces marqueurs prédictifs de réponse permettraient de relancer le traitement BVZ pour des patients hautement répondeurs sélectionnés selon les marqueurs biologiques identifiés.

L'amélioration des modèles précliniques est indispensable

En accord avec nos résultats qui suggèrent une accélération de la croissance tumorale sous traitement BVZ, dans les ccRCC, deux études précliniques (Ebos et al., 2009) (Paez-Ribes et al., 2009) démontrent que le bénéfice thérapeutique des traitements anti-angiogéniques dépend du stade de la maladie. Dans ces modèles, une phase de réponse initiale est caractérisée par une diminution de la taille tumorale. Après cette première phase de réponse objective le traitement par des molécules anti-angiogéniques de types TKI, augmente l'agressivité ainsi que les capacités invasives et métastatiques des cellules tumorales. Les traitements anti-angiogéniques augmentent l'agressivité des tumeurs et la formation de

métastases. Mais quelle est la relevance clinique de ces deux articles ? Très peu de données cliniques sont en accord avec ces résultats. L'arrêt du traitement sorafenib ou sunitinib dans les ccRCC favorise la croissance locale de la tumeur et la formation de métastases (Johannsen et al., 2009; Petrelli et al., 2010). Dans la plupart des cas, aucune évidence clinique indique clairement que ces molécules anti-angiogéniques augmentent l'agressivité de la maladie et diminuent la survie des patients (Miles et al., 2011). Cet effet n'est pas spécifique des traitements anti-angiogéniques. La chirurgie, l'irradiation et la chimiothérapie provoquent les mêmes effets pro-métastatiques. Deux études cliniques de phase III qui étudient l'efficacité du BVZ associé à une chimiothérapie dans le traitement du cancer colorectal démontrent qu'à des stades précoces de la maladie l'association avec le BVZ n'apporte aucun bénéfice clinique par rapport à la chimiothérapie utilisée seule (Allegra et al., 2011; de Gramont et al., 2011). Les molécules anti-angiogéniques présentent des bénéfices cliniques modestes avec des effets secondaires souvent importants. Le coût de ces molécules est extrêmement élevé. Le gain en terme de survie des traitements anti-angiogéniques est mesuré en mois (Kerbel, 2008). Pourquoi la survie sans progression est augmentée sans amélioration de la survie globale (Wilkerson et Fojo, 2009) ? Dans plusieurs études cliniques, l'arrêt du traitement par les TKI favorise la reprise de la croissance tumorale (Cacheux et al., 2008; Desar et al., 2009; Wolter et al., 2009. Les mêmes résultats sont observés en préclinique. L'arrêt du traitement entraine la revascularisation de la tumeur et la reprise de la croissance tumorale (di Tomaso et al., 2011). Pourtant en clinique, l'interruption du traitement est souvent obligatoire pour limiter les effets secondaires trop importants pouvant entrainer jusqu'à la mort des patients (La Vine et al., 2010). La reprise de la croissance tumorale peut être transitoire. Si le traitement est repris avec la même molécule ou une nouvelle, une nouvelle diminution de la croissance tumorale est observée (Dudek et al., 2009). Dans certains cas, le maintient du traitement BVZ après progression augmente la survie des patients. L'utilisation d'un traitement BVZ sur une longue période est bénéfique pour les patients (Burger et al., 2011; Cohn et al., 2011). L'amélioration des modèles précliniques est indispensable pour tester cette hypothèse. Dans les modèles de xénogreffes en sous-cutané, la croissance de la tumeur est très rapide et pour des raisons éthiques évidentes la fenêtre thérapeutique est souvent réduite. Le temps de traitement est souvent limité. Dans ces modèles, il est impossible de tester l'efficacité à long terme d'un traitement BVZ. En clinique, 30 à 50% des patients traités BVZ développent une maladie plus agressive avec un phénotype plus invasif et une augmentation de la formation de métastases (Iwamoto et al., 2009; Zuniga et al., 2010). Du fait de l'efficacité thérapeutique, la survie des patients est prolongée sous traitement BVZ. Le temps

de traitement est plus long et augmente le temps disponible pour acquérir un phénotype invasif. A partir de ce moment là, le développement tumoral est très rapide et la maladie devient très agressive. Le temps entre le moment de la rechute et le décès des patients est réduit. Cela permet d'expliquer, au moins en partie, pourquoi dans la plupart des études cliniques aucun effet des traitements n'est observé sur la survie globale des patients. L'acquisition de résistances sous traitement anti-angiogénique est bien établie. Mais comment ces résistances augmentent les capacités invasives et métastatiques de la tumeur ? La formation de métastases est un phénomène complexe nécessitant la mise en place d'un dialogue entre les cellules tumorales et leur microenvironnement (Nguyen et al., 2009). Différents liens entre les thérapies anti-angiogéniques et la formation de métastases sont évoqués. Les traitements augmentent l'hypoxie intra-tumorale qui favorise l'expression du récepteur MET. Ce récepteur augmente les capacités invasives des cellules et favorise la dissémination. Ce mécanisme est un évènement clé de la progression tumorale (Blagosklonny, 2004). L'inflammation est un autre des mécanismes impliqués (Solinas et al., 2010). Une question se pose ? Pourquoi certaines études ne montrent pas ces effets pro-métastatiques des traitements anti-angiogéniques ? Les variations des conditions expérimentales expliquent en partie ces résultats. Les modèles utilisés, le type de tumeur étudié, les molécules utilisées ainsi que la dose et la durée du traitement sont souvent hétérogènes. Le problème majeur est souvent le manque de cohérence entre les études précliniques et la réalité clinique. En clinique, les patients reçoivent les inhibiteurs de VEGF à des stades tardifs de la maladie avec des métastases déjà en place (Blagosklonny, 2004). En préclinique, les molécules sont rarement testées sur des stades avancés et métastatiques de la maladie. Les modèles de référence (souris génétiquement modifiées, modèles orthotopiques de xénogreffes ou syngéniques) testent seulement le traitement sur une tumeur localisée (Francia et al., 2011) et à un stade précoce du développement de la maladie. L'évaluation de l'efficacité des molécules s'effectue à la fin du traitement par une mesure de la taille tumorale. Quand la tumeur atteint une taille éthiquement limite l'expérience s'arrête, souvent de façon précoce bien avant l'établissement de la maladie métastatique. Les seules études qui cherchent à démontrer l'effet des inhibiteurs de l'angiogenèse tumorale sur les métastases sont très hétérogènes. Les modèles et le mode de formation des métastases sont très différents. La méthode de quantification de l'efficacité des traitements est également très variable. Ainsi, les résultats obtenus sont très hétérogènes et ne permettent pas de généraliser sur l'efficacité des anti-angiogéniques sur les métastases (Bos et al., 2010) (Schomber et al., 2009; Yin et al., 2010). Pour toutes ces raisons, l'urgence est de développer des modèles permettant de tester

l'effet des traitements sur des stades avancés et métastatiques de la maladie. Afin d'améliorer la corrélation entre les études précliniques et les études cliniques, il faudrait également utiliser des critères d'évaluation ayant une relevance clinique comme par exemple, la survie sans progression ou la survie globale. Au laboratoire l'arrêt du traitement s'effectue surtout sur des bases éthiques. Il faudrait d'avantage se baser sur des considérations cliniques pour évaluer l'efficacité d'un traitement (Singh et al., 2010a). D'après moi, un autre aspect important est l'évaluation précise du timing idéal pour l'administration des molécules anti-angiogéniques. En néo-adjuvant avant la chirurgie ou en adjuvant après la chirurgie. Là encore, les réponses à ces questions nécessitent d'évaluer les nouvelles molécules dans des modèles précliniques plus adaptés. Il faut tester l'efficacité des traitements à différents stades de la maladie et sur les métastases. Cela permet d'évaluer si les traitements utilisés ont une activité sur la tumeur primaire et sur les métastases ou s'il faut combiner des anti-angiogéniques avec des anti-métastastatiques. L'important est de développer des modèles précliniques mimant une étude clinique de phase III avec, comme évaluation de l'efficacité du traitement, la mesure de la survie sans progression et de la survie globale (Francia et al., 2011). Les modèles précliniques sont des composants essentiels dans l'étude et le design de nouvelles molécules thérapeutiques. L'injection sous-cutanée de cellules tumorales humaines dans des souris immuno-déficientes n'est pas une technique très adaptée, c'est pourtant la plus utilisée. La tumeur grossit rapidement ce qui ne mime pas le temps de doublement lent de la plupart des cancers. Ces tumeurs sous-cutanées à croissance rapide sont donc plus sensibles à des drogues ciblant les cellules en division. Beaucoup de paramètres sont différents. La réponse à la thérapie est différente en fonction du site d'injection (sous-cutané vs orthotopique). Les doses et les paramètres pharmacocinétiques sont différents entre l'Homme et la souris. De plus, des modèles précliniques pour lesquels les tumeurs sont pré-exposées au préalable à d'autres traitements n'existent pas. Dans les études de phase II ou de phase III, les patients ont déjà eu une, deux ou mêmes plusieurs lignes de traitement avant de devenir réfractaires au traitement. Ces modèles précliniques ne minent pas ces études cliniques où les patients présentent une maladie avancée avec de multiples résistances. Dans les modèles génétiques présentant une altération dans un gène important pour le développement tumoral, les tumeurs se développent en orthotopique. Le système immunitaire est fonctionnel, le stroma et la vascularisation de la tumeur sont de la même espèce. Ces modèles sont très utiles pour étudier les étapes précoces du développement tumoral mais sont peu utilisés car l'incidence tumorale est très faible. La transplantation orthotopique permet l'obtention de métastases. Si la tumeur primaire est retirée (comme s'est souvent le cas en clinique), cela permet d'augmenter la survie et laisser

plus de temps au développement des métastases. Les modèles d'injection en sous-cutanés ou en orthotopique sont très utiles pour tester rapidement des molécules potentiellement efficaces sur la tumeur. Mais l'efficacité de ces molécules doit être validée dans des modèles métastatiques voir dans des modèles génétiques. Les résultats peuvent être différents d'un modèle à l'autre. Une molécule peut être efficace sur la tumeur primaire mais pas sur les métastases et inversement. Ces résultats sont essentiels, car ils valident ou non l'entrée d'une nouvelle molécule dans une étude clinique de phase II ou de phase III, pourtant le nombre d'étude utilisant des modèles métastatiques est très faible (Dawson et al., 2009). La mise en place de ces modèles métastatiques est difficile. Mais ces difficultés techniques sont également un avantage. Ces techniques engendrent des patterns métastatiques très différents, en accord avec ce qui se passe en clinique. Les modèles PDX pour « Patients Derived Xenografts » sont très intéressants. Ils reflètent la situation complexe de la tumeur chez l'Homme et permettent une meilleure évaluation de la réponse clinique. Les fragments de tumeurs humaines sont directement implantés chez la souris sans passer par des systèmes *in vitro* limitant ainsi la dérive génétique des cellules tumorale. Ces modèles sont en accords avec la plupart des résultats cliniques (Krumbach et al., 2011; Raymond et al., 2011) (Hidalgo et al., 2011; Yao et al., 2011). Ces modèles, plus proches des caractéristiques des tumeurs humaines, présentent d'après moi une limitation de taille. L'influence du microenvironnement et en particuliers du système immunitaire sur la croissance tumorale et sur la réponse aux traitements ne peut être étudiée dans ces modèles. Le système immunitaire influence les effets des traitements anticancéreux (Kroemer et Zitvogel, 2012; Zitvogel et Kroemer, 2012). Des souris dépourvues du récepteur TLR4 ne répondent pas à une chimiothérapie. Pour minimiser cette limitation, une approche que je trouve très intéressante, est l'humanisation partielle du microenvironnement avec reconstitution chez la souris d'un système immunitaire humain (NOG mice CIEA®). Cela permet d'étudier l'influence du microenvironnement sur les traitements. D'après moi, continuer à développer et améliorer ce type de modèles humanisés est essentiel afin d'augmenter la relevance clinique des modèles murins et de diminuer le délai entre le développement préclinique et le bénéfice chez les patients. Des modèles alternatifs sont également en cours d'évaluation. Le poisson zèbre ou zebrafish, longtemps utilisé pour étudier le développement, est aujourd'hui considéré comme un modèle unique pour étudier la biologie et la génétique des cancers. En particuliers, ce modèle est intéressant pour l'étude des mélanomes (Ceol et al., 2008) et des tumeurs neuroendocrines (Bourque et Houvras, 2011). Il permet la mise en place efficace de modèles métastatiques. L'injection de cellules tumorales humaines ou de tumeurs primaires permet la colonisation à distance et la

formation de métastases (Lee et al., 2009; Marques et al., 2009). Dans ces modèles, le sunitinib diminue l'invasion tumorale et la dissémination métastatique. Les modèles mathématiques et informatiques peuvent également être très informatifs (Basanta et al., 2012) (Swanson et al., 2011). Les équipes du Dr Oberye et du Dr Gatenby ont développé des modèles de cancers du poumon et de la prostate. Ces derniers ont reçu un financement de plus de trois millions d'euros pour mettre en place leur modèle. Ils ont mis en évidence que les modèles mathématiques sont plus efficaces que les médecins pour prédire la réponse aux traitements et le devenir des patients. Ces modèles combinent une quantité beaucoup plus importante de données. Des informations spécifiques de chacun des patients peuvent être incorporées au modèle afin de prédire l'évolution de la maladie et la réponse aux traitements. Selon moi, cette approche est très intéressante et complémentaire des outils cliniques déjà disponibles pour envisager avec plus de simplicité la prise en charge personnalisée des patients.

Et la génétique dans tout ça ?

La tendance actuelle est donc au développement d'une médecine personnalisée. Le seul moyen d'obtenir le bon traitement pour le bon patient est d'identifier et de valider des marqueurs prédictifs d'efficacité des traitements. Les stratégies d'identification des marqueurs sont diverses. Dans la plupart des cas, il s'agit d'identifier des marqueurs très spécifiques reliés à l'activité d'un traitement. Mais l'hétérogénéité au sein d'une tumeur ainsi que l'évolution sous la pression des traitements limitent l'efficacité de l'identification de nouveaux marqueurs spécifiques. Il est indispensable de pouvoir classer les tumeurs en fonction de leurs caractéristiques propres: mutations, amplifications géniques, méthylations, expression de protéines ou ARNs.

Le succès des thérapies ciblées dans le traitement des cancers est incontestable. Depuis l'utilisation de l'anticorps anti-HER-2 dans le traitement du cancer du sein, de l'inhibiteur de la kinase BCR-ABL dans les leucémies myéloïdes chroniques, en passant par l'inhibition de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR dans les NSCLC et plus récemment l'inhibition de B-RAF dans les mélanomes, l'apport de ces traitements est considérable. Aujourd'hui, 24 TKI sont sur le marché dont 17 sont utilisés dans le traitement de cancers et 4 anticorps monoclonaux bloquant les ligands de ces protéines kinases. Le nombre de cibles est relativement faible. Par ordre décroissant d'importance on retrouve : le VEGF, la Pi3K, HER-2, mTOR, l'EGFR, le récepteur MET, le PDGF et le récepteur KIT… Le succès de ces inhibiteurs ne dépend pas de la cible thérapeutique choisie mais d'avantage de la capacité à

mettre en évidence des marqueurs prédictifs d'efficacité afin de sélectionner les patients répondeurs. Les marqueurs les plus connus et les plus utilisés sont les mutations activatrices dans les voies de signalisation ciblées par les inhibiteurs comme les mutations de KRAS dans le cancer colorectal (Van Cutsem et al., 2011), de l'EGFR dans le cancer du poumon (Rosell et al., 2012). En France, la recherche de ces mutations est même remboursée par la sécurité sociale (mutations EGFR pour les NSCLC et de BRAF pour le mélanome (Hauschild et al., 2012)). La présence ou l'absence d'un de ces marqueurs est directement liée au taux de réponse d'un traitement dans un cancer donné. Ainsi, tester ces marqueurs est une étape clé dans le diagnostic et l'évaluation thérapeutique des patients. L'expression du VEGF était un candidat naturel pour prédire l'efficacité des traitements anti-angiogéniques. Cependant les résultats sont très variables en fonction du type de tumeur et du traitement utilisé (Hegde et al., 2013; Jayson et al., 2012) (Miles et al., 2010; Zhu et al., 2009). L'importance croissante de l'analyse moléculaire dans la prise en charge clinique des patients nécessite la mise en place de tests de haute qualité, robustes et validés en clinique. La mise en place de nouveaux tests plus sensibles permet d'augmenter la valeur clinique des paramètres testés. Les limitations majeures à l'identification de ces marqueurs sont l'hétérogénéité intra- et inter-tumorale (Gerlinger et al., 2012) détectée par séquençage et l'altération génétique des voies de signalisation qui apparaît en cours de traitement due à la pression des thérapies (Garraway et Baselga, 2012). L'identification des anomalies génétiques des tumeurs et des mécanismes de résistances permet d'identifier la combinaison de traitement la plus adaptée au profil tumoral et de se diriger progressivement vers une médecine individualisée. Pour la mettre en place, les médecins ont besoin d'une carte d'identité complète de la tumeur et de connaître les facteurs prédictifs d'efficacité (Al-Lazikani et al., 2012; Yap et Workman, 2012). Le séquençage de l'ensemble du génome est encore loin de rentrer en routine clinique. Une des possibilités est donc le séquençage uniquement d'un panel de biomarqueurs qui doivent donc être identifiés au préalable. L'adaptation rapide des traitements est essentielle afin d'éviter les résistances, les effets secondaires et les rechutes rapides des patients causées par l'évolution des tumeurs sous traitement. Cela nécessite un suivi de l'évolution du profil tumoral en cours de traitements (Chen et al., 2012). Une faible proportion des patients répond objectivement à un traitement. L'objectif principal est d'identifier spécifiquement les patients sensibles au traitement et de les traiter en fonction de la biologie de leur propre tumeur. Au cours de l'évolution d'un cancer, les cellules tumorales acquièrent des résistances aux traitements. Ces cellules résistantes sont sélectionnées et une évolution clonale de la tumeur est observée (Aparicio et Caldas, 2013). Des mutations secondaires peuvent apparaître et favoriser

l'apparition de ces résistances. Une analyse de l'évolution en cours de traitement est donc indispensable afin d'adapter rapidement les traitements. Mais effectuer des biopsies intra-tumorales répétées est très invasif, éthiquement discutable, contraignant pour les patients et difficile à mettre en place. De plus, les ccRCC sont très hétérogènes. Le séquençage de différentes régions de la tumeur révèle une hétérogénéité importante (Gerlinger et al., 2012). Une seule biopsie ne révèle qu'une minorité des mutations présentes dans la tumeur. Cette hétérogénéité explique au moins en partie les difficultés d'identification des marqueurs d'efficacité des traitements dans les ccRCC. Ainsi, les marqueurs les plus recherchés par les cliniciens sont des biomarqueurs circulants. On parle alors de « biopsie liquide » en opposition aux biopsies intra-tumorales. Cette technique est plus simple à mettre en œuvre, moins invasive et permet de suivre l'effet d'un traitement et de détecter de façon précoce l'apparition de résistances. En général, il s'agit soit d'un dosage de protéines circulantes impliquées dans la résistance aux traitements, soit d'une estimation du nombre de cellules tumorales circulantes permettant d'estimer les capacités métastatiques. La détection de mutations directement à partir d'une prise de sang est envisagée. Il s'agit d'un séquençage de l'ADN tumoral circulant libéré par les cellules tumorales présentent dans le sang. L'utilisation de cette technique a été validée dans plusieurs études (Chan et al., 2013; Forshew et al., 2012; Leary et al., 2012). Le suivi sanguin de quelques patients atteints de différents cancers (notamment les cancers du sein, du poumon et de l'ovaire) pendant un ou deux ans a montré une augmentation des proportions de plusieurs mutations dans le génome plasmatique associée à l'émergence de résistances aux traitements. Ces résultats suggèrent que cette technique pourrait remplacer les biopsies intra-tumorales pour l'identification des mutations associées à l'apparition de résistances dans les cancers avancés (Murtaza et al., 2013). Il s'agit d'une nouvelle approche pour étudier l'évolution clonale des cancers. Une étude valide l'utilisation du séquençage de l'ADN circulant pour suivre l'évolution des cancers du sein sous traitement. Cet ADN est détectable dans 97% des patients, la technique est très sensible et très informative. L'évolution est corrélée avec la croissance tumorale et permet d'évaluer rapidement la réponse des patients au traitement utilisé (Dawson et al., 2013). Pour les différentes molécules que nous avons identifiées et pouvant expliquer les résistances au traitement BVZ, une analyse par « biopsie liquide » est envisageable ce qui renforce leur intérêt dans les ccRCC. Comme nous avons pu l'observer dans notre modèle, les phénomènes de résistances dans les ccRCC mais également dans d'autres cancers, sont souvent associés à une amplification des voies de signalisation EGFR et MET. Ces voies de signalisation favorisent la prolifération et la migration des cellules tumorales. Ainsi, elles favorisent la

croissance tumorale et la formation de métastases. Selon moi, l'identification précoce des mutations pouvant survenir dans ces voies est indispensable pour limiter le temps nécessaire à l'adaptation des traitements. L'utilisation, comme marqueur, de l'activité de la phosphatase PTPRκ située en amont de ces deux récepteurs semble prometteuse. Dans les ccRCC, la détection, en cours de traitement d'une diminution significative de l'expression de PTPRκ permettrait en une seule mesure d'identifier des amplifications potentielles de ces deux voies de signalisation importantes dans la résistance aux traitements. Cette identification est indispensable afin d'adapter les traitements. La détection de niveaux faibles de cette phosphatase avant traitement permettrait également d'envisager l'association d'un traitement ciblant ces voies de signalisation à la thérapie anti-angiogénique.

Dans les ccRCC, seulement une proportion des patients répond aux inhibiteurs de mTOR. Environ 15% des patients sont mutés dans la voie de signalisation impliquant mTOR et ce sont ces patients qui sont les plus sensibles à ces inhibiteurs (présentation par Hsieh et al au 11ème symposium international sur le cancer du rein en 2013). Le développement des techniques de séquençage a considérablement modifié la vision thérapeutique des ccRCC. Ces techniques mettent en évidence des mutations récurrentes ayant une valeur pronostique et/ou prédictive. Sept thérapies ciblées différentes pour les ccRCC sont actuellement disponibles. Malheureusement, par défaut de marqueurs prédictifs, le choix de l'administration de ces drogues se fait essentiellement sur des critères d'éligibilité aux études cliniques, de toxicité ou de coût et pas en fonction de la signature génétique propre des patients. Récemment, le séquençage des ccRCC a mis en évidence deux mutations exclusives intéressantes. Le gène PBRM-1, dont la protéine est impliquée dans le remodelage de la chromatine au moment de la transcription, est muté dans 40% des RCCs (Varela et al., 2011). Le gène BAP-1, dont la protéine est impliquée dans les mécanismes de dé-ubiquitination est muté dans 15% des ccRCC (Pena-Llopis et al., 2012). BAP-1 est également muté dans le cancer du sein, du pancréas et dans le mélanome. L'inactivation de ces gènes a une implication clinique directe en étant corrélée au grade de Furhman et à l'agressivité de la maladie. Ainsi, ces mutations définissent des sous types de ccRCC (Kapur et al., 2013). D'après moi, il serait donc indispensable d'exploiter ces défauts génétiques pour développer des traitements spécifiques. L'idée étant de mettre en place une nouvelle classification des ccRCC basée sur le séquençage et la présence ou l'absence d'une ou plusieurs mutations dans une certaine voie. Par exemple, 50% des patients atteints de ccRCC présentent des mutations dans la voie d'ubiquitination et de dégradation des protéines par le protéasome (UMPP), ce qui permet d'établir deux groupes

de patients en fonction des altérations de cette voie (Guo et al., 2012). Cependant, selon moi, il faut être très prudent avec cette classification. L'hétérogénéité décrite dans les ccRCC est un frein important à cette analyse par séquençage. Il est difficile d'établir et de valider un marqueur pronostique et/ou prédictif spécifique en se basant sur le statut des mutations. Enfin, il est indispensable de suivre l'évolution de ces mutations en cours de traitement car comme dans le cas des mutations du gène de l'EGFR des mutations secondaires peuvent apparaître après traitement (Ohashi et al., 2013). Ces résistances multiples rajoutent un niveau de complexité supérieur à ne pas négliger pour la prise en charge thérapeutique des ccRCC.

Et pourquoi pas le métabolisme ?

Une des cibles qui émerge actuellement est le métabolisme. Les cellules de cancer du rein ont un métabolisme altéré et fortement glycolytique pouvant constituer une cible thérapeutique intéressante. L'AMPK régule l'activation de mTOR qui a un rôle important dans la tumorigenèse. L'utilisation de l'AICAR qui active l'AMPK inhibe la croissance tumorale des ccRCC (Woodard et Platanias, 2010). Les mêmes résultats sont observés avec la metformine. L'utilisation de cette molécule inhibe la croissance des ccRCC *in vitro* et *in vivo* suggérant un rôle important de l'AMPK dans la régulation de la croissance des ccRCC (Liu et al., 2013). La metformine est dans ce cas un exemple de médicament utilisé depuis de nombreuses années et dont la fonction première peut être détournée pour le traitement d'une autre pathologie.

Une chose essentielle : Ne pas négliger le microenvironnement tumoral

Les mécanismes de résistances dus à des modifications des cellules tumorales elles mêmes sont très importants. Cependant, comme nous l'avons mis en évidence dans notre modèle, le microenvironnement à un rôle prépondérant dans ces mécanismes. La cytokine CXCL7 peut être produite par les cellules tumorales mais elle est également sécrétée par les cellules immunitaires et les cellules stromales infiltrant la tumeur. Elle favorise la croissance tumorale des ccRCC. Selon moi, il est très important d'étudier les relations entre la tumeur et son microenvironnement. Le dialogue mis en place entre les différents types cellulaires au sein de la tumeur influence la réponse aux traitements. Ne pas considérer l'influence des cellules du microenvironnement sur la croissance tumorale et sur la réponse aux traitements limite notre approche expérimentale. Une information essentielle pourrait faire défaut et empêcher l'adaptation correcte du traitement. La résistance induite par les cellules stromales est un mécanisme commun à plusieurs types de tumeurs. La présence de cellules stromales dans une

co-culture avec différents types de cellules tumorales diminue l'efficacité d'un grand nombre (65% des molécules testées) de traitements anticancéreux (Straussman et al., 2012). Cette étude a également mis en évidence un mécanisme spécifique de résistance dans les mélanomes mutés pour B-RAF. La sécrétion d'HGF par les cellules stromales active le récepteur MET et les voies de signalisation en aval, MAPK et PI3K/AKT. Cette amplification limite l'efficacité des inhibiteurs de Raf. L'inhibition de la voie de signalisation HGF/MET, en plus de l'inhibition de RAF, empêche l'apparition de ces résistances. Ces résultats démontrent l'importance du microenvironnement tumoral et témoignent encore une fois de l'importance de l'HGF et de son récepteur dans les mécanismes de résistances aux traitements anticancéreux.

Et surtout le système immunitaire…

Pour moi, un autre aspect essentiel du développement tumoral et de la réponse aux traitements est l'influence du système immunitaire. Les cellules tumorales mettent en place différents mécanismes leur permettant d'échapper à la réponse immunitaire. Les ccRCC sont sensibles à l'immunothérapie suggérant l'importance du système immunitaire, comme dans beaucoup d'autres tumeurs. Différentes approches sont étudiées pour augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale. Une des approches est de bloquer les récepteurs qui inhibent cette réponse. L'ipilimumab, un anticorps anti-CTLA4, a été approuvé par la FDA pour le traitement des mélanomes métastatiques. L'interaction entre le ligand PDL-1 et sont récepteur PD-1 présent à la surface des cellules T activées inhibe la réponse immunitaire. Le ligand PDL-1 est exprimé par les cellules tumorales. Son expression est augmentée dans les ccRCC et les mélanomes. L'inhibition de PDL-1 augmente la réponse T spécifique des cellules tumorales (Blank et al., 2006). Dans les ccRCC, cette expression est corrélée à une diminution de la survie sans progression des patients traités au pazopanib (présenté par le Dr Figueroa, DJ ASCO, Chicago mai 2013). Les niveaux de PDL-1 sont inversement corrélés aux niveaux de VEGF. Dans les ccRCC, les mélanomes et les NSCLC l'utilisation d'un anticorps anti-PD-1 entraine une réponse anti-tumorale objective pour un quart des patients. Cette réponse est directement corrélée à l'expression du ligand PDL-1 à la surface des cellules tumorales (Topalian et al., 2012). Ces résultats démontrent que l'axe PDL-1/PD1 est responsable de l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale lors de la progression de la maladie. Dans les ccRCC multi résistants l'utilisation d'un anticorps anti-PD1 diminue la croissance tumorale de 30% des patients (ASCO, Chicago mai 2013). Cet anticorps est en cours d'étude de phase III dans les ccRCC, le mélanome et les NSCLC.

Utiliser les effets des anti-angiogéniques pour améliorer la réponse immunitaire

D'après moi, un autre paramètre influençant la réponse immunitaire anti-tumorale est le concept de normalisation vasculaire. Le système vasculaire, le système lymphatique et la matrice extracellulaire sont anormaux dans les tumeurs. Une infiltration anormale de fibroblastes, de macrophages et autres cellules immunitaires complète ce microenvironnement tumoral. L'hypoxie et la pression intra-tumorales sont élevées. Ce microenvironnement hostile favorise la progression tumorale, la formation de métastases et l'immunosuppression. Il favorise également l'émergence de cellules présentant un phénotype de cellules souches. Ce microenvironnement chaotique favorise l'émergence de résistances. Les traitements anti-angiogéniques sont normalement utilisés pour détruire les vaisseaux et réduire la tumeur. Cependant, la normalisation vasculaire par les anti-angiogéniques diminue l'hypoxie intra-tumorale, augmente l'efficacité de certains traitements et la réponse immunitaire favorisant ainsi la survie des patients (Goel et al., 2011; Jain, 2013). D'après moi, l'effet des anti-angiogéniques sur l'immunité anti-tumorale et sur l'immunothérapie est essentiel et très prometteur d'un point de vue thérapeutique. Les vaisseaux tumoraux anormaux et la croissance tumorale favorisent la mise en place d'un microenvironnement immunosuppressif caractérisé par la production de cytokines immunosuppressives, la présence de macrophages de type M2 et de lymphocytes T régulateurs (LTreg) (Terme et al., 2013) et la stimulation de l'anergie des lymphocytes T (Tartour et al., 2011). Dans les ccRCC, la présence de LTreg infiltrant la tumeur est un facteur de mauvais pronostic. Le traitement sunitinib ou BVZ diminue l'expression des LTreg au sein de la tumeur (Adotevi et al., 2010; Finke et al., 2008). La diminution des LTreg est corrélée avec la survie des patients. Au cours du développement tumoral, des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) sont recrutées au sein du microenvironnement. Ces cellules favorisent l'apparition des résistances aux traitements anti-angiogéniques car elles produisent des molécules angiogéniques redondantes, comme la cytokine CXCL8 et la protéase MMP-9 (Shojaei et al., 2007). Ainsi, cibler ces cellules en association avec les traitements anti-angiogéniques permettrait d'augmenter l'efficacité en diminuant les résistances. Dans les ccRCC, le sunitinib, le sorafenib et le BVZ diminuent l'activité de ces cellules. Ce traitement diminue également l'expression des cytokines immunosuppressives IL-10 et TGFβ et des molécules de co-stimulation inhibitrices à la surface des lymphocytes T infiltrants (Ozao-Choy et al., 2009). Le VEGF circulant altère également la prolifération, la différenciation et la fonction des cellules immunitaires et oriente la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2. Des hauts niveaux d'expression de

VEGF inhibent la maturation des cellules dendritiques, augmentent la prolifération des LTreg et diminuent la réponse T anti-tumorale (Gabrilovich et al., 1996; Huang et al., 2007). Cette immunosuppression induite par un excès de VEGF est inhibée par le blocage de la voie de signalisation VEGF/VEGFR-2 (Gabrilovich et al., 1999). Les traitements anti-angiogéniques inhibent l'activité immunosuppressive induite par le développement tumoral et réorientent la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1 favorisant une réponse anti-tumorale. Plus d'une douzaine d'études montrent que la normalisation vasculaire augmente l'entrée des lymphocytes T au sein de la tumeur. La diminution de l'hypoxie favorise la perte de l'environnement immunosuppresseur au profit d'une stimulation de l'immunité (Huang et al., 2012) (Manning et al., 2007; Shrimali et al., 2010). Cette normalisation vasculaire augmente également l'efficacité des traitements anticancéreux par immunothérapie (Huang et al., 2013; Johansson et al., 2012). L'échec des traitements anti-angiogéniques pourrait être compensé par leur utilisation pour améliorer l'immunité anti-tumorale et l'efficacité de l'immunothérapie. Il existe une corrélation entre une normalisation vasculaire efficace et l'augmentation de l'infiltration des lymphocytes CD8+ au sein de la tumeur (Shrimali et al., 2010). L'ensemble de ces résultats suggère que les anti-angiogéniques peuvent être utilisés pour favoriser la normalisation du microenvironnement tumoral et pour augmenter l'efficacité des thérapies anticancéreuses en particuliers l'immunothérapie. Il existe une synergie entre les traitements immunosuppresseurs et les traitements anti-angiogéniques (Walter et al., 2012). Si les traitements anti-angiogéniques favorisent l'immunothérapie, l'inverse est vrai également. L'augmentation de l'efficacité des traitements anti-angiogéniques et la limitation de l'apparition des résistances pourraient être obtenues en levant l'immunosuppression induite lors du développement tumoral.

Conclusion générale et perspectives

L'ensemble de notre travail ne remet pas en cause l'utilisation des thérapies anti-angiogéniques dans le traitement des ccRCC. Cependant, comme beaucoup d'autres travaux, il souligne l'importance de mettre en évidence des facteurs prédictifs d'efficacité afin d'anticiper sur l'apparition de résistances au traitement. Il nous reste encore du travail afin de valider définitivement l'expression du VEGF-C, de la cytokine CXCL7 ou encore l'activité de la phosphatase PTPRκ comme marqueurs pronostiques et prédictifs de réponse aux thérapies ciblées dans les ccRCC. Nous pouvons également tester l'utilisation de ces marqueurs comme nouvelles cibles thérapeutiques.

Les années 2000 ont été celles de la mise en évidence d'un grand nombre de thérapies ciblées. Ces traitements ont révolutionné la prise en charge des patients et considérablement augmentés la survie et la qualité de vie. Les années 2010 sont celles de la recherche de marqueurs prédictifs d'efficacité afin d'améliorer et d'adapter les traitements en fonction des résistances. Dans un futur, plus ou moins proche, la tendance est au développement de thérapies personnalisées en fonction des caractéristiques spécifiques des patients. Dans cette optique, nous avons développé au laboratoire une technique rapide de criblage de molécules thérapeutiques. En collaboration avec le CHU de Nice nous obtenons des biopsies de tumeurs rénales que nous sommes capables de remettre rapidement et efficacement en culture dans un milieu adapté permettant d'éviter la dérive de la tumeur et la perte des caractéristiques initiales. Sur ces cellules nous effectuons des tests permettant de mesurer la prolifération et la viabilité cellulaire, pour tester l'efficacité des différentes molécules a disposition des cliniciens pour le traitement des ccRCC. Nous espérons créer un dialogue avec les médecins pour leur donner rapidement après la chirurgie une indication des molécules les plus efficaces *in vitro*. Une autre approche consiste à récupérer des fragments de tumeur chez le patient et de les implanter directement chez la souris afin de tester directement l'efficacité des drogues *in vivo*. Une nouvelle fois, le but est d'indiquer le plus rapidement possible et avec le plus certitudes cliniques possibles les molécules les plus efficaces pour un patient donné. Un aller-retour constant entre la paillasse du chercheur et le lit du patient est indispensable pour une amélioration de la prise en charge personnalisée des patients.

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

Abramsson, A., Lindblom, P., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. J Clin Invest *112*, 1142-1151.

Acharyya, S., Oskarsson, T., Vanharanta, S., Malladi, S., Kim, J., Morris, P.G., Manova-Todorova, K., Leversha, M., Hogg, N., Seshan, V.E.*, et al.* (2012). A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. Cell *150*, 165-178.

Achen, M.G., Mann, G.B., and Stacker, S.A. (2006). Targeting lymphangiogenesis to prevent tumour metastasis. Br J Cancer *94*, 1355-1360.

Achen, M.G., McColl, B.K., and Stacker, S.A. (2005). Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis. Cancer Cell *7*, 121-127.

Achen, M.G., and Stacker, S.A. (2008). Molecular control of lymphatic metastasis. Ann N Y Acad Sci *1131*, 225-234.

Acosta, J.C., and Gil, J. (2009). A role for CXCR2 in senescence, but what about in cancer? Cancer Res *69*, 2167-2170.

Acosta, J.C., O'Loghlen, A., Banito, A., Guijarro, M.V., Augert, A., Raguz, S., Fumagalli, M., Da Costa, M., Brown, C., Popov, N.*, et al.* (2008). Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. Cell *133*, 1006-1018.

Adams, R.H., and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 464-478.

Addison, C.L., Arenberg, D.A., Morris, S.B., Xue, Y.Y., Burdick, M.D., Mulligan, M.S., Iannettoni, M.D., and Strieter, R.M. (2000a). The CXC chemokine, monokine induced by interferon-gamma, inhibits non-small cell lung carcinoma tumor growth and metastasis. Hum Gene Ther *11*, 247-261.

Addison, C.L., Daniel, T.O., Burdick, M.D., Liu, H., Ehlert, J.E., Xue, Y.Y., Buechi, L., Walz, A., Richmond, A., and Strieter, R.M. (2000b). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. J Immunol *165*, 5269-5277.

Adotevi, O., Pere, H., Ravel, P., Haicheur, N., Badoual, C., Merillon, N., Medioni, J., Peyrard, S., Roncelin, S., Verkarre, V.*, et al.* (2010). A decrease of regulatory T cells correlates with overall survival after sunitinib-based antiangiogenic therapy in metastatic renal cancer patients. J Immunother *33*, 991-998.

Agarwal, N., Sonpavde, G., and Sternberg, C.N. (2012). Novel molecular targets for the therapy of castration-resistant prostate cancer. Eur Urol *61*, 950-960.
Aguirre-Ghiso, J.A. (2007). Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. Nat Rev Cancer *7*, 834-846.

Akiri, G., Nahari, D., Finkelstein, Y., Le, S.Y., Elroy-Stein, O., and Levi, B.Z. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. Oncogene *17*, 227-236.

Al-Lazikani, B., Banerji, U., and Workman, P. (2012). Combinatorial drug therapy for cancer in the post-genomic era. Nat Biotechnol *30*, 679-692.

Alessi, P., Leali, D., Camozzi, M., Cantelmo, A., Albini, A., and Presta, M. (2009). Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist. Eur Cytokine Netw *20*, 225-234.

Algire, GH, Chalkley, HW, Legallais FY, Park, HD. (1945). Vascular reactions of normal and malignant tissues in vivo. I. Vascular reactions of mice to wounds and to normal and neoplastic transplants. J Natl Cancer Inst; *6*: 73-85.

Alitalo, K., Tammela, T., and Petrova, T.V. (2005). Lymphangiogenesis in development and human disease. Nature *438*, 946-953.

Allavena, P., and Mantovani, A. (2012). Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. Clin Exp Immunol *167*, 195-205.

Allegra, C.J., Yothers, G., O'Connell, M.J., Sharif, S., Petrelli, N.J., Colangelo, L.H., Atkins, J.N., Seay, T.E., Fehrenbacher, L., Goldberg, R.M.*, et al.* (2011). Phase III trial assessing bevacizumab in stages II and III carcinoma of the colon: results of NSABP protocol C-08. J Clin Oncol *29*, 11-16.

Almog, N. (2010). Molecular mechanisms underlying tumor dormancy. Cancer Lett *294*, 139-146.

Amin, E.M., Oltean, S., Hua, J., Gammons, M.V., Hamdollah-Zadeh, M., Welsh, G.I., Cheung, M.K., Ni, L., Kase, S., Rennel, E.S.*, et al.* (2011). WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. Cancer Cell *20*, 768-780.

Ammirante, M., Luo, J.L., Grivennikov, S., Nedospasov, S., and Karin, M. (2010). B-cell-derived lymphotoxin promotes castration-resistant prostate cancer. Nature *464*, 302-305.

Ansell, S.M., Tang, H., Kurtin, P.J., Koenig, P.A., Inwards, D.J., Shah, K., Ziesmer, S.C., Feldman, A.L., Rao, R., Gupta, M.*, et al.* (2011). Temsirolimus and rituximab in patients with relapsed or refractory mantle cell lymphoma: a phase 2 study. Lancet Oncol *12*, 361-368.

Aparicio, S., and Caldas, C. (2013). The implications of clonal genome evolution for cancer medicine. N Engl J Med *368*, 842-851.

Arany, Z., Foo, S.Y., Ma, Y., Ruas, J.L., Bommi-Reddy, A., Girnun, G., Cooper, M., Laznik, D., Chinsomboon, J., Rangwala, S.M.*, et al.* (2008). HIF-independent regulation of VEGF and angiogenesis by the transcriptional coactivator PGC-1alpha. Nature *451*, 1008-1012.

Arao, T., Matsumoto, K., Furuta, K., Kudo, K., Kaneda, H., Nagai, T., Sakai, K., Fujita, Y., Tamura, D., Aomatsu, K.*, et al.* (2011). Acquired drug resistance to vascular endothelial

growth factor receptor 2 tyrosine kinase inhibitor in human vascular endothelial cells. Anticancer Res *31*, 2787-2796.

Arenberg, D.A., Keane, M.P., DiGiovine, B., Kunkel, S.L., Morris, S.B., Xue, Y.Y., Burdick, M.D., Glass, M.C., Iannettoni, M.D., and Strieter, R.M. (1998). Epithelial-neutrophil activating peptide (ENA-78) is an important angiogenic factor in non-small cell lung cancer. J Clin Invest *102*, 465-472.

Arenberg, D.A., Kunkel, S.L., Polverini, P.J., Glass, M., Burdick, M.D., and Strieter, R.M. (1996a). Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. J Clin Invest *97*, 2792-2802.

Arenberg, D.A., Kunkel, S.L., Polverini, P.J., Morris, S.B., Burdick, M.D., Glass, M.C., Taub, D.T., Iannettoni, M.D., Whyte, R.I., and Strieter, R.M. (1996b). Interferon-gamma-inducible protein 10 (IP-10) is an angiostatic factor that inhibits human non-small cell lung cancer (NSCLC) tumorigenesis and spontaneous metastases. J Exp Med *184*, 981-992.

Arrondeau, J., Mir, O., Boudou-Rouquette, P., Coriat, R., Ropert, S., Dumas, G., Rodrigues, M.J., Rousseau, B., Blanchet, B., and Goldwasser, F. (2012). Sorafenib exposure decreases over time in patients with hepatocellular carcinoma. Invest New Drugs *30*, 2046-2049.

Arya, M., Patel, H.R., McGurk, C., Tatoud, R., Klocker, H., Masters, J., and Williamson, M. (2004). The importance of the CXCL12-CXCR4 chemokine ligand-receptor interaction in prostate cancer metastasis. J Exp Ther Oncol *4*, 291-303.

Aspord, C., Pedroza-Gonzalez, A., Gallegos, M., Tindle, S., Burton, E.C., Su, D., Marches, F., Banchereau, J., and Palucka, A.K. (2007). Breast cancer instructs dendritic cells to prime interleukin 13-secreting CD4+ T cells that facilitate tumor development. J Exp Med *204*, 1037-1047.

Augustin, H.G., Koh, G.Y., Thurston, G., and Alitalo, K. (2009). Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 165-177.

Baar, J., Silverman, P., Lyons, J., Fu, P., Abdul-Karim, F., Ziats, N., Wasman, J., Hartman, P., Jesberger, J., Dumadag, L.*, et al.* (2009). A vasculature-targeting regimen of preoperative docetaxel with or without bevacizumab for locally advanced breast cancer: impact on angiogenic biomarkers. Clin Cancer Res *15*, 3583-3590.

Bachelder, R.E., Crago, A., Chung, J., Wendt, M.A., Shaw, L.M., Robinson, G., and Mercurio, A.M. (2001). Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells. Cancer Res *61*, 5736-5740.

Baeriswyl, V., and Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. Semin Cancer Biol *19*, 329-337.

Baffert, F., Le, T., Thurston, G., and McDonald, D.M. (2006). Angiopoietin-1 decreases plasma leakage by reducing number and size of endothelial gaps in venules. Am J Physiol Heart Circ Physiol *290*, H107-118.

Bagri, A., Berry, L., Gunter, B., Singh, M., Kasman, I., Damico, L.A., Xiang, H., Schmidt, M., Fuh, G., Hollister, B.*, et al.* (2010). Effects of anti-VEGF treatment duration on tumor growth, tumor regrowth, and treatment efficacy. Clin Cancer Res *16*, 3887-3900.

Baish, J.W., and Jain, R.K. (2000). Fractals and cancer. Cancer Res *60*, 3683-3688.

Baker, L.C., Boult, J.K., Walker-Samuel, S., Chung, Y.L., Jamin, Y., Ashcroft, M., and Robinson, S.P. (2012). The HIF-pathway inhibitor NSC-134754 induces metabolic changes and anti-tumour activity while maintaining vascular function. Br J Cancer *106*, 1638-1647.

Balbin, M., Fueyo, A., Tester, A.M., Pendas, A.M., Pitiot, A.S., Astudillo, A., Overall, C.M., Shapiro, S.D., and Lopez-Otin, C. (2003). Loss of collagenase-2 confers increased skin tumor susceptibility to male mice. Nat Genet *35*, 252-257.

Baldwin, M.E., Catimel, B., Nice, E.C., Roufail, S., Hall, N.E., Stenvers, K.L., Karkkainen, M.J., Alitalo, K., Stacker, S.A., and Achen, M.G. (2001). The specificity of receptor binding by vascular endothelial growth factor-d is different in mouse and man. J Biol Chem *276*, 19166-19171.

Balkwill, F. (2004). Cancer and the chemokine network. Nat Rev Cancer *4*, 540-550.

Bando, H., Weich, H.A., Brokelmann, M., Horiguchi, S., Funata, N., Ogawa, T., and Toi, M. (2005). Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR-1, VEGFR-2 and prognosis in breast cancer. Br J Cancer *92*, 553-561.

Barleon, B., Sozzani, S., Zhou, D., Weich, H.A., Mantovani, A., and Marme, D. (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. Blood *87*, 3336-3343.

Basanta, D., Gatenby, R.A., and Anderson, A.R. (2012). Exploiting evolution to treat drug resistance: combination therapy and the double bind. Mol Pharm *9*, 914-921.

Bass, M.B., Sherman, S.I., Schlumberger, M.J., Davis, M.T., Kivman, L., Khoo, H.M., Notari, K.H., Peach, M., Hei, Y.J., and Patterson, S.D. (2010). Biomarkers as predictors of response to treatment with motesanib in patients with progressive advanced thyroid cancer. J Clin Endocrinol Metab *95*, 5018-5027.

Batchelor, T.T., Sorensen, A.G., di Tomaso, E., Zhang, W.T., Duda, D.G., Cohen, K.S., Kozak, K.R., Cahill, D.P., Chen, P.J., Zhu, M.*, et al.* (2007). AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients. Cancer Cell *11*, 83-95.

Bates, D.O., Catalano, P.J., Symonds, K.E., Varey, A.H., Ramani, P., O'Dwyer, P.J., Giantonio, B.J., Meropol, N.J., Benson, A.B., and Harper, S.J. (2012). Association between VEGF splice isoforms and progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. Clin Cancer Res *18*, 6384-6391.

Bates, D.O., Cui, T.G., Doughty, J.M., Winkler, M., Sugiono, M., Shields, J.D., Peat, D., Gillatt, D., and Harper, S.J. (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular

endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. Cancer Res *62*, 4123-4131.

Bates, R.C., and Mercurio, A.M. (2003). Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. Mol Biol Cell *14*, 1790-1800.

Beck, B., Driessens, G., Goossens, S., Youssef, K.K., Kuchnio, A., Caauwe, A., Sotiropoulou, P.A., Loges, S., Lapouge, G., Candi, A.*, et al.* (2011). A vascular niche and a VEGF-Nrp1 loop regulate the initiation and stemness of skin tumours. Nature *478*, 399-403.

Bellomo, D., Headrick, J.P., Silins, G.U., Paterson, C.A., Thomas, P.S., Gartside, M., Mould, A., Cahill, M.M., Tonks, I.D., Grimmond, S.M.*, et al.* (2000). Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (Vegfb) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. Circ Res *86*, E29-35.

Benjamin, L.E., Golijanin, D., Itin, A., Pode, D., and Keshet, E. (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. J Clin Invest *103*, 159-165.

Benoy, I.H., Salgado, R., Van Dam, P., Geboers, K., Van Marck, E., Scharpe, S., Vermeulen, P.B., and Dirix, L.Y. (2004). Increased serum interleukin-8 in patients with early and metastatic breast cancer correlates with early dissemination and survival. Clin Cancer Res *10*, 7157-7162.

Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer *3*, 401-410.

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

Bergers, G., and Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. Neuro Oncol *7*, 452-464.

Bergers, G., Song, S., Meyer-Morse, N., Bergsland, E., and Hanahan, D. (2003). Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. J Clin Invest *111*, 1287-1295.

Berra, E., Benizri, E., Ginouves, A., Volmat, V., Roux, D., and Pouyssegur, J. (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. EMBO J *22*, 4082-4090.

Bertolini, F., Shaked, Y., Mancuso, P., and Kerbel, R.S. (2006). The multifaceted circulating endothelial cell in cancer: towards marker and target identification. Nat Rev Cancer *6*, 835-845.

Betsholtz, C. (2004). Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. Cytokine Growth Factor Rev *15*, 215-228.

Bianchi, M., Sun, M., Jeldres, C., Shariat, S.F., Trinh, Q.D., Briganti, A., Tian, Z., Schmitges, J., Graefen, M., Perrotte, P.*, et al.* (2012). Distribution of metastatic sites in renal cell carcinoma: a population-based analysis. Ann Oncol *23*, 973-980.

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

Blagoev, K.B., Wilkerson, J., Stein, W.D., Motzer, R.J., Bates, S.E., and Fojo, A.T. (2013). Sunitinib does not accelerate tumor growth in patients with metastatic renal cell carcinoma. Cell Rep *3*, 277-281.

Blagosklonny, M.V. (2004). Antiangiogenic therapy and tumor progression. Cancer Cell *5*, 13-17.

Blank, C., Kuball, J., Voelkl, S., Wiendl, H., Becker, B., Walter, B., Majdic, O., Gajewski, T.F., Theobald, M., Andreesen, R.*, et al.* (2006). Blockade of PD-L1 (B7-H1) augments human tumor-specific T cell responses in vitro. Int J Cancer *119*, 317-327.

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

Boige, V., Malka, D., Bourredjem, A., Dromain, C., Baey, C., Jacques, N., Pignon, J.P., Vimond, N., Bouvet-Forteau, N., De Baere, T.*, et al.* (2012). Efficacy, safety, and biomarkers of single-agent bevacizumab therapy in patients with advanced hepatocellular carcinoma. Oncologist *17*, 1063-1072.

Bollrath, J., Phesse, T.J., von Burstin, V.A., Putoczki, T., Bennecke, M., Bateman, T., Nebelsiek, T., Lundgren-May, T., Canli, O., Schwitalla, S.*, et al.* (2009). gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. Cancer Cell *15*, 91-102.

Bonnal, S., Vigevani, L., and Valcarcel, J. (2012). The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. Nat Rev Drug Discov *11*, 847-859.

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

Bos, P.D., Nguyen, D.X., and Massague, J. (2010). Modeling metastasis in the mouse. Curr Opin Pharmacol *10*, 571-577.

Bostwick, D.G., and Murphy, G.P. (1998). Diagnosis and prognosis of renal cell carcinoma: highlights from an international consensus workshop. Semin Urol Oncol *16*, 46-52.

Bottos, A., and Bardelli, A. (2013). Oncogenes and angiogenesis: a way to personalize anti-angiogenic therapy? Cell Mol Life Sci.

Bourcier, C., Griseri, P., Grepin, R., Bertolotto, C., Mazure, N., and Pages, G. (2011). Constitutive ERK activity induces downregulation of tristetraprolin, a major protein controlling interleukin8/CXCL8 mRNA stability in melanoma cells. Am J Physiol Cell Physiol *301*, C609-618.

Bourque, C., and Houvras, Y. (2011). Hooked on zebrafish: insights into development and cancer of endocrine tissues. Endocr Relat Cancer *18*, R149-164.

Bracher, A., Cardona, A.S., Tauber, S., Fink, A.M., Steiner, A., Pehamberger, H., Niederleithner, H., Petzelbauer, P., Groger, M., and Loewe, R. (2013). Epidermal growth factor facilitates melanoma lymph node metastasis by influencing tumor lymphangiogenesis. J Invest Dermatol *133*, 230-238.

Bray, F., Jemal, A., Grey, N., Ferlay, J., and Forman, D. (2012). Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. Lancet Oncol *13*, 790-801.

Brem, S., Brem, H., Folkman, J., Finkelstein, D., and Patz, A. (1976). Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. Cancer Res *36*, 2807-2812.

Broutin, S., Ameur, N., Lacroix, L., Robert, T., Petit, B., Oumata, N., Talbot, M., Caillou, B., Schlumberger, M., Dupuy, C.*, et al.* (2011). Identification of soluble candidate biomarkers of therapeutic response to sunitinib in medullary thyroid carcinoma in preclinical models. Clin Cancer Res *17*, 2044-2054.

Brown, E.R., Charles, K.A., Hoare, S.A., Rye, R.L., Jodrell, D.I., Aird, R.E., Vora, R., Prabhakar, U., Nakada, M., Corringham, R.E.*, et al.* (2008). A clinical study assessing the tolerability and biological effects of infliximab, a TNF-alpha inhibitor, in patients with advanced cancer. Ann Oncol *19*, 1340-1346.

Brown, J.L., Cao, Z.A., Pinzon-Ortiz, M., Kendrew, J., Reimer, C., Wen, S., Zhou, J.Q., Tabrizi, M., Emery, S., McDermott, B.*, et al.* (2010). A human monoclonal anti-ANG2 antibody leads to broad antitumor activity in combination with VEGF inhibitors and chemotherapy agents in preclinical models. Mol Cancer Ther *9*, 145-156.

Bui, J.D., and Schreiber, R.D. (2007). Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? Curr Opin Immunol *19*, 203-208.

Bukowski, R.M., Kabbinavar, F.F., Figlin, R.A., Flaherty, K., Srinivas, S., Vaishampayan, U., Drabkin, H.A., Dutcher, J., Ryba, S., Xia, Q.*, et al.* (2007). Randomized phase II study of erlotinib combined with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer. J Clin Oncol *25*, 4536-4541.

Burger, M., Glodek, A., Hartmann, T., Schmitt-Graff, A., Silberstein, L.E., Fujii, N., Kipps, T.J., and Burger, J.A. (2003). Functional expression of CXCR4 (CD184) on small-cell lung cancer cells mediates migration, integrin activation, and adhesion to stromal cells. Oncogene *22*, 8093-8101.

Burger, R.A. (2010). Role of vascular endothelial growth factor inhibitors in the treatment of gynecologic malignancies. J Gynecol Oncol *21*, 3-11.

Burger, R.A., Brady, M.F., Bookman, M.A., Fleming, G.F., Monk, B.J., Huang, H., Mannel, R.S., Homesley, H.D., Fowler, J., Greer, B.E.*, et al.* (2011). Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. N Engl J Med *365*, 2473-2483.

Burstein, H.J., Elias, A.D., Rugo, H.S., Cobleigh, M.A., Wolff, A.C., Eisenberg, P.D., Lehman, M., Adams, B.J., Bello, C.L., DePrimo, S.E., *et al.* (2008). Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. J Clin Oncol *26*, 1810-1816.

Cabioglu, N., Summy, J., Miller, C., Parikh, N.U., Sahin, A.A., Tuzlali, S., Pumiglia, K., Gallick, G.E., and Price, J.E. (2005). CXCL-12/stromal cell-derived factor-1alpha transactivates HER2-neu in breast cancer cells by a novel pathway involving Src kinase activation. Cancer Res *65*, 6493-6497.

Cacheux, W., Boisserie, T., Staudacher, L., Vignaux, O., Dousset, B., Soubrane, O., Terris, B., Mateus, C., Chaussade, S., and Goldwasser, F. (2008). Reversible tumor growth acceleration following bevacizumab interruption in metastatic colorectal cancer patients scheduled for surgery. Ann Oncol *19*, 1659-1661.

Cao, R., Ji, H., Feng, N., Zhang, Y., Yang, X., Andersson, P., Sun, Y., Tritsaris, K., Hansen, A.J., Dissing, S., *et al.* (2012a). Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis. Proc Natl Acad Sci U S A *109*, 15894-15899.

Cao, Y. (2010). Adipose tissue angiogenesis as a therapeutic target for obesity and metabolic diseases. Nat Rev Drug Discov *9*, 107-115.

Cao, Y., E, G., Wang, E., Pal, K., Dutta, S.K., Bar-Sagi, D., and Mukhopadhyay, D. (2012b). VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. Cancer Res *72*, 3912-3918.

Cao, Y., Hoeppner, L., Bach, S., E, G., Guo, Y., Wang, E., Wu, J., Cowley, M.J., Chang, D.K., Waddell, N., *et al.* (2013). Neuropilin-2 promotes extravasation and metastasis by interacting with endothelial alpha5 integrin. Cancer Res.

Cao, Y., and Liu, Q. (2007). Therapeutic targets of multiple angiogenic factors for the treatment of cancer and metastasis. Adv Cancer Res *97*, 203-224.

Cao, Y., Wang, L., Nandy, D., Zhang, Y., Basu, A., Radisky, D., and Mukhopadhyay, D. (2008). Neuropilin-1 upholds dedifferentiation and propagation phenotypes of renal cell carcinoma cells by activating Akt and sonic hedgehog axes. Cancer Res *68*, 8667-8672.

Carew, J.S., Esquivel, J.A., 2nd, Espitia, C.M., Schultes, C.M., Mulbaier, M., Lewis, J.D., Janssen, B., Giles, F.J., and Nawrocki, S.T. (2012). ELR510444 inhibits tumor growth and angiogenesis by abrogating HIF activity and disrupting microtubules in renal cell carcinoma. PLoS ONE *7*, e31120.

Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. Nat Med *9*, 653-660.

Carmeliet, P., and Collen, D. (1999). Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. Curr Top Microbiol Immunol *237*, 133-158.

Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P.*, et al.* (1998). Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. Nature *394*, 485-490.

Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vanderhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C.*, et al.* (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature *380*, 435-439.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. Nature *407*, 249-257.

Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. Nature *473*, 298-307.

Cartwright, T.H., Yim, Y.M., Yu, E., Chung, H., Halm, M., and Forsyth, M. (2012). Survival outcomes of bevacizumab beyond progression in metastatic colorectal cancer patients treated in US community oncology. Clin Colorectal Cancer *11*, 238-246.

Casanovas, O., Hicklin, D.J., Bergers, G., and Hanahan, D. (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. Cancer Cell *8*, 299-309.

Catena, R., Larzabal, L., Larrayoz, M., Molina, E., Hermida, J., Agorreta, J., Montes, R., Pio, R., Montuenga, L.M., and Calvo, A. (2010). VEGF(1)(2)(1)b and VEGF(1)(6)(5)b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. Mol Cancer *9*, 320.

Catena, R., Muniz-Medina, V., Moralejo, B., Javierre, B., Best, C.J., Emmert-Buck, M.R., Green, J.E., Baker, C.C., and Calvo, A. (2007). Increased expression of VEGF121/VEGF165-189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis. Int J Cancer *120*, 2096-2109.

Catz, S.D., and Johnson, J.L. (2001). Transcriptional regulation of bcl-2 by nuclear factor kappa B and its significance in prostate cancer. Oncogene *20*, 7342-7351.

Cella, D., Li, J.Z., Cappelleri, J.C., Bushmakin, A., Charbonneau, C., Kim, S.T., Chen, I., and Motzer, R.J. (2008). Quality of life in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib or interferon alfa: results from a phase III randomized trial. J Clin Oncol *26*, 3763-3769.

Ceol, C.J., Houvras, Y., White, R.M., and Zon, L.I. (2008). Melanoma biology and the promise of zebrafish. Zebrafish *5*, 247-255.

Chae, S.S., Kamoun, W.S., Farrar, C.T., Kirkpatrick, N.D., Niemeyer, E., de Graaf, A.M., Sorensen, A.G., Munn, L.L., Jain, R.K., and Fukumura, D. (2010). Angiopoietin-2 interferes with anti-VEGFR2-induced vessel normalization and survival benefit in mice bearing gliomas. Clin Cancer Res *16*, 3618-3627.

Chan, K.C., Jiang, P., Zheng, Y.W., Liao, G.J., Sun, H., Wong, J., Siu, S.S., Chan, W.C.,

Chan, S.L., Chan, A.T., *et al.* (2013). Cancer genome scanning in plasma: detection of tumor-associated copy number aberrations, single-nucleotide variants, and tumoral heterogeneity by massively parallel sequencing. Clin Chem *59*, 211-224.

Chen, C., Edelstein, L.C., and Gelinas, C. (2000). The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). Mol Cell Biol *20*, 2687-2695.

Chen, R., Mias, G.I., Li-Pook-Than, J., Jiang, L., Lam, H.Y., Miriami, E., Karczewski, K.J., Hariharan, M., Dewey, F.E., Cheng, Y., *et al.* (2012). Personal omics profiling reveals dynamic molecular and medical phenotypes. Cell *148*, 1293-1307.

Cheung, N., Wong, M.P., Yuen, S.T., Leung, S.Y., and Chung, L.P. (1998). Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. Hum Pathol *29*, 910-914.

Choueiri, T.K., Schutz, F.A., Je, Y., Rosenberg, J.E., and Bellmunt, J. (2010). Risk of arterial thromboembolic events with sunitinib and sorafenib: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. J Clin Oncol *28*, 2280-2285.

Chowdhury, T., Prichard-Jones, K., Sebire, N.J., Bier, N., Cherian, A., Sullivan, M.O., O'Meara, A., and Anderson, J. (2013). Persistent complete response after single-agent sunitinib treatment in a case of TFE translocation positive relapsed metastatic pediatric renal cell carcinoma. J Pediatr Hematol Oncol *35*, e1-3.

Christofori, G., Naik, P., and Hanahan, D. (1995). Vascular endothelial growth factor and its receptors, flt-1 and flk-1, are expressed in normal pancreatic islets and throughout islet cell tumorigenesis. Mol Endocrinol *9*, 1760-1770.

Chuang, M.J., Sun, K.H., Tang, S.J., Deng, M.W., Wu, Y.H., Sung, J.S., Cha, T.L., and Sun, G.H. (2008). Tumor-derived tumor necrosis factor-alpha promotes progression and epithelial-mesenchymal transition in renal cell carcinoma cells. Cancer Sci *99*, 905-913.

Chung, A.S., Kowanetz, M., Wu, X., Zhuang, G., Ngu, H., Finkle, D., Komuves, L., Peale, F., and Ferrara, N. (2012). Differential drug class-specific metastatic effects following treatment with a panel of angiogenesis inhibitors. J Pathol *227*, 404-416.

Claffey, K.P., Shih, S.C., Mullen, A., Dziennis, S., Cusick, J.L., Abrams, K.R., Lee, S.W., and Detmar, M. (1998). Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. Mol Biol Cell *9*, 469-481.

Cockman, M.E., Masson, N., Mole, D.R., Jaakkola, P., Chang, G.W., Clifford, S.C., Maher, E.R., Pugh, C.W., Ratcliffe, P.J., and Maxwell, P.H. (2000). Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. J Biol Chem *275*, 25733-25741.

Cohen-Eliav, M., Golan-Gerstl, R., Siegfried, Z., Andersen, C.L., Thorsen, K., Orntoft, T.F., Mu, D., and Karni, R. (2013). The splicing factor SRSF6 is amplified and is an oncoprotein in lung and colon cancers. J Pathol *229*, 630-639.

Cohn, D.E., Kim, K.H., Resnick, K.E., O'Malley, D.M., and Straughn, J.M., Jr. (2011). At what cost does a potential survival advantage of bevacizumab make sense for the primary treatment of ovarian cancer? A cost-effectiveness analysis. J Clin Oncol *29*, 1247-1251.

Colotta, F., Allavena, P., Sica, A., Garlanda, C., and Mantovani, A. (2009). Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: links to genetic instability. Carcinogenesis *30*, 1073-1081.

Condeelis, J., and Pollard, J.W. (2006). Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. Cell *124*, 263-266.

Conley, S.J., Gheordunescu, E., Kakarala, P., Newman, B., Korkaya, H., Heath, A.N., Clouthier, S.G., and Wicha, M.S. (2012). Antiangiogenic agents increase breast cancer stem cells via the generation of tumor hypoxia. Proc Natl Acad Sci U S A *109*, 2784-2789.

Connolly, D.T., Olander, J.V., Heuvelman, D., Nelson, R., Monsell, R., Siegel, N., Haymore, B.L., Leimgruber, R., and Feder, J. (1989). Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. J Biol Chem *264*, 20017-20024.

Coppe, J.P., Kauser, K., Campisi, J., and Beausejour, C.M. (2006). Secretion of vascular endothelial growth factor by primary human fibroblasts at senescence. J Biol Chem *281*, 29568-29574.

Cornu, J.N., Roupret, M., Bensalah, K., Oudard, S., and Patard, J.J. (2008). [Antiangiogenics: new therapeutic standards in metastatic kidney cancer]. Prog Urol *18 Suppl 4*, S69-76.

Couvelard, A., O'Toole, D., Turley, H., Leek, R., Sauvanet, A., Degott, C., Ruszniewski, P., Belghiti, J., Harris, A.L., Gatter, K.*, et al.* (2005). Microvascular density and hypoxia-inducible factor pathway in pancreatic endocrine tumours: negative correlation of microvascular density and VEGF expression with tumour progression. Br J Cancer *92*, 94-101.

Covello, K.L., Simon, M.C., and Keith, B. (2005). Targeted replacement of hypoxia-inducible factor-1alpha by a hypoxia-inducible factor-2alpha knock-in allele promotes tumor growth. Cancer Res *65*, 2277-2286.

Crawford, Y., and Ferrara, N. (2009). VEGF inhibition: insights from preclinical and clinical studies. Cell Tissue Res *335*, 261-269.

Cristofaro, B., Shi, Y., Faria, M., Suchting, S., Leroyer, A.S., Trindade, A., Duarte, A., Zovein, A.C., Iruela-Arispe, M.L., Nih, L.R.*, et al.* (2013). Dll4-Notch signaling determines the formation of native arterial collateral networks and arterial function in mouse ischemia models. Development *140*, 1720-1729.

Dawson, M.R., Duda, D.G., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2009). VEGFR1-activity-independent metastasis formation. Nature *461*, E4; discussion E5.

Dawson, S.J., Tsui, D.W., Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, O.M., Chin, S.F., Dunning, M.J., Gale, D., Forshew, T., Mahler-Araujo, B.*, et al.* (2013). Analysis of circulating tumor DNA to monitor metastatic breast cancer. N Engl J Med *368*, 1199-1209.

De Bock, K., Mazzone, M., and Carmeliet, P. (2011). Antiangiogenic therapy, hypoxia, and metastasis: risky liaisons, or not? Nat Rev Clin Oncol *8*, 393-404.

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

de Gramont, A., Chibaudel, B., Bachet, J.B., Larsen, A.K., Tournigand, C., Louvet, C., and Andre, T. (2011). From chemotherapy to targeted therapy in adjuvant treatment for stage III colon cancer. Semin Oncol *38*, 521-532.

De Palma, M., and Naldini, L. (2009). Tie2-expressing monocytes (TEMs): novel targets and vehicles of anticancer therapy? Biochim Biophys Acta *1796*, 5-10.

De Stefano, A., Carlomagno, C., Pepe, S., Bianco, R., and De Placido, S. (2011). Bevacizumab-related arterial hypertension as a predictive marker in metastatic colorectal cancer patients. Cancer Chemother Pharmacol *68*, 1207-1213.

del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J.S., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., Fukamizu, A.*, et al.* (2010). Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. Blood *116*, 4025-4033.

DeNardo, D.G., Barreto, J.B., Andreu, P., Vasquez, L., Tawfik, D., Kolhatkar, N., and Coussens, L.M. (2009). CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. Cancer Cell *16*, 91-102.

Desar, I.M., Mulder, S.F., Stillebroer, A.B., van Spronsen, D.J., van der Graaf, W.T., Mulders, P.F., and van Herpen, C.M. (2009). The reverse side of the victory: flare up of symptoms after discontinuation of sunitinib or sorafenib in renal cell cancer patients. A report of three cases. Acta Oncol *48*, 927-931.

Dickson, P.V., Hamner, J.B., Sims, T.L., Fraga, C.H., Ng, C.Y., Rajasekeran, S., Hagedorn, N.L., McCarville, M.B., Stewart, C.F., and Davidoff, A.M. (2007). Bevacizumab-induced transient remodeling of the vasculature in neuroblastoma xenografts results in improved delivery and efficacy of systemically administered chemotherapy. Clin Cancer Res *13*, 3942-3950.

Dor, Y., Porat, R., and Keshet, E. (2001). Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. Am J Physiol Cell Physiol *280*, C1367-1374.

Du, M., Qiu, Q., Gruslin, A., Gordon, J., He, M., Chan, C.C., Li, D., and Tsang, B.K. (2013). SB225002 promotes mitotic catastrophe in chemo-sensitive and -resistant ovarian cancer cells independent of p53 status in vitro. PLoS ONE *8*, e54572.

Dudek, A.Z., Zolnierek, J., Dham, A., Lindgren, B.R., and Szczylik, C. (2009). Sequential therapy with sorafenib and sunitinib in renal cell carcinoma. Cancer *115*, 61-67.

Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. Immunity *21*, 137-148.

Ebos, J.M., Bocci, G., Man, S., Thorpe, P.E., Hicklin, D.J., Zhou, D., Jia, X., and Kerbel, R.S. (2004). A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. Mol Cancer Res *2*, 315-326.

Ebos, J.M., and Kerbel, R.S. (2011). Antiangiogenic therapy: impact on invasion, disease progression, and metastasis. Nat Rev Clin Oncol *8*, 210-221.

Ebos, J.M., Lee, C.R., Christensen, J.G., Mutsaers, A.J., and Kerbel, R.S. (2007). Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 17069-17074.

Ebos, J.M., Lee, C.R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G.A., Christensen, J.G., and Kerbel, R.S. (2009). Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. Cancer Cell *15*, 232-239.

Edmond, V., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S., and Eymin, B. (2011a). SRSF2 is required for sodium butyrate-mediated p21(WAF1) induction and premature senescence in human lung carcinoma cell lines. Cell Cycle *10*, 1968-1977.

Edmond, V., Moysan, E., Khochbin, S., Matthias, P., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S., and Eymin, B. (2011b). Acetylation and phosphorylation of SRSF2 control cell fate decision in response to cisplatin. EMBO J *30*, 510-523.

Ehrmann, R.L., and Knoth, M. (1968). Choriocarcinoma. Transfilter stimulation of vasoproliferation in the hamster cheek pouch. Studied by light and electron microscopy. J Natl Cancer Inst *41*, 1329-1341.

Eisen, T., Oudard, S., Szczylik, C., Gravis, G., Heinzer, H., Middleton, R., Cihon, F., Anderson, S., Shah, S., Bukowski, R.*, et al.* (2008). Sorafenib for older patients with renal cell carcinoma: subset analysis from a randomized trial. J Natl Cancer Inst *100*, 1454-1463.

Ellis, L.M. (2006). The role of neuropilins in cancer. Mol Cancer Ther *5*, 1099-1107.

Ellis, P.M., and Al-Saleh, K. (2012). Multitargeted anti-angiogenic agents and NSCLC: clinical update and future directions. Crit Rev Oncol Hematol *84*, 47-58.

Enge, M., Bjarnegard, M., Gerhardt, H., Gustafsson, E., Kalen, M., Asker, N., Hammes, H.P., Shani, M., Fassler, R., and Betsholtz, C. (2002). Endothelium-specific platelet-derived growth factor-B ablation mimics diabetic retinopathy. EMBO J *21*, 4307-4316.

Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A.*, et al.* (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell *107*, 43-54.

Erez, N., Truitt, M., Olson, P., Arron, S.T., and Hanahan, D. (2010). Cancer-Associated Fibroblasts Are Activated in Incipient Neoplasia to Orchestrate Tumor-Promoting Inflammation in an NF-kappaB-Dependent Manner. Cancer Cell *17*, 135-147.

Eriksson, A., Cao, R., Pawliuk, R., Berg, S.M., Tsang, M., Zhou, D., Fleet, C., Tritsaris, K., Dissing, S., Leboulch, P.*, et al.* (2002). Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PlGF-1/VEGF heterodimers. Cancer Cell *1*, 99-108.

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG) (2005). Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. Lancet *365*, 1687-1717.

Escudier, B., Bellmunt, J., Negrier, S., Bajetta, E., Melichar, B., Bracarda, S., Ravaud, A., Golding, S., Jethwa, S., and Sneller, V. (2010). Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival. J Clin Oncol *28*, 2144-2150.

Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W.M., Szczylik, C., Oudard, S., Staehler, M., Negrier, S., Chevreau, C., Desai, A.A., Rolland, F.*, et al.* (2009a). Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: Final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial. J Clin Oncol *27*, 3312-3318.

Escudier, B., and Kataja, V. (2010). Renal cell carcinoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol *21 Suppl 5*, v137-139.

Escudier, B., Pluzanska, A., Koralewski, P., Ravaud, A., Bracarda, S., Szczylik, C., Chevreau, C., Filipek, M., Melichar, B., Bajetta, E.*, et al.* (2007). Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. Lancet *370*, 2103-2111.

Escudier, B., Roigas, J., Gillessen, S., Harmenberg, U., Srinivas, S., Mulder, S.F., Fountzilas, G., Peschel, C., Flodgren, P., Maneval, E.C.*, et al.* (2009b). Phase II study of sunitinib administered in a continuous once-daily dosing regimen in patients with cytokine-refractory metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol *27*, 4068-4075.

Fairbrother, W.G., Yeh, R.F., Sharp, P.A., and Burge, C.B. (2002). Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. Science *297*, 1007-1013.

Falcon, B.L., Hashizume, H., Koumoutsakos, P., Chou, J., Bready, J.V., Coxon, A., Oliner, J.D., and McDonald, D.M. (2009). Contrasting actions of selective inhibitors of angiopoietin-1 and angiopoietin-2 on the normalization of tumor blood vessels. Am J Pathol *175*, 2159-2170.

Farhat, F.S., Tfayli, A., Fakhruddin, N., Mahfouz, R., Otrock, Z.K., Alameddine, R.S., Awada, A.H., and Shamseddine, A. (2012). Expression, prognostic and predictive impact of VEGF and bFGF in non-small cell lung cancer. Crit Rev Oncol Hematol *84*, 149-160.

Ferrara, N. (2001). Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis. Am J Physiol Cell Physiol *280*, C1358-1366.

Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. Endocr Rev *25*, 581-611.

Ferrara, N. (2009). Vascular endothelial growth factor. Arterioscler Thromb Vasc Biol *29*, 789-791.

Ferrara, N. (2010a). Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev *21*, 21-26.
Ferrara, N. (2010b). Role of myeloid cells in vascular endothelial growth factor-independent tumor angiogenesis. Curr Opin Hematol *17*, 219-224.

Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature *380*, 439-442.

Ferrara, N., and Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. Endocr Rev *18*, 4-25.

Ferrara, N., Gerber, H.P., and LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. Nat Med *9*, 669-676.

Ferrara, N., and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun *161*, 851-858.

Ferrara, N., Hillan, K.J., Gerber, H.P., and Novotny, W. (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. Nat Rev Drug Discov *3*, 391-400.

Fillies, T., Werkmeister, R., van Diest, P.J., Brandt, B., Joos, U., and Buerger, H. (2005). HIF1-alpha overexpression indicates a good prognosis in early stage squamous cell carcinomas of the oral floor. BMC Cancer *5*, 84.

Finke, J.H., Rini, B., Ireland, J., Rayman, P., Richmond, A., Golshayan, A., Wood, L., Elson, P., Garcia, J., Dreicer, R.*, et al.* (2008). Sunitinib reverses type-1 immune suppression and decreases T-regulatory cells in renal cell carcinoma patients. Clin Cancer Res *14*, 6674-6682.

Fischer, C., Jonckx, B., Mazzone, M., Zacchigna, S., Loges, S., Pattarini, L., Chorianopoulos, E., Liesenborghs, L., Koch, M., De Mol, M.*, et al.* (2007). Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. Cell *131*, 463-475.

Flavell, J.R., Baumforth, K.R., Wood, V.H., Davies, G.L., Wei, W., Reynolds, G.M., Morgan, S., Boyce, A., Kelly, G.L., Young, L.S.*, et al.* (2008). Down-regulation of the TGF-beta target gene, PTPRK, by the Epstein-Barr virus encoded EBNA1 contributes to the growth and survival of Hodgkin lymphoma cells. Blood *111*, 292-301.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N Engl J Med *285*, 1182-1186.

Folkman, J. (1990). What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst *82*, 4-6.

Folkman, J. (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med *1*, 27-31.

Folkman, J. (2002). Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol *29*, 15-18.
Folkman, J. (2006). Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action. Exp Cell Res *312*, 594-607.

Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? Nat Rev Drug Discov *6*, 273-286.

Fong, G.H., Rossant, J., Gertsenstein, M., and Breitman, M.L. (1995). Role of Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. Nature *376*, 66-70.

Forshew, T., Murtaza, M., Parkinson, C., Gale, D., Tsui, D.W., Kaper, F., Dawson, S.J., Piskorz, A.M., Jimenez-Linan, M., Bentley, D*., et al.* (2012). Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. Sci Transl Med *4*, 136ra168.

Forsythe, J.A., Jiang, B.-H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L. (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by Hypoxia-inducible factor 1. Mol Cell Biol *16*, 4604-4613.

Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P., and Kerbel, R.S. (2011). Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. Nat Rev Cancer *11*, 135-141.

Fridlender, Z.G., Sun, J., Kim, S., Kapoor, V., Cheng, G., Ling, L., Worthen, G.S., and Albelda, S.M. (2009). Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. Cancer Cell *16*, 183-194.

Friedman, H.S., Prados, M.D., Wen, P.Y., Mikkelsen, T., Schiff, D., Abrey, L.E., Yung, W.K., Paleologos, N., Nicholas, M.K., Jensen, R*., et al.* (2009). Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. J Clin Oncol *27*, 4733-4740.

Fukumura, D., Duda, D.G., Munn, L.L., and Jain, R.K. (2010). Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models. Microcirculation *17*, 206-225.
Gabrilovich, D.I., Chen, H.L., Girgis, K.R., Cunningham, H.T., Meny, G.M., Nadaf, S., Kavanaugh, D., and Carbone, D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. Nat Med *2*, 1096-1103.

Gabrilovich, D.I., Ishida, T., Nadaf, S., Ohm, J.E., and Carbone, D.P. (1999). Antibodies to vascular endothelial growth factor enhance the efficacy of cancer immunotherapy by improving endogenous dendritic cell function. Clin Cancer Res *5*, 2963-2970.

Gabrilovich, D.I., Patterson, S., Harvey, J.J., Woods, G.M., Elsley, W., and Knight, S.C. (1995). Defects in the function of dendritic cells in murine retroviral infection. Adv Exp Med Biol *378*, 469-472.

Gale, N.W., Dominguez, M.G., Noguera, I., Pan, L., Hughes, V., Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Adams, N.C., Lin, H.C., Holash, J.*, et al.* (2004). Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. Proc Natl Acad Sci U S A *101*, 15949-15954.

Gallimore, A.M., and Simon, A.K. (2008). Positive and negative influences of regulatory T cells on tumour immunity. Oncogene *27*, 5886-5893.

Garcia-Donas, J., Esteban, E., Leandro-Garcia, L.J., Castellano, D.E., del Alba, A.G., Climent, M.A., Arranz, J.A., Gallardo, E., Puente, J., Bellmunt, J.*, et al.* (2011). Single nucleotide polymorphism associations with response and toxic effects in patients with advanced renal-cell carcinoma treated with first-line sunitinib: a multicentre, observational, prospective study. Lancet Oncol *12*, 1143-1150.

Garkavtsev, I., Kozin, S.V., Chernova, O., Xu, L., Winkler, F., Brown, E., Barnett, G.H., and Jain, R.K. (2004). The candidate tumour suppressor protein ING4 regulates brain tumour growth and angiogenesis. Nature *428*, 328-332.

Garraway, L.A., and Baselga, J. (2012). Whole-genome sequencing and cancer therapy: is too much ever enough? Cancer Discov *2*, 766-768.

Gerber, H.P., and Ferrara, N. (2005). Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. Cancer Res *65*, 671-680.

Gerber, H.P., Malik, A.K., Solar, G.P., Sherman, D., Liang, X.H., Meng, G., Hong, K., Marsters, J.C., and Ferrara, N. (2002). VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. Nature *417*, 954-958.

Gerhardt, H., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. Cell Tissue Res *314*, 15-23.

Gerlinger, M., Rowan, A.J., Horswell, S., Larkin, J., Endesfelder, D., Gronroos, E., Martinez, P., Matthews, N., Stewart, A., Tarpey, P.*, et al.* (2012). Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. N Engl J Med *366*, 883-892.

Gherardi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., and Vande Woude, G. (2012). Targeting MET in cancer: rationale and progress. Nat Rev Cancer *12*, 89-103.

Ghosh, G., and Adams, J.A. (2011). Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. FEBS J *278*, 587-597.

Gierach, G.L., Lacey, J.V., Jr., Schatzkin, A., Leitzmann, M.F., Richesson, D., Hollenbeck, A.R., and Brinton, L.A. (2008). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and breast cancer risk in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study. Breast Cancer Res *10*, R38.

Gimenez-Bachs, J.M., Salinas-Sanchez, A.S., Sanchez-Sanchez, F., Lorenzo-Romero, J.G., Donate-Moreno, M.J., Pastor-Navarro, H., Carrion-Lopez, P., Escribano-Martinez, J., and Virseda-Rodriguez, J.A. (2007). VHL protein alterations in sporadic renal cell carcinoma. Clin Oncol (R Coll Radiol) *19*, 784-789.

Ginestier, C., Liu, S., Diebel, M.E., Korkaya, H., Luo, M., Brown, M., Wicinski, J., Cabaud, O., Charafe-Jauffret, E., Birnbaum, D.*, et al.* (2010). CXCR1 blockade selectively targets human breast cancer stem cells in vitro and in xenografts. J Clin Invest *120*, 485-497.

Giuliano, S., and Pages, G. (2013). Mechanisms of resistance to anti-angiogenesis therapies. Biochimie *95*, 1110-1119.

Goda, A.E., Koyama, M., Sowa, Y., Elokely, K.M., Yoshida, T., Kim, B.Y., and Sakai, T. (2013). Molecular mechanisms of the antitumor activity of SB225002: A novel microtubule inhibitor. Biochem Pharmacol *85*, 1741-1752.

Goede, V., Coutelle, O., Neuneier, J., Reinacher-Schick, A., Schnell, R., Koslowsky, T.C., Weihrauch, M.R., Cremer, B., Kashkar, H., Odenthal, M.*, et al.* (2010). Identification of serum angiopoietin-2 as a biomarker for clinical outcome of colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing therapy. Br J Cancer *103*, 1407-1414.

Goel, S., Duda, D.G., Xu, L., Munn, L.L., Boucher, Y., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2011). Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. Physiol Rev *91*, 1071-1121.

Gordan, J.D., Bertout, J.A., Hu, C.J., Diehl, J.A., and Simon, M.C. (2007a). HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. Cancer Cell *11*, 335-347.

Gordan, J.D., Thompson, C.B., and Simon, M.C. (2007b). HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. Cancer Cell *12*, 108-113.

Gorski, D.H., Mauceri, H.J., Salloum, R.M., Gately, S., Hellman, S., Beckett, M.A., Sukhatme, V.P., Soff, G.A., Kufe, D.W., and Weichselbaum, R.R. (1998). Potentiation of the antitumor effect of ionizing radiation by brief concomitant exposures to angiostatin. Cancer Res *58*, 5686-5689.

Gospodarowicz, D., Abraham, J.A., and Schilling, J. (1989). Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. Proc Natl Acad Sci U S A *86*, 7311-7315.

Gospodarowicz, D., and Thakral, K.K. (1978). Production a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. Proc Natl Acad Sci U S A *75*, 847-851.

Gotink, K.J., Broxterman, H.J., Labots, M., de Haas, R.R., Dekker, H., Honeywell, R.J., Rudek, M.A., Beerepoot, L.V., Musters, R.J., Jansen, G.*, et al.* (2011). Lysosomal sequestration of sunitinib: a novel mechanism of drug resistance. Clin Cancer Res *17*, 7337-7346.

Grau, S., Thorsteinsdottir, J., von Baumgarten, L., Winkler, F., Tonn, J.C., and Schichor, C. (2011). Bevacizumab can induce reactivity to VEGF-C and -D in human brain and tumour derived endothelial cells. J Neurooncol *104*, 103-112.

Greenblatt, M., and Shubik, P. (1968). Tumor angiogenesis: transfilter diffusion studies in the hamster by the transparent chamber technique. J Natl Cancer Inst *41*, 111-124.

Grepin, R., Guyot, M., Jacquin, M., Durivault, J., Chamorey, E., Sudaka, A., Serdjebi, C., Lacarelle, B., Scoazec, J.Y., Negrier, S.*, et al.* (2012). Acceleration of clear cell renal cell carcinoma growth in mice following bevacizumab/Avastin treatment: the role of CXCL cytokines. Oncogene *31*, 1683-1694.

Gressett, S.M., and Shah, S.R. (2009). Intricacies of bevacizumab-induced toxicities and their management. Ann Pharmacother *43*, 490-501.
Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G.Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L.*, et al.* (2009). IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. Cancer Cell *15*, 103-113.

Grothey, A., Sugrue, M.M., Purdie, D.M., Dong, W., Sargent, D., Hedrick, E., and Kozloff, M. (2008). Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE). J Clin Oncol *26*, 5326-5334.

Guleng, B., Tateishi, K., Ohta, M., Kanai, F., Jazag, A., Ijichi, H., Tanaka, Y., Washida, M., Morikane, K., Fukushima, Y.*, et al.* (2005). Blockade of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 axis attenuates in vivo tumor growth by inhibiting angiogenesis in a vascular endothelial growth factor-independent manner. Cancer Res *65*, 5864-5871.

Guo, G., Gui, Y., Gao, S., Tang, A., Hu, X., Huang, Y., Jia, W., Li, Z., He, M., Sun, L.*, et al.* (2012). Frequent mutations of genes encoding ubiquitin-mediated proteolysis pathway components in clear cell renal cell carcinoma. Nat Genet *44*, 17-19.

Gupta, R.A., and Dubois, R.N. (2001). Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. Nat Rev Cancer *1*, 11-21.

Haiko, P., Makinen, T., Keskitalo, S., Taipale, J., Karkkainen, M.J., Baldwin, M.E., Stacker, S.A., Achen, M.G., and Alitalo, K. (2008). Deletion of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) and VEGF-D is not equivalent to VEGF receptor 3 deletion in mouse embryos. Mol Cell Biol *28*, 4843-4850.

Hainaud, P., Contreres, J.O., Villemain, A., Liu, L.X., Plouet, J., Tobelem, G., and Dupuy, E. (2006). The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. Cancer Res *66*, 8501-8510.

Hamano, Y., Zeisberg, M., Sugimoto, H., Lively, J.C., Maeshima, Y., Yang, C., Hynes, R.O., Werb, Z., Sudhakar, A., and Kalluri, R. (2003). Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV alpha3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via alphaV beta3 integrin. Cancer Cell *3*, 589-601.

Hamerlik, P., Lathia, J.D., Rasmussen, R., Wu, Q., Bartkova, J., Lee, M., Moudry, P., Bartek, J., Jr., Fischer, W., Lukas, J.*, et al.* (2012). Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. J Exp Med *209*, 507-520.

Hammes, H.P., Lin, J., Wagner, P., Feng, Y., Vom Hagen, F., Krzizok, T., Renner, O., Breier, G., Brownlee, M., and Deutsch, U. (2004). Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. Diabetes *53*, 1104-1110.

Hanahan, D. (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. Science *277*, 48-50.

Hanahan, D., and Coussens, L.M. (2012). Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. Cancer Cell *21*, 309-322.
Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell *86*, 353-364.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. Cell *144*, 646-674.

Hansen, T.F., Christensen, R., Andersen, R.F., Garm Spindler, K.L., Johnsson, A., and Jakobsen, A. (2012). The predictive value of single nucleotide polymorphisms in the VEGF system to the efficacy of first-line treatment with bevacizumab plus chemotherapy in patients with metastatic colorectal cancer: results from the Nordic ACT trial. Int J Colorectal Dis *27*, 715-720.

Hao, N.B., Lu, M.H., Fan, Y.H., Cao, Y.L., Zhang, Z.R., and Yang, S.M. (2012). Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. Clin Dev Immunol *2012*, 948098.

Harper, S.J., and Bates, D.O. (2008). VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? Nat Rev Cancer *8*, 880-887.

Harris, S., Craze, M., Newton, J., Fisher, M., Shima, D.T., Tozer, G.M., and Kanthou, C. (2012). Do anti-angiogenic VEGF (VEGFxxxb) isoforms exist? A cautionary tale. PLoS ONE *7*, e35231.

Harrison, M.L., Obermueller, E., Maisey, N.R., Hoare, S., Edmonds, K., Li, N.F., Chao, D., Hall, K., Lee, C., Timotheadou, E.*, et al.* (2007). Tumor necrosis factor alpha as a new target for renal cell carcinoma: two sequential phase II trials of infliximab at standard and high dose. J Clin Oncol *25*, 4542-4549.

Hashimoto, K., Man, S., Xu, P., Cruz-Munoz, W., Tang, T., Kumar, R., and Kerbel, R.S. (2010). Potent preclinical impact of metronomic low-dose oral topotecan combined with the antiangiogenic drug pazopanib for the treatment of ovarian cancer. Mol Cancer Ther *9*, 996-1006.

Hashizume, H., Falcon, B.L., Kuroda, T., Baluk, P., Coxon, A., Yu, D., Bready, J.V., Oliner, J.D., and McDonald, D.M. (2010). Complementary actions of inhibitors of angiopoietin-2 and VEGF on tumor angiogenesis and growth. Cancer Res *70*, 2213-2223.

Hauschild, A., Grob, J.J., Demidov, L.V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Miller, W.H., Jr., Kaempgen, E.*, et al.* (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. Lancet *380*, 358-365.

Hedvat, M., Huszar, D., Herrmann, A., Gozgit, J.M., Schroeder, A., Sheehy, A., Buettner, R., Proia, D., Kowolik, C.M., Xin, H.*, et al.* (2009). The JAK2 inhibitor AZD1480 potently blocks Stat3 signaling and oncogenesis in solid tumors. Cancer Cell *16*, 487-497.

Hegde, P.S., Jubb, A.M., Chen, D., Li, N.F., Meng, Y.G., Bernaards, C., Elliott, R., Scherer, S.J., and Chen, D.S. (2013). Predictive impact of circulating vascular endothelial growth factor in four phase III trials evaluating bevacizumab. Clin Cancer Res *19*, 929-937.

Heinrich, M.C., Maki, R.G., Corless, C.L., Antonescu, C.R., Harlow, A., Griffith, D., Town, A., McKinley, A., Ou, W.B., Fletcher, J.A.*, et al.* (2008). Primary and secondary kinase genotypes correlate with the biological and clinical activity of sunitinib in imatinib-resistant gastrointestinal stromal tumor. J Clin Oncol *26*, 5352-5359.

Helfrich, I., Edler, L., Sucker, A., Thomas, M., Christian, S., Schadendorf, D., and Augustin, H.G. (2009). Angiopoietin-2 levels are associated with disease progression in metastatic malignant melanoma. Clin Cancer Res *15*, 1384-1392.

Helfrich, I., Scheffrahn, I., Bartling, S., Weis, J., von Felbert, V., Middleton, M., Kato, M., Ergun, S., Augustin, H.G., and Schadendorf, D. (2010). Resistance to antiangiogenic therapy is directed by vascular phenotype, vessel stabilization, and maturation in malignant melanoma. J Exp Med *207*, 491-503.

Hellstrom, M., Phng, L.K., Hofmann, J.J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.K., Karlsson, L., Gaiano, N.*, et al.* (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. Nature *445*, 776-780.

Hickey, M.M., and Simon, M.C. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia and hypoxia-inducible factors. Curr Top Dev Biol *76*, 217-257.

Hidalgo, M., Bruckheimer, E., Rajeshkumar, N.V., Garrido-Laguna, I., De Oliveira, E., Rubio-Viqueira, B., Strawn, S., Wick, M.J., Martell, J., and Sidransky, D. (2011). A pilot clinical study of treatment guided by personalized tumorgrafts in patients with advanced cancer. Mol Cancer Ther *10*, 1311-1316.

Hirakawa, S., Brown, L.F., Kodama, S., Paavonen, K., Alitalo, K., and Detmar, M. (2007). VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. Blood *109*, 1010-1017.

Hirakawa, S., Kodama, S., Kunstfeld, R., Kajiya, K., Brown, L.F., and Detmar, M. (2005). VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. J Exp Med *201*, 1089-1099.

Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (1999a). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. Science *284*, 1994-1998.

Holash, J., Wiegand, S.J., and Yancopoulos, G.D. (1999b). New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. Oncogene *18*, 5356-5362.

Holmgren, L., O'Reilly, M.S., and Folkman, J. (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. Nat Med *1*, 149-153.

Hong, T.M., Chen, Y.L., Wu, Y.Y., Yuan, A., Chao, Y.C., Chung, Y.C., Wu, M.H., Yang, S.C., Pan, S.H., Shih, J.Y.*, et al.* (2007). Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. Clin Cancer Res *13*, 4759-4768.

Horak, E.R., Leek, R., Klenk, N., LeJeune, S., Smith, K., Stuart, N., Greenall, M., Stepniewska, K., and Harris, A.L. (1992). Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. Lancet *340*, 1120-1124.

Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. Mol Endocrinol *5*, 1806-1814.

Hu, C.J., Sataur, A., Wang, L., Chen, H., and Simon, M.C. (2007a). The N-terminal transactivation domain confers target gene specificity of hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha. Mol Biol Cell *18*, 4528-4542.

Hu, W.G., Li, J.W., Feng, B., Beveridge, M., Yue, F., Lu, A.G., Ma, J.J., Wang, M.L., Guo, Y., Jin, X.L.*, et al.* (2007b). Vascular endothelial growth factors C and D represent novel prognostic markers in colorectal carcinoma using quantitative image analysis. Eur Surg Res *39*, 229-238.

Huang, D., Ding, Y., Zhou, M., Rini, B.I., Petillo, D., Qian, C.N., Kahnoski, R., Futreal, P.A., Furge, K.A., and Teh, B.T. (2010). Interleukin-8 mediates resistance to antiangiogenic agent sunitinib in renal cell carcinoma. Cancer Res *70*, 1063-1071.

Huang, H., Lai, J.Y., Do, J., Liu, D., Li, L., Del Rosario, J., Doppalapudi, V.R., Pirie-Shepherd, S., Levin, N., Bradshaw, C.*, et al.* (2011). Specifically targeting angiopoietin-2 inhibits angiogenesis, Tie2-expressing monocyte infiltration, and tumor growth. Clin Cancer Res *17*, 1001-1011.

Huang, J., Bae, J.O., Tsai, J.P., Kadenhe-Chiweshe, A., Papa, J., Lee, A., Zeng, S., Kornfeld, Z.N., Ullner, P., Zaghloul, N.*, et al.* (2009). Angiopoietin-1/Tie-2 activation contributes to vascular survival and tumor growth during VEGF blockade. Int J Oncol *34*, 79-87.

Huang, Y., Chen, X., Dikov, M.M., Novitskiy, S.V., Mosse, C.A., Yang, L., and Carbone, D.P. (2007). Distinct roles of VEGFR-1 and VEGFR-2 in the aberrant hematopoiesis associated with elevated levels of VEGF. Blood *110*, 624-631.

Huang, Y., Goel, S., Duda, D.G., Fukumura, D., and Jain, R.K. (2013). Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy. Cancer Res *73*, 2943-2948.

Huang, Y., Lei, L., Liu, D., Jovin, I., Russell, R., Johnson, R.S., Di Lorenzo, A., and Giordano, F.J. (2012). Normal glucose uptake in the brain and heart requires an endothelial cell-specific HIF-1alpha-dependent function. Proc Natl Acad Sci U S A *109*, 17478-17483.

Huang, Y., and Steitz, J.A. (2005). SRprises along a messenger's journey. Mol Cell *17*, 613-615.

Hudes, G., Carducci, M., Tomczak, P., Dutcher, J., Figlin, R., Kapoor, A., Staroslawska, E., Sosman, J., McDermott, D., Bodrogi, I.*, et al.* (2007). Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. N Engl J Med *356*, 2271-2281.

Huez, I., Bornes, S., Bresson, D., Creancier, L., and Prats, H. (2001). New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. Mol Endocrinol *15*, 2197-2210.

Huez, I., Créancier, L., Audigier, S., Gensac, M.C., Prats, A.C., and Prats, H. (1998). Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. Mol Cell Biol *18*, 6178-6190.

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. N Engl J Med *350*, 2335-2342.

Hussain, S.P., Hofseth, L.J., and Harris, C.C. (2003). Radical causes of cancer. Nat Rev Cancer *3*, 276-285.

Hutson, T.E., Davis, I.D., Machiels, J.P., De Souza, P.L., Rottey, S., Hong, B.F., Epstein, R.J., Baker, K.L., McCann, L., Crofts, T.*, et al.* (2010). Efficacy and safety of pazopanib in patients with metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol *28*, 475-480.

Iida, K., Kawakami, Y., Sone, H., Suzuki, H., Yatoh, S., Isobe, K., Takekoshi, K., and Yamada, N. (2002). Vascular endothelial growth factor gene expression in a retinal pigmented cell is up-regulated by glucose deprivation through 3' UTR. Life Sci *71*, 1607-1614.

Inai, T., Mancuso, M., Hashizume, H., Baffert, F., Haskell, A., Baluk, P., Hu-Lowe, D.D., Shalinsky, D.R., Thurston, G., Yancopoulos, G.D.*, et al.* (2004). Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. Am J Pathol *165*, 35-52.

Indraccolo, S. (2010). Interferon-alpha as angiogenesis inhibitor: learning from tumor models. Autoimmunity *43*, 244-247.

Inoue, M., Hager, J.H., Ferrara, N., Gerber, H.P., and Hanahan, D. (2002). VEGF-A has a critical, nonredundant role in angiogenic switching and pancreatic beta cell carcinogenesis. Cancer Cell *1*, 193-202.

Iwamoto, F.M., Abrey, L.E., Beal, K., Gutin, P.H., Rosenblum, M.K., Reuter, V.E., DeAngelis, L.M., and Lassman, A.B. (2009). Patterns of relapse and prognosis after bevacizumab failure in recurrent glioblastoma. Neurology *73*, 1200-1206.

Iyer, G., Hanrahan, A.J., Milowsky, M.I., Al-Ahmadie, H., Scott, S.N., Janakiraman, M., Pirun, M., Sander, C., Socci, N.D., Ostrovnaya, I.*, et al.* (2012). Genome sequencing identifies a basis for everolimus sensitivity. Science *338*, 221.

Jain, L., Vargo, C.A., Danesi, R., Sissung, T.M., Price, D.K., Venzon, D., Venitz, J., and Figg, W.D. (2009a). The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. Mol Cancer Ther *8*, 2496-2508.

Jain, R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. Nat Med *9*, 685-693.

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

Jain, R.K. (2013). Normalizing tumor microenvironment to treat cancer: bench to bedside to biomarkers. J Clin Oncol *31*, 2205-2218.

Jain, R.K., Duda, D.G., Willett, C.G., Sahani, D.V., Zhu, A.X., Loeffler, J.S., Batchelor, T.T., and Sorensen, A.G. (2009b). Biomarkers of response and resistance to antiangiogenic therapy. Nat Rev Clin Oncol *6*, 327-338.

Jaini, R., Kesaraju, P., Johnson, J.M., Altuntas, C.Z., Jane-Wit, D., and Tuohy, V.K. (2010). An autoimmune-mediated strategy for prophylactic breast cancer vaccination. Nat Med *16*, 799-803.

Jarvis, A., Allerston, C.K., Jia, H., Herzog, B., Garza-Garcia, A., Winfield, N., Ellard, K., Aqil, R., Lynch, R., Chapman, C.*, et al.* (2010). Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) interaction. J Med Chem *53*, 2215-2226.

Javle, M.M., Shroff, R.T., Xiong, H., Varadhachary, G.A., Fogelman, D., Reddy, S.A., Davis, D., Zhang, Y., Wolff, R.A., and Abbruzzese, J.L. (2010). Inhibition of the mammalian target of rapamycin (mTOR) in advanced pancreatic cancer: results of two phase II studies. BMC Cancer *10*, 368.

Jawad, N., Direkze, N., and Leedham, S.J. (2011). Inflammatory bowel disease and colon cancer. Recent Results Cancer Res *185*, 99-115.

Jayson, G.C., Hicklin, D.J., and Ellis, L.M. (2012). Antiangiogenic therapy--evolving view based on clinical trial results. Nat Rev Clin Oncol *9*, 297-303.

Je, Y., Schutz, F.A., and Choueiri, T.K. (2009). Risk of bleeding with vascular endothelial growth factor receptor tyrosine-kinase inhibitors sunitinib and sorafenib: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. Lancet Oncol *10*, 967-974.

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

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

Ji, R.C. (2006). Lymphatic endothelial cells, tumor lymphangiogenesis and metastasis: New insights into intratumoral and peritumoral lymphatics. Cancer Metastasis Rev *25*, 677-694.

Jiang, B.H., Jiang, G., Zheng, J.Z., Lu, Z., Hunter, T., and Vogt, P.K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase signaling controls levels of hypoxia-inducible factor 1. Cell Growth Differ *12*, 363-369.

Jinushi, M., Chiba, S., Yoshiyama, H., Masutomi, K., Kinoshita, I., Dosaka-Akita, H., Yagita, H., Takaoka, A., and Tahara, H. (2011). Tumor-associated macrophages regulate tumorigenicity and anticancer drug responses of cancer stem/initiating cells. Proc Natl Acad Sci U S A *108*, 12425-12430.

Johannsen, M., Florcken, A., Bex, A., Roigas, J., Cosentino, M., Ficarra, V., Kloeters, C., Rief, M., Rogalla, P., Miller, K.*, et al.* (2009). Can tyrosine kinase inhibitors be discontinued in patients with metastatic renal cell carcinoma and a complete response to treatment? A multicentre, retrospective analysis. Eur Urol *55*, 1430-1438.

Johansson, A., Hamzah, J., Payne, C.J., and Ganss, R. (2012). Tumor-targeted TNFalpha stabilizes tumor vessels and enhances active immunotherapy. Proc Natl Acad Sci U S A *109*, 7841-7846.

Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. Nat Rev Cancer *9*, 239-252.

Jubb, A.M., and Harris, A.L. (2010). Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer. Lancet Oncol *11*, 1172-1183.

Jubb, A.M., Miller, K.D., Rugo, H.S., Harris, A.L., Chen, D., Reimann, J.D., Cobleigh, M.A., Schmidt, M., Langmuir, V.K., Hillan, K.J.*, et al.* (2011). Impact of exploratory biomarkers on the treatment effect of bevacizumab in metastatic breast cancer. Clin Cancer Res *17*, 372-381.

Jung, Y.J., Isaacs, J.S., Lee, S., Trepel, J., and Neckers, L. (2003). IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis. Faseb J *17*, 2115-2117.

Kaelin, W.G., Jr., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. Mol Cell *30*, 393-402.

Kaifi, J.T., Yekebas, E.F., Schurr, P., Obonyo, D., Wachowiak, R., Busch, P., Heinecke, A., Pantel, K., and Izbicki, J.R. (2005). Tumor-cell homing to lymph nodes and bone marrow and CXCR4 expression in esophageal cancer. J Natl Cancer Inst *97*, 1840-1847.

Kalluri, R. (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer *3*, 422-433.

Kapur, P., Pena-Llopis, S., Christie, A., Zhrebker, L., Pavia-Jimenez, A., Rathmell, W.K., Xie, X.J., and Brugarolas, J. (2013). Effects on survival of BAP1 and PBRM1 mutations in sporadic clear-cell renal-cell carcinoma: a retrospective analysis with independent validation. Lancet Oncol *14*, 159-167.

Karin, M. (2006). Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. Nature *441*, 431-436.

Karkkainen, M.J., Haiko, P., Sainio, K., Partanen, J., Taipale, J., Petrova, T.V., Jeltsch, M., Jackson, D.G., Talikka, M., Rauvala, H.*, et al.* (2004). Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. Nat Immunol *5*, 74-80.

Karni, R., de Stanchina, E., Lowe, S.W., Sinha, R., Mu, D., and Krainer, A.R. (2007). The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. Nat Struct Mol Biol *14*, 185-193.

Karpanen, T., Heckman, C.A., Keskitalo, S., Jeltsch, M., Ollila, H., Neufeld, G., Tamagnone, L., and Alitalo, K. (2006). Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. Faseb J *20*, 1462-1472.

Kaseb, A.O., Garrett-Mayer, E., Morris, J.S., Xiao, L., Lin, E., Onicescu, G., Hassan, M.M., Hassabo, H.M., Iwasaki, M., Deaton, F.L.*, et al.* (2012). Efficacy of bevacizumab plus erlotinib for advanced hepatocellular carcinoma and predictors of outcome: final results of a phase II trial. Oncology *82*, 67-74.

Kaumaya, P.T., and Foy, K.C. (2012). Peptide vaccines and targeting HER and VEGF proteins may offer a potentially new paradigm in cancer immunotherapy. Future Oncol *8*, 961-987.

Kawada, K., Sonoshita, M., Sakashita, H., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., Manabe, T., Inaba, K., Minato, N., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2004). Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. Cancer Res *64*, 4010-4017.

Kawai, H., Minamiya, Y., Ito, M., Saito, H., and Ogawa, J. (2008). VEGF121 promotes lymphangiogenesis in the sentinel lymph nodes of non-small cell lung carcinoma patients. Lung Cancer *59*, 41-47.

Kawamura, H., Li, X., Harper, S.J., Bates, D.O., and Claesson-Welsh, L. (2008). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. Cancer Res *68*, 4683-4692.

Kazazi-Hyseni, F., Beijnen, J.H., and Schellens, J.H. (2010). Bevacizumab. Oncologist *15*, 819-825.

Keane, M.P., Belperio, J.A., Xue, Y.Y., Burdick, M.D., and Strieter, R.M. (2004). Depletion of CXCR2 inhibits tumor growth and angiogenesis in a murine model of lung cancer. J Immunol *172*, 2853-2860.

Keck, P.J., Hauser, S.D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., and Connolly, D.T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science *246*, 1309-1312.

Kedhi, E., Joesoef, K.S., McFadden, E., Wassing, J., van Mieghem, C., Goedhart, D., and Smits, P.C. (2010). Second-generation everolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in real-life practice (COMPARE): a randomised trial. Lancet *375*, 201-209.

Keeley, E.C., Mehrad, B., and Strieter, R.M. (2011). Chemokines as mediators of tumor angiogenesis and neovascularization. Exp Cell Res *317*, 685-690.

Kerbel, R., and Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. Nat Rev Cancer *2*, 727-739.
Kerbel, R.S. (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. Carcinogenesis *21*, 505-515.

Kerbel, R.S. (2007). Improving conventional or low dose metronomic chemotherapy with targeted antiangiogenic drugs. Cancer Res Treat *39*, 150-159.

Kerbel, R.S. (2008). Tumor angiogenesis. N Engl J Med *358*, 2039-2049.

Kerbel, R.S. (2009). Issues regarding improving the impact of antiangiogenic drugs for the treatment of breast cancer. Breast *18 Suppl 3*, S41-47.

Kerkela, R., Woulfe, K.C., Durand, J.B., Vagnozzi, R., Kramer, D., Chu, T.F., Beahm, C., Chen, M.H., and Force, T. (2009). Sunitinib-induced cardiotoxicity is mediated by off-target inhibition of AMP-activated protein kinase. Clin Transl Sci *2*, 15-25.

Kim, S., Takahashi, H., Lin, W.W., Descargues, P., Grivennikov, S., Kim, Y., Luo, J.L., and Karin, M. (2009). Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. Nature *457*, 102-106.

Kitamura, T., Kometani, K., Hashida, H., Matsunaga, A., Miyoshi, H., Hosogi, H., Aoki, M., Oshima, M., Hattori, M., Takabayashi, A.*, et al.* (2007). SMAD4-deficient intestinal tumors recruit CCR1+ myeloid cells that promote invasion. Nat Genet *39*, 467-475.

Klinck, R., Bramard, A., Inkel, L., Dufresne-Martin, G., Gervais-Bird, J., Madden, R., Paquet, E.R., Koh, C., Venables, J.P., Prinos, P.*, et al.* (2008). Multiple alternative splicing markers for ovarian cancer. Cancer Res *68*, 657-663.

Koch, A.E., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Harlow, L.A., DiPietro, L.A., Elner, V.M., Elner, S.G., and Strieter, R.M. (1992). Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. Science *258*, 1798-1801.

Koebel, C.M., Vermi, W., Swann, J.B., Zerafa, N., Rodig, S.J., Old, L.J., Smyth, M.J., and Schreiber, R.D. (2007). Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. Nature *450*, 903-907.

Kondo, K., Kim, W.Y., Lechpammer, M., and Kaelin, W.G., Jr. (2003). Inhibition of HIF2alpha is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. PLoS Biol *1*, E83.

Kondo, S., Asano, M., Matsuo, K., Ohmori, I., and Suzuki, H. (1994). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. Biochim Biophys Acta *1221*, 211-214.

Kopetz, S., Hoff, P.M., Morris, J.S., Wolff, R.A., Eng, C., Glover, K.Y., Adinin, R., Overman, M.J., Valero, V., Wen, S.*, et al.* (2010). Phase II trial of infusional fluorouracil, irinotecan, and bevacizumab for metastatic colorectal cancer: efficacy and circulating angiogenic biomarkers associated with therapeutic resistance. J Clin Oncol *28*, 453-459.

Kortlever, R.M., Higgins, P.J., and Bernards, R. (2006). Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. Nat Cell Biol *8*, 877-884.

Kreisl, T.N., Kim, L., Moore, K., Duic, P., Royce, C., Stroud, I., Garren, N., Mackey, M., Butman, J.A., Camphausen, K.*, et al.* (2009). Phase II trial of single-agent bevacizumab followed by bevacizumab plus irinotecan at tumor progression in recurrent glioblastoma. J Clin Oncol *27*, 740-745.

Krishnamachary, B., Berg-Dixon, S., Kelly, B., Agani, F., Feldser, D., Ferreira, G., Iyer, N., LaRusch, J., Pak, B., Taghavi, P.*, et al.* (2003). Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. Cancer Res *63*, 1138-1143.

Kroemer, G., and Zitvogel, L. (2012). Abscopal but desirable: The contribution of immune responses to the efficacy of radiotherapy. Oncoimmunology *1*, 407-408.

Kruidenier, L., MacDonald, T.T., Collins, J.E., Pender, S.L., and Sanderson, I.R. (2006). Myofibroblast matrix metalloproteinases activate the neutrophil chemoattractant CXCL7 from intestinal epithelial cells. Gastroenterology *130*, 127-136.

Krumbach, R., Schuler, J., Hofmann, M., Giesemann, T., Fiebig, H.H., and Beckers, T. (2011). Primary resistance to cetuximab in a panel of patient-derived tumour xenograft models: activation of MET as one mechanism for drug resistance. Eur J Cancer *47*, 1231-1243.

Kujawski, M., Kortylewski, M., Lee, H., Herrmann, A., Kay, H., and Yu, H. (2008). Stat3 mediates myeloid cell-dependent tumor angiogenesis in mice. J Clin Invest *118*, 3367-3377.

Kulbe, H., Hagemann, T., Szlosarek, P.W., Balkwill, F.R., and Wilson, J.L. (2005). The inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha regulates chemokine receptor expression on ovarian cancer cells. Cancer Res *65*, 10355-10362.

Kuo, P.L., Shen, K.H., Hung, S.H., and Hsu, Y.L. (2012). CXCL1/GROalpha increases cell migration and invasion of prostate cancer by decreasing fibulin-1 expression through NF-kappaB/HDAC1 epigenetic regulation. Carcinogenesis *33*, 2477-2487.

Kyriakides, T.R., Zhu, Y.H., Smith, L.T., Bain, S.D., Yang, Z., Lin, M.T., Danielson, K.G., Iozzo, R.V., LaMarca, M., McKinney, C.E.*, et al.* (1998). Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen

fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. J Cell Biol *140*, 419-430.

La Vine, D.B., Coleman, T.A., Davis, C.H., Carbonell, C.E., and Davis, W.B. (2010). Frequent dose interruptions are required for patients receiving oral kinase inhibitor therapy for advanced renal cell carcinoma. Am J Clin Oncol *33*, 217-220.

Laghi, L., Bianchi, P., Miranda, E., Balladore, E., Pacetti, V., Grizzi, F., Allavena, P., Torri, V., Repici, A., Santoro, A.*, et al.* (2009). CD3+ cells at the invasive margin of deeply invading (pT3-T4) colorectal cancer and risk of post-surgical metastasis: a longitudinal study. Lancet Oncol *10*, 877-884.

Larcher, F., Murillas, R., Bolontrade, M., Conti, C.J., and Jorcano, J.L. (1998). VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. Oncogene *17*, 303-311.

Leary, R.J., Sausen, M., Kinde, I., Papadopoulos, N., Carpten, J.D., Craig, D., O'Shaughnessy, J., Kinzler, K.W., Parmigiani, G., Vogelstein, B.*, et al.* (2012). Detection of chromosomal alterations in the circulation of cancer patients with whole-genome sequencing. Sci Transl Med *4*, 162ra154.

Lee, G., Gardner, B.K., Elashoff, D.A., Purcell, C.M., Sandha, H.S., Mao, J.T., Krysan, K., Lee, J.M., and Dubinett, S.M. (2011). Elevated levels of CXC chemokine connective tissue activating peptide (CTAP)-III in lung cancer patients. Am J Transl Res *3*, 226-233.

Lee, S., Chen, T.T., Barber, C.L., Jordan, M.C., Murdock, J., Desai, S., Ferrara, N., Nagy, A., Roos, K.P., and Iruela-Arispe, M.L. (2007a). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. Cell *130*, 691-703.

Lee, S., Jilani, S.M., Nikolova, G.V., Carpizo, D., and Iruela-Arispe, M.L. (2005). Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors. J Cell Biol *169*, 681-691.

Lee, S.L., Rouhi, P., Dahl Jensen, L., Zhang, D., Ji, H., Hauptmann, G., Ingham, P., and Cao, Y. (2009). Hypoxia-induced pathological angiogenesis mediates tumor cell dissemination, invasion, and metastasis in a zebrafish tumor model. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 19485-19490.

Lee, T.H., Seng, S., Sekine, M., Hinton, C., Fu, Y., Avraham, H.K., and Avraham, S. (2007b). Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. PLoS Med *4*, e186.

Lee, Y.H., Tokunaga, T., Oshika, Y., Suto, R., Yanagisawa, K., Tomisawa, M., Fukuda, H., Nakano, H., Abe, S., Tateishi, A.*, et al.* (1999). Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. Eur J Cancer *35*, 1089-1093.

Lee, Y.S., Choi, I., Ning, Y., Kim, N.Y., Khatchadourian, V., Yang, D., Chung, H.K., Choi, D., LaBonte, M.J., Ladner, R.D.*, et al.* (2012). Interleukin-8 and its receptor CXCR2 in the

tumour microenvironment promote colon cancer growth, progression and metastasis. Br J Cancer *106*, 1833-1841.

Lemaire, R., Prasad, J., Kashima, T., Gustafson, J., Manley, J.L., and Lafyatis, R. (2002). Stability of a PKCI-1-related mRNA is controlled by the splicing factor ASF/SF2: a novel function for SR proteins. Genes Dev *16*, 594-607.

Leow, C.C., Coffman, K., Inigo, I., Breen, S., Czapiga, M., Soukharev, S., Gingles, N., Peterson, N., Fazenbaker, C., Woods, R.*, et al.* (2012). MEDI3617, a human anti-angiopoietin 2 monoclonal antibody, inhibits angiogenesis and tumor growth in human tumor xenograft models. Int J Oncol *40*, 1321-1330.

Leung, D.W., Cachianes, G., Kuang, W.J., Goeddel, D.V., and Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science *246*, 1306-1309.

Levy, A.P., Levy, N.S., and Goldberg, M.A. (1996a). Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the Von-Hippel Lindau protein. J Biol Chem *271*, 25492-25497.

Levy, A.P., Levy, N.S., and Goldberg, M.A. (1996b). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. J Biol Chem *271*, 2746-2753.

Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., and Goldberg, M.A. (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial factor gene by hypoxia. J Biol Chem *270*, 13333-13340.

Levy, N.S., Chung, S., Furneaux, H., and Levy, A.P. (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. J Biol Chem *273*, 6417-6423.

Li, A., Dubey, S., Varney, M.L., Dave, B.J., and Singh, R.K. (2003). IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. J Immunol *170*, 3369-3376.

Li, A., Varney, M.L., Valasek, J., Godfrey, M., Dave, B.J., and Singh, R.K. (2005). Autocrine role of interleukin-8 in induction of endothelial cell proliferation, survival, migration and MMP-2 production and angiogenesis. Angiogenesis *8*, 63-71.

Li, J.L., Sainson, R.C., Oon, C.E., Turley, H., Leek, R., Sheldon, H., Bridges, E., Shi, W., Snell, C., Bowden, E.T.*, et al.* (2011). DLL4-Notch signaling mediates tumor resistance to anti-VEGF therapy in vivo. Cancer Res *71*, 6073-6083.

Liang, H., Zhong, Y., Luo, Z., Huang, Y., Lin, H., Zhan, S., Xie, K., and Li, Q.Q. (2011). Diagnostic value of 16 cellular tumor markers for metastatic thyroid cancer: an immunohistochemical study. Anticancer Res *31*, 3433-3440.

Limbourg, F.P., Takeshita, K., Radtke, F., Bronson, R.T., Chin, M.T., and Liao, J.K. (2005). Essential role of endothelial Notch1 in angiogenesis. Circulation *111*, 1826-1832.

Lin, E.Y., Nguyen, A.V., Russell, R.G., and Pollard, J.W. (2001). Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. J Exp Med *193*, 727-740.

Lin, E.Y., and Pollard, J.W. (2007). Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. Cancer Res *67*, 5064-5066.

Lin, M., Lin, H.Z., Ma, S.P., Ji, P., Xie, D., and Yu, J.X. (2011). Vascular endothelial growth factor-A and -C: expression and correlations with lymphatic metastasis and prognosis in colorectal cancer. Med Oncol *28*, 151-158.

Lin, S., Xiao, R., Sun, P., Xu, X., and Fu, X.D. (2005). Dephosphorylation-dependent sorting of SR splicing factors during mRNP maturation. Mol Cell *20*, 413-425.

Lin, W.W., and Karin, M. (2007). A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. J Clin Invest *117*, 1175-1183.
Lindholm, D.P., Eriksson, B., and Granberg, D. (2012). Response to temozolomide and bevacizumab in a patient with poorly differentiated neuroendocrine carcinoma. Med Oncol *29*, 301-303.

Liu, J., Li, M., Song, B., Jia, C., Zhang, L., Bai, X., and Hu, W. (2013). Metformin inhibits renal cell carcinoma in vitro and in vivo xenograft. Urol Oncol *31*, 264-270.

Liu, S., Ginestier, C., Ou, S.J., Clouthier, S.G., Patel, S.H., Monville, F., Korkaya, H., Heath, A., Dutcher, J., Kleer, C.G.*, et al.* (2011). Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. Cancer Res *71*, 614-624.

Liu, X., Plummer, S.J., Nock, N.L., Casey, G., and Witte, J.S. (2006). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and decreased risk of advanced prostate cancer: modification by lymphotoxin alpha. Am J Epidemiol *164*, 984-989.

Llovet, J.M., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, J.F., de Oliveira, A.C., Santoro, A., Raoul, J.L., Forner, A.*, et al.* (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. N Engl J Med *359*, 378-390.

Loboda, A., Jozkowicz, A., and Dulak, J. (2012). HIF-1 versus HIF-2--is one more important than the other? Vascul Pharmacol *56*, 245-251.

Lobov, I.B., Renard, R.A., Papadopoulos, N., Gale, N.W., Thurston, G., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (2007). Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 3219-3224.

Loges, S., Schmidt, T., and Carmeliet, P. (2010). Mechanisms of resistance to anti-angiogenic therapy and development of third-generation anti-angiogenic drug candidates. Genes Cancer *1*, 12-25.

Longo-Imedio, M.I., Longo, N., Trevino, I., Lazaro, P., and Sanchez-Mateos, P. (2005).
Clinical significance of CXCR3 and CXCR4 expression in primary melanoma. Int J Cancer *117*, 861-865.

Lu, K.V., Chang, J.P., Parachoniak, C.A., Pandika, M.M., Aghi, M.K., Meyronet, D., Isachenko, N., Fouse, S.D., Phillips, J.J., Cheresh, D.A.*, et al.* (2012). VEGF inhibits tumor

cell invasion and mesenchymal transition through a MET/VEGFR2 complex. Cancer Cell *22*, 21-35.

Luan, J., Shattuck-Brandt, R., Haghnegahdar, H., Owen, J.D., Strieter, R., Burdick, M., Nirodi, C., Beauchamp, D., Johnson, K.N., and Richmond, A. (1997). Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. J Leukoc Biol *62*, 588-597.

Luppi, F., Longo, A.M., de Boer, W.I., Rabe, K.F., and Hiemstra, P.S. (2007). Interleukin-8 stimulates cell proliferation in non-small cell lung cancer through epidermal growth factor receptor transactivation. Lung Cancer *56*, 25-33.

Lurje, G., Husain, H., Power, D.G., Yang, D., Groshen, S., Pohl, A., Zhang, W., Ning, Y., Manegold, P.C., El-Khoueiry, A.*, et al.* (2010). Genetic variations in angiogenesis pathway genes associated with clinical outcome in localized gastric adenocarcinoma. Ann Oncol *21*, 78-86.

Luster, A.D. (1998). Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med *338*, 436-445.

Luttun, A., Tjwa, M., Moons, L., Wu, Y., Angelillo-Scherrer, A., Liao, F., Nagy, J.A., Hooper, A., Priller, J., De Klerck, B.*, et al.* (2002). Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. Nat Med *8*, 831-840.

Lynch, T.J., Bell, D.W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R.A., Brannigan, B.W., Harris, P.L., Haserlat, S.M., Supko, J.G., Haluska, F.G.*, et al.* (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med *350*, 2129-2139.

Macchiarini, P., Fontanini, G., Hardin, M.J., Squartini, F., and Angeletti, C.A. (1992). Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. Lancet *340*, 145-146.

Macedo, L.T., da Costa Lima, A.B., and Sasse, A.D. (2012). Addition of bevacizumab to first-line chemotherapy in advanced colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis, with emphasis on chemotherapy subgroups. BMC Cancer *12*, 89.

Madajewicz, S., Waterhouse, D.M., Ritch, P.S., Khan, M.Q., Higby, D.J., Leichman, C.G., Malik, S.K., Hentschel, P., Gill, J.F., Zhao, L.*, et al.* (2012). Multicenter, randomized phase II trial of bevacizumab plus folinic acid, fluorouracil, gemcitabine (FFG) versus bevacizumab plus folinic acid, fluorouracil, oxaliplatin (FOLFOX4) as first-line therapy for patients with advanced colorectal cancer. Invest New Drugs *30*, 772-778.

Madhusudan, S., Muthuramalingam, S.R., Braybrooke, J.P., Wilner, S., Kaur, K., Han, C., Hoare, S., Balkwill, F., and Ganesan, T.S. (2005). Study of etanercept, a tumor necrosis factor-alpha inhibitor, in recurrent ovarian cancer. J Clin Oncol *23*, 5950-5959.

Maeda, K., Chung, Y.S., Ogawa, Y., Takatsuka, S., Kang, S.M., Ogawa, M., Sawada, T., and Sowa, M. (1996). Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. Cancer *77*, 858-863.

Makinen, T., Veikkola, T., Mustjoki, S., Karpanen, T., Catimel, B., Nice, E.C., Wise, L., Mercer, A., Kowalski, H., Kerjaschki, D*., et al.* (2001). Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. EMBO J *20*, 4762-4773.

Mancuso, M.R., Davis, R., Norberg, S.M., O'Brien, S., Sennino, B., Nakahara, T., Yao, V.J., Inai, T., Brooks, P., Freimark, B*., et al.* (2006a). Rapid vascular regrowth in tumors after reversal of VEGF inhibition. J Clin Invest *116*, 2610-2621.

Mancuso, P., Colleoni, M., Calleri, A., Orlando, L., Maisonneuve, P., Pruneri, G., Agliano, A., Goldhirsch, A., Shaked, Y., Kerbel, R.S*., et al.* (2006b). Circulating endothelial-cell kinetics and viability predict survival in breast cancer patients receiving metronomic chemotherapy. Blood *108*, 452-459.

Mandriota, S.J., Menoud, P.A., and Pepper, M.S. (1996). Transforming growth factor beta 1 down-regulates vascular endothelial growth factor receptor 2/flk-1 expression in vascular endothelial cells. J Biol Chem *271*, 11500-11505.

Mandriota, S.J., Turner, K.J., Davies, D.R., Murray, P.G., Morgan, N.V., Sowter, H.M., Wykoff, C.C., Maher, E.R., Harris, A.L., Ratcliffe, P.J*., et al.* (2002). HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. Cancer Cell *1*, 459-468.

Manning, E.A., Ullman, J.G., Leatherman, J.M., Asquith, J.M., Hansen, T.R., Armstrong, T.D., Hicklin, D.J., Jaffee, E.M., and Emens, L.A. (2007). A vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibitor enhances antitumor immunity through an immune-based mechanism. Clin Cancer Res *13*, 3951-3959.

Manohar, S.M., Padgaonkar, A.A., Jalota-Badhwar, A., Sonawane, V., Rathos, M.J., Kumar, S., and Joshi, K.S. (2011). A novel inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha P3155 also modulates PI3K pathway and inhibits growth of prostate cancer cells. BMC Cancer *11*, 338.

Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008). Cancer-related inflammation. Nature *454*, 436-444.

Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P., and Sica, A. (2002). Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. Trends Immunol *23*, 549-555.

Manzoni, M., Mariucci, S., Delfanti, S., Rovati, B., Ronzoni, M., Loupakis, F., Brugnatelli, S., Tinelli, C., Villa, E., Falcone, A*., et al.* (2012). Circulating endothelial cells and their apoptotic fraction are mutually independent predictive biomarkers in Bevacizumab-based treatment for advanced colorectal cancer. J Cancer Res Clin Oncol *138*, 1187-1196.

Maranchie, J.K., Vasselli, J.R., Riss, J., Bonifacino, J.S., Linehan, W.M., and Klausner, R.D. (2002). The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. Cancer Cell *1*, 247-255.

Marchesi, F., Monti, P., Leone, B.E., Zerbi, A., Vecchi, A., Piemonti, L., Mantovani, A., and Allavena, P. (2004). Increased survival, proliferation, and migration in metastatic human pancreatic tumor cells expressing functional CXCR4. Cancer Res *64*, 8420-8427.

Marques, I.J., Weiss, F.U., Vlecken, D.H., Nitsche, C., Bakkers, J., Lagendijk, A.K., Partecke, L.I., Heidecke, C.D., Lerch, M.M., and Bagowski, C.P. (2009). Metastatic behaviour of primary human tumours in a zebrafish xenotransplantation model. BMC Cancer *9*, 128.

Marotta, V., Ramundo, V., Camera, L., Del Prete, M., Fonti, R., Esposito, R., Palmieri, G., Salvatore, M., Vitale, M., Colao, A.*, et al.* (2013). Sorafenib in advanced iodine-refractory differentiated thyroid cancer: efficacy, safety and exploratory analysis of role of serum thyroglobulin and FDG-PET. Clin Endocrinol (Oxf) *78*, 760-767.

Matsubara, J., Honda, K., Ono, M., Tanaka, Y., Kobayashi, M., Jung, G., Yanagisawa, K., Sakuma, T., Nakamori, S., Sata, N.*, et al.* (2011). Reduced plasma level of CXC chemokine ligand 7 in patients with pancreatic cancer. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev *20*, 160-171.
Matsusaka, S., Suenaga, M., Mishima, Y., Takagi, K., Terui, Y., Mizunuma, N., and Hatake, K. (2011). Circulating endothelial cells predict for response to bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. Cancer Chemother Pharmacol *68*, 763-768.

Mauceri, H.J., Hanna, N.N., Beckett, M.A., Gorski, D.H., Staba, M.J., Stellato, K.A., Bigelow, K., Heimann, R., Gately, S., Dhanabal, M.*, et al.* (1998). Combined effects of angiostatin and ionizing radiation in antitumour therapy. Nature *394*, 287-291.

Maxwell, P.J., Gallagher, R., Seaton, A., Wilson, C., Scullin, P., Pettigrew, J., Stratford, I.J., Williams, K.J., Johnston, P.G., and Waugh, D.J. (2007). HIF-1 and NF-kappaB-mediated upregulation of CXCR1 and CXCR2 expression promotes cell survival in hypoxic prostate cancer cells. Oncogene *26*, 7333-7345.

Mehlen, P., and Puisieux, A. (2006). Metastasis: a question of life or death. Nat Rev Cancer *6*, 449-458.

Merdzhanova, G., Gout, S., Keramidas, M., Edmond, V., Coll, J.L., Brambilla, C., Brambilla, E., Gazzeri, S., and Eymin, B. (2010). The transcription factor E2F1 and the SR protein SC35 control the ratio of pro-angiogenic versus antiangiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor-A to inhibit neovascularization in vivo. Oncogene *29*, 5392-5403.

Mestas, J., Burdick, M.D., Reckamp, K., Pantuck, A., Figlin, R.A., and Strieter, R.M. (2005). The role of CXCR2/CXCR2 ligand biological axis in renal cell carcinoma. J Immunol *175*, 5351-5357.

Mesters, R.M., Padro, T., Bieker, R., Steins, M., Kreuter, M., Goner, M., Kelsey, S., Scigalla, P., Fiedler, W., Buchner, T.*, et al.* (2001). Stable remission after administration of the receptor tyrosine kinase inhibitor SU5416 in a patient with refractory acute myeloid leukemia. Blood *98*, 241-243.

Milanini-Mongiat, J., Pouyssegur, J., and Pages, G. (2002). Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. J Biol Chem *277*, 20631-20639.

Milanini, J., Vinals, F., Pouysségur, J., and Pagès, G. (1998). p42/p44 MAP Kinase module plays a key role in the transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor gene in fibroblasts. J Biol Chem *273*, 18165-18172.

Miles, D., Harbeck, N., Escudier, B., Hurwitz, H., Saltz, L., Van Cutsem, E., Cassidy, J., Mueller, B., and Sirzen, F. (2011). Disease course patterns after discontinuation of bevacizumab: pooled analysis of randomized phase III trials. J Clin Oncol *29*, 83-88.

Miles, D.W., Chan, A., Dirix, L.Y., Cortes, J., Pivot, X., Tomczak, P., Delozier, T., Sohn, J.H., Provencher, L., Puglisi, F.*, et al.* (2010). Phase III study of bevacizumab plus docetaxel compared with placebo plus docetaxel for the first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative metastatic breast cancer. J Clin Oncol *28*, 3239-3247.

Miles, D.W., de Haas, S.L., Dirix, L.Y., Romieu, G., Chan, A., Pivot, X., Tomczak, P., Provencher, L., Cortes, J., Delmar, P.R.*, et al.* (2013). Biomarker results from the AVADO phase 3 trial of first-line bevacizumab plus docetaxel for HER2-negative metastatic breast cancer. Br J Cancer *108*, 1052-1060.

Millauer, B., Longhi, M.P., Plate, K.H., Shawver, L.K., Risau, W., Ullrich, A., and Strawn, L.M. (1996). Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. Cancer Res *56*, 1615-1620.

Miller, K., Wang, M., Gralow, J., Dickler, M., Cobleigh, M., Perez, E.A., Shenkier, T., Cella, D., and Davidson, N.E. (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. N Engl J Med *357*, 2666-2676.

Miquerol, L., Langille, B.L., and Nagy, A. (2000). Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. Development *127*, 3941-3946.

Misteli, T., Caceres, J.F., Clement, J.Q., Krainer, A.R., Wilkinson, M.F., and Spector, D.L. (1998). Serine phosphorylation of SR proteins is required for their recruitment to sites of transcription in vivo. J Cell Biol *143*, 297-307.

Miyahara, K., Nouso, K., Tomoda, T., Kobayashi, S., Hagihara, H., Kuwaki, K., Toshimori, J., Onishi, H., Ikeda, F., Miyake, Y.*, et al.* (2011). Predicting the treatment effect of sorafenib using serum angiogenesis markers in patients with hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol *26*, 1604-1611.

Montagna, E., Cancello, G., Bagnardi, V., Pastrello, D., Dellapasqua, S., Perri, G., Viale, G., Veronesi, P., Luini, A., Intra, M.*, et al.* (2012). Metronomic chemotherapy combined with bevacizumab and erlotinib in patients with metastatic HER2-negative breast cancer: clinical and biological activity. Clin Breast Cancer *12*, 207-214.

Monti, E., and Gariboldi, M.B. (2011). HIF-1 as a target for cancer chemotherapy, chemosensitization and chemoprevention. Curr Mol Pharmacol *4*, 62-77.

Morera, Y., Bequet-Romero, M., Ayala, M., Lamdan, H., Agger, E.M., Andersen, P., and Gavilondo, J.V. (2008). Anti-tumoral effect of active immunotherapy in C57BL/6 mice using a recombinant human VEGF protein as antigen and three chemically unrelated adjuvants. Angiogenesis *11*, 381-393.

Morikawa, S., Baluk, P., Kaidoh, T., Haskell, A., Jain, R.K., and McDonald, D.M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. Am J Pathol *160*, 985-1000.

Motzer, R.J., Escudier, B., Oudard, S., Hutson, T.E., Porta, C., Bracarda, S., Grunwald, V., Thompson, J.A., Figlin, R.A., Hollaender, N.*, et al.* (2008). Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial. Lancet *372*, 449-456.

Motzer, R.J., Escudier, B., Tomczak, P., Hutson, T.E., Michaelson, M.D., Negrier, S., Oudard, S., Gore, M.E., Tarazi, J., Hariharan, S.*, et al.* (2013). Axitinib versus sorafenib as second-line treatment for advanced renal cell carcinoma: overall survival analysis and updated results from a randomised phase 3 trial. Lancet Oncol *14*, 552-562.

Motzer, R.J., Hudes, G.R., Curti, B.D., McDermott, D.F., Escudier, B.J., Negrier, S., Duclos, B., Moore, L., O'Toole, T., Boni, J.P.*, et al.* (2007a). Phase I/II trial of temsirolimus combined with interferon alfa for advanced renal cell carcinoma. J Clin Oncol *25*, 3958-3964.

Motzer, R.J., Hutson, T.E., Tomczak, P., Michaelson, M.D., Bukowski, R.M., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Pili, R., Bjarnason, G.A.*, et al.* (2009). Overall survival and updated results for sunitinib compared with interferon alfa in patients with metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol *27*, 3584-3590.

Motzer, R.J., Hutson, T.E., Tomczak, P., Michaelson, M.D., Bukowski, R.M., Rixe, O., Oudard, S., Negrier, S., Szczylik, C., Kim, S.T.*, et al.* (2007b). Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. N Engl J Med *356*, 115-124.

Motzer, R.J., Mazumdar, M., Bacik, J., Berg, W., Amsterdam, A., and Ferrara, J. (1999). Survival and prognostic stratification of 670 patients with advanced renal cell carcinoma. J Clin Oncol *17*, 2530-2540.

Mould, A.W., Greco, S.A., Cahill, M.M., Tonks, I.D., Bellomo, D., Patterson, C., Zournazi, A., Nash, A., Scotney, P., Hayward, N.K.*, et al.* (2005). Transgenic overexpression of vascular endothelial growth factor-B isoforms by endothelial cells potentiates postnatal vessel growth in vivo and in vitro. Circ Res *97*, e60-70.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N.*, et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. Nature *410*, 50-56.

Murdoch, C., Muthana, M., Coffelt, S.B., and Lewis, C.E. (2008). The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis. Nat Rev Cancer *8*, 618-631.

Murtaza, M., Dawson, S.J., Tsui, D.W., Gale, D., Forshew, T., Piskorz, A.M., Parkinson, C., Chin, S.F., Kingsbury, Z., Wong, A.S.*, et al.* (2013). Non-invasive analysis of acquired resistance to cancer therapy by sequencing of plasma DNA. Nature *497*, 108-112.

Nagpal, S., Harsh, G., and Recht, L. (2011). Bevacizumab improves quality of life in patients with recurrent glioblastoma. Chemother Res Pract *2011*, 602812.

Nagy, J.A., Herzberg, K.T., Masse, E.M., Zientara, G.P., and Dvorak, H.F. (1989). Exchange of macromolecules between plasma and peritoneal cavity in ascites tumor-bearing, normal, and serotonin-injected mice. Cancer Res *49*, 5448-5458.

Narayana, A., Kelly, P., Golfinos, J., Parker, E., Johnson, G., Knopp, E., Zagzag, D., Fischer, I., Raza, S., Medabalmi, P.*, et al.* (2009). Antiangiogenic therapy using bevacizumab in recurrent high-grade glioma: impact on local control and patient survival. J Neurosurg *110*, 173-180.

Nasarre, P., Thomas, M., Kruse, K., Helfrich, I., Wolter, V., Deppermann, C., Schadendorf, D., Thurston, G., Fiedler, U., and Augustin, H.G. (2009). Host-derived angiopoietin-2 affects early stages of tumor development and vessel maturation but is dispensable for later stages of tumor growth. Cancer Res *69*, 1324-1333.

Naumov, G.N., Townson, J.L., MacDonald, I.C., Wilson, S.M., Bramwell, V.H., Groom, A.C., and Chambers, A.F. (2003). Ineffectiveness of doxorubicin treatment on solitary dormant mammary carcinoma cells or late-developing metastases. Breast Cancer Res Treat *82*, 199-206.

Ng, Y.S., Rohan, R., Sunday, M.E., Demello, D.E., and D'Amore, P.A. (2001). Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. Dev Dyn *220*, 112-121.

Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massague, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. Nat Rev Cancer *9*, 274-284.

Nickoloff, B.J., Ben-Neriah, Y., and Pikarsky, E. (2005). Inflammation and cancer: is the link as simple as we think? J Invest Dermatol *124*, x-xiv.

Nielsen, D.L., Andersson, M., Andersen, J.L., and Kamby, C. (2010). Antiangiogenic therapy for breast cancer. Breast Cancer Res *12*, 209.

Noguera-Troise, I., Daly, C., Papadopoulos, N.J., Coetzee, S., Boland, P., Gale, N.W., Lin, H.C., Yancopoulos, G.D., and Thurston, G. (2006). Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. Nature *444*, 1032-1037.

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

Nosov, D.A., Esteves, B., Lipatov, O.N., Lyulko, A.A., Anischenko, A.A., Chacko, R.T., Doval, D.C., Strahs, A., Slichenmyer, W.J., and Bhargava, P. (2012). Antitumor activity and safety of tivozanib (AV-951) in a phase II randomized discontinuation trial in patients with renal cell carcinoma. J Clin Oncol *30*, 1678-1685.

Novellino, L., De Filippo, A., Deho, P., Perrone, F., Pilotti, S., Parmiani, G., and Castelli, C. (2008). PTPRK negatively regulates transcriptional activity of wild type and mutated oncogenic beta-catenin and affects membrane distribution of beta-catenin/E-cadherin complexes in cancer cells. Cell Signal *20*, 872-883.

Nowak, D.G., Woolard, J., Amin, E.M., Konopatskaya, O., Saleem, M.A., Churchill, A.J., Ladomery, M.R., Harper, S.J., and Bates, D.O. (2008). Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. J Cell Sci *121*, 3487-3495.

Nyberg, P., Xie, L., and Kalluri, R. (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. Cancer Res *65*, 3967-3979.

O'Connor, J.P., Jackson, A., Parker, G.J., Roberts, C., and Jayson, G.C. (2012). Dynamic contrast-enhanced MRI in clinical trials of antivascular therapies. Nat Rev Clin Oncol *9*, 167-177.

O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., and Folkman, J. (1997). Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. Cell *88*, 277-285.

O'Reilly, M.S., Holmgren, L., Chen, C., and Folkman, J. (1996). Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. Nat Med *2*, 689-692.
Ohashi, K., Maruvka, Y.E., Michor, F., and Pao, W. (2013). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor-resistant disease. J Clin Oncol *31*, 1070-1080.

Oliver, G., and Alitalo, K. (2005). The lymphatic vasculature: recent progress and paradigms. Annu Rev Cell Dev Biol *21*, 457-483.

Oliver, G., and Srinivasan, R.S. (2010). Endothelial cell plasticity: how to become and remain a lymphatic endothelial cell. Development *137*, 363-372.

Oosthuyse, B., Moons, L., Storkebaum, E., Beck, H., Nuyens, D., Brusselmans, K., Van Dorpe, J., Hellings, P., Gorselink, M., Heymans, S*., et al.* (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. Nat Genet *28*, 131-138.

Orlidge, A., and D'Amore, P.A. (1987). Inhibition of capillary endothelial cell growth by pericytes and smooth muscle cells. J Cell Biol *105*, 1455-1462.

Overall, C.M., and Lopez-Otin, C. (2002). Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. Nat Rev Cancer *2*, 657-672.

Owen, J.D., Strieter, R., Burdick, M., Haghnegahdar, H., Nanney, L., Shattuck-Brandt, R., and Richmond, A. (1997). Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins. Int J Cancer *73*, 94-103.

Ozao-Choy, J., Ma, G., Kao, J., Wang, G.X., Meseck, M., Sung, M., Schwartz, M., Divino, C.M., Pan, P.Y., and Chen, S.H. (2009). The novel role of tyrosine kinase inhibitor in the

reversal of immune suppression and modulation of tumor microenvironment for immune-based cancer therapies. Cancer Res *69*, 2514-2522.

Paez-Ribes, M., Allen, E., Hudock, J., Takeda, T., Okuyama, H., Vinals, F., Inoue, M., Bergers, G., Hanahan, D., and Casanovas, O. (2009). Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. Cancer Cell *15*, 220-231.

Paez, J.G., Janne, P.A., Lee, J.C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., Herman, P., Kaye, F.J., Lindeman, N., Boggon, T.J.*, et al.* (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. Science *304*, 1497-1500.

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

Pan, Q., Chanthery, Y., Liang, W.C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., Tong, R.K., Kowalski, J., Yee, S.F., Pacheco, G.*, et al.* (2007). Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. Cancer Cell *11*, 53-67.

Park, E.J., Lee, J.H., Yu, G.Y., He, G., Ali, S.R., Holzer, R.G., Osterreicher, C.H., Takahashi, H., and Karin, M. (2010). Dietary and genetic obesity promote liver inflammation and tumorigenesis by enhancing IL-6 and TNF expression. Cell *140*, 197-208.

Park, J.E., Chen, H.H., Winer, J., Houck, K.A., and Ferrara, N. (1994). Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. J Biol Chem *269*, 25646-25654.

Park, J.E., Keller, G.A., and Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. Mol Biol Cell *4*, 1317-1326.

Parrinello, S., Coppe, J.P., Krtolica, A., and Campisi, J. (2005). Stromal-epithelial interactions in aging and cancer: senescent fibroblasts alter epithelial cell differentiation. J Cell Sci *118*, 485-496.

Patel, P., and Chen, E.I. (2012). Cancer stem cells, tumor dormancy, and metastasis. Front Endocrinol (Lausanne) *3*, 125.

Pathak, A.P., Hochfeld, W.E., Goodman, S.L., and Pepper, M.S. (2008). Circulating and imaging markers for angiogenesis. Angiogenesis *11*, 321-335.

Patry, C., Bouchard, L., Labrecque, P., Gendron, D., Lemieux, B., Toutant, J., Lapointe, E., Wellinger, R., and Chabot, B. (2003). Small interfering RNA-mediated reduction in heterogeneous nuclear ribonucleoparticule A1/A2 proteins induces apoptosis in human cancer cells but not in normal mortal cell lines. Cancer Res *63*, 7679-7688.

Pena-Llopis, S., Vega-Rubin-de-Celis, S., Liao, A., Leng, N., Pavia-Jimenez, A., Wang, S., Yamasaki, T., Zhrebker, L., Sivanand, S., Spence, P.*, et al.* (2012). BAP1 loss defines a new class of renal cell carcinoma. Nat Genet *44*, 751-759.

Pennacchietti, S., Michieli, P., Galluzzo, M., Mazzone, M., Giordano, S., and Comoglio, P.M. (2003). Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. Cancer Cell *3*, 347-361.

Pepper, M.S., Ferrara, N., Orci, L., and Montesano, R. (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. Biochem Biophys Res Commun *189*, 824-831.

Perren, T.J., Swart, A.M., Pfisterer, J., Ledermann, J.A., Pujade-Lauraine, E., Kristensen, G., Carey, M.S., Beale, P., Cervantes, A., Kurzeder, C.*, et al.* (2011). A phase 3 trial of bevacizumab in ovarian cancer. N Engl J Med *365*, 2484-2496.

Peters, K.G., De Vries, C., and Williams, L.T. (1993). Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. Proc Natl Acad Sci U S A *90*, 8915-8919.

Petrelli, F., and Barni, S. (2012). Bevacizumab in advanced breast cancer: an opportunity as second-line therapy? Med Oncol *29*, 1-4.

Petrelli, F., Cabiddu, M., Carpo, M., Ghilardi, M., and Barni, S. (2010). Progression of intramedullary metastasis during perioperative cessation of sunitinib. Nat Rev Urol *7*, 634-637.

Pezzella, F., Pastorino, U., Tagliabue, E., Andreola, S., Sozzi, G., Gasparini, G., Menard, S., Gatter, K.C., Harris, A.L., Fox, S.*, et al.* (1997). Non-small-cell lung carcinoma tumor growth without morphological evidence of neo-angiogenesis. Am J Pathol *151*, 1417-1423.

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

Piekielko-Witkowska, A., Wiszomirska, H., Wojcicka, A., Poplawski, P., Boguslawska, J., Tanski, Z., and Nauman, A. (2010). Disturbed expression of splicing factors in renal cancer affects alternative splicing of apoptosis regulators, oncogenes, and tumor suppressors. PLoS ONE *5*, e13690.

Pietras, K., and Hanahan, D. (2005). A multitargeted, metronomic, and maximum-tolerated dose "chemo-switch" regimen is antiangiogenic, producing objective responses and survival benefit in a mouse model of cancer. J Clin Oncol *23*, 939-952.

Platonova, N., Miquel, G., Regenfuss, B., Taouji, S., Cursiefen, C., Chevet, E., and Bikfalvi, A. (2013). Evidence for the interaction of fibroblast growth factor-2 with the lymphatic endothelial cell marker LYVE-1. Blood *121*, 1229-1237.

Plouet, J., Schilling, J., and Gospodarowicz, D. (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. EMBO J *8*, 3801-3806.

Pold, M., Zhu, L.X., Sharma, S., Burdick, M.D., Lin, Y., Lee, P.P., Pold, A., Luo, J., Krysan, K., Dohadwala, M.*, et al.* (2004). Cyclooxygenase-2-dependent expression of angiogenic CXC chemokines ENA-78/CXC Ligand (CXCL) 5 and interleukin-8/CXCL8 in human non-small cell lung cancer. Cancer Res *64*, 1853-1860.

Poon, E., Harris, A.L., and Ashcroft, M. (2009). Targeting the hypoxia-inducible factor (HIF) pathway in cancer. Expert Rev Mol Med *11*, e26.

Poon, R.T., Ng, I.O., Fan, S.T., Lai, E.C., Lo, C.M., Liu, C.L., and Wong, J. (2001). Clinicopathologic features of long-term survivors and disease-free survivors after resection of hepatocellular carcinoma: a study of a prospective cohort. J Clin Oncol *19*, 3037-3044.

Poultsides, G.A., Servais, E.L., Saltz, L.B., Patil, S., Kemeny, N.E., Guillem, J.G., Weiser, M., Temple, L.K., Wong, W.D., and Paty, P.B. (2009). Outcome of primary tumor in patients with synchronous stage IV colorectal cancer receiving combination chemotherapy without surgery as initial treatment. J Clin Oncol *27*, 3379-3384.

Pozzi, A., Moberg, P.E., Miles, L.A., Wagner, S., Soloway, P., and Gardner, H.A. (2000). Elevated matrix metalloprotease and angiostatin levels in integrin alpha 1 knockout mice cause reduced tumor vascularization. Proc Natl Acad Sci U S A *97*, 2202-2207.

Priceman, S.J., Sung, J.L., Shaposhnik, Z., Burton, J.B., Torres-Collado, A.X., Moughon, D.L., Johnson, M., Lusis, A.J., Cohen, D.A., Iruela-Arispe, M.L.*, et al.* (2010). Targeting distinct tumor-infiltrating myeloid cells by inhibiting CSF-1 receptor: combating tumor evasion of antiangiogenic therapy. Blood *115*, 1461-1471.

Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nat Med *9*, 677-684.

Punturieri, A., Szabo, E., Croxton, T.L., Shapiro, S.D., and Dubinett, S.M. (2009). Lung cancer and chronic obstructive pulmonary disease: needs and opportunities for integrated research. J Natl Cancer Inst *101*, 554-559.

Purdue, M.P., Johansson, M., Zelenika, D., Toro, J.R., Scelo, G., Moore, L.E., Prokhortchouk, E., Wu, X., Kiemeney, L.A., Gaborieau, V.*, et al.* (2011). Genome-wide association study of renal cell carcinoma identifies two susceptibility loci on 2p21 and 11q13.3. Nat Genet *43*, 60-65.

Qian, B.Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. Cell *141*, 39-51.

Rad, F.H., Le Buanec, H., Paturance, S., Larcier, P., Genne, P., Ryffel, B., Bensussan, A., Bizzini, B., Gallo, R.C., Zagury, D.*, et al.* (2007). VEGF kinoid vaccine, a therapeutic approach against tumor angiogenesis and metastases. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 2837-2842.

Ramlau, R., Gorbunova, V., Ciuleanu, T.E., Novello, S., Ozguroglu, M., Goksel, T., Baldotto, C., Bennouna, J., Shepherd, F.A., Le-Guennec, S.*, et al.* (2012). Aflibercept and Docetaxel versus Docetaxel alone after platinum failure in patients with advanced or metastatic non-small-cell lung cancer: a randomized, controlled phase III trial. J Clin Oncol *30*, 3640-3647.

Ramsauer, M., and D'Amore, P.A. (2002). Getting Tie(2)d up in angiogenesis. J Clin Invest *110*, 1615-1617.

Ranpura, V., Hapani, S., and Wu, S. (2011). Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. JAMA *305*, 487-494.

Rapisarda, A., Hollingshead, M., Uranchimeg, B., Bonomi, C.A., Borgel, S.D., Carter, J.P., Gehrs, B., Raffeld, M., Kinders, R.J., Parchment, R.*, et al.* (2009). Increased antitumor activity of bevacizumab in combination with hypoxia inducible factor-1 inhibition. Mol Cancer Ther *8*, 1867-1877.

Rapisarda, A., Zalek, J., Hollingshead, M., Braunschweig, T., Uranchimeg, B., Bonomi, C.A., Borgel, S.D., Carter, J.P., Hewitt, S.M., Shoemaker, R.H.*, et al.* (2004). Schedule-dependent inhibition of hypoxia-inducible factor-1alpha protein accumulation, angiogenesis, and tumor growth by topotecan in U251-HRE glioblastoma xenografts. Cancer Res *64*, 6845-6848.

Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., and Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. Mol Cell Biol *25*, 5675-5686.

Raymond, E., Dahan, L., Raoul, J.L., Bang, Y.J., Borbath, I., Lombard-Bohas, C., Valle, J., Metrakos, P., Smith, D., Vinik, A.*, et al.* (2011). Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med *364*, 501-513.
Reiss, Y., Knedla, A., Tal, A.O., Schmidt, M.H., Jugold, M., Kiessling, F., Burger, A.M., Wolburg, H., Deutsch, U., and Plate, K.H. (2009). Switching of vascular phenotypes within a murine breast cancer model induced by angiopoietin-2. J Pathol *217*, 571-580.

Rennel, E., Waine, E., Guan, H., Schuler, Y., Leenders, W., Woolard, J., Sugiono, M., Gillatt, D., Kleinerman, E., Bates, D.*, et al.* (2008). The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. Br J Cancer *98*, 1250-1257.

Rennel, E.S., Harper, S.J., and Bates, D.O. (2009). Therapeutic potential of manipulating VEGF splice isoforms in oncology. Future Oncol *5*, 703-712.

Ribatti, D. (2009a). The discovery of antiangiogenic molecules: a historical review. Curr Pharm Des *15*, 345-352.

Ribatti, D. (2009b). Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review. Leuk Res *33*, 638-644.

Richard, D.E., Berra, E., Gothie, E., Roux, D., and Pouyssegur, J. (1999). p42/p44 mitogen-activated protein kinases phosphorylate hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and enhance the transcriptional activity of HIF-1. J Biol Chem *274*, 32631-32637.

Richard, S., Graff, J., Lindau, J., and Resche, F. (2004). Von Hippel-Lindau disease. Lancet *363*, 1231-1234.

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

Rini, B.I., Escudier, B., Tomczak, P., Kaprin, A., Szczylik, C., Hutson, T.E., Michaelson, M.D., Gorbunova, V.A., Gore, M.E., Rusakov, I.G.*, et al.* (2011). Comparative effectiveness of axitinib versus sorafenib in advanced renal cell carcinoma (AXIS): a randomised phase 3 trial. Lancet *378*, 1931-1939.

Rini, B.I., Halabi, S., Rosenberg, J.E., Stadler, W.M., Vaena, D.A., Ou, S.S., Archer, L., Atkins, J.N., Picus, J., Czaykowski, P.*, et al.* (2008). Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206. J Clin Oncol *26*, 5422-5428.

Rini, B.I., Wilding, G., Hudes, G., Stadler, W.M., Kim, S., Tarazi, J., Rosbrook, B., Trask, P.C., Wood, L., and Dutcher, J.P. (2009). Phase II study of axitinib in sorafenib-refractory metastatic renal cell carcinoma. J Clin Oncol *27*, 4462-4468.

Roberts, W.G., and Palade, G.E. (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. J Cell Sci *108 (Pt 6)*, 2369-2379.

Rolny, C., Mazzone, M., Tugues, S., Laoui, D., Johansson, I., Coulon, C., Squadrito, M.L., Segura, I., Li, X., Knevels, E.*, et al.* (2011). HRG inhibits tumor growth and metastasis by inducing macrophage polarization and vessel normalization through downregulation of PlGF. Cancer Cell *19*, 31-44.

Rosell, R., Molina, M.A., and Serrano, M.J. (2012). EGFR mutations in circulating tumour DNA. Lancet Oncol *13*, 971-973.

Roskoski, R., Jr. (2007). Sunitinib: a VEGF and PDGF receptor protein kinase and angiogenesis inhibitor. Biochem Biophys Res Commun *356*, 323-328.

Russo, P. (2010). Multi-modal treatment for metastatic renal cancer: the role of surgery. World J Urol *28*, 295-301.

Ryan, H.E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassmann, M., Arbeit, J.M., and Johnson, R.S. (2000). Hypoxia-inducible factor-1alpha is a positive factor in solid tumor growth. Cancer Res *60*, 4010-4015.

Saharinen, P., Eklund, L., Miettinen, J., Wirkkala, R., Anisimov, A., Winderlich, M., Nottebaum, A., Vestweber, D., Deutsch, U., Koh, G.Y.*, et al.* (2008). Angiopoietins assemble distinct Tie2 signalling complexes in endothelial cell-cell and cell-matrix contacts. Nat Cell Biol *10*, 527-537.

Salcedo, R., and Oppenheim, J.J. (2003). Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. Microcirculation *10*, 359-370.

Salgia, R. (2011). Prognostic significance of angiogenesis and angiogenic growth factors in nonsmall cell lung cancer. Cancer *117*, 3889-3899.

Sallinen, H., Anttila, M., Narvainen, J., Koponen, J., Hamalainen, K., Kholova, I., Heikura, T., Toivanen, P., Kosma, V.M., Heinonen, S.*, et al.* (2009). Antiangiogenic gene therapy with

soluble VEGFR-1, -2, and -3 reduces the growth of solid human ovarian carcinoma in mice. Mol Ther *17*, 278-284.

Sandler, A., Gray, R., Perry, M.C., Brahmer, J., Schiller, J.H., Dowlati, A., Lilenbaum, R., and Johnson, D.H. (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N Engl J Med *355*, 2542-2550.

Saur, D., Seidler, B., Schneider, G., Algul, H., Beck, R., Senekowitsch-Schmidtke, R., Schwaiger, M., and Schmid, R.M. (2005). CXCR4 expression increases liver and lung metastasis in a mouse model of pancreatic cancer. Gastroenterology *129*, 1237-1250.

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

Schaal, T.D., and Maniatis, T. (1999a). Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA. Mol Cell Biol *19*, 261-273.

Schaal, T.D., and Maniatis, T. (1999b). Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. Mol Cell Biol *19*, 1705-1719.

Schimanski, C.C., Schwald, S., Simiantonaki, N., Jayasinghe, C., Gonner, U., Wilsberg, V., Junginger, T., Berger, M.R., Galle, P.R., and Moehler, M. (2005). Effect of chemokine receptors CXCR4 and CCR7 on the metastatic behavior of human colorectal cancer. Clin Cancer Res *11*, 1743-1750.

Schneider, B.P., Wang, M., Radovich, M., Sledge, G.W., Badve, S., Thor, A., Flockhart, D.A., Hancock, B., Davidson, N., Gralow, J.*, et al.* (2008). Association of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptor-2 genetic polymorphisms with outcome in a trial of paclitaxel compared with paclitaxel plus bevacizumab in advanced breast cancer: ECOG 2100. J Clin Oncol *26*, 4672-4678.

Schoenleber, S.J., Kurtz, D.M., Talwalkar, J.A., Roberts, L.R., and Gores, G.J. (2009). Prognostic role of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma: systematic review and meta-analysis. Br J Cancer *100*, 1385-1392.

Schomber, T., Zumsteg, A., Strittmatter, K., Crnic, I., Antoniadis, H., Littlewood-Evans, A., Wood, J., and Christofori, G. (2009). Differential effects of the vascular endothelial growth factor receptor inhibitor PTK787/ZK222584 on tumor angiogenesis and tumor lymphangiogenesis. Mol Cancer Ther *8*, 55-63.

Schutz, F.A., Je, Y., Richards, C.J., and Choueiri, T.K. (2012). Meta-analysis of randomized controlled trials for the incidence and risk of treatment-related mortality in patients with cancer treated with vascular endothelial growth factor tyrosine kinase inhibitors. J Clin Oncol *30*, 871-877.

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

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

Semenza, G.L. (2010). Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. Oncogene *29*, 625-634.

Sennino, B., and McDonald, D.M. (2012). Controlling escape from angiogenesis inhibitors. Nat Rev Cancer *12*, 699-709.

Seppinen, L., Sormunen, R., Soini, Y., Elamaa, H., Heljasvaara, R., and Pihlajaniemi, T. (2008). Lack of collagen XVIII accelerates cutaneous wound healing, while overexpression of its endostatin domain leads to delayed healing. Matrix Biol *27*, 535-546.

Shaheen, R.M., Tseng, W.W., Davis, D.W., Liu, W., Reinmuth, N., Vellagas, R., Wieczorek, A.A., Ogura, Y., McConkey, D.J., Drazan, K.E.*, et al.* (2001). Tyrosine kinase inhibition of multiple angiogenic growth factor receptors improves survival in mice bearing colon cancer liver metastases by inhibition of endothelial cell survival mechanisms. Cancer Res *61*, 1464-1468.

Shaked, Y., Ciarrocchi, A., Franco, M., Lee, C.R., Man, S., Cheung, A.M., Hicklin, D.J., Chaplin, D., Foster, F.S., Benezra, R.*, et al.* (2006). Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors. Science *313*, 1785-1787.

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T.P., Gerssenstein, M., Wu, X.F., Breitman, M.L., and Schuh, A.C. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. Nature *376*, 62-66.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. Nature *410*, 1107-1111.

Sharma, B., Nawandar, D.M., Nannuru, K.C., Varney, M.L., and Singh, R.K. (2013). Targeting CXCR2 enhances chemotherapeutic response, inhibits mammary tumor growth, angiogenesis, and lung metastasis. Mol Cancer Ther *12*, 799-808.

Shen, C., Beroukhim, R., Schumacher, S.E., Zhou, J., Chang, M., Signoretti, S., and Kaelin, W.G., Jr. (2011). Genetic and functional studies implicate HIF1alpha as a 14q kidney cancer suppressor gene. Cancer Discov *1*, 222-235.

Shibuya, M., and Claesson-Welsh, L. (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. Exp Cell Res *312*, 549-560.

Shields, J.D., Fleury, M.E., Yong, C., Tomei, A.A., Randolph, G.J., and Swartz, M.A. (2007). Autologous chemotaxis as a mechanism of tumor cell homing to lymphatics via interstitial flow and autocrine CCR7 signaling. Cancer Cell *11*, 526-538.

Shima, D.T., Kuroki, M., Deutsch, U., Ng, Y.S., Adamis, A.P., and D'Amore, P.A. (1996). The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of the transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. J Biol Chem *271*, 3877-3883.

Shin, J.W., Min, M., Larrieu-Lahargue, F., Canron, X., Kunstfeld, R., Nguyen, L., Henderson, J.E., Bikfalvi, A., Detmar, M., and Hong, Y.K. (2006). Prox1 promotes lineage-specific expression of fibroblast growth factor (FGF) receptor-3 in lymphatic endothelium: a role for FGF signaling in lymphangiogenesis. Mol Biol Cell *17*, 576-584.

Shojaei, F., and Ferrara, N. (2008). Role of the microenvironment in tumor growth and in refractoriness/resistance to anti-angiogenic therapies. Drug Resist Updat *11*, 219-230.

Shojaei, F., Wu, X., Malik, A.K., Zhong, C., Baldwin, M.E., Schanz, S., Fuh, G., Gerber, H.P., and Ferrara, N. (2007). Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. Nat Biotechnol *25*, 911-920.

Shrimali, R.K., Yu, Z., Theoret, M.R., Chinnasamy, D., Restifo, N.P., and Rosenberg, S.A. (2010). Antiangiogenic agents can increase lymphocyte infiltration into tumor and enhance the effectiveness of adoptive immunotherapy of cancer. Cancer Res *70*, 6171-6180.

Shweiki, D., Itin, A., Soffer, D., and Keshet, E. (1992). Vascular endothlial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature *359*, 843-945.

Singh, M., Lima, A., Molina, R., Hamilton, P., Clermont, A.C., Devasthali, V., Thompson, J.D., Cheng, J.H., Bou Reslan, H., Ho, C.C.*, et al.* (2010a). Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models. Nat Biotechnol *28*, 585-593.
Singh, S., Singh, A.P., Sharma, B., Owen, L.B., and Singh, R.K. (2010b). CXCL8 and its cognate receptors in melanoma progression and metastasis. Future Oncol *6*, 111-116.

Sitohy, B., Nagy, J.A., Jaminet, S.C., and Dvorak, H.F. (2011). Tumor-surrogate blood vessel subtypes exhibit differential susceptibility to anti-VEGF therapy. Cancer Res *71*, 7021-7028.

Smith, D.C., Smith, M.R., Sweeney, C., Elfiky, A.A., Logothetis, C., Corn, P.G., Vogelzang, N.J., Small, E.J., Harzstark, A.L., Gordon, M.S.*, et al.* (2013). Cabozantinib in patients with advanced prostate cancer: results of a phase II randomized discontinuation trial. J Clin Oncol *31*, 412-419.

Smith, M.C., Luker, K.E., Garbow, J.R., Prior, J.L., Jackson, E., Piwnica-Worms, D., and Luker, G.D. (2004). CXCR4 regulates growth of both primary and metastatic breast cancer. Cancer Res *64*, 8604-8612.

Solinas, G., Marchesi, F., Garlanda, C., Mantovani, A., and Allavena, P. (2010). Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. Cancer Metastasis Rev *29*, 243-248.

Sosa, M.S., Avivar-Valderas, A., Bragado, P., Wen, H.C., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2011). ERK1/2 and p38alpha/beta signaling in tumor cell quiescence: opportunities to control dormant residual disease. Clin Cancer Res *17*, 5850-5857.

Sosa, M.S., Bragado, P., Debnath, J., and Aguirre-Ghiso, J.A. (2013). Regulation of tumor cell dormancy by tissue microenvironments and autophagy. Adv Exp Med Biol *734*, 73-89.

Soucek, L., Lawlor, E.R., Soto, D., Shchors, K., Swigart, L.B., and Evan, G.I. (2007). Mast cells are required for angiogenesis and macroscopic expansion of Myc-induced pancreatic islet tumors. Nat Med *13*, 1211-1218.

Sparmann, A., and Bar-Sagi, D. (2004). Ras-induced interleukin-8 expression plays a critical role in tumor growth and angiogenesis. Cancer Cell *6*, 447-458.

Stein, I., Itin, A., Einat, P., Skaliter, R., Grossman, Z., and Keshet, E. (1998). Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. Mol Cell Biol *18*, 3112-3119.

Sternberg, C.N., Davis, I.D., Mardiak, J., Szczylik, C., Lee, E., Wagstaff, J., Barrios, C.H., Salman, P., Gladkov, O.A., Kavina, A.*, et al.* (2010). Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial. J Clin Oncol *28*, 1061-1068.

Stewart, D.A., Yang, Y., Makowski, L., and Troester, M.A. (2012). Basal-like breast cancer cells induce phenotypic and genomic changes in macrophages. Mol Cancer Res *10*, 727-738.

Stoletov, K., Kato, H., Zardouzian, E., Kelber, J., Yang, J., Shattil, S., and Klemke, R. (2010). Visualizing extravasation dynamics of metastatic tumor cells. J Cell Sci *123*, 2332-2341.

Straussman, R., Morikawa, T., Shee, K., Barzily-Rokni, M., Qian, Z.R., Du, J., Davis, A., Mongare, M.M., Gould, J., Frederick, D.T.*, et al.* (2012). Tumour micro-environment elicits innate resistance to RAF inhibitors through HGF secretion. Nature *487*, 500-504.

Streit, M., Velasco, P., Riccardi, L., Spencer, L., Brown, L.F., Janes, L., Lange-Asschenfeldt, B., Yano, K., Hawighorst, T., Iruela-Arispe, L.*, et al.* (2000). Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. EMBO J *19*, 3272-3282.

Strieter, R.M., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., and Polverini, P.J. (1995a). Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun *210*, 51-57.

Strieter, R.M., Polverini, P.J., Arenberg, D.A., Walz, A., Opdenakker, G., Van Damme, J., and Kunkel, S.L. (1995b). Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. J Leukoc Biol *57*, 752-762.

Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D.*, et al.* (1995c). The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. J Biol Chem *270*, 27348-27357.

Su, L., Zhang, J., Xu, H., Wang, Y., Chu, Y., Liu, R., and Xiong, S. (2005). Differential expression of CXCR4 is associated with the metastatic potential of human non-small cell lung cancer cells. Clin Cancer Res *11*, 8273-8280.

Suchting, S., and Eichmann, A. (2009). Jagged gives endothelial tip cells an edge. Cell *137*, 988-990.

Suchting, S., Freitas, C., le Noble, F., Benedito, R., Breant, C., Duarte, A., and Eichmann, A. (2007). The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. Proc Natl Acad Sci U S A *104*, 3225-3230.

Sun, H., Chung, W.C., Ryu, S.H., Ju, Z., Tran, H.T., Kim, E., Kurie, J.M., and Koo, J.S. (2008). Cyclic AMP-responsive element binding protein- and nuclear factor-kappaB-regulated CXC chemokine gene expression in lung carcinogenesis. Cancer Prev Res (Phila) *1*, 316-328.

Sun, P.H., Ye, L., Mason, M.D., and Jiang, W.G. (2013). Protein tyrosine phosphatase kappa (PTPRK) is a negative regulator of adhesion and invasion of breast cancer cells, and associates with poor prognosis of breast cancer. J Cancer Res Clin Oncol.

Sun, W. (2012). Angiogenesis in metastatic colorectal cancer and the benefits of targeted therapy. J Hematol Oncol *5*, 63.

Sundberg, C., Kowanetz, M., Brown, L.F., Detmar, M., and Dvorak, H.F. (2002). Stable expression of angiopoietin-1 and other markers by cultured pericytes: phenotypic similarities to a subpopulation of cells in maturing vessels during later stages of angiogenesis in vivo. Lab Invest *82*, 387-401.

Swanson, K.R., Rockne, R.C., Claridge, J., Chaplain, M.A., Alvord, E.C., Jr., and Anderson, A.R. (2011). Quantifying the role of angiogenesis in malignant progression of gliomas: in silico modeling integrates imaging and histology. Cancer Res *71*, 7366-7375.

Swift, M.R., and Weinstein, B.M. (2009). Arterial-venous specification during development. Circ Res *104*, 576-588.

Syrios, J., Kechagias, G., and Tsavaris, N. (2013). Treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma undergoing hemodialysis: case report of two patients and short literature review. BMC Nephrol *14*, 84.

Szarvas, T., Jager, T., Totsch, M., vom Dorp, F., Kempkensteffen, C., Kovalszky, I., Romics, I., Ergun, S., and Rubben, H. (2008). Angiogenic switch of angiopietins-Tie2 system and its prognostic value in bladder cancer. Clin Cancer Res *14*, 8253-8262.

Tabruyn, S.P., Colton, K., Morisada, T., Fuxe, J., Wiegand, S.J., Thurston, G., Coyle, A.J., Connor, J., and McDonald, D.M. (2010). Angiopoietin-2-driven vascular remodeling in airway inflammation. Am J Pathol *177*, 3233-3243.

Takahashi, Y., Akishima-Fukasawa, Y., Kobayashi, N., Sano, T., Kosuge, T., Nimura, Y., Kanai, Y., and Hiraoka, N. (2007). Prognostic value of tumor architecture, tumor-associated vascular characteristics, and expression of angiogenic molecules in pancreatic endocrine tumors. Clin Cancer Res *13*, 187-196.

Tammela, T., and Alitalo, K. (2010). Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise. Cell *140*, 460-476.

Tammela, T., Zarkada, G., Wallgard, E., Murtomaki, A., Suchting, S., Wirzenius, M., Waltari, M., Hellstrom, M., Schomber, T., Peltonen, R.*, et al.* (2008). Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. Nature *454*, 656-660.

Tan, E.H., Goss, G.D., Salgia, R., Besse, B., Gandara, D.R., Hanna, N.H., Yang, J.C., Thertulien, R., Wertheim, M., Mazieres, J.*, et al.* (2011). Phase 2 trial of Linifanib (ABT-869) in patients with advanced non-small cell lung cancer. J Thorac Oncol *6*, 1418-1425.

Tang, Z., Yu, M., Miller, F., Berk, R.S., Tromp, G., and Kosir, M.A. (2008). Increased invasion through basement membrane by CXCL7-transfected breast cells. Am J Surg *196*, 690-696.

Tannenbaum, C.S., Tubbs, R., Armstrong, D., Finke, J.H., Bukowski, R.M., and Hamilton, T.A. (1998). The CXC chemokines IP-10 and Mig are necessary for IL-12-mediated regression of the mouse RENCA tumor. J Immunol *161*, 927-932.

Tannir, N.M., Wong, Y.N., Kollmannsberger, C.K., Ernstoff, M.S., Perry, D.J., Appleman, L.J., Posadas, E.M., Cho, D., Choueiri, T.K., Coates, A.*, et al.* (2011). Phase 2 trial of linifanib (ABT-869) in patients with advanced renal cell cancer after sunitinib failure. Eur J Cancer *47*, 2706-2714.

Tartour, E., Pere, H., Maillere, B., Terme, M., Merillon, N., Taieb, J., Sandoval, F., Quintin-Colonna, F., Lacerda, K., Karadimou, A.*, et al.* (2011). Angiogenesis and immunity: a bidirectional link potentially relevant for the monitoring of antiangiogenic therapy and the development of novel therapeutic combination with immunotherapy. Cancer Metastasis Rev *30*, 83-95.

Terme, M., Pernot, S., Marcheteau, E., Sandoval, F., Benhamouda, N., Colussi, O., Dubreuil, O., Carpentier, A.F., Tartour, E., and Taieb, J. (2013). VEGFA-VEGFR pathway blockade inhibits tumor-induced regulatory T-cell proliferation in colorectal cancer. Cancer Res *73*, 539-549.

Thomas, G.V., Tran, C., Mellinghoff, I.K., Welsbie, D.S., Chan, E., Fueger, B., Czernin, J., and Sawyers, C.L. (2006). Hypoxia-inducible factor determines sensitivity to inhibitors of mTOR in kidney cancer. Nat Med *12*, 122-127.

Toh, H.C., Chen, P.J., Carr, B.I., Knox, J.J., Gill, S., Ansell, P., McKeegan, E.M., Dowell, B., Pedersen, M., Qin, Q.*, et al.* (2013). Phase 2 trial of linifanib (ABT-869) in patients with unresectable or metastatic hepatocellular carcinoma. Cancer *119*, 380-387.

Topalian, S.L., Hodi, F.S., Brahmer, J.R., Gettinger, S.N., Smith, D.C., McDermott, D.F., Powderly, J.D., Carvajal, R.D., Sosman, J.A., Atkins, M.B.*, et al.* (2012). Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. N Engl J Med *366*, 2443-2454.

Tran, H.T., Liu, Y., Zurita, A.J., Lin, Y., Baker-Neblett, K.L., Martin, A.M., Figlin, R.A., Hutson, T.E., Sternberg, C.N., Amado, R.G.*, et al.* (2012). Prognostic or predictive plasma cytokines and angiogenic factors for patients treated with pazopanib for metastatic renal-cell cancer: a retrospective analysis of phase 2 and phase 3 trials. Lancet Oncol *13*, 827-837.

Trastour, C., Benizri, E., Ettore, F., Ramaioli, A., Chamorey, E., Pouyssegur, J., and Berra, E. (2007). HIF-1alpha and CA IX staining in invasive breast carcinomas: prognosis and treatment outcome. Int J Cancer *120*, 1451-1458.

Turley, R.S., Fontanella, A.N., Padussis, J.C., Toshimitsu, H., Tokuhisa, Y., Cho, E.H., Hanna, G., Beasley, G.M., Augustine, C.K., Dewhirst, M.W.*, et al.* (2012). Bevacizumab-induced alterations in vascular permeability and drug delivery: a novel approach to augment regional chemotherapy for in-transit melanoma. Clin Cancer Res *18*, 3328-3339.

Uehara, H., Troncoso, P., Johnston, D., Bucana, C.D., Dinney, C., Dong, Z., Fidler, I.J., and Pettaway, C.A. (2005). Expression of interleukin-8 gene in radical prostatectomy specimens is associated with advanced pathologic stage. Prostate *64*, 40-49.

Uthoff, S.M., Duchrow, M., Schmidt, M.H., Broll, R., Bruch, H.P., Strik, M.W., and Galandiuk, S. (2002). VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. Int J Cancer *101*, 32-36.

Vakkila, J., and Lotze, M.T. (2004). Inflammation and necrosis promote tumour growth. Nat Rev Immunol *4*, 641-648.

Van Cutsem, E., de Haas, S., Kang, Y.K., Ohtsu, A., Tebbutt, N.C., Ming Xu, J., Peng Yong, W., Langer, B., Delmar, P., Scherer, S.J.*, et al.* (2012a). Bevacizumab in combination with chemotherapy as first-line therapy in advanced gastric cancer: a biomarker evaluation from the AVAGAST randomized phase III trial. J Clin Oncol *30*, 2119-2127.

Van Cutsem, E., Kohne, C.H., Lang, I., Folprecht, G., Nowacki, M.P., Cascinu, S., Shchepotin, I., Maurel, J., Cunningham, D., Tejpar, S.*, et al.* (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. J Clin Oncol *29*, 2011-2019.

Van Cutsem, E., Tabernero, J., Lakomy, R., Prenen, H., Prausova, J., Macarulla, T., Ruff, P., van Hazel, G.A., Moiseyenko, V., Ferry, D.*, et al.* (2012b). Addition of aflibercept to fluorouracil, leucovorin, and irinotecan improves survival in a phase III randomized trial in patients with metastatic colorectal cancer previously treated with an oxaliplatin-based regimen. J Clin Oncol *30*, 3499-3506.

Van der Auwera, I., Cao, Y., Tille, J.C., Pepper, M.S., Jackson, D.G., Fox, S.B., Harris, A.L., Dirix, L.Y., and Vermeulen, P.B. (2006). First international consensus on the methodology of lymphangiogenesis quantification in solid human tumours. Br J Cancer *95*, 1611-1625.

Van der Veldt, A.A., Lubberink, M., Bahce, I., Walraven, M., de Boer, M.P., Greuter, H.N., Hendrikse, N.H., Eriksson, J., Windhorst, A.D., Postmus, P.E.*, et al.* (2012). Rapid decrease in delivery of chemotherapy to tumors after anti-VEGF therapy: implications for scheduling of anti-angiogenic drugs. Cancer Cell *21*, 82-91.

Vandercappellen, J., Van Damme, J., and Struyf, S. (2008). The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. Cancer Lett *267*, 226-244.

Varela, I., Tarpey, P., Raine, K., Huang, D., Ong, C.K., Stephens, P., Davies, H., Jones, D., Lin, M.L., Teague, J.*, et al.* (2011). Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma. Nature *469*, 539-542.

Varey, A.H., Rennel, E.S., Qiu, Y., Bevan, H.S., Perrin, R.M., Raffy, S., Dixon, A.R., Paraskeva, C., Zaccheo, O., Hassan, A.B.*, et al.* (2008). VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. Br J Cancer *98*, 1366-1379.

Venables, J.P. (2004). Aberrant and alternative splicing in cancer. Cancer Res *64*, 7647-7654.

Venables, J.P., Klinck, R., Bramard, A., Inkel, L., Dufresne-Martin, G., Koh, C., Gervais-Bird, J., Lapointe, E., Froehlich, U., Durand, M.*, et al.* (2008). Identification of alternative splicing markers for breast cancer. Cancer Res *68*, 9525-9531.

Villaume, K., Blanc, M., Gouysse, G., Walter, T., Couderc, C., Nejjari, M., Vercherat, C., Cordier-Bussat, M., Roche, C., and Scoazec, J.Y. (2010). VEGF secretion by neuroendocrine tumor cells is inhibited by octreotide and by inhibitors of the PI3K/AKT/mTOR pathway. Neuroendocrinology *91*, 268-278.

Vinader, V., and Afarinkia, K. (2012). A beginner's guide to chemokines. Future Med Chem *4*, 845-852.

Vincenti, V., Cassano, C., Rocchi, M., and Persico, G. (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. Circulation *93*, 1493-1495.

Wakui, S., Furusato, M., Itoh, T., Sasaki, H., Akiyama, A., Kinoshita, I., Asano, K., Tokuda, T., Aizawa, S., and Ushigome, S. (1992). Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. J Pathol *168*, 257-262.

Waldner, M.J., and Neurath, M.F. (2009). Colitis-associated cancer: the role of T cells in tumor development. Semin Immunopathol *31*, 249-256.

Walter, S., Weinschenk, T., Stenzl, A., Zdrojowy, R., Pluzanska, A., Szczylik, C., Staehler, M., Brugger, W., Dietrich, P.Y., Mendrzyk, R.*, et al.* (2012). Multipeptide immune response to cancer vaccine IMA901 after single-dose cyclophosphamide associates with longer patient survival. Nat Med.

Wang, B., Kaumaya, P.T., and Cohn, D.E. (2010). Immunization with synthetic VEGF peptides in ovarian cancer. Gynecol Oncol *119*, 564-570.

Wang, J., He, Q., Shao, Y.G., and Ji, M. (2013a). Chemokines fluctuate in the progression of primary breast cancer. Eur Rev Med Pharmacol Sci *17*, 596-608.

Wang, S., Wu, Y., Hou, Y., Guan, X., Castelvetere, M.P., Oblak, J.J., Banerjee, S., Filtz, T.M., Sarkar, F.H., Chen, X.*, et al.* (2013b). CXCR2 macromolecular complex in pancreatic cancer: a potential therapeutic target in tumor growth. Transl Oncol *6*, 216-225.

Wang, V., Davis, D.A., Haque, M., Huang, L.E., and Yarchoan, R. (2005). Differential gene up-regulation by hypoxia-inducible factor-1alpha and hypoxia-inducible factor-2alpha in HEK293T cells. Cancer Res *65*, 3299-3306.

Wells, S.A., Jr., Robinson, B.G., Gagel, R.F., Dralle, H., Fagin, J.A., Santoro, M., Baudin, E., Elisei, R., Jarzab, B., Vasselli, J.R.*, et al.* (2012). Vandetanib in patients with locally

advanced or metastatic medullary thyroid cancer: a randomized, double-blind phase III trial. J Clin Oncol *30*, 134-141.

Wigle, J.T., and Oliver, G. (1999). Prox1 function is required for the development of the murine lymphatic system. Cell *98*, 769-778.

Wilkerson, J., and Fojo, T. (2009). Progression-free survival is simply a measure of a drug's effect while administered and is not a surrogate for overall survival. Cancer J *15*, 379-385.

Willett, C.G., Boucher, Y., Duda, D.G., di Tomaso, E., Munn, L.L., Tong, R.T., Kozin, S.V., Petit, L., Jain, R.K., Chung, D.C*., et al.* (2005). Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. J Clin Oncol *23*, 8136-8139.

Willett, C.G., Duda, D.G., di Tomaso, E., Boucher, Y., Ancukiewicz, M., Sahani, D.V., Lahdenranta, J., Chung, D.C., Fischman, A.J., Lauwers, G.Y*., et al.* (2009). Efficacy, safety, and biomarkers of neoadjuvant bevacizumab, radiation therapy, and fluorouracil in rectal cancer: a multidisciplinary phase II study. J Clin Oncol *27*, 3020-3026.
Willett, C.G., Duda, D.G., di Tomaso, E., Boucher, Y., Czito, B.G., Vujaskovic, Z., Vlahovic, G., Bendell, J., Cohen, K.S., Hurwitz, H.I*., et al.* (2007). Complete pathological response to bevacizumab and chemoradiation in advanced rectal cancer. Nat Clin Pract Oncol *4*, 316-321.

Winkler, F., Kozin, S.V., Tong, R.T., Chae, S.S., Booth, M.F., Garkavtsev, I., Xu, L., Hicklin, D.J., Fukumura, D., di Tomaso, E*., et al.* (2004). Kinetics of vascular normalization by VEGFR2 blockade governs brain tumor response to radiation: role of oxygenation, angiopoietin-1, and matrix metalloproteinases. Cancer Cell *6*, 553-563.

Wissmann, C., and Detmar, M. (2006). Pathways targeting tumor lymphangiogenesis. Clin Cancer Res *12*, 6865-6868.

Wolter, P., Beuselinck, B., Pans, S., and Schoffski, P. (2009). Flare-up: an often unreported phenomenon nevertheless familiar to oncologists prescribing tyrosine kinase inhibitors. Acta Oncol *48*, 621-624.

Woodard, J., and Platanias, L.C. (2010). AMP-activated kinase (AMPK)-generated signals in malignant melanoma cell growth and survival. Biochem Biophys Res Commun *398*, 135-139.

Woolard, J., Bevan, H.S., Harper, S.J., and Bates, D.O. (2009). Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. Microcirculation *16*, 572-592.

Woolard, J., Wang, W.Y., Bevan, H.S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R.O., Cui, T.G., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R*., et al.* (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. Cancer Res *64*, 7822-7835.

Wu, S., Chen, J.J., Kudelka, A., Lu, J., and Zhu, X. (2008). Incidence and risk of hypertension with sorafenib in patients with cancer: a systematic review and meta-analysis. Lancet Oncol *9*, 117-123.

Xiong, H.Q., Abbruzzese, J.L., Lin, E., Wang, L., Zheng, L., and Xie, K. (2004). NF-kappaB activity blockade impairs the angiogenic potential of human pancreatic cancer cells. Int J Cancer *108*, 181-188.

Xu, C.F., Bing, N.X., Ball, H.A., Rajagopalan, D., Sternberg, C.N., Hutson, T.E., de Souza, P., Xue, Z.G., McCann, L., King, K.S.*, et al.* (2011). Pazopanib efficacy in renal cell carcinoma: evidence for predictive genetic markers in angiogenesis-related and exposure-related genes. J Clin Oncol *29*, 2557-2564.

Xu, L., Duda, D.G., di Tomaso, E., Ancukiewicz, M., Chung, D.C., Lauwers, G.Y., Samuel, R., Shellito, P., Czito, B.G., Lin, P.C.*, et al.* (2009). Direct evidence that bevacizumab, an anti-VEGF antibody, up-regulates SDF1alpha, CXCR4, CXCL6, and neuropilin 1 in tumors from patients with rectal cancer. Cancer Res *69*, 7905-7910.

Yakes, F.M., Chen, J., Tan, J., Yamaguchi, K., Shi, Y., Yu, P., Qian, F., Chu, F., Bentzien, F., Cancilla, B.*, et al.* (2011). Cabozantinib (XL184), a novel MET and VEGFR2 inhibitor, simultaneously suppresses metastasis, angiogenesis, and tumor growth. Mol Cancer Ther *10*, 2298-2308.

Yao, C., Lin, Y., Chua, M.S., Ye, C.S., Bi, J., Li, W., Zhu, Y.F., and Wang, S.M. (2007). Interleukin-8 modulates growth and invasiveness of estrogen receptor-negative breast cancer cells. Int J Cancer *121*, 1949-1957.

Yao, J.C., Shah, M.H., Ito, T., Bohas, C.L., Wolin, E.M., Van Cutsem, E., Hobday, T.J., Okusaka, T., Capdevila, J., de Vries, E.G.*, et al.* (2011). Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. N Engl J Med *364*, 514-523.

Yap, T.A., and Workman, P. (2012). Exploiting the cancer genome: strategies for the discovery and clinical development of targeted molecular therapeutics. Annu Rev Pharmacol Toxicol *52*, 549-573.

Yee, J., Sadar, M.D., Sin, D.D., Kuzyk, M., Xing, L., Kondra, J., McWilliams, A., Man, S.F., and Lam, S. (2009). Connective tissue-activating peptide III: a novel blood biomarker for early lung cancer detection. J Clin Oncol *27*, 2787-2792.

Yin, J.J., Zhang, L., Munasinghe, J., Linnoila, R.I., and Kelly, K. (2010). Cediranib/AZD2171 inhibits bone and brain metastasis in a preclinical model of advanced prostate cancer. Cancer Res *70*, 8662-8673.

Yoneda, J., Kuniyasu, H., Crispens, M.A., Price, J.E., Bucana, C.D., and Fidler, I.J. (1998). Expression of angiogenesis-related genes and progression of human ovarian carcinomas in nude mice. J Natl Cancer Inst *90*, 447-454.

Yoshida, S., Ono, M., Shono, T., Izumi, H., Ishibashi, T., Suzuki, H., and Kuwano, M. (1997). Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. Mol Cell Biol *17*, 4015-4023.

You, W.K., Sennino, B., Williamson, C.W., Falcon, B., Hashizume, H., Yao, L.C., Aftab, D.T., and McDonald, D.M. (2011). VEGF and c-Met blockade amplify angiogenesis inhibition in pancreatic islet cancer. Cancer Res *71*, 4758-4768.

Yu, J.L., Rak, J.W., Klement, G., and Kerbel, R.S. (2002). Vascular endothelial growth factor isoform expression as a determinant of blood vessel patterning in human melanoma xenografts. Cancer Res *62*, 1838-1846.

Yu, M., Berk, R., and Kosir, M.A. (2010). CXCL7-Mediated Stimulation of Lymphangiogenic Factors VEGF-C, VEGF-D in Human Breast Cancer Cells. J Oncol *2010*, 939407.

Zelzer, E., Mamluk, R., Ferrara, N., Johnson, R.S., Schipani, E., and Olsen, B.R. (2004). VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. Development *131*, 2161-2171.

Zhang, B., Bowerman, N.A., Salama, J.K., Schmidt, H., Spiotto, M.T., Schietinger, A., Yu, P., Fu, Y.X., Weichselbaum, R.R., Rowley, D.A.*, et al.* (2007). Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. J Exp Med *204*, 49-55.

Zhang, F., Tang, Z., Hou, X., Lennartsson, J., Li, Y., Koch, A.W., Scotney, P., Lee, C., Arjunan, P., Dong, L.*, et al.* (2009). VEGF-B is dispensable for blood vessel growth but critical for their survival, and VEGF-B targeting inhibits pathological angiogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A *106*, 6152-6157.

Zhang, H.T., Scott, P.A., Morbidelli, L., Peak, S., Moore, J., Turley, H., Harris, A.L., Ziche, M., and Bicknell, R. (2000). The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic thanother splice variants in vivo. Br J Cancer *83*, 63-68.

Zhong, H., Chiles, K., Feldser, D., Laughner, E., Hanrahan, C., Georgescu, M.M., Simons, J.W., and Semenza, G.L. (2000). Modulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. Cancer Res *60*, 1541-1545.

Zhong, X.Y., Wang, P., Han, J., Rosenfeld, M.G., and Fu, X.D. (2009). SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. Mol Cell *35*, 1-10.

Zhu, A.X., Sahani, D.V., Duda, D.G., di Tomaso, E., Ancukiewicz, M., Catalano, O.A., Sindhwani, V., Blaszkowsky, L.S., Yoon, S.S., Lahdenranta, J.*, et al.* (2009). Efficacy, safety, and potential biomarkers of sunitinib monotherapy in advanced hepatocellular carcinoma: a phase II study. J Clin Oncol *27*, 3027-3035.

Zhu, Q., Han, X., Peng, J., Qin, H., and Wang, Y. (2012). The role of CXC chemokines and their receptors in the progression and treatment of tumors. J Mol Histol *43*, 699-713.

Zhu, Y.M., Webster, S.J., Flower, D., and Woll, P.J. (2004). Interleukin-8/CXCL8 is a growth factor for human lung cancer cells. Br J Cancer *91*, 1970-1976.

Zini, L., Capitanio, U., Perrotte, P., Jeldres, C., Shariat, S.F., Arjane, P., Widmer, H., Montorsi, F., Patard, J.J., and Karakiewicz, P.I. (2009). Population-based assessment of

survival after cytoreductive nephrectomy versus no surgery in patients with metastatic renal cell carcinoma. Urology *73*, 342-346.

Zitvogel, L., Apetoh, L., Ghiringhelli, F., and Kroemer, G. (2008). Immunological aspects of cancer chemotherapy. Nat Rev Immunol *8*, 59-73.

Zitvogel, L., and Kroemer, G. (2012). Targeting PD-1/PD-L1 interactions for cancer immunotherapy. Oncoimmunology *1*, 1223-1225.

Zong, W.X., and Thompson, C.B. (2006). Necrotic death as a cell fate. Genes Dev *20*, 1-15.

Zundel, W., Schindler, C., Haas-Kogan, D., Koong, A., Kaper, F., Chen, E., Gottschalk, A.R., Ryan, H.E., Johnson, R.S., Jefferson, A.B.*, et al.* (2000). Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. Genes Dev *14*, 391-396.

Zuniga, R.M., Torcuator, R., Jain, R., Anderson, J., Doyle, T., Schultz, L., and Mikkelsen, T. (2010). Rebound tumour progression after the cessation of bevacizumab therapy in patients with recurrent high-grade glioma. J Neurooncol *99*, 237-242.

ANNEXES

ANNEXE 1

Hindawi Publishing Corporation
Journal of Nucleic Acids
Volume 2012, Article ID 162692, 7 pages
doi:10.1155/2012/162692

Review Article

VEGF Spliced Variants: Possible Role of Anti-Angiogenesis Therapy

Caroline Hilmi, Mélanie Guyot, and Gilles Pagès

University of Nice Sophia Antipolis, Institute of Development and Cancer Research, UMR CNRS 6543, Centre Antoine Lacassagne, 33 Avenue de Valombrose, 06189 Nice, France

Correspondence should be addressed to Gilles Pagès, gpages@unice.fr

Received 17 June 2011; Revised 27 July 2011; Accepted 29 July 2011

Academic Editor: Didier Auboeuf

Copyright © 2012 Caroline Hilmi et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Angiogenesis has been targeted in retinopathies, psoriasis, and a variety of cancers (colon, breast, lung, and kidney). Among these tumour types, clear cell renal cell carcinomas (RCCs) are the most vascularized tumours due to mutations of the von Hippel Lindau gene resulting in HIF-1 alpha stabilisation and overexpression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Surgical nephrectomy remains the most efficient curative treatment for patients with noninvasive disease, while VEGF targeting has resulted in varying degrees of success for treating metastatic disease. VEGF pre-mRNA undergoes alternative splicing generating pro-angiogenic isoforms. However, the recent identification of novel splice variants of VEGF with anti-angiogenic properties has provided some insight for the lack of current treatment efficacy. Here we discuss an explanation for the relapse to anti-angiogenesis treatment as being due to either an initial or acquired resistance to the therapy. We also discuss targeting angiogenesis via SR (serine/arginine-rich) proteins implicated in VEGF splicing.

1. Introduction

Therapies targeting angiogenesis seek to either decrease VEGF levels or to block its receptors resulting in the inhibition of downstream signalling pathways such as RAS/RAF/MEK/ERK and PI3 Kinase. Thus, molecules used in the clinic block VEGF or inhibit the tyrosine kinase activity of the VEGF receptors. These classical strategies evidently target endothelial cells and thus prevent angiogenesis but may also inhibit autocrine proliferative/survival pathways due to abnormal expression of VEGF receptors by tumour cells of different origins [1–9].

The main treatment commonly used is Bevacizumab (BVZ), a humanized IgG1 monoclonal antibody against VEGF [10]. A phase II clinical trial has shown that BVZ can significantly prolong the time to progression of disease in patients with metastatic renal-cell cancer [11]. However, only the BVZ plus interferon alpha (IFN) treatment has obtained approval by the Food and Drugs administration (FDA) in the United States of America and the European Medicines Agency (EMA) in Europe following phase III clinical assays [12, 13]. These clinical assays have demonstrated an increase in progression-free survival associated with the treatment combining IFN and BVZ compared to IFN alone. Unfortunately, BVZ plus IFN did not improve overall survival when compared to IFN monotherapy [14, 15]. Other treatments targeting the different VEGF receptors are Receptor Tyrosine Kinase Inhibitors (RTKI) such as sunitinib targeting VEGFR2, PDGFR, FLT3, and c-Kit or sorafenib targeting B-Raf, c-Raf, VEGFR2/3, PDGFR, FLT3, and c-Kit. These compounds are used in cases of advanced RCC with good or intermediate prognosis. Two clinical trials showed the benefit of using sunitinib for treating advanced RCC with a greater decrease in tumour size, an increase of progression-free survival of about nine months, and a better quality of life [16, 17]. Another phase III clinical trial has also demonstrated efficacy of sorafenib on RCC [17]. However, as for the BVZ plus IFN combined treatment, sunitinib or sorafenib did not increase overall survival of RCC patients. Axitinib [18] and pazopanib [19] are new VEGFR-TKI compounds generated for the treatment of RCC but it is too early to evaluate their efficacy compared to

sorafenib or sunitinib. The other class of compounds targets the mTOR pathway. Patients who progressed on sorafenib or sunitinib as well as patients who have a poor prognosis are treated with mTOR blockers such as temsirolimus [20, 21] or everolimus [22]. Deforolimus is also a new generation of anti-mTOR compounds for the treatment of RCC [23].

2. Lack of Predictive Factors for the Success/Failure of Anti-Angiogenic Therapies

One of the main problems for patients treated with anti-angiogenic therapies is the lack of an effective predictive biomarker for their use. Many trials have tried to identify predictive biomarkers to assist in the selection of appropriate therapies. However, contradictory results from a number of these studies necessitate further investigations. Indeed, the circulating VEGF, thought to be associated with BVZ efficiency, is not predictive on benefit as has been shown in a phase II trial on RCC [11, 24]. Plasma levels of VEGF were not predictive of response to treatment by BVZ in other cancers either [24–26]. In the same way, no correlation had been observed with circulating endothelial cells (CECs) or circulating endothelial progenitors (CEPs) at only early stage, where RCC is rare to be diagnosed [27]. In summary, identification of predictive biomarkers for this treatment failed even though hypertension is thought to be a good candidate as a predictive marker of outcome with BVZ plus INF as the first-line treatment in advanced RCC [15, 28] as well as sunitinib in metastatic RCC treated patients [29].

3. Different Biological Effects Depending on Ligands and/or Receptors Involved

VEGF binds to its receptors, which then form either homodimers or heterodimers. Following the dimerization, the receptors are transphosphorylated and the downstream signalling pathways are activated. Furthermore, the kinase domain of each type of receptor is not the same and consequently, signalling will differ depending on the receptor involved. Thus, in the case of heterodimerization, the kinase domain of VEGFR1 will phosphorylate different tyrosine sites than VEGFR2 for example [30]. The same observations are also found with VEGFR2, and VEGFR3 [31]. Furthermore, depending on the ligand bound to the receptor, the signalling pathway can be rather different as has been well-described previously by Autiero et al. [32]. The situation is also complicated by the fact that neuropilin-1 a co-VEGFR is overexpressed on RCC cells and induces a specific activation of the PI3 Kinase pathway [33]. Whereas VEGFR are not expressed on RCC cells, neuropilin overexpression mediates potent proliferative and invasive capacities.

4. Implication of VEGFxxxb Isoforms

VEGF-A is the first form of VEGF that was described twenty years ago for which the codiscoverer Napoleone Ferrara was awarded the Lasker Prize [34]. The pre-mRNA of VEGF-A undergoes alternative splicing leading to different isoforms noted as VEGFxxx (xxx stands for the number of amino acids present in proteins minus the signal peptide). The major ones are VEGF165, VEGF189, and VEGF121. There are also a few minor isoforms spliced from the pre-mRNA, which are VEGF206, VEGF183, VEGF145 and VEGF148, and VEGF111 although their functions remain less clear (Figure 1) [35–40].

In 2002 Bates et al. identified a splice variant of VEGF165, VEGF165b that is expressed in most normal tissues and downregulated in cancers especially in RCC [41]. Furthermore, this finding could put a full stop to the paradox of a high level of VEGF in podocytes where angiogenesis is not upregulated. As suggested by Bates and Harper, the codiscoverers of VEGFxxxb, the existence of anti-angiogenic forms of VEGF "needs reinterpretation or at worst, require repeating the experiment with reagent that differentiate between isoforms families" [42]. In light of the discovery of Bates et al., these forms of VEGF may be anti-angiogenic forms [41, 43]. After the identification of VEGF165b, a new sub-family of VEGFxxxb isoforms were identified (VEGF189b, VEGF121b) (Figure 1) [42].

Since then, a few publications assessed the anti-angiogenic or at least a less angiogenic outcome of VEGFxxxb isoforms by, in particular, the downregulation of VEGFR signalling pathway and a decrease of tumour growth [44–46]. These results have been achieved *in vitro* on proliferation and migration of endothelial cells along with *in vivo* studies on tumour volume of RCC, prostate, melanoma, and colorectal cancers and on experimental choroidal neovascularization [44, 47–50]. Moreover, the downregulation of VEGF165b expression leads to metastatic melanoma while VEGF165b expression prevents metastasis of malignant melanoma [51]. We can hypothesize that the ratio between the pro- and the anti-angiogenic or the less angiogenic isoforms may be crucial for the angiogenic balance. Recent results strongly suggest that VEGFxxxb may act as an anticancer therapy [45, 47, 48] and as an efficient therapy of eye pathologies associated with exacerbated angiogenesis [52].

5. VEGFxxxb Isoforms as an Explanation for the Failure of Anti-Angiogenic Treatments

The identification of VEGFxxxb isoforms has complicated the initial notion that targeting the pro-angiogenic forms of VEGF would be beneficial for the treatment of diseases associated with abnormal angiogenesis. Therefore, BVZ can recognize and bind VEGFxxxb as well as VEGFxxx isoforms since BVZ recognition motif is located in VEGFR-binding domain of VEGF [53]. Hence, the concomitant presence of VEGFxxx and VEGFxxxb isoforms may contribute to the inhibition of the anti-angiogenic effect of BVZ on tumour growth [45]. This hypothesis is particularly striking since we have detected VEGFxxx and VEGFxxxb isoforms in 70% of the RCC we have tested (Grépin, R and Pagès, G personal communication). Thus, BVZ can trap the VEGFxxxb isoforms that are, by themselves, capable of decreasing the activation of the angiogenic pathway.

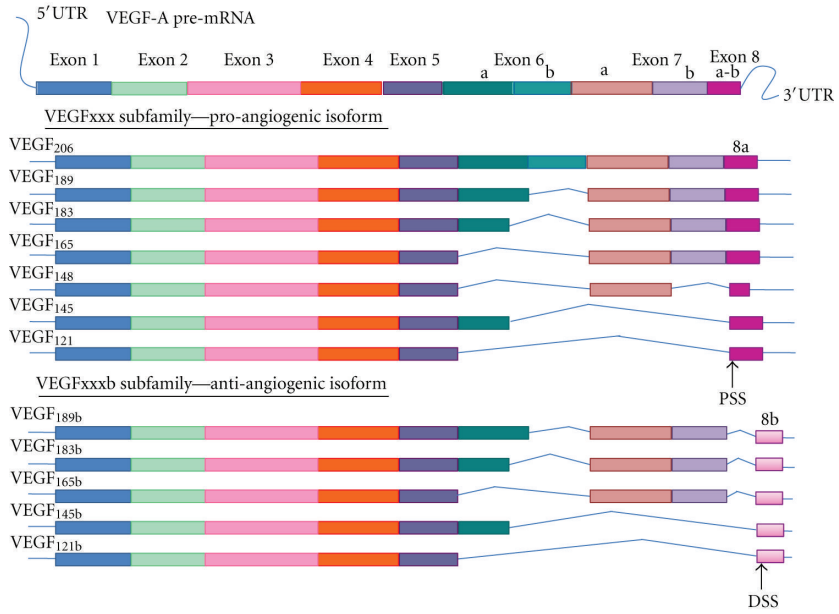


Figure 1: Alternative splicing of VEGF-A pre-mRNA. The pre-mRNA of VEGF-A undergoes alternative splicing leading to pro-angiogenic isoforms notated with the number of amino acids and containing as last exon, the exon 8a stemming from the Proximal Splicing Site (PSS) located at the beginning of exon 8. The more recent subfamily of VEGF isoforms containing five members so far, are anti-angiogenic and contain as last exon, the exon 8b resulting of the splicing at the Distal Splicing Site (DSS) located after the exon 8a.

Effectively, VEGFxxxb homodimers bind to the VEGF receptors and block the downstream signalling pathway [44]. On the other hand, VEGFxxxb can heterodimerize with VEGF preventing VEGF-mediated activation of VEGF receptors [42]. Consequently, the presence of VEGFxxxb may have a double anti-angiogenic action through (i) direct downregulation of VEGF receptors signalling pathways and (ii) by inhibiting VEGF activation of the pathway. This finding could explain why patients treated with BVZ do not have as good results as expected if VEGFxxxb isoforms are still present.

Furthermore, treatment of breast, lung, colon, and kidney cancers has combined BVZ to conventional chemotherapies. A phase III trial of metastatic breast cancers, at primary diagnosis treated with BVZ plus Paclitaxel, showed a better benefit on progression-free survival than Paclitaxel alone [54]. Similarly, combination of BVZ plus Paclitaxel-Carboplatin in a randomized study of non-small-cell lung cancer showed a better benefit than Paclitaxel-Carboplatin alone [55]. Also, the addition of BVZ to Irinotecan, Fluorouracil and Leucovorin for treatment of metastatic colorectal cancer improved survival [56]. Finally, a randomized phase III trial of metastatic RCC showed the improvement on progression-free survival of the addition of BVZ to IFN as first-line treatment [12]. However, the relapse to therapy or an acquired resistance may be explained by either the redundancy of angiogenic factors or the selection of aggressive cells, showing the limit of these treatments and the necessity to switch to RTKI to bypass resistance to anti-VEGF therapy. We can hypothesize that the chemotherapeutic agents used in combination with BVZ may normalize the VEGF/VEGFxxxb ratio in favour of VEGFxxxb. Hence, targeting the "good and bad" VEGF isoforms may lead to selection of more aggressive cells rendering the therapeutic combination totally inefficient and even deleterious. Thus, in order to get the expected benefit, two different strategies could be investigated: either targeting specifically the pro-angiogenic VEGF isoform or treating patients with BVZ only in cases where the VEGFxxxb isoforms are absent, although it represents a third of patients as described above.

6. Regulation of VEGF Splicing Leading to Targeting Splicing for Therapy

The study of VEGFxxxb isoforms regulation may be key for targeting the angiogenic balance in cancers and other pathologies. Most genes, like VEGF, can produce different transcripts, which result in the production of different protein isoforms. This phenomenon, known as alternative splicing, is mainly regulated by SR proteins. One of these proteins, ASF/SF2, has been described as a protooncogene with it being sufficient to induce cell transformation [57]. These observations provide a link between angiogenesis, cancer, and splicing. The study of VEGF splicing has illustrated in particular the need of SR proteins such

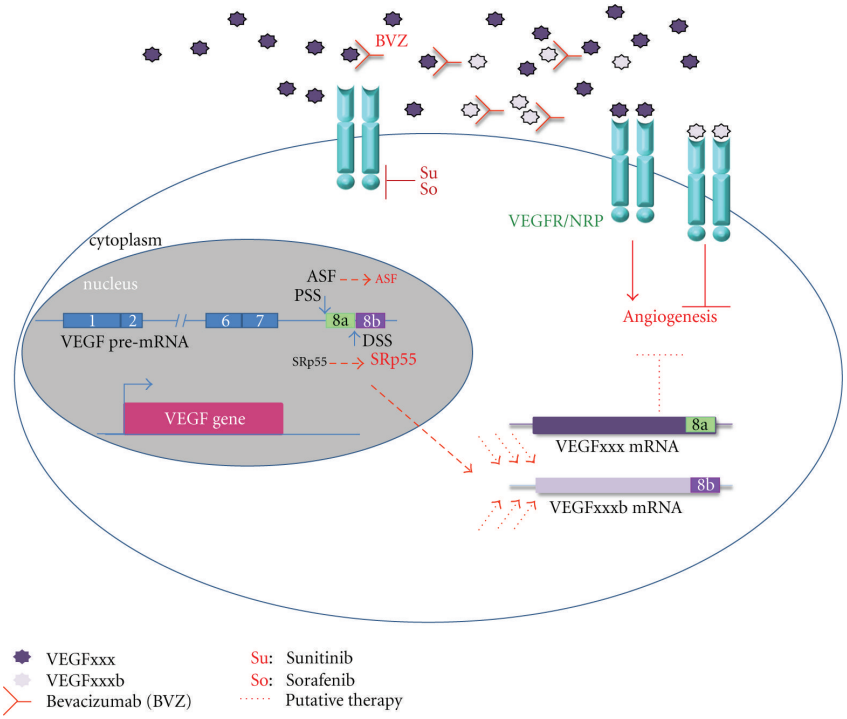


Figure 2: Existing and putative therapies targeting angiogenesis in RCC. VEGFxxx forms homodimers and interacts with their receptors inducing the activation of signalling pathways leading to increased angiogenesis. Homodimers of VEGFxxxb can bind the receptors blocking angiogenesis. However, the existence and function of potential VEGFxxx/VEGFxxxb heterodimers remain unclear. The monoclonal antibody Bevacizumab targets VEGFxxx blocking the VEGFR signalling pathways but also interacts with VEGFxxxb. Sorafenib and Sunitinib are Receptor Tyrosine Kinase inhibitors that interact with the kinase domain of VEGFR and thus inactivate the downstream signalling pathways. The VEGF gene is transcribed into a pre-mRNA that undergoes different splicing events leading to different isoforms. Splicing at Exon 8 will determinate the pro- or anti-angiogenic property of the produced protein. Hence, the use of the proximal splicing site (PSS) by in particular the splicing factor ASF/SF2 leads to pro-angiogenic -VEGFxxx- forms while the use of the distal splicing site (DSS) by another SR protein, SRp55 provides the anti-angiogenic -VEGFxxxb- forms. Combining all of this knowledge leads to propose that by acting on the VEGFxxx/VEGFxxxb ratio through the modulation of splicing, we could modify the angiogenic potential.

as ASF/SF2 and SRp55. ASF/SF2, which is upregulated in most tumour types [58–60], favours the production of the pro-angiogenic isoforms, while SRp55 favours the production of the anti-angiogenic isoforms in normal cells [58]. Furthermore, TGFβ treatment leads to an increase in the VEGFxxxb expression through an increase of SRp55 by the activation of the p38MAPK pathway. In contrast, IGF-1 stimulation leads to an increase in activated ASF/SF2 by phosphorylation and thus an increase of VEGFxxx isoforms [58]. All of the SR proteins are mainly regulated by SRPK and Clk kinases. Depending on the type of SR proteins, their phosphorylation can be mediated by specific kinases. Thus, the IGF-1-dependent increase of VEGFxxx could be blocked by the use of specific inhibitors of SRPK and/or Clk kinases. Thereby, TG0003 mainly inhibits Clk kinases and SRPIN340 inhibiting SRPK kinase, mainly involved in ASF/SF2 activation [60]. Furthermore, chromatin structure and associated modifications may influence the splicing [61].

The balance of splicing and transcription regulation depends on several other contributing factors, such as recruitment of RNA recognition, motif-containing proteins, or potential associated cofactors [62]. In addition, the sequence and the length of introns and exons play a major role for the splicing and the following translation of the mRNA. The use of Histone Deacetylase (HDAC) inhibitors such as sodium butyrate has been shown to promote the production of specific splice variants from a single pre-mRNA [63]. In the same manner, treatment of human lung microvascular endothelial cells (HLMECs) with sodium butyrate showed an increase of anti-angiogenic isoforms of VEGF suggesting that the treatment may act via a change of splicing factors acting on the balance of pro- and anti-angiogenic isoforms [64]. Thus, treatments already used in the clinic such as sunitinib or sorafenib may act through the same mechanisms leading to an increase of VEGFxxxb isoforms. Furthermore, when expressed, VEGFxxxb may be sequestered within the

cytoplasm rather than secreted suggesting an intracellular role for these isoforms [65] as was already demonstrated for VEGF [3]. We can then predict that the combination of anti-angiogenic therapies and targeting of SRPK activity to alter the VEGF/VEGFxxxb balance may improve actual therapies and be a key to increased treatment efficiency (Figure 2).

Authors' Contribution

C. Hilmi and M. Guyot equally contributed to the paper.

Acknowledgments

This work was supported by the National Institute of Cancer (INCA), the Association for Cancer Research (ARC), the "Fondation de France", the "Fondation pour la Recherche Médicale" (financial support for Caroline Hilmi), and the Ministry for Research and Education (financial support for Mélanie Guyot). The authors gratefully thank Dr. Scott Parks for editorial corrections.

References

[1] C. Ortholan, J. Durivault, J. M. Hannoun-Levi et al., "Bevacizumab/docetaxel association is more efficient than docetaxel alone in reducing breast and prostate cancer cell growth: a new paradigm for understanding the therapeutic effect of combined treatment," *European Journal of Cancer*, vol. 46, no. 16, pp. 3022–3036, 2010.

[2] S. Lee, T. T. Chen, C. L. Barber et al., "Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis," *Cell*, vol. 130, no. 4, pp. 691–703, 2007.

[3] T. H. Lee, S. Seng, M. Sekine et al., "Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1," *PLoS Medicine*, vol. 4, e186, no. 6, pp. 1101–1116, 2007.

[4] S. E. Duff, M. Jeziorska, D. D. Rosa et al., "Vascular endothelial growth factors and receptors in colorectal cancer: implications for anti-angiogenic therapy," *European Journal of Cancer*, vol. 42, no. 1, pp. 112–117, 2006.

[5] G. Giannelli, A. Azzariti, C. Sgarra, L. Porcelli, S. Antonaci, and A. Paradiso, "ZD6474 inhibits proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells," *Biochemical Pharmacology*, vol. 71, no. 4, pp. 479–485, 2006.

[6] A. D. Yang, E. R. Camp, F. Fan et al., "Vascular endothelial growth factor receptor-1 activation mediates epithelial to mesenchymal transition in human pancreatic carcinoma cells," *Cancer Research*, vol. 66, no. 1, pp. 46–51, 2006.

[7] A. Hiramatsu, H. Miwa, M. Shikami et al., "Disease-specific expression of VEGF and its receptors in AML cells: possible autocrine pathway of VEGF/type1 receptor of VEGF in t(15;17) AML and VEGF/type2 receptor of VEGF in t(8;21) AML," *Leukemia and Lymphoma*, vol. 47, no. 1, pp. 89–95, 2006.

[8] T. Seto, M. Higashiyama, H. Funai et al., "Prognostic value of expression of vascular endothelial growth factor and its flt-1 and KDR receptors in stage I non-small-cell lung cancer," *Lung Cancer*, vol. 53, no. 1, pp. 91–96, 2006.

[9] P. M. Lacal, F. Ruffini, E. Pagani, and S. D'Atri, "An autocrine loop directed by the vascular endothelial growth factor promotes invasiveness of human melanoma cells," *International Journal of Oncology*, vol. 27, no. 6, pp. 1625–1632, 2005.

[10] L. G. Presta, H. Chen, S. J. O'Connor et al., "Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders," *Cancer Research*, vol. 57, no. 20, pp. 4593–4599, 1997.

[11] J. C. Yang, L. Haworth, R. M. Sherry et al., "A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 349, no. 5, pp. 427–434, 2003.

[12] B. Escudier, A. Pluzanska, P. Koralewski et al., "Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial," *Lancet*, vol. 370, no. 9605, pp. 2103–2111, 2007.

[13] B. I. Rini, S. Halabi, J. E. Rosenberg et al., "Bevacizumab plus interferon alfa compared with interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: CALGB 90206," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 33, pp. 5422–5428, 2008.

[14] B. Escudier, J. Bellmunt, S. Négrier et al., "Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma (AVOREN): final analysis of overall survival," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 13, pp. 2144–2150, 2010.

[15] B. I. Rini, S. Halabi, J. E. Rosenberg et al., "Phase III trial of bevacizumab plus interferon alfa versus interferon alfa monotherapy in patients with metastatic renal cell carcinoma: final results of CALGB 90206," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 13, pp. 2137–2143, 2010.

[16] R. J. Motzer, G. R. Hudes, B. D. Curti et al., "Phase I/II trial of temsirolimus combined with interferon alfa for advanced renal cell carcinoma," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 25, no. 25, pp. 3958–3964, 2007.

[17] B. Escudier, T. Eisen, W. M. Stadler et al., "Sorafenib for treatment of renal cell carcinoma: final efficacy and safety results of the phase III treatment approaches in renal cancer global evaluation trial," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 20, pp. 3312–3318, 2009.

[18] B. I. Rini, G. Wilding, G. Hudes et al., "Phase II study of axitinib in sorafenib-refractory metastatic renal cell carcinoma," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 27, no. 27, pp. 4462–4468, 2009.

[19] C. N. Sternberg, I. D. Davis, J. Mardiak et al., "Pazopanib in locally advanced or metastatic renal cell carcinoma: results of a randomized phase III trial," *Journal of Clinical Oncology*, vol. 28, no. 6, pp. 1061–1068, 2010.

[20] M. J. MacKenzie, B. I. Rini, P. Elson et al., "Temsirolimus in VEGF-refractory metastatic renal cell carcinoma," *Annals of Oncology*, vol. 22, no. 1, pp. 145–148, 2011.

[21] J. Bellmunt, C. Szczylik, J. Feingold, A. Strahs, and A. Berkenblit, "Temsirolimus safety profile and management of toxic effects in patients with advanced renal cell carcinoma and poor prognostic features," *Annals of Oncology*, vol. 19, no. 8, pp. 1387–1392, 2008.

[22] R. J. Motzer, B. Escudier, S. Oudard et al., "Efficacy of everolimus in advanced renal cell carcinoma: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase III trial," *The Lancet*, vol. 372, no. 9637, pp. 449–456, 2008.

[23] M. Mita, K. Sankhala, I. Abdel-Karim, A. Mita, and F. Giles, "Deforolimus (AP23573) a novel mTOR inhibitor in clinical development," *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 17, no. 12, pp. 1947–1954, 2008.

[24] A. M. Jubb and A. L. Harris, "Biomarkers to predict the clinical efficacy of bevacizumab in cancer," *The Lancet Oncology*, vol. 11, no. 12, pp. 1172–1183, 2010.

[25] W. L. Ince, A. M. Jubb, S. N. Holden et al., "Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 97, no. 13, pp. 981–989, 2005.

[26] L. Zahiragic, C. Schliemann, R. Bieker et al., "Bevacizumab reduces VEGF expression in patients with relapsed and refractory acute myeloid leukemia without clinical antileukemic activity," *Leukemia*, vol. 21, no. 6, pp. 1310–1312, 2007.

[27] Y. Shaked, A. Ciarrocchi, M. Franco et al., "Therapy-induced acute recruitment of circulating endothelial progenitor cells to tumors," *Science*, vol. 313, no. 5794, pp. 1785–1787, 2006.

[28] C. Porta, J. Bellmunt, T. Eisen, C. Szczylik, and P. Mulders, "Treating the individual: the need for a patient-focused approach to the management of renal cell carcinoma," *Cancer Treatment Reviews*, vol. 36, no. 1, pp. 16–23, 2010.

[29] B. I. Rini, D. P. Cohen, D. R. Lu et al., "Hypertension as a biomarker of efficacy in patients with metastatic renal cell carcinoma treated with sunitinib," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 103, no. 9, pp. 763–773, 2011.

[30] K. Huang, C. Andersson, G. M. Roomans, N. Ito, and L. Claesson-Welsh, "Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 33, no. 4, pp. 315–324, 2001.

[31] J. Dixelius, T. Mäkinen, M. Wirzenius et al., "Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 42, pp. 40973–40979, 2003.

[32] M. Autiero, J. Waltenberger, D. Communi et al., "Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1," *Nature Medicine*, vol. 9, no. 7, pp. 936–943, 2003.

[33] Y. Cao, L. Wang, D. Nandy et al., "Neuropilin-1 upholds dedifferentiation and propagation phenotypes of renal cell carcinoma cells by activating Akt and sonic hedgehog axes," *Cancer Research*, vol. 68, no. 21, pp. 8667–8672, 2008.

[34] N. Ferrara and W. J. Henzel, "Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 161, no. 2, pp. 851–858, 1989.

[35] N. Ferrara, K. A. Houck, L. B. Jakeman, J. Winer, and D. W. Leung, "The vascular endothelial growth factor family of polypeptides," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 47, no. 3, pp. 211–218, 1991.

[36] K. A. Houck, N. Ferrara, J. Winer, G. Cachianes, B. Li, and D. W. Leung, "The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA," *Molecular Endocrinology*, vol. 5, no. 12, pp. 1806–1814, 1991.

[37] L. Jingjing, Y. Xue, N. Agarwal, and R. S. Roque, "Human Muller cells express VEGF183, a novel spliced variant of vascular endothelial growth factor," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 40, no. 3, pp. 752–759, 1999.

[38] Z. Poltorak, T. Cohen, R. Sivan et al., "VEGF145, a secreted vascular endothelial growth factor isoform that binds to extracellular matrix," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 272, no. 11, pp. 7151–7158, 1997.

[39] C. Whittle, K. Gillespie, R. Harrison, P. W. Mathieson, and S. J. Harper, "Heterogeneous vascular endothelial growth factor (VEGF) isoform mRNA and receptor mRNA expression in human glomeruli, and the identification of VEGF148 mRNA, a novel truncated splice variant," *Clinical Science*, vol. 97, no. 3, pp. 303–312, 1999.

[40] P. Mineur, A. C. Colige, C. F. Deroanne et al., "Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents," *Journal of Cell Biology*, vol. 179, no. 6, pp. 1261–1273, 2007.

[41] D. O. Bates, T. G. Cui, J. M. Doughty et al., "VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma," *Cancer Research*, vol. 62, no. 14, pp. 4123–4131, 2002.

[42] S. J. Harper and D. O. Bates, "VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics?" *Nature Reviews Cancer*, vol. 8, no. 11, pp. 880–887, 2008.

[43] T. G. Cui, R. R. Foster, M. Saleem et al., "Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein," *American Journal of Physiology—Renal Physiology*, vol. 286, no. 4, pp. F767–F773, 2004.

[44] J. Woolard, W. Y. Wang, H. S. Bevan et al., "VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression," *Cancer Research*, vol. 64, no. 21, pp. 7822–7835, 2004.

[45] A. H. R. Varey, E. S. Rennel, Y. Qiu et al., "VEGF165b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy," *British Journal of Cancer*, vol. 98, no. 8, pp. 1366–1379, 2008.

[46] R. Catena, L. Larzabal, M. Larrayoz et al., "VEGF121b and VEGF165b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A," *Molecular Cancer*, vol. 9, p. 320, 2010.

[47] E. S. Rennel, E. Waine, H. Guan et al., "The endogenous anti-angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice," *British Journal of Cancer*, vol. 98, no. 7, pp. 1250–1257, 2008.

[48] E. S. Rennel, M. A. Hamdollah-Zadeh, E. R. Wheatley et al., "Recombinant human VEGF165b protein is an effective anti-cancer agent in mice," *European Journal of Cancer*, vol. 44, no. 13, pp. 1883–1894, 2008.

[49] J. Hua, C. Spee, S. Kase et al., "Recombinant human VEGF165b inhibits experimental choroidal neovascularization," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 51, no. 8, pp. 4282–4288, 2010.

[50] A. L. Magnussen, E. S. Rennel, J. Hua et al., "VEGF-A165b is cytoprotective and antiangiogenic in the retina," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 51, no. 8, pp. 4273–4281, 2010.

[51] R. O. Pritchard-Jones, D. B. A. Dunn, Y. Qiu et al., "Expression of VEGFxxxb, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma," *British Journal of Cancer*, vol. 97, no. 2, pp. 223–230, 2007.

[52] R. M. Perrin, O. Konopatskaya, Y. Qiu, S. Harper, D. O. Bates, and A. J. Churchill, "Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor," *Diabetologia*, vol. 48, no. 11, pp. 2422–2427, 2005.

[53] Y. A. Muller, Y. Chen, H. W. Christinger et al., "VEGF and the Fab fragment of a humanized neutralizing antibody: crystal structure of the complex at 2.4 A resolution and mutational analysis of the interface," *Structure*, vol. 6, no. 9, pp. 1153–1167, 1998.

[54] K. Miller, M. Wang, J. Gralow et al., "Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 357, no. 26, pp. 2666–2676, 2007.

[55] A. Sandler, R. Gray, M. C. Perry et al., "Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 355, no. 24, pp. 2542–2550, 2006.

[56] H. Hurwitz, L. Fehrenbacher, W. Novotny et al., "Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer," *New England Journal of Medicine*, vol. 350, no. 23, pp. 2335–2342, 2004.

[57] R. Karni, E. de Stanchina, S. W. Lowe, R. Sinha, D. Mu, and A. R. Krainer, "The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene," *Nature Structural and Molecular Biology*, vol. 14, no. 3, pp. 185–193, 2007.

[58] D. G. Nowak, J. Woolard, E. M. Amin et al., "Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors," *Journal of Cell Science*, vol. 121, no. 20, pp. 3487–3495, 2008.

[59] T. Ezponda, M. J. Pajares, J. Agorreta et al., "The oncoprotein SF2/ASF promotes non-small cell lung cancer survival by enhancing survivin expression," *Clinical Cancer Research*, vol. 16, no. 16, pp. 4113–4125, 2010.

[60] D. G. Nowak, E. M. Amin, E. S. Rennel et al., "Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms: a novel therapeutic strategy for angiogenesis," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 8, pp. 5532–5540, 2010.

[61] S. Schwartz, E. Meshorer, and G. Ast, "Chromatin organization marks exon-intron structure," *Nature Structural and Molecular Biology*, vol. 16, no. 9, pp. 990–995, 2009.

[62] D. Auboeuf, D. H. Dowhan, X. Li et al., "CoAA, a nuclear receptor coactivator protein at the interface of transcriptional coactivation and RNA splicing," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 24, no. 1, pp. 442–453, 2004.

[63] C. Puppin, N. Passon, A. Franzoni, D. Russo, and G. Damante, "Histone deacetylase inhibitors control the transcription and alternative splicing of prohibitin in thyroid tumor cells," *Oncology Reports*, vol. 25, no. 2, pp. 393–397, 2011.

[64] J. Ciura and P. P. Jagodzinski, "Butyrate increases the formation of anti-angiogenic vascular endothelial growth factor variants in human lung microvascular endothelial cells," *Molecular Biology Reports*, vol. 37, no. 8, pp. 3729–3734, 2010.

[65] M. Peiris-Pages, S. J. Harper, D. O. Bates, and P. Ramani, "Balance of pro-versus anti-angiogenic splice isoforms of vascular endothelial growth factor as a regulator of neuroblastoma growth," *Journal of Pathology*, vol. 222, no. 2, pp. 138–147, 2010.

ANNEXE 2

Article de revue sous presse dans Methods Mol Biol, 2013

VEGF splicing and the role of VEGF splice variants: From physiological-pathological conditions to specific pre-mRNA splicing.

Mélanie Guyot and Gilles Pagès

University of Nice Sophia Antipolis, Institute for Research on Cancer and Aging of Nice (IRCAN) UMR/7284 U1081 (mguyot@unice.fr; gpages@unice.fr)

¤ Corresponding author

Summary

During this past decade, the VEGF pathway has been extensively studied. VEGF is a paradigm of molecular regulation since its expression is controlled at all possible steps including transcription, mRNA stability, translation and pre-mRNA splicing. The latter form of molecular regulation is probably the least studied. This field has been neglected, yet different forms of VEGF with different sizes and different physiological properties issued from alternative splicing have been described a long time ago. Recently a new level of complexity was added to the field of splicing of VEGF pre-mRNA. Whereas thousands of publications have described VEGF as a pro-angiogenic factor, an alternative splicing event generates specific anti-angiogenic forms of VEGF that only differ from the others by a modification in the last six amino acids of the protein. According to the scientists who discovered these isoforms, which are indistinguishable from the pro-angiogenic ones with pan VEGF antibodies, some of the literature on VEGF is at least inexact if not completely false. Moreover, the presence of anti-angiogenic forms of VEGF may explain the disappointing efficacy of anti-VEGF therapies on the overall survival of patients with different forms of cancers and with wet age-related macular degeneration (WAMD). This review will focus on the existence of the different alternative splice variants of VEGF and the molecular mechanisms associated with their expression and function.

Key words: VEGF, angiogenesis, splicing, anti-agiogenesis treatments.

1. Introduction

Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGF) was first identified by independent teams in the late Eighties as a growth or permeability factor for endothelial cells (1-7). It is mainly implicated in angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones, in physiological situations such as pregnancy, the female menstruation cycle, wound healing but also in several pathologies including WAMD, diabetic retinopathy, rheumatoid arthritis, cardiovascular diseases and cancer. VEGF belongs to a family of growth factors for vascular and lymphatic endothelial cells and include VEGF B, C, D and Placental Growth Factor (PlGF). VEGF exerts its action through the stimulation of the tyrosine kinase receptors that include VEGF receptors 1 and 2 (VEGFR1 and VEGFR2) and the co-receptor neuropilin, the latter is deprived of intrinsic enzymatic activity. VEGF binding to its receptors stimulates RAS/RAF/MEK/ERK and PI3 Kinase/AKT/mTOR pathways that are implicated in cell proliferation and survival. The VEGF/VEGFR pathway has different levels of complexity because of the different VEGF isoforms that can be present depending on the cell type and the physiological/pathological situation. VEGF-dependent angiogenesis (i.e. VEGF produced by epithelial or stromal cells stimulate endothelial cells to promote angiogenesis) is not straightforward in the case of cancer since tumor cells aberrantly express both VEGF and VEGF receptors. This generates autocrine loops that further induce production of VEGF. Finally, specific splice isoforms of VEGF may slow down angiogenesis (8). Hence, from a single gene, the different VEGF variants play a key role in the regulation of the angiogenic balance.

2. Mechanism of splicing

Splicing is a modification of the nascent pre-mRNA, which takes place after or concurrent with transcription. RNA splicing removes introns and joins exons into a primary transcript. Since it occurs prior to mRNA translation, alternative mRNA splicing enables a single gene to increase its coding capacity, allowing the synthesis of different proteins that are structurally and functionally distinct, all from a single gene. Introns can range in size from less than 100 nucleotides to hundreds of thousands of nucleotides, which is in contrast to exons that are generally short and have a size distribution of 50–300 nucleotides. Highly conserved nucleotides are present at the beginning of the intron-**the splice donor-**, at the end of the intron-**splice acceptor-** and at the 5’ and 3’ exon/intron junctions. The **branch site,** located

20 to 50 bases upstream of the acceptor site is also a very important domain since it directs the splicing event. The consensus sequences of the splice donor, of the branch site and of the splice acceptor are the following, respectively (the underlined sequences are present within the exon, the sequences in bold are present in the intron): (A/C) A G **G U (A/G) A G U**; C U (A/G) A (conserved in all genes) (C/U**);** the **pyrimidine rich track N A G** G, where A is conserved in all genes (9) (Figure 1). The splicing mechanism involves a complex of five small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs, U1, U2, U4, U5, and U6) and their associated proteins (U2AF and SF1) called **spliceosome,** which are active in the nucleus. Studies into spliceosomes have revealed their role in cancer progression and may be a good target for the development of novel anti-tumor therapies (10). More than 99% of splicing events involve canonical splicing called the **lariat pathway** (11), although a non canonical pathway that does not follow the GU/AG rule has been described (12).

In addition to the canonical mechanisms of splicing, specific sequences within the exons and introns called exonic/introning splicing enhancers/silencers (ESE/ESS and ISE/ISS) (13-19) and specific proteins of the Serine/Arginine (SR) family, which influence splicing, have been described (20). SR factors belong to the most studied family of splicing regulators but they also play a major role in nuclear export, RNA stability, mRNA quality control, and translation (21). SR proteins have a common structure composed of one or two RNA binding domains followed by a arginine-serine rich domain (RS domain) in which the serine residues can be phosphorylated. The best studied SR factors are ASF/SF2 and SC35 but SRp20, SRp30c, 9G8, SRp40, SRp55 and SRp70 also belong to the SR family of proteins. The Cdc2-like kinase (Clk) family, the dual-specificity tyrosine phosphorylation regulated kinases, the SR Protein Kinases (SRPK) 1 and 2 and the Protein Kinase B (PKB, Akt) have been shown to phosphorylate SR proteins and to influence their activity (22-24). Because of the importance of SR factors in cancer development SR factor kinases may become new therapeutic targets (25,26).

3. The pro-angiogenic forms of VEGF

A general schematic of the different isoforms of VEGF identified to date is given in figure 2. The different modifications lie in the 3' part of the gene wherein splicing events have been described. This results in nine clearly identified mRNA/proteins; VEGF 206; 189; 183; 165; 162; 148; 145; 121; 111 (Figure 2) (27). We will now focus principally on the most studied forms, VEGF189, 165 and 121.

3.1 Initial identification

The VEGF and Vascular Permiability Factor (VPF) proteins were purified to homogeneity and micro-sequenced from the N- terminus. Oligonucleotide probes of 30 or 59 bases were used to screen a cDNA library of bovine folliculo stellate cells (FC) (2) or a cDNA library of human U937 histiocytic lymphoma cells stimulated with phorbol esters (5). The entire bovine cDNA was used to screen a cDNA library of human HL60 promyelocytic leukemia cells stimulated with phorbol esters (2). From this initial screening three independent cDNA containing open reading frames that code for 215, 191 and 147 amino acids were cloned. In each case 26 amino acids corresponded to a signal peptide. Hence the corresponding mature proteins contain 189, 165 and 121 amino acids. A fourth mature molecular form of 206 amino acids was identified by screening different human cDNA library (28). The presence of different cDNAs suggested at that time a splicing mechanism but was not clearly demonstrated. Strong evidence of splicing events was revealed when the VEGF gene was cloned (28,29). Comparison of cDNA sequences indicated that the VEGF gene was split into 8 exons separated by 7 introns flanked by consensus splice donor and acceptor sites (see above).

3.2 Biological role of the first identified VEGF isoforms

To assess the functionality of the different VEGF isoforms described above, the corresponding cDNA was cloned into an expression vector and transfected into HEK 293 cells. Cell supernatants of transfected cells stimulated proliferation of capillary endothelial cells (2) or extravasation of Evan's blue dye from the circulation after injection into guinea pig (5). These properties confirmed that VEGF is a growth and a permeability factor for endothelial cells. These early experiments were followed by experiments that determined the alternative presence of specific splicing isoforms, depending on the cell type or the physiological/pathological condition. However, the specific splicing factors and enhancer splicing elements or inhibitor splicing elements controlling expression of specific VEGF isoforms were not investigated at that time except for the anti-angiogenic forms of VEGF (see below).

3.3 Relationship between sub-cellular localization and function

3.3.1 VEGF isoforms tightly associated with the plasma membrane

The logical view of the VEGF activity resides in its capacity to be secreted and to exert its action through paracrine activation of endothelial cells. However, some VEGF isoforms are tightly bound to extra-cellular heparin-containing proteoglycans through the presence of an insertion of a 24-amino acid sequence that is rich in basic residues encoded by exon 6a. They include VEGF 206, 189, 183, 162 and 145. The bioavailability of these forms depended on their release by heparinase or heparin, or proteolytic cleavage by plasmin. Cleavage by plasmin generated a diffusible protein but with a significant loss in bioactivity (30). Hence the extracellular matrix plays a role in storage of these specific forms that can be progressively released to exert a less potent effect but during a longer period of time.

3.3.2 Soluble VEGF isoforms

Soluble forms are the main isoforms that induce paracrine activation of proliferation of endothelial cells through the binding to specific VEGF tyrosine kinase receptors, the VEGFR1 and VEGFR2. They include VEGF 121 (31) and VEGF 111 (32). Since they do not contain amino acids encoded by exons 6 and 7 they are freely diffusible and have potent angiogenic properties. VEGF binding induces dimerization of the receptors, which is followed by activation of the receptor kinase activity and subsequent phosphorylation of tyrosine residues within the intracellular domain. This leads to the recruitment of molecules that contain Src Homology 2 (SH2) or Phosphotyrosine Binding (PTB) domains that are essential for further activation of intracellular signaling pathways, in particular the RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/AKT/mTOR pathways. VEGF may also bind to Neuropilin-1 (NP-1), a cell surface glycoprotein that serves as a co-receptor of VEGF (33). NPs were originally identified as co-receptors of semaphorins, which are secreted or membrane proteins responsible for axon guidance during the development of the central nervous system in vertebrates. NPs have short cytoplasmic domains and generally rely on interaction with other partners to transduce the signal from the cell surface to the nucleus although it was recently shown that NP-1 may activate AKT (34). In contrast, a naturally soluble form of NP-1 (sNP-1) was identified in liver, skin, kidney and liver cells. sNP-1 inhibits VEGF-dependent activation of VEGFR2 and possesses a potent anti-tumor activity (35).

3.3.3 VEGF isoforms with moderate association with the plasma membrane

The major representative of this category is VEGF165, one of the first isoforms to be described and probably the most studied. The heparin-binding domains encoded by exons 6 and 7 modulate cell association and bioavailability. VEGF165 contains part of the polypeptide encoded by exon 7 and thus at least 50% of this isoform remains cell-associated. VEGF is indispensable for life since invalidation of one allele of its gene leads to embryonic lethality (36,37). Moreover specific gene invalidation by homologous recombination of VEGF 164 in mice (VEGF in humans has one additional amino acid) by deletion of exons 6 and 7 resulted in impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy (38).

3.3.4 Intracellular isoforms

Any of the VEGF isoforms cited above can contain an additional 180 amino acids due to translational initiation at a CUG codon situated in what was supposed to be the 5' untranslated domain of VEGF mRNA (39-42). Initiation at this CUG codon is due to the presence of Intra Ribosomal Entry Sites (IRES) sequences, which allow translation even during stress condition and in particular in hypoxia. These VEGF isoforms, called large VEGF (L-VEGF) are present in different mouse tissues. L-VEGF is subjected to proteolytic cleavage to generate a 23 kDa NH2-specific fragment and a fragment with an apparent size similar to that of the classical AUG-initiated form (39). While the C-terminal part of L-VEGF, such as that of VEGF165, is secreted, L-VEGF or its N-terminal part resulting from proteolytic cleavage is an intracellular form. Moreover, the N-terminal part translocates to the nucleus under hypoxic conditions (42). VEGF189 was also shown to be located in the nucleus because of the presence of a highly conserved nuclear localization signal (43).

3.4 The function of the different VEGF isoforms

The role of the different isoforms of VEGF was investigated in different physiological and pathological situations. However, these results should be interpreted with caution since the presence of specific isoforms was investigated by specific RT-PCR analysis using specific primers. Therefore, it is not really known whether the presence of specific RNA strictly correlates with the presence of the corresponding protein.

3.4.1 Physiological properties of the most represented isoforms (VEGF121, 165, 189)

VEGF121 is abundant in the kidney, lung and the anterior cruciate ligament (44,46). It is a potent growth factor for vascular endothelial cells. It promotes vascular permeability and angiogenesis (47). Approximately 50% of mice expressing exclusively the VEGF120 isoform (equivalent to human VEGF121) die just after birth or after a few days of impaired myocardial angiogenesis and ischaemic cardiomyopathy (38). VEGF120/120 mice also exhibit a defect in angiogenesis during embryogenesis (48) and abnormal retinal vascular outgrowth (49).

VEGF165 induces angiogenesis and vascular permeability in different *in vivo* models (matrigel assays, the corneal eye pocket, the chick chorioallantoic membrane). Different physiological processes also depend on VEGF165 including embryonic implantation (50), the female reproductive cycle (51,52), wound healing and tissue repair (53,54). Moreover, it plays an essential role as a growth or survival factor on non endothelial cells, including lymphocytes and hematopoietic cells (55,56), retinal pigmental cells (57), neurons and Schwann cells (58), and podocytes (59). Mice expressing only VEGF164 are normal, while inactivation of this isoform caused embryonic lethality with major defects in vascularization in many organs (60,61). Clearly, the various VEGF splice isoforms do not demonstrate the same function.

VEGF189 is also highly expressed in cardiac and vascular tissue, albeit to a lesser degree than VEGF165 and VEGF121 (62). VEGF189 may play an important role during phases of lower angiogenic potential. Its effect on endothelial cell proliferation seems to be cell-specific (63). It supports cell adhesion and survival via alpha(v)beta3 integrin (64). Mice only expressing VEGF188 display normal venular outgrowth but impaired arterial development in retinas, dwarfism, disrupted development of growth plates and secondary ossification centers, and knee joint dysplasia (65). VEGF189 is preferentially expressed under conditions of increased stretch-induced cell tension, where it is thought to play a role in vascularization during bone repair (66).

3.4.2 Pathological situations involving the most represented isoforms (VEGF121, 165, 189)

Abnormal angiogenesis is a common feature of psoriasis, rheumatoid arthritis, diabetic retinopathy, WAMD and cancer. The different VEGF isoforms play a pivotal role in such pathologies (67).

VEGF121 was shown to be the most tumorigenic isoform in experimental models of breast cancers (43). Its expression is up-regulated compared to VEGF165 in malignant colon and

prostate cancers and it correlated with increased angiogenesis (68,69). VEGF121 promoted lymphangiogenesis in lung cancer patients through the production of VEGF-C (70). Recombinant VEGF121 or adenoviral delivery of VEGF121 attenuated hypertension and improved kidney repair in a rat or mouse model of preeclampsia (71,72). Intra-myocardial administration of an Adenoviral Vector Expressing (AAV) the VEGF121 cDNA for the treatment of diffuse coronary artery disease also showed promising results (73,74). VEGF121 protects rats from renal necrosis induced by thrombotic micro-angiopathy (75) and was predominantly detected in psoriatic scales (76).

VEGF165 mediated neovascularization in diabetic retinopathy, WAMD (77) and in ischemic retinal disease (78). The clear demonstration of the importance of VEGF165-mediated retinal neovascularization came from a mouse transgenic model (79). VEGF165 promoted favorable angiogenic effects but also aberrant vascular structures in normal and ischemic rabbit hindlimb skeletal muscles after AAV-VEGF-A gene transfer. Importantly, increased amounts of extracellular matrix with a high number of macrophages and fibrosis in AAV-VEGF A transduced muscles were observed (80). Electroporation of plasmid DNA encoding VEGF165 was shown to promote wound healing of skin flaps in a rat model of skin reconstructive surgery (81), sustained VEGF165 release from a sprayed fibrin biomatrix reduced ischemic flap necrosis (82) and the delivery of AAV-VEGF165 prevented tissue ischemia and improved flap survival in reconstructive surgery (83). Transfection of VEGF165 increased angiogenesis with a subsequent improvement in anastomotic healing in a clinically relevant model of gastrointestinal surgery (84). Liposome-mediated VEGF165 gene transfer may alleviate acute ischemic limb disease (85) and ultrasonic destruction of plasmid-bearing microbubbles induced therapeutic arteriogenesis in the setting of severe chronic ischemia (86). Encapsulated VEGF-secreting cell grafts showed neuroprotective and angiogenic effects on focal cerebral ischemia in rats (87).

Despite the positive effects of VEGF165 in the different situations described above, no benefit of VEGF165 was observed in a preclinical model of ischemia/reperfusion (88) or in patients with severe chronic ischemic heart disease (89).

VEGF165 is also over-expressed in solid and hematological tumors (68,90-98) and correlates with tumor aggressiveness (99).

The role of **VEGF189** was addressed in cancer patients. Tokunaga *et al.* classified isoform patterns of VEGF mRNA in human cancers into three groups: type 1, only VEGF-A121; type 2, VEGF-A121+VEGF-A165; and type 3, VEGF-A121+VEGF-A165+VEGF-A189 (100). The type 3 isoform pattern indicated the worst tumor type because of the presence of liver

metastases of colon cancers (100), poor prognosis of renal cell carcinoma (101) and hepatocellular carcinoma (96), and poor prognosis and post-operative relapse of lung cancers (102,103). VEGF189 was suggested to induce an autocrine proliferation loop on breast and renal cancer cells via NP-1 (104-105).

The localized role of VEGF189 in the tumor microenvironment appeared to be essential for the dissemination of the most aggressive tumor cells.

In addition to its essential role in tumor development VEGF189 was recently associated with choroidal endothelial cell transmigration across the retinal epithelial epithelium suggesting an essential role in WAMD (106).

3.5 Anti-angiogenesis treatments

In the case of cancer or eye pathologies, notably WAMD, the evident increase of neovascularization is principally driven by VEGF. The first approved targeted therapy against VEGF was bevacizumab (BVZ) 'Avastin', which was developed by Genentech and commercialized by Roche (107). Genentech also developed another therapeutic antibody, Ranibizumab 'Lucentis' (RNZ) for the treatment of WAMD (108); RNZ is commercialized by Novartis in Europe. RNZ is a recombinant humanized monoclonal IgG1 kappa-isotype antibody fragment (with a molecular weight of about 48 kDa). It is produced in an *Escherichia coli* expression system (and thus is not glycosylated) and is designed for intraocular use. BVZ is a recombinant humanized monoclonal IgG1 antibody (with a molecular weight of about 149 kDa). It was produced in a Chinese-hamster-ovary mammalian-cell expression system (and thus was glycosylated) and was designed for intravenous infusion. Both the antibody fragment and the full-length antibody bound to and inhibited all the biologically active forms of VEGF and were derived from the same mouse monoclonal antibody. However, RNZ has been genetically engineered through a process of selective mutation to increase its affinity for binding and for inhibiting the growth factor. The Fab domain of RNZ differs from the Fab domain of BVZ by six amino acids, five on the heavy chain (four of which are in the binding site) and one on the light chain (77). Determination of predictive marker(s) of BVZ or RNZ efficiency is important since it is expensive (about 1100 euros per injection). For WAMD only half of the treated patients maintained an optimal response (109). Absence of normalization of the vascular network in patients under treatment could help the decision to use an alternative therapy (110).

Tumor **neovascularization or angiogenesis** and growth factors inducing proliferation of cells constituting tumor blood vessels are considered as major targets for cancer treatment. The general aim of these therapeutic approaches is to asphyxiate tumors through oxygen and/or nutrient deprivation by reducing the blood flow. Inhibitors of these growth factors or of their receptors named **anti-angiogenesis therapies** were approved for the treatment of cancers of the colon, lung, breast, kidney, ovaries, brain, and pancreas (107, 111-116). Another anti-angiogenesis therapy consists of the ATP mimetic /tyrosine Kinase inhibitor (TKi), which inhibits the activity of the VEGF receptors 1,2,3, the Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) receptor, the CSF receptor and c-Kit (117-119). Despite an increase in the time to progression no convincing effects on overall survival were reported. Although physicians observed a decrease in tumor size during the first months of treatment, for the large majority of patients the remaining tumor cells acquired invasive properties and disseminated to distant sites from the primary tumor, if not removed surgically (120,121), or resulted in metastatic re-growth despite initial reduction in the size of the tumor or stabilization of the patient during the first months of treatment.

Hence, in both cases (eye pathologies and cancers), epithelial or tumor cells acquired specific properties when selection pressure was exerted by therapeutic agents, which promoted treatment evasion. It is striking to note that these therapeutic agents should only target endothelial cells. However, upon selection pressure epithelial or tumor cells aberrantly express the receptors targeted by the drugs, a situation particularly evident in the case of tumor cells.

4. The anti-angiogenic forms of VEGF

4.1 The discovery and expression in normal physiological conditions

The level of complexity of the VEGF biology was enhanced by the discovery of a new VEGF variant in which the two sub-exons 8a and 8b were alternatively spliced (8). These new isoforms were named VEGFxxxb (XXX is the number of amino acids present in the proteins, as described above, VEGF165 being the most represented). Currently, the VEGF165b form has been studied, in particular, and its properties investigated. However, in theory all pro-angiogenic isoforms of VEGF mRNA could have an alternative exon 8b in their 3' end but to date only VEGF121b, VEGF165b, VEGF145b, and VEGF189b isoforms have been described as having this addition (122). This splicing event modifies the C-terminal part of the VEGF protein from CDKPRR (VEGFxxx) to SLTRKD (VEGFxxxb). Cysteine 160 in the C-

terminal part forms a disulfide bond with cysteine 146 of exon 7. Hence its loss in the VEGFxxxb isoform modifies the tertiary structure of the protein (123). Modification of the overall charge (RR positively charged versus KD neutral) and the presence of an arginine residue instead of a proline participate in the general structure of this C-terminal domain. When considering the presence of these new VEGF isoforms many publications should be considered with caution and new studies in humans must address the role of VEGF and VEGFxxxb in parallel. Specific antibodies directed against these latter isoforms are precious tools for such studies (124).

In most normal non angiogenic tissues, VEGFxxxb constitutes 50% or more of the total VEGF expressed whereas in non angiogenic tissues VEGFxxxb represents a small proportion (125-128). In primary non-cancerous cells, VEGFxxxb isoforms are also significantly expressed (124,129,130). When considering this striking observation, VEGFxxxb isoforms were suggested to behave as being anti-angiogenic. A strong argument in favor of this assumption came from a transgenic mouse model expressing VEGF165b in the mammary gland. Over-expression of these forms decreased drastically blood vessel development, impaired alveolar coverage of the fat pad, and significantly reduced milk production (131).

4.2 VEGFxxxb in pathological conditions: down-regulation or over-expression?

According to Bates and collaborators the VEGFxxxb isoforms were identified through serendipity from kidney in which they showed down-regulation in the tumor tissue compared to the normal counterpart (8). Such down-regulation was confirmed in different cancer types including prostate (132) and colon cancers (124), and melanoma (133).

VEGFxxxb isoforms are also down-regulated in pathologies with exacerbated angiogenesis, including diabetic retinopathy (125), preeclampsia (134,135) and Denys-Drash syndrome (136). In the Denys-Drash syndrome reduced VEGF165b is due to a lack of WT1-mediated transcriptional repression of the splicing-factor kinase SRPK1 (137).

In contrast, VEGFxxxb was up-regulated in conditions of impaired angiogenesis including rat model of glaucoma (138) and in patients with systemic sclerosis (139). VEGFxxxb expression was down-regulated after stimulation of primary retinal or kidney epithelial cells with insulin-like growth factor, PDGF, and tumor necrosis factor-alpha and up-regulated after stimulation with transforming growth factor-beta. Such regulation is mediated by modulation of the

activity of the splicing factors ASF/SF2, SRp40 and SRp55 by the kinases SRPK, Clk and p38 MAP Kinase (130).

4.3 The mechanism of action of VEGFxxxb

VEGF165b can displace ^{125}I-VEGF165 from binding to HUVECs with the same affinity as VEGF165 (132). Hence, VEGF165b can be considered as a competitive inhibitor of VEGF165. VEGF165b binds to VEGFR1 and VEGFR2 but not to the VEGFR2 co-receptor NP-1 (140). However, VEGF-165b is considerably less efficient than VEGF165 in inducing phosphorylation of the positive regulatory site Y1052, which is essential for VEGFR2-dependent angiogenesis (141). The lower ability of VEGF165b to induce VEGFR2 phosphorylation on Y1052 is due to its incapacity to induce optimal rotation of the intracellular domain of the receptor. Therefore, autophosphorylation of the receptor following its dimerization upon ligand binding is drastically reduced (142). Reduced Y1052 phosphorylation induces rapid inactivation of the kinase domains of the receptor hence resulting in weak activation of the RAS/RAF/MEK/ERK and PI3 Kinase/AKT/mTOR signaling pathways. Despite the role of VEGF165b as an antagonist of VEGF165, it has been shown that VEGF165b and VEGF121b may stimulate endothelial cell proliferation and subsequent ERK activation, although it was less potent than that induced by VEGF165. Hence VEGFxxxb are not anti-angiogenic but weakly angiogenic forms of VEGF (143).

4.4 Therapeutic use of VEGFxxxb and consequences of the presence of VEGFxxxb on anti-VEGF therapy efficiency

VEGFxxxb by itself or by over-expression in different models of tumors was shown to limit abnormal angiogenesis and to prevent tumor growth, which suggested that it may be considered as a potent therapeutic compound in the case of exacerbated angiogenesis (122,124,126,132,144-147). The use of anti-angiogenesis therapies, especially the first to have FDA approval BVZ, has shown disappointing effects. Varey and colleagues have recently shown that BVZ recognized VEGF and VEGFxxxb with the same affinity since the domain targeted by the antibody that allowed VEGF receptor binding was conserved in both isoforms (124). These results may give a partial answer to the disappointing clinical results of BVZ (148). Hence, VEGFxxxb may be considered as a predictive marker of BVZ efficiency since its presence did not prolong overall survival of patients with colon carcinoma whereas in its absence, BVZ significantly prolonged survival (149).

4.5 The controversy on the existence of VEGFxxxb isoforms

Recently, a paper by Harris and co-workers questioned the real existence of the VEGFxxxb isoforms (150). This was very provocative and globally argued that VEGFxxxb isoforms were an artifact of PCR reactions. Harris *et al.* clearly showed that in a classical PCR reaction they failed to amplify VEGFxxxb isoforms from human and mouse tissues as well as from mouse cells. However, depending on the PCR primers they amplified a cDNA corresponding to a VEGF164/120 heteroduplex but also to VEGF164b from mouse cells. As suggested by Qui **et al**. VEGFxxx isoforms may amplify preferentially in PCR reactions, because of the presence of secondary structure present in the 3'UTR of the VEGF mRNA (122). One important difference in the experiments described by Bates and co-workers and Harris and co-workers is the use of different reverse transcriptases for cDNA synthesis. The group of Bates used MMLV reverse transcriptase, RNase H Minus, Point mutant (Promega) and oligo dT (Promega) as a primer while Harris *et al*. used MMLV-RT (100 units/µL). MMLV-RT, RNase H Minus can function at a higher temperature and this may be determinant in amplifying specific VEGFxxxb isoforms. Nevertheless, different groups including ours encountered difficulties in amplying VEGFxxxb isoforms, whatever the reverse transcriptase, oligo dT or random primers used for cDNA synthesis and the oligonucleotides used in the PCR reaction. As everybody knows, PCR may give rise to specific as well as non-specific amplification. However, numerous experiments described in the literature used the only commercialized anti-VEGFxxxb antibodies (anti-human VEGF165b). This antibody was extensively used not only to detect human forms (124) but also mouse (151) and rat forms (138). Although the detection and quantification of VEGFxxxb isoforms by immuno-histochemistry or ELISA, respectively in human samples are convincing the immunoblot experiments were more questionable, especially for mouse and rat samples. The VEGFxxxb antibodies were raised against the SLTRKD peptide, which is specific for the human forms (the mouse and rat counterparts are slightly different (PLTGKTD). Hence, it is very surprising that the antibody directed against the human forms recognized the mouse and rat form. Moreover, we generated HEK293 cells over-expressing VEGF165b by stable transfection of the VEGF165b cDNA in parallel with HEK293 cell transfected with the empty vector. Whereas ELISA detected high levels of intracellular and secreted VEGF165b in VEGF165b cells and very low amounts in control cells (almost a 10-fold increase) no differences were observed if the same extracts were tested by immunoblotting (for ELISA and immunoblotting we used the antibodies MAB 3045 commercialized by R&D systems which

is specific for VEGF165b). Hence, we believe that new tools must be developed to optimally detect the VEGFxxxb isoforms and finally prove their existence.

5. Conclusion

VEGF is a paradigm of gene regulation. The diversity of its isoforms demonstrates that splicing mechanisms are at the origin of a variety of functions depending on the cell type, tissues, organs and physiological and pathological conditions. The existence of VEGFxxxb is still controversial because of the difficulties in detecting them reproducibly with the available tools. Substantial effort is required to deepen the insight into all the subtleties of VEGF biology. The importance of VEGF as a therapeutic target will require a redoubling of effort to understand the subtleties of its different types of regulation. The proteins important for the generation of specific spliced isoforms may constitute new relevant therapeutic targets. Moreover, if VEGFxxxb isoforms definitely exist - we believe- that the development of specific antibodies directed only against the pro-angiogenic (the more angiogenic if VEGFxxxb is considered as less angiogenic) would be particularly pertinent in pathological situations in which VEGF and VEGFxxxb are concomitantly expressed.

6. Acknowledgments

This work was supported by the Institut National pour la Santé et la Recherche Médicale (INSERM), the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the National Institute of Cancer (INCA), the Association for Cancer Research (ARC), the Fondation de France, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), The « Association pour la Recherche sur les Tumeurs du Rein (ARTuR) » and ROCHE France. We thank Dr M Christiane Brahimi-Horn for editorial assistance.

The other authors declare that they have no conflicts of interest.

7. References

1. Ferrara N. and Henzel W. J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 161:851-858.

2. Leung D. W., Cachianes G., Kuang W. J., Goeddel D. V. and Ferrara N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. Science 246:1306-1309.

3. Plouet J., Schilling J. and Gospodarowicz D. (1989) Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. EMBO J 8:3801-3806.

4. Gospodarowicz D., Abraham J. A. and Schilling J. (1989) Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. Proc Natl Acad Sci U S A 86:7311-7315.

5. Keck P. J., Hauser S. D., Krivi G., Sanzo K., Warren T., Feder J. and Connolly D. T. (1989) Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. Science 246:1309-1312.

6. Connolly D. T., Olander J. V., Heuvelman D., Nelson R., Monsell R., Siegel N., Haymore B. L., Leimgruber R. and Feder J. (1989) Human vascular permeability factor. Isolation from U937 cells. J Biol Chem 264:20017-20024.

7. Connolly D. T., Heuvelman D. M., Nelson R., Olander J. V., Eppley B. L., Delfino J. J., Siegel N. R., Leimgruber R. M. and Feder J. (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. J Clin Invest 84:1470-1478.

8. Bates D. O., Cui T. G., Doughty J. M., Winkler M., Sugiono M., Shields J. D., Peat D., Gillatt D. and Harper S. J. (2002) VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. Cancer Res 62:4123-4131.

9. Wu Q. and Krainer A. R. (1999) AT-AC pre-mRNA splicing mechanisms and conservation of minor introns in voltage-gated ion channel genes. Mol Cell Biol 19:3225-3236.

10. Bonnal S., Vigevani L. and Valcarcel J. (2012) The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. Nat Rev Drug Discov 11:847-859.

11. Matlin A. J., Clark F. and Smith C. W. (2005) Understanding alternative splicing: towards a cellular code. Nat Rev Mol Cell Biol 6:386-398.

12. Ng B., Yang F., Huston D. P., Yan Y., Yang Y., Xiong Z., Peterson L. E., Wang H. and Yang X. F. (2004) Increased noncanonical splicing of autoantigen transcripts provides the structural basis for expression of untolerized epitopes. J Allergy Clin Immunol 114:1463-1470.

13. Gallego M. E., Gattoni R., Stevenin J., Marie J. and Expert-Bezancon A. (1997) The SR splicing factors ASF/SF2 and SC35 have antagonistic effects on intronic enhancer-dependent splicing of the beta-tropomyosin alternative exon 6A. EMBO J 16:1772-1784.

14. Schaal T. D. and Maniatis T. (1999) Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. Mol Cell Biol 19:1705-1719.

15. Schaal T. D. and Maniatis T. (1999) Multiple distinct splicing enhancers in the protein-coding sequences of a constitutively spliced pre-mRNA. Mol Cell Biol 19:261-273.

16. Krecic A. M. and Swanson M. S. (1999) hnRNP complexes: composition, structure, and function. Curr Opin Cell Biol 11:363-371.

17. Hastings M. L., Wilson C. M. and Munroe S. H. (2001) A purine-rich intronic element enhances alternative splicing of thyroid hormone receptor mRNA. RNA 7:859-874.

18. Simard M. J. and Chabot B. (2002) SRp30c is a repressor of 3' splice site utilization. Mol Cell Biol 22:4001-4010.

19. Fairbrother W. G., Yeh R. F., Sharp P. A. and Burge C. B. (2002) Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. Science 297:1007-1013.

20. Zhong X. Y., Wang P., Han J., Rosenfeld M. G. and Fu X. D. (2009) SR proteins in vertical integration of gene expression from transcription to RNA processing to translation. Mol Cell 35:1-10.

21. Huang Y. and Steitz J. A. (2005) SRprises along a messenger's journey. Mol Cell 17:613-615.

22. Eisenreich A. and Rauch U. (2010) Regulation and differential role of the tissue factor isoforms in cardiovascular biology. Trends Cardiovasc Med 20:199-203.

23. Giannakouros T., Nikolakaki E., Mylonis I. and Georgatsou E. (2011) Serine-arginine protein kinases: a small protein kinase family with a large cellular presence. FEBS J 278:570-586.

24. Ghosh G. and Adams J. A. (2011) Phosphorylation mechanism and structure of serine-arginine protein kinases. FEBS J 278:587-597.

25. Jang S. W., Yang S. J., Ehlen A., Dong S., Khoury H., Chen J., Persson J. L. and Ye K. (2008) Serine/arginine protein-specific kinase 2 promotes leukemia cell proliferation by phosphorylating acinus and regulating cyclin A1. Cancer Res 68:4559-4570.

26. Edmond V., Brambilla C., Brambilla E., Gazzeri S. and Eymin B. (2011) SRSF2 is required for sodium butyrate-mediated p21(WAF1) induction and premature senescence in human lung carcinoma cell lines. Cell Cycle 10:1968-1977.

27. Woolard J., Bevan H. S., Harper S. J. and Bates D. O. (2009) Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. Microcirculation 16:572-592.

28. Houck K. A., Ferrara N., Winer J., Cachianes G., Li B. and Leung D. W. (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. Mol Endocrinol 5:1806-1814.

29. Tischer E., Mitchell R., Hartman T., Silva M., Gospodarowicz D., Fiddes J. C. and Abraham J. A. (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. J Biol Chem 266:11947-11954.

30. Keyt B. A., Berleau L. T., Nguyen H. V., Chen H., Heinsohn H., Vandlen R. and Ferrara N. (1996) The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. J Biol Chem 271:7788-7795.

31. Houck K. A., Leung D. W., Rowland A. M., Winer J. and Ferrara N. (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. J Biol Chem 267:26031-26037.

32. Mineur P., Colige A. C., Deroanne C. F., Dubail J., Kesteloot F., Habraken Y., Noel A., Voo S., Waltenberger J., Lapiere C. M., Nusgens B. V. and Lambert C. A. (2007) Newly identified biologically active and proteolysis-resistant VEGF-A isoform VEGF111 is induced by genotoxic agents. J Cell Biol 179:1261-1273.

33. Soker S., Takashima S., Miao H. Q., Neufeld G. and Klagsbrun M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. Cell 92:735-745.

34. Cao Y., Wang L., Nandy D., Zhang Y., Basu A., Radisky D. and Mukhopadhyay D. (2008) Neuropilin-1 upholds dedifferentiation and propagation phenotypes of renal cell carcinoma cells by activating Akt and sonic hedgehog axes. Cancer Res 68:8667-8672.

35. Gagnon M. L., Bielenberg D. R., Gechtman Z., Miao H. Q., Takashima S., Soker S. and Klagsbrun M. (2000) Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. Proc Natl Acad Sci U S A 97:2573-2578.

36. Ferrara N., Carver-Moore K., Chen H., Dowd M., Lu L., O'Shea K. S., Powell-Braxton L., Hillan K. J. and Moore M. W. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. Nature 380:439-442.

37. Carmeliet P., Ferreira V., Breier G., Pollefeyt S., Kieckens L., Gertsenstein M., Fahrig M., Vanderhoeck A., Harpal K., Eberhardt C., Declercq C., Pawling J., Moons L., Collen D., Risau W. and Nagy A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. Nature 380:435-439.

38. Carmeliet P., Ng Y. S., Nuyens D., Theilmeier G., Brusselmans K., Cornelissen I., Ehler E., Kakkar V. V., Stalmans I., Mattot V., Perriard J. C., Dewerchin M., Flameng W., Nagy A., Lupu F., Moons L., Collen D., D'Amore P. A. and Shima D. T. (1999) Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. Nat Med 5:495-502.

39. Huez I., Bornes S., Bresson D., Creancier L. and Prats H. (2001) New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. Mol Endocrinol 15:2197-2210.

40. Meiron M., Anunu R., Scheinman E. J., Hashmueli S. and Levi B. Z. (2001) New isoforms of VEGF are translated from alternative initiation CUG codons located in its 5'UTR. Biochem Biophys Res Commun 282:1053-1060.

41. Tee M. K. and Jaffe R. B. (2001) A precursor form of vascular endothelial growth factor arises by initiation from an upstream in-frame CUG codon. Biochem J 359:219-226.

42. Rosenbaum-Dekel Y., Fuchs A., Yakirevich E., Azriel A., Mazareb S., Resnick M. B. and Levi B. Z. (2005) Nuclear localization of long-VEGF is associated with hypoxia and tumor angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun 332:271-278.

43. Zhang H. T., Scott P. A., Morbidelli L., Peak S., Moore J., Turley H., Harris A. L., Ziche M. and Bicknell R. (2000) The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. Br J Cancer 83:63-68.

44. Takahashi H. and Shibuya M. (2005) The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. Clin Sci (Lond) 109:227-241.

45. Rapisarda A. and Melillo G. (2012) Role of the VEGF/VEGFR axis in cancer biology and therapy. Adv Cancer Res 114:237-267.

46. Hofstaetter J. G., Saad F. A., Sunk I. G., Bobacz K., Friehs I. and Glimcher M. J. (2007) Age-dependent expression of VEGF isoforms and receptors in the rabbit anterior cruciate ligament. Biochim Biophys Acta 1770:997-1002.

47. Kondo S., Matsumoto T., Yokoyama Y., Ohmori I. and Suzuki H. (1995) The shortest isoform of human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF121) produced by Saccharomyces cerevisiae promotes both angiogenesis and vascular permeability. Biochim Biophys Acta 1243:195-202.

48. Ruhrberg C., Gerhardt H., Golding M., Watson R., Ioannidou S., Fujisawa H., Betsholtz C. and Shima D. T. (2002) Spatially restricted patterning cues provided by heparin-binding VEGF-A control blood vessel branching morphogenesis. Genes Dev 16:2684-2698.

49. Stalmans I., Ng Y. S., Rohan R., Fruttiger M., Bouche A., Yuce A., Fujisawa H., Hermans B., Shani M., Jansen S., Hicklin D., Anderson D. J., Gardiner T., Hammes H. P., Moons L., Dewerchin M., Collen D., Carmeliet P. and D'Amore P. A. (2002) Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. J Clin Invest 109:327-336.

50. Smith S. K. (2000) Angiogenesis and implantation. Hum Reprod 15 Suppl 6:59-66-
Krussel J. S., Bielfeld P., Polan M. L. and Simon C. (2003) Regulation of embryonic implantation. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 110 Suppl 1:S2-9.

51. Hoozemans D. A., Schats R., Lambalk C. B., Homburg R. and Hompes P. G. (2004) Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. Reprod Biomed Online 9:692-715.

52. Lam P. M. and Haines C. (2005) Vascular endothelial growth factor plays more than an angiogenic role in the female reproductive system. Fertil Steril 84:1775-1778.

53. Breen E. C. (2007) VEGF in biological control. J Cell Biochem 102:1358-1367.

54. Sung H. K., Michael I. P. and Nagy A. (2010) Multifaceted role of vascular endothelial growth factor signaling in adult tissue physiology: an emerging concept with clinical implications. Curr Opin Hematol 17:206-212.

55. Katoh O., Tauchi H., Kawaishi K., Kimura A. and Satow Y. (1995) Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. Cancer Res 55:5687-5692.

56. Favard C., Moukadiri H., Dorey C., Praloran V. and Plouet J. (1991) Purification and biological properties of vasculotropin, a new angiogenic cytokine. Biol Cell 73:1-6.

57. Guerrin M., Moukadiri H., Chollet P., Moro F., Dutt K., Malecaze F. and Plouet J. (1995) Vasculotropin/vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for human retinal pigment epithelial cells cultured in vitro. J Cell Physiol 164:385-394.

58. Sondell M., Lundborg G. and Kanje M. (1999) Vascular endothelial growth factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts. Brain Res 846:219-228- Sondell M., Lundborg G. and Kanje M. (1999) Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. J Neurosci 19:5731-5740- Lambrechts D., Storkebaum E., Morimoto M., Del-Favero J., Desmet F., Marklund S. L., Wyns S., Thijs V., Andersson J., van Marion I., Al-Chalabi A., Bornes S., Musson R., Hansen V., Beckman L., Adolfsson R., Pall H. S., Prats H., Vermeire S., Rutgeerts P., Katayama S., Awata T., Leigh N., Lang-Lazdunski L., Dewerchin M., Shaw C., Moons L., Vlietinck R., Morrison K. E., Robberecht W., Van Broeckhoven C., Collen D., Andersen P. M. and Carmeliet P. (2003) VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death. Nat Genet 34:383-394.

59. Foster R. R., Saleem M. A., Mathieson P. W., Bates D. O. and Harper S. J. (2005) Vascular endothelial growth factor and nephrin interact and reduce apoptosis in human podocytes. Am J Physiol Renal Physiol 288:F48-57.

60. Ferrara N. (1999) Role of vascular endothelial growth factor in the regulation of angiogenesis. Kidney Int 56:794-814.

61. Carmeliet P. and Collen D. (2000) Transgenic mouse models in angiogenesis and cardiovascular disease. J Pathol 190:387-405.

62. Zygalaki E., Kaklamanis L., Nikolaou N. I., Kyrzopoulos S., Houri M., Kyriakides Z., Lianidou E. S. and Kremastinos D. T. (2008) Expression profile of total VEGF, VEGF splice variants and VEGF receptors in the myocardium and arterial vasculature of diabetic and non-diabetic patients with coronary artery disease. Clin Biochem 41:82-87.

63. Herve M. A., Buteau-Lozano H., Mourah S., Calvo F. and Perrot-Applanat M. (2005) VEGF189 stimulates endothelial cells proliferation and migration in vitro and up-regulates the expression of Flk-1/KDR mRNA. Exp Cell Res 309:24-31.

64. Hutchings H., Ortega N. and Plouet J. (2003) Extracellular matrix-bound vascular endothelial growth factor promotes endothelial cell adhesion, migration, and survival through integrin ligation. Faseb J 17:1520-1522.

65. Maes C., Stockmans I., Moermans K., Van Looveren R., Smets N., Carmeliet P., Bouillon R. and Carmeliet G. (2004) Soluble VEGF isoforms are essential for establishing epiphyseal vascularization and regulating chondrocyte development and survival. J Clin Invest 113:188-199.

66. Faure C., Linossier M. T., Malaval L., Lafage-Proust M. H., Peyroche S., Vico L. and Guignandon A. (2008) Mechanical signals modulated vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) alternative splicing in osteoblastic cells through actin polymerisation. Bone 42:1092-1101.

67. Folkman J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. Nat Med 1:27-31.

68. Uthoff S. M., Duchrow M., Schmidt M. H., Broll R., Bruch H. P., Strik M. W. and Galandiuk S. (2002) VEGF isoforms and mutations in human colorectal cancer. Int J Cancer 101:32-36.

69. Catena R., Muniz-Medina V., Moralejo B., Javierre B., Best C. J., Emmert-Buck M. R., Green J. E., Baker C. C. and Calvo A. (2007) Increased expression of VEGF121/VEGF165-189 ratio results in a significant enhancement of human prostate tumor angiogenesis. Int J Cancer 120:2096-2109.

70. Kawai H., Minamiya Y., Ito M., Saito H. and Ogawa J. (2008) VEGF121 promotes lymphangiogenesis in the sentinel lymph nodes of non-small cell lung carcinoma patients. Lung Cancer 59:41-47.

71. Li Z., Zhang Y., Ying Ma J., Kapoun A. M., Shao Q., Kerr I., Lam A., O'Young G., Sannajust F., Stathis P., Schreiner G., Karumanchi S. A., Protter A. A. and Pollitt N. S. (2007) Recombinant vascular endothelial growth factor 121 attenuates hypertension and improves kidney damage in a rat model of preeclampsia. Hypertension 50:686-692.

72. Woods A. K., Hoffmann D. S., Weydert C. J., Butler S. D., Zhou Y., Sharma R. V. and Davisson R. L. (2011) Adenoviral delivery of VEGF121 early in pregnancy prevents spontaneous development of preeclampsia in BPH/5 mice. Hypertension 57:94-102.

73. Rosengart T. K., Lee L. Y., Patel S. R., Sanborn T. A., Parikh M., Bergman G. W., Hachamovitch R., Szulc M., Kligfield P. D., Okin P. M., Hahn R. T., Devereux R. B., Post M. R., Hackett N. R., Foster T., Grasso T. M., Lesser M. L., Isom O. W. and Crystal R. G. (1999) Angiogenesis gene therapy: phase I assessment of direct intramyocardial administration of an adenovirus vector expressing VEGF121 cDNA to individuals with clinically significant severe coronary artery disease. Circulation 100:468-474.

74. Rosengart T. K., Bishawi M. M., Halbreiner M. S., Fakhoury M., Finnin E., Hollmann C., Shroyer A. L. and Crystal R. G. (2013) Long-Term Follow-Up Assessment of a Phase 1 Trial of Angiogenic Gene Therapy Using Direct Intramyocardial Administration of an Adenoviral Vector Expressing the VEGF121 cDNA for the Treatment of Diffuse Coronary Artery Disease. Hum Gene Ther 24:203-208.

75. Suga S., Kim Y. G., Joly A., Puchacz E., Kang D. H., Jefferson J. A., Abraham J. A., Hughes J., Johnson R. J. and Schreiner G. F. (2001) Vascular endothelial growth factor (VEGF121) protects rats from renal infarction in thrombotic microangiopathy. Kidney Int 60:1297-1308.

76. Zhang Y., Matsuo H. and Morita E. (2005) Vascular endothelial growth factor 121 is the predominant isoform in psoriatic scales. Exp Dermatol 14:758-764.

77. Ciulla T. A. and Rosenfeld P. J. (2009) Antivascular endothelial growth factor therapy for neovascular age-related macular degeneration. Curr Opin Ophthalmol 20:158-165.

78. Wells J. A., Murthy R., Chibber R., Nunn A., Molinatti P. A., Kohner E. M. and Gregor Z. J. (1996) Levels of vascular endothelial growth factor are elevated in the vitreous of patients with subretinal neovascularisation. Br J Ophthalmol 80:363-366.

79. Lai C. M., Dunlop S. A., May L. A., Gorbatov M., Brankov M., Shen W. Y., Binz N., Lai Y. K., Graham C. E., Barry C. J., Constable I. J., Beazley L. D. and Rakoczy E. P. (2005) Generation of transgenic mice with mild and severe retinal neovascularisation. Br J Ophthalmol 89:911-916.

80. Karvinen H., Pasanen E., Rissanen T. T., Korpisalo P., Vahakangas E., Jazwa A., Giacca M. and Yla-Herttuala S. (2011) Long-term VEGF-A expression promotes aberrant angiogenesis and fibrosis in skeletal muscle. Gene Ther 18:1166-1172.

81. Ferraro B., Cruz Y. L., Coppola D. and Heller R. (2009) Intradermal delivery of plasmid VEGF(165) by electroporation promotes wound healing. Mol Ther 17:651-657.

82. Mittermayr R., Morton T., Hofmann M., Helgerson S., van Griensven M. and Redl H. (2008) Sustained (rh)VEGF(165) release from a sprayed fibrin biomatrix induces angiogenesis, up-regulation of endogenous VEGF-R2, and reduces ischemic flap necrosis. Wound Repair Regen 16:542-550.

83. Zacchigna S., Papa G., Antonini A., Novati F., Moimas S., Carrer A., Arsic N., Zentilin L., Visintini V., Pascone M. and Giacca M. (2005) Improved survival of ischemic cutaneous and musculocutaneous flaps after vascular endothelial growth factor gene transfer using adeno-associated virus vectors. Am J Pathol 167:981-991.

84. Enestvedt C. K., Hosack L., Winn S. R., Diggs B. S., Uchida B., O'Rourke R. W. and Jobe B. A. (2008) VEGF gene therapy augments localized angiogenesis and promotes anastomotic wound healing: a pilot study in a clinically relevant animal model. J Gastrointest Surg 12:1762-1770; discussion 1771-1762.

85. Ye L., Haider H., Esa W. B., Su L., Law P. K., Zhang W., Lim Y., Poh K. K. and Sim E. K. (2010) Liposome-based vascular endothelial growth factor-165 transfection with skeletal myoblast for treatment of ischaemic limb disease. J Cell Mol Med 14:323-336.

86. Leong-Poi H., Kuliszewski M. A., Lekas M., Sibbald M., Teichert-Kuliszewska K., Klibanov A. L., Stewart D. J. and Lindner J. R. (2007) Therapeutic arteriogenesis by ultrasound-mediated VEGF165 plasmid gene delivery to chronically ischemic skeletal muscle. Circ Res 101:295-303.

87. Yano A., Shingo T., Takeuchi A., Yasuhara T., Kobayashi K., Takahashi K., Muraoka K., Matsui T., Miyoshi Y., Hamada H. and Date I. (2005) Encapsulated vascular endothelial growth factor-secreting cell grafts have neuroprotective and angiogenic effects on focal cerebral ischemia. J Neurosurg 103:104-114.

88. Guerrero M., Athota K., Moy J., Mehta L. S., Laguens R., Crottogini A., Borrelli M., Corry P., Schoenherr D., Gentry R., Boura J., Grines C. L., Raff G. L., Shanley C. J. and O'Neill W. W. (2008) Vascular endothelial growth factor-165 gene therapy promotes cardiomyogenesis in reperfused myocardial infarction. J Interv Cardiol 21:242-251.

89. Ripa R. S., Wang Y., Jorgensen E., Johnsen H. E., Hesse B. and Kastrup J. (2006) Intramyocardial injection of vascular endothelial growth factor-A165 plasmid followed by granulocyte-colony stimulating factor to induce angiogenesis in patients with severe chronic ischaemic heart disease. Eur Heart J 27:1785-1792.

90. Cheng S. Y., Nagane M., Huang H. S. and Cavenee W. K. (1997) Intracerebral tumor-associated hemorrhage caused by overexpression of the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF121 and VEGF165 but not VEGF189. Proc Natl Acad Sci U S A 94:12081-12087.

91. Salven P., Perhoniemi V., Tykka H., Maenpaa H. and Joensuu H. (1999) Serum VEGF levels in women with a benign breast tumor or breast cancer. Breast Cancer Res Treat 53:161-166.

92. Jacobsen J., Rasmuson T., Grankvist K. and Ljungberg B. (2000) Vascular endothelial growth factor as prognostic factor in renal cell carcinoma. J Urol 163:343-347.

93. Giatromanolaki A., Koukourakis M. I., Sivridis E., Turley H., Talks K., Pezzella F., Gatter K. C. and Harris A. L. (2001) Relation of hypoxia inducible factor 1 alpha and 2 alpha in operable non-small cell lung cancer to angiogenic/molecular profile of tumours and survival. Br J Cancer 85:881-890.

94. Stimpfl M., Tong D., Fasching B., Schuster E., Obermair A., Leodolter S. and Zeillinger R. (2002) Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. Clin Cancer Res 8:2253-2259.

95. Harlozinska A., Sedlaczek P., Kulpa J., Grybos M., Wojcik E., Van Dalen A. and Einarsson R. (2004) Vascular endothelial growth factor (VEGF) concentration in sera and tumor effusions from patients with ovarian carcinoma. Anticancer Res 24:1149-1157.

96. Li Q., Xu B., Fu L. and Hao X. S. (2006) Correlation of four vascular specific growth factors with carcinogenesis and portal vein tumor thrombus formation in human hepatocellular carcinoma. J Exp Clin Cancer Res 25:403-409.

97. Aguayo A., Kantarjian H., Manshouri T., Gidel C., Estey E., Thomas D., Koller C., Estrov Z., O'Brien S., Keating M., Freireich E. and Albitar M. (2000) Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. Blood 96:2240-2245.

98. Legros L., Bourcier C., Jacquel A., Mahon F. X., Cassuto J. P., Auberger P. and Pages G. (2004) Imatinib mesylate (STI571) decreases the vascular endothelial growth factor plasma concentration in patients with chronic myeloid leukemia. Blood 104:495-501.

99. Folkman J. (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. Semin Oncol 29:15-18.

100. Tokunaga T., Oshika Y., Abe Y., Ozeki Y., Sadahiro S., Kijima H., Tsuchida T., Yamazaki H., Ueyama Y., Tamaoki N. and Nakamura M. (1998) Vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA isoform expression pattern is correlated with liver metastasis and poor prognosis in colon cancer. Br J Cancer 77:998-1002.

101. Tomisawa M., Tokunaga T., Oshika Y., Tsuchida T., Fukushima Y., Sato H., Kijima H., Yamazaki H., Ueyama Y., Tamaoki N. and Nakamura M. (1999) Expression pattern of vascular endothelial growth factor isoform is closely correlated with tumour stage and vascularisation in renal cell carcinoma. Eur J Cancer 35:133-137.

102. Oshika Y., Nakamura M., Tokunaga T., Ozeki Y., Fukushima Y., Hatanaka H., Abe Y., Yamazaki H., Kijima H., Tamaoki N. and Ueyama Y. (1998) Expression of cell-associated isoform of vascular endothelial growth factor 189 and its prognostic relevance in non-small cell lung cancer. Int J Oncol 12:541-544.

103. Yuan A., Yu C. J., Kuo S. H., Chen W. J., Lin F. Y., Luh K. T., Yang P. C. and Lee Y. C. (2001) Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. J Clin Oncol 19:432-441.

104. Herve M. A., Buteau-Lozano H., Vassy R., Bieche I., Velasco G., Pla M., Perret G., Mourah S. and Perrot-Applanat M. (2008) Overexpression of vascular endothelial growth factor 189 in breast cancer cells leads to delayed tumor uptake with dilated intratumoral vessels. Am J Pathol 172:167-178.

105. Cao Y., E G., Wang E., Pal K., Dutta S. K., Bar-Sagi D. and Mukhopadhyay D. (2012) VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. Cancer Res 72:3912-3918.

106. Wang H., Geisen P., Wittchen E. S., King B., Burridge K., D'Amore P. A. and Hartnett M. E. (2011) The role of RPE cell-associated VEGF(1)(8)(9) in choroidal endothelial cell transmigration across the RPE. Invest Ophthalmol Vis Sci 52:570-578.

107. Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., Griffing S., Holmgren E., Ferrara N., Fyfe G., Rogers B., Ross R. and Kabbinavar F. (2004) Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med 350:2335-2342.

108. Rosenfeld P. J., Brown D. M., Heier J. S., Boyer D. S., Kaiser P. K., Chung C. Y. and Kim R. Y. (2006) Ranibizumab for neovascular age-related macular degeneration. N Engl J Med 355:1419-1431.

109. Farah S. E. (2008) Treatment of neovascular age-related macular degeneration with pegaptanib and boosting with bevacizumab or ranibizumab as needed. Ophthalmic Surg Lasers Imaging 39:294-298.

110. Barakat M. R. and Kaiser P. K. (2009) VEGF inhibitors for the treatment of neovascular age-related macular degeneration. Expert Opin Investig Drugs 18:637-646.

111. Sandler A., Gray R., Perry M. C., Brahmer J., Schiller J. H., Dowlati A., Lilenbaum R. and Johnson D. H. (2006) Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 355:2542-2550.

112. Miller K., Wang M., Gralow J., Dickler M., Cobleigh M., Perez E. A., Shenkier T., Cella D. and Davidson N. E. (2007) Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. N Engl J Med 357:2666-2676.

113. Escudier B., Pluzanska A., Koralewski P., Ravaud A., Bracarda S., Szczylik C., Chevreau C., Filipek M., Melichar B., Bajetta E., Gorbunova V., Bay J. O., Bodrogi I., Jagiello-Gruszfeld A. and Moore N. (2007) Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. Lancet 370:2103-2111.

114. Burger R. A. (2007) Experience with bevacizumab in the management of epithelial ovarian cancer. J Clin Oncol 25:2902-2908.

115. Vredenburgh J. J., Desjardins A., Herndon J. E., 2nd, Marcello J., Reardon D. A., Quinn J. A., Rich J. N., Sathornsumetee S., Gururangan S., Sampson J., Wagner M., Bailey L., Bigner D. D., Friedman A. H. and Friedman H. S. (2007) Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. J Clin Oncol 25:4722-4729.

116. Masellis A. M., Sielaff T. D. and Bender G. P. (2009) Successful treatment of metastatic pancreatic adenocarcinoma with combination chemotherapy regimens. Int J Clin Oncol 14:478-481.

117. Motzer R. J., Hutson T. E., Tomczak P., Michaelson M. D., Bukowski R. M., Rixe O., Oudard S., Negrier S., Szczylik C., Kim S. T., Chen I., Bycott P. W., Baum C. M. and Figlin R. A. (2007) Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. N Engl J Med 356:115-124.

118. Choueiri T. K., Plantade A., Elson P., Negrier S., Ravaud A., Oudard S., Zhou M., Rini B. I., Bukowski R. M. and Escudier B. (2008) Efficacy of sunitinib and sorafenib in metastatic papillary and chromophobe renal cell carcinoma. J Clin Oncol 26:127-131.

119. Al-Marrawi M. Y. and Rini B. (2011) Pazopanib for the treatment of renal cancer. Expert Opin Pharmacother 12:1171-1189.

120. Paez-Ribes M., Allen E., Hudock J., Takeda T., Okuyama H., Vinals F., Inoue M., Bergers G., Hanahan D. and Casanovas O. (2009) Antiangiogenic therapy elicits

malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. Cancer Cell 15:220-231.

121. Ebos J. M., Lee C. R., Cruz-Munoz W., Bjarnason G. A., Christensen J. G. and Kerbel R. S. (2009) Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis. Cancer Cell 15:232-239.

122. Qiu Y., Hoareau-Aveilla C., Oltean S., Harper S. J. and Bates D. O. (2009) The anti-angiogenic isoforms of VEGF in health and disease. Biochem Soc Trans 37:1207-1213.

123. Claffey K. P., Senger D. R. and Spiegelman B. M. (1995) Structural requirements for dimerization, glycosylation, secretion, and biological function of VPF/VEGF. Biochim Biophys Acta 1246:1-9.

124. Varey A. H., Rennel E. S., Qiu Y., Bevan H. S., Perrin R. M., Raffy S., Dixon A. R., Paraskeva C., Zaccheo O., Hassan A. B., Harper S. J. and Bates D. O. (2008) VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. Br J Cancer 98:1366-1379.

125. Perrin R. M., Konopatskaya O., Qiu Y., Harper S., Bates D. O. and Churchill A. J. (2005) Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. Diabetologia 48:2422-2427.

126. Konopatskaya O., Churchill A. J., Harper S. J., Bates D. O. and Gardiner T. A. (2006) VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. Mol Vis 12:626-632.

127. Bevan H. S., van den Akker N. M., Qiu Y., Polman J. A., Foster R. R., Yem J., Nishikawa A., Satchell S. C., Harper S. J., Gittenberger-de Groot A. C. and Bates D. O. (2008) The alternatively spliced anti-angiogenic family of VEGF isoforms VEGFxxxb in human kidney development. Nephron Physiol 110:p57-67.

128. Ladomery M. R., Harper S. J. and Bates D. O. (2007) Alternative splicing in angiogenesis: the vascular endothelial growth factor paradigm. Cancer Lett 249:133-142.

129. Cui T. G., Foster R. R., Saleem M., Mathieson P. W., Gillatt D. A., Bates D. O. and Harper S. J. (2004) Differentiated human podocytes endogenously express an inhibitory isoform of vascular endothelial growth factor (VEGF165b) mRNA and protein. Am J Physiol Renal Physiol 286:F767-773.

130. Nowak D. G., Woolard J., Amin E. M., Konopatskaya O., Saleem M. A., Churchill A. J., Ladomery M. R., Harper S. J. and Bates D. O. (2008) Expression of pro- and anti-angiogenic isoforms of VEGF is differentially regulated by splicing and growth factors. J Cell Sci 121:3487-3495.

131. Qiu Y., Bevan H., Weeraperuma S., Wratting D., Murphy D., Neal C. R., Bates D. O. and Harper S. J. (2008) Mammary alveolar development during lactation is inhibited by the endogenous antiangiogenic growth factor isoform, VEGF165b. Faseb J 22:1104-1112.

132. Woolard J., Wang W. Y., Bevan H. S., Qiu Y., Morbidelli L., Pritchard-Jones R. O., Cui T. G., Sugiono M., Waine E., Perrin R., Foster R., Digby-Bell J., Shields J. D., Whittles C. E., Mushens R. E., Gillatt D. A., Ziche M., Harper S. J. and Bates D. O. (2004) VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. Cancer Res 64:7822-7835.

133. Pritchard-Jones R. O., Dunn D. B., Qiu Y., Varey A. H., Orlando A., Rigby H., Harper S. J. and Bates D. O. (2007) Expression of VEGF(xxx)b, the inhibitory isoforms of VEGF, in malignant melanoma. Br J Cancer 97:223-230.

134. Bates D. O., MacMillan P. P., Manjaly J. G., Qiu Y., Hudson S. J., Bevan H. S., Hunter A. J., Soothill P. W., Read M., Donaldson L. F. and Harper S. J. (2006) The endogenous anti-angiogenic family of splice variants of VEGF, VEGFxxxb, are down-regulated in pre-eclamptic placentae at term. Clin Sci (Lond) 110:575-585.

135. Bills V. L., Salmon A. H., Harper S. J., Overton T. G., Neal C. R., Jeffery B., Soothill P. W. and Bates D. O. (2011) Impaired vascular permeability regulation caused by the VEGF(1)(6)(5)b splice variant in pre-eclampsia. BJOG 118:1253-1261.

136. Schumacher V. A., Jeruschke S., Eitner F., Becker J. U., Pitschke G., Ince Y., Miner J. H., Leuschner I., Engers R., Everding A. S., Bulla M. and Royer-Pokora B. (2007)

Impaired glomerular maturation and lack of VEGF165b in Denys-Drash syndrome. J Am Soc Nephrol 18:719-729.

137. Amin E. M., Oltean S., Hua J., Gammons M. V., Hamdollah-Zadeh M., Welsh G. I., Cheung M. K., Ni L., Kase S., Rennel E. S., Symonds K. E., Nowak D. G., Royer-Pokora B., Saleem M. A., Hagiwara M., Schumacher V. A., Harper S. J., Hinton D. R., Bates D. O. and Ladomery M. R. (2011) WT1 mutants reveal SRPK1 to be a downstream angiogenesis target by altering VEGF splicing. Cancer Cell 20:768-780.

138. Ergorul C., Ray A., Huang W., Darland D., Luo Z. K. and Grosskreutz C. L. (2008) Levels of vascular endothelial growth factor-A165b (VEGF-A165b) are elevated in experimental glaucoma. Mol Vis 14:1517-1524.

139. Manetti M., Guiducci S., Romano E., Ceccarelli C., Bellando-Randone S., Conforti M. L., Ibba-Manneschi L. and Matucci-Cerinic M. (2011) Overexpression of VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, leads to insufficient angiogenesis in patients with systemic sclerosis. Circ Res 109:e14-26.

140. Cebe Suarez S., Pieren M., Cariolato L., Arn S., Hoffmann U., Bogucki A., Manlius C., Wood J. and Ballmer-Hofer K. (2006) A VEGF-A splice variant defective for heparan sulfate and neuropilin-1 binding shows attenuated signaling through VEGFR-2. Cell Mol Life Sci 63:2067-2077.

141. Kawamura H., Li X., Harper S. J., Bates D. O. and Claesson-Welsh L. (2008) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165b is a weak in vitro agonist for VEGF receptor-2 due to lack of coreceptor binding and deficient regulation of kinase activity. Cancer Res 68:4683-4692.

142. Ruch C., Skiniotis G., Steinmetz M. O., Walz T. and Ballmer-Hofer K. (2007) Structure of a VEGF-VEGF receptor complex determined by electron microscopy. Nat Struct Mol Biol 14:249-250.

143. Catena R., Larzabal L., Larrayoz M., Molina E., Hermida J., Agorreta J., Montes R., Pio R., Montuenga L. M. and Calvo A. (2010) VEGF(1)(2)(1)b and VEGF(1)(6)(5)b are weakly angiogenic isoforms of VEGF-A. Mol Cancer 9:320.

144. Rennel E., Waine E., Guan H., Schuler Y., Leenders W., Woolard J., Sugiono M., Gillatt D., Kleinerman E., Bates D. and Harper S. (2008) The endogenous anti-

angiogenic VEGF isoform, VEGF165b inhibits human tumour growth in mice. Br J Cancer 98:1250-1257.

145. Rennel E. S., Hamdollah-Zadeh M. A., Wheatley E. R., Magnussen A., Schuler Y., Kelly S. P., Finucane C., Ellison D., Cebe-Suarez S., Ballmer-Hofer K., Mather S., Stewart L., Bates D. O. and Harper S. J. (2008) Recombinant human VEGF165b protein is an effective anti-cancer agent in mice. Eur J Cancer 44:1883-1894.

146. Rennel E. S., Varey A. H., Churchill A. J., Wheatley E. R., Stewart L., Mather S., Bates D. O. and Harper S. J. (2009) VEGF(121)b, a new member of the VEGF(xxx)b family of VEGF-A splice isoforms, inhibits neovascularisation and tumour growth in vivo. Br J Cancer 101:1183-1193.

147. Hua J., Spee C., Kase S., Rennel E. S., Magnussen A. L., Qiu Y., Varey A., Dhayade S., Churchill A. J., Harper S. J., Bates D. O. and Hinton D. R. (2010) Recombinant human VEGF165b inhibits experimental choroidal neovascularization. Invest Ophthalmol Vis Sci 51:4282-4288.

148. Ranpura V., Hapani S. and Wu S. (2011) Treatment-related mortality with bevacizumab in cancer patients: a meta-analysis. JAMA 305:487-494.

149. Bates D. O., Catalano P. J., Symonds K. E., Varey A. H., Ramani P., O'Dwyer P. J., Giantonio B. J., Meropol N. J., Benson A. B. and Harper S. J. (2012) Association between VEGF splice isoforms and progression-free survival in metastatic colorectal cancer patients treated with bevacizumab. Clin Cancer Res 18:6384-6391.

150. Harris S., Craze M., Newton J., Fisher M., Shima D. T., Tozer G. M. and Kanthou C. (2012) Do anti-angiogenic VEGF (VEGFxxxb) isoforms exist? A cautionary tale. PLoS ONE 7:e35231.

151. Artac R. A., McFee R. M., Smith R. A., Baltes-Breitwisch M. M., Clopton D. T. and Cupp A. S. (2009) Neutralization of vascular endothelial growth factor antiangiogenic isoforms is more effective than treatment with proangiogenic isoforms in stimulating vascular development and follicle progression in the perinatal rat ovary. Biol Reprod 81:978-988.

Figures

Figure 1: The consensus sequences for splicing

The different important zones for splicing are indicated (splice Donor and splice Acceptor and the Branch site). Pyr = Pyrimidine (C or T); nt = nucleotide.

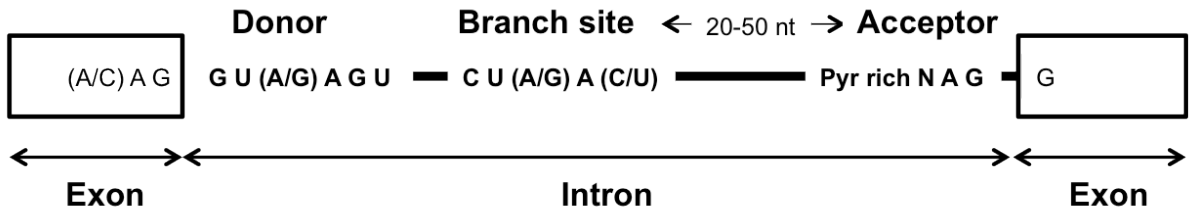


Figure 1: Guyot, M and Pagès, G

Figure 2: The different forms of VEGF

Sequence alignment of the different identified forms of VEGF is presented. These forms only concern spliced exons including exon 4, 5, 6a, 6b, 7a, 7b, 8a and 8b. The VEGF isoforms that are associated with the plasma membrane appear on a grey background. The VEGFxxxb isoforms that have already been described are presented (VEGFxxx/VEGFxxxb).

```
                Exon 4   Exon 5      Exon 6a              Exon6b              Exon7a                Exon7b   Exon8a Exon8b
VEGF206         SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPGPHPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRR
VEGF189/189b    SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSV----------------PCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRRSLTRKD
VEGF183/183b    SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSR--------------------PCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRRSLTRKD
VEGF165/165b    SFLQHNKCECRPKKDRARQE------------------------------------NPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKARQLELNERTCRCDKPRRSLTRKD
VEGF162         SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSVYVGARCCLMPWSLPGPH------------------------------------------CDKPRR
VEGF148         SFLQHNKCECRPKKDRARQE------------------------------------NPCGPCSERRKHLFVQDPQTCKCSCKNTDSRCKM-----------------
VEGF145/145b    SFLQHNKCECRPKKDRARQEKKSVRGKGKGQKRKRKKSRYKSWSV----------------------------------------------------------CDKPRRSLTRKD
VEGF121/121b    SFLQHNKCECRPKKDRARQE------------------------------------------------------------------------------------KCDKPRRSLTRKD
VEGF111         SFLQHNKCECR----------------------------------------------------------------------------------------CDKPRR
```

Figure 2: Guyot, M and Pagès, G