

## Matrikines : une nouvelle stratégie thérapeutique anti-cancéreuse

Jean Claude Monboisse<sup>1,2</sup>, Karine Sénéchal<sup>1</sup>, Jessica Thevenard<sup>1</sup>, Laurent Ramont<sup>1,2</sup>, Sylvie Brassart-Pasco<sup>1</sup> et François-Xavier Maquart<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> FRE CNRS/URCA 3481, Université Reims Champagne Ardenne, UFR Médecine, 51 Rue Cognacq-Jay, 51095 Reims Cedex, France

<sup>2</sup> Laboratoire Central de Biochimie, CHU Reims, 51100 Reims, France

Auteur correspondant : Jean Claude Monboisse, [jc.monboisse@univ-reims.fr](mailto:jc.monboisse@univ-reims.fr)

Reçu le 14 mars 2012

**Résumé** – Le microenvironnement tumoral est un système complexe comportant une matrice extracellulaire largement modifiée et différents types cellulaires qui déterminent la réponse angiogénique et l'invasion locale. Sous l'influence de l'hypoxie, les cellules cancéreuses sécrètent des cytokines qui activent les cellules du stroma pour produire des protéases et des facteurs angiogéniques. Ces protéases dégradent la matrice extracellulaire stromale et participent à la libération de divers fragments de macromolécules matricielles, appelés matrikines ou matricryptines, capables de contrôler l'invasion tumorale et la dissémination métastatique. Nous focaliserons cet exposé sur les matrikines dérivées des domaines NC1 des différentes chaînes constitutives des collagènes associés aux membranes basales et notamment le collagène de type IV. Les cibles potentielles d'action des matrikines sont la prolifération et les propriétés invasives des cellules cancéreuses ou des cellules inflammatoires, ainsi que les réponses angiogéniques et lymphangiogéniques. Par exemple, la canstatine, la tumstatine et la tétrastatine, dérivant respectivement des domaines NC1 des chaînes  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$  du collagène IV, inhibent *in vivo* la croissance tumorale dans divers modèles expérimentaux de cancer. Leur activité anti-cancéreuse se manifeste par un effet anti-prolifératif sur les cellules tumorales et/ou les cellules endothéliales par induction de l'apoptose ou blocage du cycle cellulaire ainsi qu'en provoquant la perte de leur phénotype migratoire. Les matrikines constituent une nouvelle famille de puissants agents anticancéreux qui peuvent être utilisés dans différentes stratégies thérapeutiques : (i) induction de leur surexpression par les cellules cancéreuses ou par les cellules de l'hôte, (ii) utilisation de protéines recombinantes, de peptides synthétiques, d'analogues structuraux conçus à partir de la structure des séquences actives. Ces matrikines pourront être utilisées en combinaison avec des chimiothérapies conventionnelles ou la radiothérapie pour lutter contre la progression tumorale.

**Mots clés** : Cancer / matrice extracellulaire / angiogenèse / matrikines / stratégie thérapeutique

**Abstract** – Matrikines: a new anticancer therapeutic strategy.

Tumor microenvironment is a complex system composed of a largely altered extracellular matrix (ECM) with different cell types that determine the angiogenic response. Upon the influence of hypoxia, tumor cells secrete cytokines that activate stromal cells to produce proteases and angiogenic factors. The proteases degrade the stromal ECM and participate in the release of various ECM fragments, named matrikines or matricryptins, capable to control tumor invasion and metastasis dissemination. We will focus on the matrikines derived from the NC1 domains of the different constitutive chains of basement membrane-associated collagens and mainly collagen IV. The putative targets of the matrikine action are the proliferation and invasive properties of tumor or inflammatory cells, and the

angiogenic and lymphangiogenic responses. For example, canstatin, tumstatin and tetrastatin, respectively derived from the NC1 domains of  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  and  $\alpha 4$  chains of collagen IV, inhibit *in vivo* tumor growth in various experimental cancer models. Their anti-cancer activity comprises an anti-proliferative effect on tumor cells and on endothelial cells by induction of cell apoptosis or cell cycle blockade and the induction of a loss of their migratory phenotype. Matrikines constitute a new family of potent anticancer agents that could be used under various therapeutic strategies: i) induction of their overexpression by cancer cells or by the host cells, ii) use of recombinant proteins or synthetic peptides or structural analogues designed from the structure of the active sequences. These matrikines could be used in combination with conventional chemotherapy or radiotherapy to limit tumor progression.

**Key words:** Cancer / extracellular matrix / angiogenesis / matrikine / therapeutic strategy

---

## Introduction

L'invasion tumorale est une phase clé de la maladie cancéreuse. Elle implique la progression et la dissémination des cellules cancéreuses dans le microenvironnement local puis dans l'ensemble de l'organisme. Cette dissémination aboutit à la formation de métastases, cause la plus fréquente de décès des patients. Les différentes étapes de l'invasion tumorale mettent en jeu de nombreuses interactions entre les cellules cancéreuses et la matrice extracellulaire, aboutissant à un profond remaniement du microenvironnement tumoral.

Ce microenvironnement est constitué de différents types cellulaires (fibroblastes, cellules musculaires lisses, cellules inflammatoires et immunitaires, adipocytes, cellules endothéliales, ...) interagissant avec la matrice extracellulaire environnante. Le développement de la tumeur et sa progression vers des stades avancés requièrent la coopération entre ces divers types cellulaires, conduisant à la désorganisation structurale et fonctionnelle de ce microenvironnement (Weiss & Cheresh, 2011).

Dès que la tumeur atteint la taille critique de quelques millimètres de diamètre, l'hypoxie, l'acidose et la privation de nutriments entraînent un « *switch* angiogénique », conduisant les cellules tumorales à sécréter des protéases qui libèrent des facteurs de croissance stockés dans la matrice extracellulaire. Ces derniers stimulent ensuite les cellules stromales qui modifient le microenvironnement. Parmi ces cellules, les fibroblastes associés aux carcinomes (CAF) et les myofibroblastes jouent un rôle majeur dans ce remaniement, notamment en sécrétant à leur tour des facteurs de croissance et des cytokines, comme la chimiokine SDF1 (*Stromal Cell Derived Factor 1* ou CXCL12), TGF $\beta$ , ... et des protéases comme les métalloprotéases matricielles (MMP-2, -9 et -14) (Shimoda *et al.*, 2010).

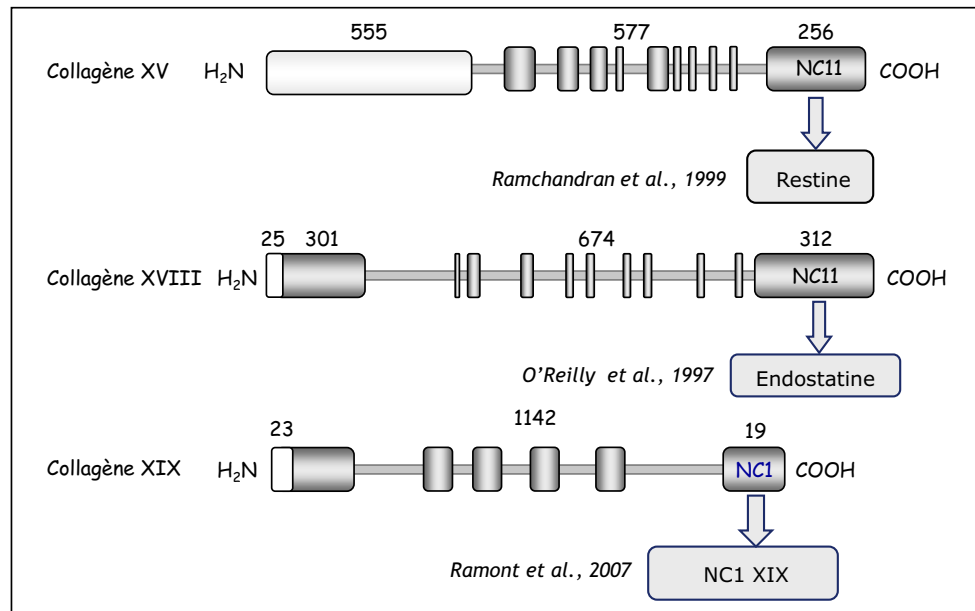
Les interactions entre les cellules et les composants de la matrice extracellulaire environnante se font par l'intermédiaire d'une famille de récepteurs de surface cellulaire, les intégrines, plus particulièrement l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (Desgrollier & Cheresh, 2010).

D'autre part, ces interactions peuvent être contrôlées par les molécules constitutives de la matrice extracellulaire, soit dans leur intégralité, soit par l'intermédiaire de certains de leurs domaines constitutifs, libérés par protéolyse ménagée ou par exposition de sites cryptiques par les protéases sécrétées par les cellules présentes. Ce type de domaine a reçu le nom de matrikine, désignant un domaine protéique doté d'une activité biologique (Maquart *et al.*, 1999). Certaines matrikines ont également été désignées sous le terme de matricryptines, lorsque ce domaine possède une activité biologique que n'exerce pas la protéine native d'origine et que cette activité biologique a été démasquée notamment par protéolyse ménagée (Davis *et al.*, 2000). Pour la simplification du propos, nous n'utiliserons que le terme de matrikines, même si certaines d'entre elles sont des matricryptines.

Dans cette revue non exhaustive, nous décrirons tout d'abord les principales matrikines dérivées des domaines non collagéniques des différentes chaînes du collagène de type IV, ainsi que leurs principales cibles cellulaires pour limiter la progression tumorale. Dans un deuxième temps, nous citerons des exemples d'outils moléculaires qui peuvent être mis en œuvre pour définir des stratégies thérapeutiques fondées sur ces matrikines.

## Les matrikines dérivées des collagènes de membrane basale

Les membranes basales sont des matrices extracellulaires hautement spécialisées qui représentent une zone



**Fig. 1.** Structure schématique des collagènes associés aux membranes basales et des matrikines dérivées.

frontière entre l'épithélium et le tissu conjonctif sous-jacent. Elles sont constituées de collagènes, collagène de type IV essentiellement, mais aussi de collagènes associés (collagènes XV, XVIII et XIX), de glycoprotéines de structure (laminines, entactine, ...) et de protéoglycane, comme le perlécane (Kalluri, 2003). Elles assurent un rôle mécanique de soutien pour les cellules et de cohésion des tissus. La membrane basale glomérulaire exerce un rôle plus spécifique de filtration. Ces membranes basales servent aussi de réservoir de facteurs de croissance et de cytokines qui, après libération par des protéases comme les MMPs, peuvent contrôler différentes fonctions cellulaires. Par interaction de ces différents constituants avec les cellules, elles régulent des activités biologiques telles que la migration, la prolifération ou encore la différenciation cellulaire (Kruegel & Miosge, 2010).

De fait, les domaines NC1 des différentes chaînes constitutives du collagène de type IV ou des collagènes associés aux membranes basales exercent des activités anti-angiogéniques et/ou anti-tumorales. Pour inhiber la croissance tumorale, ces différentes matrikines appliquent leurs effets inhibiteurs à différents niveaux. La première cible potentielle est directement constituée par les cellules cancéreuses, avec inhibition de leur prolifération, par induction de l'apoptose ou par blocage du cycle cellulaire. De même, cette inhibition peut agir sur les propriétés invasives de ces cellules par inhibition des cascades protéolytiques [MMPs, système d'activation du plasminogène, ADAMs (*A Disintegrin And Metalloproteases*)]. L'inhibition des MMPs peut aussi

correspondre à une modification de leur localisation au front de migration des cellules par induction de l'endocytose de ces protéases, entraînant une diminution de leur expression à la surface cellulaire. Une deuxième cible potentielle de ces matrikines est l'angiogenèse tumorale, avec action sur les cellules endothéliales. Dans ce cas également, cette activité inhibitrice peut s'exercer sur la prolifération et l'apoptose des cellules ou sur leurs propriétés migratoires. Une troisième cible potentielle est constituée par les cellules inflammatoires et les cellules immunitaires, même si peu d'études ont déterminé l'action des matrikines sur ces cellules. Enfin, la sécrétion de facteurs modulant l'angiogenèse par les fibroblastes du stroma peut aussi être contrôlée par des matrikines (Liu *et al.*, 2008).

## Les collagènes associés aux membranes basales et leurs matrikines

### Le collagène XV

Il appartient à la famille des multiplexines. De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, il est constitué d'un domaine non collagénique (NC) de 529 résidus d'acides aminés, d'une séquence collagénique de 579 résidus comportant 8 interruptions de 7 à 45 résidus et d'un domaine NC (non collagénique) C-terminal de 256 résidus (figure 1). Il est essentiellement localisé au niveau des membranes basales

neuronales, mésenchymateuses, vasculaires et de certaines membranes basales épithéliales (Li *et al.*, 2000). La protéolyse ménagée du domaine NC10, C-terminal, donne naissance à une matrikine, la restine, qui exerce un effet anti-tumoral reposant sur ses propriétés anti-angiogéniques (Ramchandran *et al.*, 1999).

### Le collagène XVII

Il appartient également à la famille des multiplexines, présente une forte homologie de structure avec le collagène XV et a été décrit au départ comme un protéoglycane à héparane sulfate (Rehn & Pihlajaniemi, 1994). Son domaine NC11, C-terminal, après clivage par différentes MMPs (MMP-2, -7, -9, -14) ou par d'autres protéases, donne naissance à une matrikine de 20 kDa, l'endostatine (O'Reilly *et al.*, 1997). Les activités anti-tumorales et anti-angiogéniques de cette dernière ont été largement décrites dans de nombreuses revues et nous ne la décrivons pas ici (Folkman, 2006 ; Ricard-Blum & Ballut, 2011).

### Le collagène XIX

C'est un collagène FACIT (*Fibril Associated Collagen with Interrupted Triple helix*), minoritaire, associé aux membranes basales. Il est formé par l'association de trois chaînes  $\alpha 1(\text{XIX})$ . De l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale, il comprend :

- un domaine N-terminal NC de 268 résidus ;
- un domaine collagénique discontinu de 832 résidus constitué de cinq régions collagéniques interrompues par quatre régions non collagéniques de 20 à 40 résidus ;
- un domaine non collagénique NC1 C-terminal de 19 résidus (Myers *et al.*, 1997).

Il est présent au niveau des membranes vasculaires, neuronales et épithéliales et semble jouer un rôle important dans la différenciation musculaire et l'angiogenèse (Myers *et al.*, 2003). Le clivage de son domaine NC1 donne naissance à une matrikine dont les effets anti-tumoraux ont été décrits dans un modèle de mélanome murin. Ils exercent essentiellement une activité anti-angiogénique et une inhibition de la migration des cellules cancéreuses (Ramont *et al.*, 2007 ; Toubal *et al.*, 2010).

### Le collagène IV

C'est le composant majeur des membranes basales. Il est constitué par l'association de trois chaînes  $\alpha(\text{IV})$

parmi six possibles, de  $\alpha 1(\text{IV})$  à  $\alpha 6(\text{IV})$ , chacune codée par un gène différent (Ricard-Blum, 2011). Ces gènes, appelés *COL4A1* à *COL4A6*, sont respectivement portés par le chromosome 13 pour *COL4A1* et *COL4A2*, le chromosome 2 pour *COL4A3* et *COL4A4* et le chromosome X pour *COL4A5* et *COL4A6*.

La distribution tissulaire de ces six chaînes  $\alpha(\text{IV})$  est variable. Alors que les chaînes  $\alpha 1(\text{IV})$  et  $\alpha 2(\text{IV})$  sont ubiquistes, les autres chaînes, dites mineures en raison de leur plus faible proportion, sont exprimées dans certaines membranes basales spécialisées. Les chaînes  $\alpha 3(\text{IV})$  et  $\alpha 4(\text{IV})$  se trouvent uniquement dans des trimères  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ , au niveau de l'aorte, des alvéoles pulmonaires, de la cochlée, du glomérule rénal ou de la capsule du cristallin. La chaîne  $\alpha 5(\text{IV})$  se retrouve en association avec les chaînes  $\alpha 3(\text{IV})$  et  $\alpha 4(\text{IV})$  dans les mêmes localisations, mais aussi en association avec la chaîne  $\alpha 6(\text{IV})$  dans les membranes basales rénales, pulmonaires, de l'œsophage et de la peau (Lebleu *et al.*, 2010).

Chacune de ces chaînes comprend, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale :

- un domaine N-terminal comprenant le domaine 7S ;
- un long domaine central en triple hélice avec des interruptions ;
- un domaine NC1 C-terminal, d'environ 230 résidus.

L'assemblage des trimères, sous la dépendance des laminines, fait intervenir des liaisons se créant au niveau des domaines 7S pour former des tétramères et au niveau des domaines NC1 pour donner des dimères et polymériser sous forme d'un réseau (Kalluri, 2003).

De nombreuses matrikines dérivent du collagène IV, soit de la partie en triple hélice, soit des domaines NC1. Diverses séquences collagéniques de la chaîne  $\alpha 1(\text{IV})$  favorisent l'adhésion et la migration de cellules de mélanome en se fixant sur l'intégrine  $\alpha 3\beta 1$  (Chelberg *et al.*, 1990 ; Miles *et al.*, 1994).

Le tableau 1 montre les principales matrikines dérivées des domaines NC1 de chaque chaîne du collagène IV.

L'arrestène, domaine NC1 $\alpha 1(\text{IV})$ , exerce une activité anti-angiogénique en se fixant sur l'intégrine  $\alpha 1\beta 1$  et en induisant un signal intracellulaire de transduction conduisant à l'inhibition du facteur HIF-1 $\alpha$  (Colorado *et al.*, 2000 ; Sudhakar *et al.*, 2005). Celle-ci provoque un ralentissement de la croissance tumorale dans divers modèles de cancer et de métastases hépatiques (Long *et al.*, 2008).

La canstatine, domaine NC1 $\alpha 2(\text{IV})$ , est un inhibiteur endogène de l'angiogenèse. *In vitro*, elle inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales, ainsi que leur synthèse protéique (Kamphaus *et al.*, 2000 ; Panka & Mier, 2003). Le domaine N-terminal

**Tableau 1.** Les matrikines dérivées des domaines NC1 des chaînes  $\alpha$ (IV) du collagène IV.

Domaine NC1	Matrikine	Activité anti-angiogénique	Activité anti-tumorale
NC1 $\alpha$ 1(IV)	Arrestène	Arrestène	
NC1 $\alpha$ 2(IV)	Canstatine	Canstatine	
NC1 $\alpha$ 3(IV)	Tumstatine	Tumstatine	
NC1 $\alpha$ 4(IV)	Tétrastatine		Tétrastatine
NC1 $\alpha$ 5(IV)	Pentastatine	Pentastatine	
NC1 $\alpha$ 6(IV)	Hexastatine	Hexastatine	

(résidus 1-89) de la canstatine contient la séquence responsable de l'induction de l'apoptose alors que la séquence C-terminale (résidus 157–227) inhibe de façon spécifique la prolifération des cellules endothéliales (He *et al.*, 2003, 2004). L'induction de l'apoptose fait intervenir deux voies de signalisation, une dépendant de la voie Fas/Fas ligand avec activation des caspases 8 et 3, et une deuxième à partir de la fixation de la canstatine sur l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 5, avec inhibition de la cascade FAK/PI3K/Akt (Magnon *et al.*, 2005). La canstatine inhibe la croissance tumorale *in vivo* dans divers modèles de cancer (Kamphaus *et al.*, 2000 ; Magnon *et al.*, 2005 ; Hwang-Bo *et al.*, 2011). Lorsqu'elle est surexprimée par des cellules tumorales, elle inhibe leur prolifération (Magnon *et al.*, 2008). Elle induit la diminution de l'expression d'angiopoïétine-1 par des cellules endothéliales et des cellules endothéliales lymphatiques en conditions d'hypoxie (Hwang-Bo *et al.*, 2011).

La tumstatine, domaine NC1  $\alpha$ 3(IV), exerce des activités anti-angiogéniques et anti-tumorales par deux séquences distinctes (Maeshima *et al.*, 2000). La séquence 54–132, appelée Tum-5, de la partie N-terminale est responsable de l'activité anti-angiogénique qui se traduit par l'induction de l'apoptose des cellules endothéliales. Sa fixation sur l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3, indépendante de la séquence RGD, induit une voie de transduction similaire à celle déclenchée par la canstatine, avec inhibition de la voie mTOR régulant la

synthèse protéique (Maeshima *et al.*, 2002). Dans la partie C-terminale de la tumstatine, une deuxième séquence, correspondant aux résidus 185–203, exerce une forte activité anti-tumorale, démontrée dans des modèles de mélanome murin et de mélanome humain, à la fois par utilisation de peptides synthétiques reproduisant cette séquence et par induction de sa surexpression dans des cellules cancéreuses (Han *et al.*, 1997 ; Pasco *et al.*, 2000a, 2004). Cette séquence se fixe également sur l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3, indépendamment de la séquence RGD, et induit une voie de transduction intracellulaire comportant l'activation précoce de la phosphorylation de FAK et de la PI3 kinase (Pasco *et al.*, 2000b). Cette séquence diminue la progression tumorale en inhibant les cascades protéolytiques de la progression tumorale, MMPs et activation du plasminogène. Une première étude immunohistochimique, réalisée sur des coupes de tumeurs de patients atteints de carcinome broncho-pulmonaire, avait montré une expression de la tumstatine autour de certains amas cancéreux (Polette *et al.*, 1997). Chez 34 patients atteints de carcinome broncho-pulmonaire, une forte expression de la tumstatine est associée à un degré moindre de vascularisation de la tumeur (Caudroy *et al.*, 2004).

Aucune activité anti-angiogénique n'avait été démontrée pour le domaine NC1 $\alpha$ 4(IV) dans le modèle de membrane chorio-allantoïdienne de poulet

**Tableau 2.** Les récepteurs des matrikines dérivées des domaines NC1 du collagène IV.

Matrikines	Récepteurs	Références
Arrestène	Intégrine $\alpha 1\beta 1$	Sudhakar <i>et al.</i> , 2005
Canstatine	Intégrines $\alpha V\beta 3$ et $\alpha V\beta 5$	Magnon <i>et al.</i> , 2005
Tumstatine	Intégrine $\alpha V\beta 3$	Pasco <i>et al.</i> , 2000b Maeshima <i>et al.</i> , 2001
	Intégrine $\alpha 3\beta 1$	Borza <i>et al.</i> , 2006
Tétrastatine	Intégrine $\alpha V\beta 3$	Brassart-Pasco <i>et al.</i> , sous-presse
Pentastatine	Nd	
Hexastatine	Nd	

Nd : non déterminé.

(Petitclerc *et al.*, 2000). Toutefois, la surexpression de ce domaine, induite dans des cellules de mélanome humain par transfection stable, produit un effet anti-prolifératif pour ces cellules ainsi qu'une importante inhibition de leurs propriétés invasives. Cette réduction des propriétés invasives s'explique, au moins en partie, par une diminution de la quantité de MMP-14 active et une perte de sa localisation au front de migration, conduisant à un phénotype non migratoire des cellules. Dans un modèle de xéno greffe de mélanome humain chez la souris, le domaine NC1 $\alpha 4$ (IV), pour lequel le nom de tétrastatine a été proposé, provoque une diminution de plus de 80 % de la croissance tumorale (Brassart-Pasco *et al.*, sous-presse).

De même, peu d'études ont été consacrées au domaine NC1 de la chaîne  $\alpha 5$ (IV), même si sa forte activité anti-angiogénique avait été démontrée dans le modèle de membrane chorio-allantoïdienne de poulet (Petitclerc *et al.*, 2000). Des séquences peptidiques de ce domaine, appelées respectivement pentastatines 1, 2 et 3 inhibent la prolifération et la migration de cellules endothéliales *in vitro* (Karagiannis & Popel, 2007). Parmi ces peptides, la pentastatine 1, correspondant aux résidus 1516–1535 de la chaîne  $\alpha 5$ (IV), exerce une forte activité anti-angiogénique dans un modèle d'angiogenèse *in vivo* chez la souris et diminue fortement la croissance tumorale dans un modèle de xéno greffes de cancer pulmonaire non à petites cellules (Koskimaki *et al.*, 2010).

L'hexastatine, domaine NC1 $\alpha 6$ (IV), inhibe la prolifération des cellules endothéliales et la néovascularisation dans un modèle d'angiogenèse *in vivo* chez la souris. De même, elle limite la croissance tumorale dans différents modèles de cancer chez la souris, carcinome pulmonaire de Lewis, insulome pancréatique (Mundel *et al.*, 2008).

### Récepteurs des matrikines et transduction intracellulaire

Les différentes matrikines dérivées des collagènes de membrane basale exercent leurs activités anti-angiogéniques et anti-tumorales en se fixant sur des récepteurs de surface des cellules tumorales ou endothéliales, les intégrines. Les principales intégrines impliquées dans ces interactions sont résumées dans le tableau 2. Par exemple, la tumstatine se fixe sur les intégrines  $\alpha V\beta 3$  et  $\alpha 3\beta 1$ , sur un site différent du site de fixation de la séquence RGD et induit un changement de conformation de l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (Pasco *et al.*, 2000b ; Maeshima *et al.*, 2001). Les voies de transduction intracellulaire, induites par cette fixation, aboutissent à une inhibition de la voie FAK/PI3K/Akt, conduisant à :

- une inhibition de la synthèse protéique par la voie mTOR et empêchant la libération du facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Maeshima *et al.*, 2002)
- l'induction de l'apoptose avec activation des caspases 3, 8 et 9 (Magnon *et al.*, 2005)
- une inhibition de la voie NF- $\kappa$ B avec inhibition de l'expression du facteur de transcription COX-2, induit par l'hypoxie (Boosani *et al.*, 2007).

### Génération des matrikines *in vivo*

La tumstatine est produite *in vivo* par clivage de la molécule de collagène IV par les MMP-2 et MMP-9, ce qui a été démontré chez des souris dont les gènes codant ces protéases ont été invalidés (Hamano *et al.*, 2003).

Par dosage ELISA, la concentration sérique de tumstatine circulante a été déterminée chez la souris (300–360 ng/mL) (Hamano *et al.*, 2003). Dans des

**Tableau 3.** Les principaux essais précliniques des matrikines dérivées des domaines NC1 du collagène IV.

Matrikines	Forme utilisée	Modèles de cancer	Références
Arrestène	Domaine recombinant	Tératocarcinome	Sudhakar <i>et al.</i> , 2005
	Surexpression : ADN recombinant	Cancer colorectal	Long <i>et al.</i> , 2008
Canstatine	Adénovirus Canstatine-GFP	Carcinome œsophage	Zheng <i>et al.</i> , 2009
	Adénovirus Canstatine-HSA	Cancer du sein - Mélanome	Magnon <i>et al.</i> , 2005
	Domaine recombinant	Adénocarcinome prostate	Kamphaus <i>et al.</i> , 2000
	Domaine recombinant	Mélanome	He <i>et al.</i> , 2003, 2004 ; Roth <i>et al.</i> , 2005
	Domaine recombinant	Carcinome gastrique	He <i>et al.</i> , 2006
Tumstatine	Domaine recombinant	Carcinome colon	Hwang-Bo <i>et al.</i> , 2011
	Surexpression : ADN recombinant	Mélanome	Pasco <i>et al.</i> , 2004
	Surexpression : ADN recombinant	Carcinome hépatocellulaire	Goto <i>et al.</i> , 2008
	Domaine recombinant	Carcinome rein – prostate	Maeshima <i>et al.</i> , 2000
	Domaine recombinant	Carcinome poumon Lewis	Boosani <i>et al.</i> , 2010
	Domaine recombinant	Carcinome cellule squameuse	Chung <i>et al.</i> , 2008
	Peptide P21 recombinant	Cancer ovaire	Zhang <i>et al.</i> , 2008
	Peptide synthétique	Mélanome	Floquet <i>et al.</i> , 2004
Tétrastatine	Peptide synthétique	Cancer gastrique	Li <i>et al.</i> , 2009; He <i>et al.</i> , 2010
	Analogues structuraux	Mélanome	Thevenard <i>et al.</i> , 2006
Tétrastatine	Surexpression : ADN recombinant	Mélanome	Brassart-Pasco <i>et al.</i> , sous-presse
Pentastatine	Peptide synthétique (Pentastatine-1)	Cancer poumon non à petites cellules	Koskimaki <i>et al.</i> , 2009, 2010
Hexastatine	Domaine recombinant	Carcinome poumon Lewis	Mundel <i>et al.</i> , 2008

expériences menées au laboratoire, nous avons trouvé des concentrations de l'ordre de 600 ng/mL (Thevenard, communication personnelle). Plus récemment, la concentration de tumstatine circulante a été déterminée chez l'Homme (10 à 150 ng/mL), confortant ainsi sa production *in vivo* et son intérêt physiologique dans le contrôle de la progression tumorale (Luo *et al.*, 2010).

## Les stratégies thérapeutiques à base de matrikines

### Les matrikines comme marqueurs biologiques

L'expression des différents collagènes associés aux membranes basales est modulée au cours de l'invasion tumorale. C'est ainsi qu'une diminution et même une perte d'expression locale du collagène de type XIX est observée au cours de la progression du carcinome mammaire (Amenta *et al.*, 2003). À l'opposé, une expression *de novo* de la chaîne  $\alpha 3(\text{IV})$  est mise en évidence autour de certains amas tumoraux de carcinomes bronchiques (Polette *et al.*, 1997 ; Caudroy *et al.*, 2004). La relation

entre cette expression et le devenir des tumeurs reste à établir.

La mise au point de dosages ELISA des matrikines, et notamment de la tumstatine, a permis d'étudier les variations de sa production chez des patients atteints de carcinome pulmonaire. Ces derniers montrent des concentrations de tumstatine supérieure à celle des patients témoins. En revanche, on observe une diminution de sa concentration chez des patients présentant des métastases par rapport à des patients sans métastases (Luo *et al.*, 2010). De même, chez des patients atteints de carcinome rénal, on observe une nette diminution de l'expression de la tumstatine, à la fois de l'ARNm et de la protéine, dans les tissus cancéreux vis-à-vis des tissus sains (Xu *et al.*, 2010). Ces deux observations conduisent leurs auteurs à proposer la tumstatine comme marqueur biologique de la progression tumorale.

### Les stratégies thérapeutiques

Les principaux essais précliniques d'utilisation des matrikines ont été réalisés dans divers modèles

expérimentaux de cancer chez la souris (tableau 3). Ils sont fondés sur :

- la surexpression des matrikines *in vivo* en utilisant des constructions avec des vecteurs viraux ou par électrotransfert d'ADN plasmidique ;
- l'utilisation de protéines recombinantes ;
- l'utilisation de peptides synthétiques ou d'analogues structuraux reproduisant les séquences actives.

### Surexpression des matrikines

La surexpression de la canstatine *in vivo* chez la souris a été obtenue par transfert d'ADN après construction d'un adénovirus codant une protéine de fusion canstatine-albumine humaine. Cette construction permet de diminuer la clairance de la canstatine par augmentation de la masse moléculaire. L'injection intra-tumorale de l'adénovirus entraîne un net ralentissement de la croissance tumorale dans un modèle de carcinome mammaire, en induisant l'apoptose des cellules tumorales et endothéliales (Magnon *et al.*, 2005). L'injection intra-tumorale d'un adénovirus associant la canstatine avec une protéine fluorescente (canstatine-GFP) aboutit à des résultats similaires dans un modèle de carcinome de l'œsophage (Zheng *et al.*, 2009). Une autre stratégie a été développée à partir de la surexpression de la tumstatine induite par un lentivirus dans des cellules souches mésenchymateuses. Dans un modèle de cancer de la prostate, ces cellules souches entraînent aussi une forte régression de la croissance tumorale (Zhang *et al.*, 2011). Toutefois, les stratégies thérapeutiques utilisant des vecteurs viraux peuvent être à l'origine d'effets secondaires liés à ces vecteurs. Une autre construction, à base d'un plasmide contenant l'ADNc codant un fragment de la tumstatine, Tum-1, et injectée à intervalles réguliers dans les tumeurs d'un modèle de carcinome hépatocellulaire, induit un ralentissement significatif de la croissance tumorale (Goto *et al.*, 2008).

Pour éviter ces effets secondaires et la nécessité de répéter des injections, une technique d'électrotransfert d'ADN dans les cellules musculaires, qui ne se divisent pas en conditions physiologiques, peut être utilisée car elle est simple et n'induit pas de réponse immunitaire inappropriée. Un plasmide contenant l'ADNc codant la matrikine est injecté dans le muscle chez la souris et induit sa production à taux élevé et sur des temps pouvant aller jusqu'à plusieurs mois. Une telle stratégie a permis de démontrer les effets anti-angiogéniques et anti-tumoraux de la canstatine dans des modèles de carcinome mammaire, de la prostate chez des souris athymiques et dans un modèle de mélanome syngénique (Magnon *et al.*, 2008). De même, nous avons montré,

dans notre laboratoire, que la surexpression de la tumstatine ou de la tétrastatine induite après électrotransfert d'ADN conduisait à un net ralentissement de la croissance tumorale et à une augmentation de la survie des souris dans un modèle syngénique de mélanome (Thevenard, communication personnelle).

### Les matrikines recombinantes

Les matrikines dérivées des domaines NC1 des chaînes  $\alpha$ (IV) du collagène IV ont été produites dans différents systèmes cellulaires. Leur injection péri- ou intra-tumorale induit le ralentissement de la croissance tumorale dans différents modèles expérimentaux de cancer chez la souris (Kamphaus *et al.*, 2000 ; Chung *et al.*, 2008 ; Boosani *et al.*, 2010). Toutefois, ces stratégies nécessitent l'obtention de quantités importantes de ces matrikines recombinantes sous forme soluble. La production en système procaryote, chez *E. coli* par exemple, permet d'obtenir des quantités notoires de matrikines recombinantes, mais pour la majeure partie sous forme insoluble. De plus, la présence d'entérotoxines dans la fraction soluble limite les possibilités d'utilisation *in vivo*. La production en système eucaryote, notamment avec des cellules HEK, permet d'obtenir des matrikines solubles, mais en trop faible quantité, nécessitant des processus de production trop longs et ne favorisant pas la conservation des protéines obtenues. Le système du baculovirus semble offrir le meilleur compromis pour la production de matrikines recombinantes solubles en quantités suffisantes (Boosani *et al.*, 2010).

### Les peptides synthétiques et les analogues structuraux

Différentes séquences sont responsables des activités anti-angiogéniques et anti-tumorales des domaines NC1 des chaînes du collagène IV. Par exemple, la tumstatine contient deux séquences distinctes :

- la séquence 74–90, dénommée peptide T7, responsable de l'activité anti-angiogénique (Eikesdal *et al.*, 2008) ;
- la séquence 185–203, responsable de l'activité anti-tumorale (Han *et al.*, 1997).

Au sein du peptide T7, des expériences de mutagenèse dirigée montrent que les acides aminés Leu (L78), Val (V82) et Asp (D84) sont indispensables à l'activité biologique et sont directement impliqués dans la liaison de la tumstatine sur l'intégrine  $\alpha$ V $\beta$ 3 (Eikesdal *et al.*, 2008). Un peptide synthétique, le peptide 21, reproduisant une partie du peptide T7, induit l'apoptose des cellules endothéliales et inhibe la croissance tumorale de carcinome gastrique chez la souris (Zhang *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2009).



**Tableau 4.** Les thérapies combinées à base de matrikines.

Matrikine	Traitement associé	Modèle de cancer	Références
Canstatine	TRAIL	Sein	Wang <i>et al.</i> , 2008
Canstatine	Radiothérapie ( $I^{131}$ )	Sein	Magnon <i>et al.</i> , 2007
Canstatine	Radiation ionisante	Sein Prostate Mélanome	Magnon <i>et al.</i> , 2008
Tumstatine	Gemcitabine	Poumon Rein	Yao <i>et al.</i> , 2005
Tumstatine 185–191	Cisplatine	Poumon	Wang <i>et al.</i> , 2010
Tumstatin T7	Bevacizumab	Rein	Eikesdal <i>et al.</i> , 2008

Le peptide 185-203 inhibe la prolifération et les propriétés invasives de cellules de mélanome et la croissance tumorale de mélanome murin en se fixant sur l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  (Han *et al.*, 1997 ; Pasco *et al.*, 2000a, 2000b). Par injection intraveineuse, il ralentit la croissance tumorale de carcinome gastrique chez la souris (Li *et al.*, 2009 ; He *et al.*, 2010). Au sein de ce peptide 185–203, l'activité biologique est contenue dans les 7 acides aminés N-terminaux de cette séquence (CNYYSNS) (Floquet *et al.*, 2004 ; Wang *et al.*, 2010). Les acides aminés Tyr (Y188), Ser (S189) et Ser (S191) sont indispensables, leur remplacement par Phe pour Y188 ou Ala pour S189 et S191 abolit l'activité biologique (Han *et al.*, 1997). Par simulation de dynamique moléculaire, nous avons montré qu'ils forment un coude  $\beta$  (Floquet *et al.*, 2004). Sur la base de ces résultats, le cyclopeptide YSNSG, formant un coude  $\beta$  contraint, a été conçu. Dans un modèle de mélanome *in vitro* et *in vivo*, il exerce des activités anti-tumorales et anti-angiogéniques supérieures à celles exercées par le peptide linéaire natif et montre une stabilité accrue (Thevenard *et al.*, 2006, 2010).

Des peptides synthétiques reproduisant des séquences du domaine NC1 $\alpha$ 5(IV) sont dotés d'activité anti-angiogénique *in vitro* et ont été dénommés pentastatines (Karagiannis & Popel, 2007). La pentastatine-1, comportant 20 acides aminés, réduit fortement la croissance tumorale de carcinome mammaire et de cancer pulmonaire à petites cellules chez la souris, lorsqu'elle est injectée par voie intra-péritonéale (Koskimaki *et al.*, 2009, 2010). À partir de ces peptides, un modèle d'analyse de la relation structure-activité a été établi pour tenter d'optimiser les performances de peptides de collagène IV capables d'exercer des activités anti-angiogéniques (Rivera *et al.*, 2011).

### Les thérapies combinées

Le tableau 4 présente les principaux essais précliniques chez la souris avec des traitements comportant une matrikine en association avec une chimiothérapie ou une radiothérapie. La surexpression *in vivo* de la canstatine, associée à celle du ligand induisant l'apoptose (TRAIL), sous le contrôle du promoteur hTERT permettant de cibler les cellules prolifératives, potentialise les effets inhibiteurs de chacun des traitements utilisés séparément (Wang *et al.*, 2008). La surexpression de la canstatine, induite par un adénovirus ou après électrotransfert d'ADN recombinant, renforce également les effets de la radiothérapie en augmentant l'apoptose des cellules endothéliales, dans des modèles de cancer mammaire (Magnon *et al.*, 2007, 2008).

De même, la surexpression de la tumstatine, induite par injection intramusculaire d'un ADN recombinant, augmente de façon très significative les effets anti-tumoraux du gemcitabine, un inhibiteur de la synthèse d'ADN dans deux modèles de cancer (Yao *et al.*, 2005). *In vitro* et *in vivo*, l'utilisation du peptide 185–191 de la tumstatine potentialise les effets du cisplatine (Wang *et al.*, 2010). L'utilisation d'un autre fragment de tumstatine, le peptide T7, accroît également les effets du traitement avec le bevacizumab, un anticorps monoclonal anti-VEGF (Eikesdal *et al.*, 2008).

### Les essais cliniques

De nombreux essais cliniques ont été menés ou sont en cours de réalisation avec l'endostatine ; dans l'ensemble, ils se sont révélés peu efficaces. Actuellement, divers essais cliniques sont en cours en Chine, avec un dérivé de l'endostatine, l'endostar, seul ou en association

avec des chimiothérapies conventionnelles chez des patients atteints de cancers pulmonaires non à petites cellules ou de cancers colorectaux et gastriques (Zhou *et al.*, 2011).

En revanche, pas ou peu d'essais cliniques ont, jusqu'à présent, été réalisés avec les matrikines dérivées du collagène IV, canstatine ou tumstatine, et ils n'ont fait l'objet d'aucune publication.

## Conclusions

Les études expérimentales *in vitro* et les divers essais précliniques dans des modèles de cancer chez la souris mettent en évidence les fortes potentialités des matrikines pour le développement d'agents anti-cancéreux. Leurs capacités d'inhibition des propriétés prolifératives et invasives des cellules cancéreuses et leur activité anti-angiogénique en font des outils ouvrant de nouvelles perspectives pour limiter la progression tumorale. De plus, leur origine endogène contribue à une meilleure tolérance en limitant les effets secondaires. La caractérisation des séquences minimales actives favorisera la conception d'analogues structuraux pour améliorer leur biodisponibilité et leurs propriétés pharmacocinétiques. La liaison de ces matrikines ou de leurs analogues avec des récepteurs de surface cellulaire, comme l'intégrine  $\alpha V\beta 3$  par exemple, permettra également de concevoir des stratégies de ciblage spécifique des cellules cancéreuses ou des cellules endothéliales activées, d'adresser des molécules chimiothérapeutiques directement sur leurs cellules cibles et d'en diminuer les doses administrées. Au total, les matrikines et les molécules dérivées constituent une nouvelle famille de puissants agents anti-cancéreux dont l'utilisation en stratégie thérapeutique combinée avec des chimiothérapies conventionnelles ou la radiothérapie ouvre de réels espoirs pour lutter efficacement contre la progression tumorale.

## Remerciements

L'ensemble de ce travail a été financé par des fonds du Centre National de la Recherche Scientifique (UMR 6237), l'Université de Reims Champagne-Ardenne, la Région Champagne-Ardenne et le FEDER (Contrat de Plan État-Région 2007-2013), la Ligue Nationale contre le Cancer.

## Références

- Amenta P.S., Hadad S., Lee M.T., Barnard N., Li D., Myers J.C., Loss of types XV and XIX collagen precedes basement membrane invasion in ductal carcinoma of the female breast. *J Pathol*, 2003, 199, 298–308.
- Borza C.M., Pozzi A., Borza D.B., Pedchenko V., Hellmark T., Hudson B.G., Rent Z., Integrin  $\alpha 3\beta 1$ , a novel receptor for  $\alpha 3$ (IV) noncollagenous domain and a trans-dominant inhibitor for integrin  $\alpha V\beta 3$ . *J Biol Chem*, 2006, 281, 20932–20939.
- Boosani C.S., Mannam A.P., Cosgrove D., Silva R., Hodivala-Dilke K.M., Sudhakar A., Regulation of COX-2 mediated signaling by  $\alpha 3$  type IV noncollagenous domain in tumor angiogenesis. *Blood*, 2007, 110, 1168–1177.
- Boosani C.S., Varma A.K., Sudhakar A., Validation of different systems for tumstatin expression and its *in vitro* and *in vivo* activities. *J Cancer Sci Ther*, 2010, 2009, 8–18.
- Brassart-Pasco S., Thevenard J., Senechal K., Ramont L., Devy J., Di Stefano L., Dupont-Deshorgue A., Brezillon S., Jazeron J.F., Ricard-Blum S., Maquart F.X., Monboisse J.C., A novel anti-tumor matrikine: the NC1 domain of the  $\alpha 4$  (IV) collagen chain. *PlosOne*, sous presse.
- Caudroy S., Cucherousset J., Lorenato M., Zahm J.M., Martinella-Catusse C., Polette M., Birembaut P., Implication of tumstatin in tumor progression of human bronchopulmonary carcinomas. *Hum Pathol*, 2004, 35, 1218–1222.
- Chelberg M.K., Mc Carthy J.B., Skubitz A.P.N., Furcht L.T., Tsilibary E.C., Characterization of a synthetic peptide from type IV collagen that promotes melanoma cell adhesion, spreading and motility. *J Cell Biol*, 1990, 111, 262–270.
- Chung I.S., Son Y.I., Ko Y.J., Baek C.H., Cho J.K., Jeong H.S., Peritumor injections of purified tumstatin delay tumor growth and lymphatic metastasis in an orthotopic oral squamous cell carcinoma model. *Oral Oncol*, 2008, 44, 1118–1126.
- Colorado P.C., Torre A., Kamphaus G., Maeshima Y., Hopfer H., Takahashi K., Volk R., Zamborsky E.D., Herman S., Sarkar P.K., Ericksen M.B., Dhanabal M., Simons M., Post, M., Kufe D.W., Weichselbaum R.R., Sukhatme V.P., Kalluri R., Anti-angiogenic cues from vascular basement membrane collagen. *Cancer Res*, 2000, 60, 2520–2526.
- Davis G.E., Bayless K.J., Davis M.J., Meininger G.A., Regulation of tissue injury responses by the exposure of matricryptic sites within extracellular matrix molecules. *Am J Pathol*, 2000, 156, 1489–1498.
- Desgrollier J.S., Cheres D.A., Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10, 9–23.
- Eikesdal H.P., Sugimoto H., Birrane G., Maeshima Y., Cooke V.G., Kieran M., Kalluri R., Identification of amino acids essential for the antiangiogenic activity of tumstatin and its use in combination antitumor activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105, 15040–15045.
- Floquet N., Pasco S., Ramont L., Derreumaux P., Laronze J.Y., Nuzillard J.M., Maquart F.X., Alix A.J., Monboisse J.C., The antitumor properties of the  $\alpha 3$  (IV)-(185–203)

- peptide from the NC1 domain of type IV collagen (tumstatin) are conformation-dependent. *J Biol Chem*, 2004, 279, 2091–2100.
- Folkman J., Antiangiogenesis in cancer therapy – Endostatin and its mechanisms of action. *Exp Cell Res*, 2006, 312, 594–607.
- Goto T., Ishikawa H., Matsumoto K., Nishimura D., Kusaba N., Taura N., Shibata H. Miyaaki H., Ichikawa T., Hamasaki K., Nakao K., Maeshima Y., Eguchi K., Tum-1, a tumstatin fragment, gene delivery into hepatocellular carcinoma suppresses tumor growth through inhibiting angiogenesis. *Int J Oncol*, 2008, 33, 33–40.
- Hamano Y., Zeisberg M., Sugimoto H., Lively J.C., Maeshima Y., Yang C., Hynes R.O., Werb Z., Sudhakar A., Kalluri R., Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV  $\alpha 3$  chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis *via*  $\alpha V\beta 3$  integrin. *Cancer Cell*, 2003, 3, 589–601.
- Han J., Ohno N., Pasco S., Monboisse J.C., Borel J.P., Kefalides N.A., A cell binding domain from the  $\alpha 3$  chain of type IV collagen inhibits proliferation of melanoma cells. *J Biol Chem*, 1997, 272, 20395–20401.
- He G.A., Luo J.X., Zhang T.Y., Wang F.Y., Li R.F., Canstatin-N inhibits *in vitro* endothelial cell proliferation and suppresses *in vivo* tumor growth. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 312, 801–805.
- He G.A., Luo J.X., Zhang T.Y., Hu Z.S., Wang F.Y., The C-terminal domain of canstatin suppresses *in vivo* tumor growth associated with proliferation of endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 318, 354–360.
- He X.P., Li Z.S., Zhu R.M., Tu Z.X., Gao J., Pan X., Gong Y.F., Jin J., Man X.H., Wu H.Y., Xu A.F., Effects of recombinant human canstatin protein in the treatment of pancreatic cancer. *World J Gastroenterol*, 2006, 12, 6652–6657.
- He Y., Jiang Y., Li Y.J., Liu X.H., Zhang L., Liu J.J., Shi H., Li H.N., Ma Y.C., Jin X.M., 19-peptide, a fragment of tumstatin, inhibits the growth of poorly differentiated gastric carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25, 935–941.
- Hwang-Bo J., Yoo K.H., Jeong H.S., Chung I.S., Recombinant canstatin inhibits angiopoietin-1 induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Int J Cancer*, 2011, doi: 10.1002/ijc.26353.
- Kalluri R., Basement membranes: structure. *Nat Rev Cancer*, 2003, 3, 422–433.
- Kamphaus G.D., Colorado P.C., Panka D.J., Hopfer H., Ramchandran R., Torre A., Maeshima Y., Mier J.W., Sukhatme V.P., Kalluri R., Canstatin, a novel matrix-derived inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *J Biol Chem*, 2000, 275, 1209–1215.
- Karagiannis E.D., Popel A.S., Identification of novel short peptides derived from the  $\alpha 4$ ,  $\alpha 5$ , and  $\alpha 6$  fibrils of type IV collagen with anti-angiogenic properties. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 354, 434–439.
- Koskimaki J.E., Karagiannis E.D., Rosca E.V., Vesuna F., Winnard P.T. Jr., Raman V., Bhujwala Z.M., Popel A.S., Peptides derived from type IV collagen, CXC chemokines, and thrombospondin-1 domain containing proteins inhibit neovascularization and suppress tumor growth in MBA-MB-231 breast cancer xenografts. *Neoplasia*, 2009, 11, 1285–1291.
- Koskimaki J.E., Karagiannis E.D., Tang B.C., Hammers H., Watkins D.N., Pili R., Popel A.S., Pentastatin-1, a collagen IV-derived 20-mer peptide, suppresses tumor growth in a small cell lung cancer xenograft model. *BMC Cancer*, 2010, 10, 29–35.
- Kruegel J., Miosge N., Basement membrane components are key players in specialized extracellular matrices. *Cell Mol Life Sci*, 2010, 67, 2879–2895.
- LeBleu V., Sund M., Sugimoto H., Birrane G., Kanasaki K., Finan E., Miller C.A., Gattone V.H. 2nd, McLaughlin H., Shield C.F. 3rd, Kalluri R., Identification of the NC1 domain of  $\alpha 3$  chain as critical for  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  type IV collagen network assembly. *J Biol Chem*, 2010, 285, 41874–41885.
- Li D., Clark C.C., Myers J.C., Basement membrane zone type XV collagen is a disulfide-bonded chondroitin-sulfate proteoglycan in human tissues and cultured cells. *J Biol Chem*, 2000, 275, 22339–22347.
- Li Y.J., Sun L.C., He Y., Liu X.H., Wang Q.M., Jin X.M., The anti-tumor properties of two tumstatin peptide fragments in human gastric carcinoma. *Acta Pharmacol Sin*, 2009, 30, 1307–1315.
- Liu H., Chen B., Lilly B., Fibroblasts potentiate blood vessel formation partially through secreted factor TIMP-1. *Angiogenesis*, 2008, 11, 223–234.
- Long M.Y., Li H.H., Xu J.Y., Lai D.M., Weng Z.H., Inhibitory effects of transfection of arresten gene on liver metastasis from colorectal cancer in nude mice. *Chin J Cancer*, 2008, 27, 312–315.
- Luo Y.Q., Yao L.J., Zhao L., Sun A.Y., Dong H., Du J.P., Wu S.Z., Hu W., Development of an ELISA for quantification of tumstatin in serum samples and tissue extracts of patients with lung carcinomas. *Clin Chim Acta*, 2010, 411, 510–515.
- Maeshima Y., Colorado P.C., Torre A., Holthaus K.A., Grunkemeyer J.A., Ericksen M.B., Hopfer H., Xiao Y., Stillman I.E., Kalluri R., Distinct antitumor properties of a type IV collagen domain derived from basement membrane. *J Biol Chem*, 2000, 275, 21340–21348.
- Maeshima Y., Yerramalla U.L., Dhanabal M., Holthaus K.A., Barbashov S., Kharbanda S., Reimer C., Manfredi M., Dickerson W.M., Kalluri R., Extracellular matrix-derived peptide binds to  $\alpha V\beta 3$  integrin and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem*, 2001, 276, 31959–31968.
- Maeshima Y., Sudhakar A., Lively J.C., Ueki K., Kharbanda S., Kahn C.R., Sonenberg N., Hynes R.O., Kalluri R., Tumstatin, an endothelial cell-specific inhibitor of protein synthesis. *Science*, 2002, 295, 140–143.
- Magnon C., Galaup A., Mullan B., Rouffiac V., Bouquet C., Bidart J.M., Griselli F., Opolon P., Perricaudet M., Canstatin acts on endothelial and tumor cells *via* mitochondrial damage initiated through interaction with

- $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha v\beta 5$  integrins. *Cancer Res*, 2005, 15, 4353–4361.
- Magnon C., Opolon P., Ricard M., Connault E., Ardouin P., Galaup A., Métivier D., Bidart J.M., Germain S., Perricaudet M., Schlumberger M., Radiation and inhibition of angiogenesis by canstatin synergize to induce HIF-1 $\alpha$ -mediated tumor apoptotic switch. *J Clin Invest*, 2007, 117, 1844–1855.
- Magnon C., Opolon P., Connault E., Mir L.M., Perricaudet M., Martel-Renoir D., Canstatin gene electrotransfer combined with radiotherapy: preclinical trials for cancer treatment. *Gene Ther*, 2008, 15, 1436–1445.
- Maquart F.X., Siméon A., Pasco S., Monboisse J.C., Régulation de l'activité cellulaire par la matrice extracellulaire : le concept de matrikine. *J Soc Biol*, 1999, 193, 423–428.
- Miles A.J., Skubitz A.P., Furcht L.T., Fields G.B., Promotion of cell adhesion by single-stranded and triple-helical peptide models of basement membrane collagen  $\alpha 1(IV)$ 531–543. Evidence for conformationally dependent and conformationally independent type IV collagen cell adhesion sites. *J Biol Chem*, 1994, 269, 30939–30945.
- Mundel T.M., Yliniemi A.M., Maeshima Y., Sugimoto H., Kieran M.K., Kalluri R., Type IV collagen  $\alpha 6$  chain-derived noncollagenous domain 1 ( $\alpha 6(IV)$  NC1) inhibits angiogenesis and tumor growth. *Int J Cancer*, 2008, 122, 1738–1744.
- Myers J.C., Li D., Bageris A., Abraham V., Dion A.S., Amenta P.S., Biochemical and immunohistochemical characterization of human type XIX defines a novel class of basement membrane zone collagens. *Am J Pathol*, 1997, 151, 1729–1740.
- Myers J.C., Li D., Amenta P.S., Clark C.C., Nagaswami C., Weisel J.W., Type XIX collagen purified from human umbilical cord is characterized by multiple sharp kinks delineating collagenous subdomains and by intermolecular aggregates *via* globular, disulfide-linked, and heparin-binding amino termini. *J Biol Chem*, 2003, 278, 32047–32057.
- O'Reilly M.S., Boehm T., Shing Y., Fukai N., Vasios G., Lane W.S., Flynn E., Birkhead J.R., Olsen B.R., Folkman J., Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 1997, 88, 277–285.
- Panka D.J., Mier J.W., Canstatin inhibits Akt activation and induces Fas dependent apoptosis in endothelial cells. *J Biol Chem*, 2003, 278, 37632–37636.
- Pasco S., Han J., Gillery P., Bellon G., Maquart F.X., Borel J.P., Kefalides N.A., Monboisse J.C., A specific sequence of the noncollagenous domain of the  $\alpha 3(IV)$  chain of type IV collagen inhibits expression and activation of matrix metalloproteinases by tumor cells. *Cancer Res*, 2000a, 60, 467–473.
- Pasco S., Monboisse J.C., Kieffer N., The  $\alpha 3(IV)$  185–5203 peptide from noncollagenous domain I of type IV collagen interacts with a novel binding site on the  $\beta 3$  subunit of integrin  $\alpha v\beta 3$  and stimulates focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3-kinase phosphorylation. *J Biol Chem*, 2000b, 275, 32999–33007.
- Pasco S., Ramont L., Venteo L., Pluot M., Maquart F.X., Monboisse J.C., *In vivo* overexpression of tumstatin domains by tumor cells inhibits their invasive properties in a mouse melanoma model. *Exp Cell Res*, 2004, 301, 251–265.
- Petitlerc E., Boutaud A., Prestayko A., Xu J., Sado Y., Ninomiya Y., Sarras M.P. Jr., Hudson B.G., Brooks P.C., New functions for non-collagenous domains of human collagen type IV. Novel integrin ligands inhibiting angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *J Biol Chem*, 2000, 275, 8051–8061.
- Polette M., Thiblet J., Ploton D., Buisson A.C., Monboisse J.C., Tournier J.M., Birembaut P., Distribution of  $\alpha 1(IV)$  and  $\alpha 3(IV)$  chains of type IV collagen in lung tumors. *J Pathol*, 1997, 182, 185–191.
- Ramchandran R., Dhanabal M., Volk R., Waterman M.J.F., Segal M., Lu H., Knebelmann B., Sukhatme V.P., Antiangiogenic activity of restin, NC10 domain of human collagen XV: comparison to endostatin. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 255, 735–739.
- Ramont L., Brassart-Pasco S., Thevenard J., Deshorgue A., Venteo L., Laronze J.Y., Pluot M., Monboisse J.C., Maquart F.X., The NC1 domain of type XIX collagen inhibits *in vivo* melanoma growth. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6, 506–514.
- Rehn M., Pihlajaniemi T.,  $\alpha 1(XVIII)$ , a collagen with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91, 4234–4238.
- Ricard-Blum S., The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3, a004978.
- Ricard-Blum S., Ballut L., Matricryptins derived from collagens and proteoglycans. *Front Biosci*, 2011, 16, 674–697.
- Rivera C.G., Rosca E.V., Pandey N.B., Koskimaki J.E., Bader J.S., Popel A.S., Novel peptide-specific quantitative structure-activity relationship (QSAR) analysis applied to collagen IV peptides with antiangiogenic activity. *J Med Chem*, 2011, 54, 6492–6500.
- Roth J.M., Akalu A., Zelmanovich A., Policarpio D., Ng B., MacDonald S., Formenti S., Liebes L., Brooks P.C., Recombinant  $\alpha 2(IV)$ NC1 domain inhibits tumor cell-extracellular matrix interactions, induces cellular senescence, and inhibits tumor growth *in vivo*. *Am J Pathol*, 2005, 166, 901–911.
- Shimoda M., Mellody K.T., Orimo A., Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Sem Cell Dev Biol*, 2010, 21, 19–25.
- Sudhakar A., Nyberg P., Keshamouni V.G., Mannam A.P., Li J., Sugimoto H., Cosgrove D., Kalluri R., Human  $\alpha 1$  type IV collagen NC1 domain exhibits distinct antiangiogenic activity mediated by  $\alpha 1\beta 1$  integrin. *J Clin Invest*, 2005, 115, 2801–2810.
- Thevenard J., Floquet N., Ramont L., Prost E., Nuzillard J.M., Dauchez M., Yezid H., Alix A.J., Maquart F.X.,

- Monboisse J.C., Brassart-Pasco S., Structural and antitumor properties of the YSNSG cyclopeptide derived from tumstatin. *Chem Biol*, 2006, 13, 1307–1315.
- Thevenard J., Ramont L., Devy J., Brassart B., Dupont-Deshorgue A., Floquet N., Schneider L., Ouchani F., Terryn C., Maquart F.X., Monboisse J.C., Brassart-Pasco S., The YSNSG cyclopeptide derived from tumstatin inhibits tumor angiogenesis by down-regulating endothelial cell migration. *Int J Cancer*, 2010, 126, 1055–1066.
- Toubal A., Ramont L., Terryn C., Brassart-Pasco S., Patigny D., Sapi J., Monboisse J.C., Maquart F.X., The NC1 domain of type XIX collagen inhibits melanoma cell migration. *Eur J Dermatol*, 2010, 20, 712–718.
- Wang W.B., Zhou Y.L., Heng D.F., Miao C.H., Cao Y.L., Combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and canstatin gene suppression therapy on breast tumor xenograft growth in mice. *Breast Cancer Res Ther*, 2008, 110, 283–295.
- Wang W., Chen P., Li J.L., Pei Y.F., Shuang Q.C., Liu C.H., Cai S., Liu S.K., Zhu L.Y., Zhou R., The effects of tumstatin 185–191 on lung adenocarcinoma cell lines and the association with protein kinase B and extracellular regulated protein kinase activation. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*, 2010, 33, 123–127.
- Weiss S.A., Cheresch D.A., Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. *Nat Med*, 2011, 17, 1359–1370.
- Xu C.X., Liu X.X., Hou G.S., Yan Y.F., Chen S.M., Wang W., Jiang G.S., Liu B., Xin J.X., The expression of tumstatin is down-regulated in renal carcinoma. *Mol Biol Rep*, 2010, 37, 2273–2277.
- Yao B., He Q.M., Tian L., Xiao F., Jiang Y., Zhang R., Li G., Zhang L., Hou J.M., Cheng X.C., Wen Y.J., Kan B., Li J., Zhao X., Hu B., Zhou Q., Zhang L., Wei Y.Q., Enhanced antitumor effect of the combination of tumstatin gene therapy and gemcitabine in murine models. *Hum Gene Ther*, 2005, 16, 1075–1086.
- Zhang G.M., Zhang Y.M., Fu S.B., Liu X.H., Fu X., Yu Y., Zhang Z.Y., Effects of cloned tumstatin-related and angiogenesis-inhibitory peptides on proliferation and apoptosis of endothelial cells. *Chin Med J*, 2008, 121, 2324–2334.
- Zhang X., Xu W., Qian H., Zhu W., Zhang R., Mesenchymal stem cells modified to express lentivirus TNF- $\alpha$  tumstatin (45–132) inhibit the growth of prostate cancer. *J Cell Mol Med*, 2011, 15, 433–444.
- Zheng X.W., Li Y., Tang F.A., Ma J., Zheng P.Y., Lu G.F., *In vivo* antitumor effect of canstatin gene on human oesophageal carcinoma xenografts in nude mice. *Chin J Cancer*, 2009, 28, 1–7.
- Zhou J.F., Bai C.M., Wang Y.Z., Li X.Y., Cheng Y.J., Chen S.C., Endostar combined with chemotherapy for treatment of metastatic colorectal and gastric cancer: a pilot study. *Chin Med J*, 2011, 124, 4299–4303.