

**THÈSE**  
Présentée à

**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX I**  
Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

par **Alexandre Dubrac**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR en biologie**

SPECIALITE : BIOLOGIE CELLULAIRE ET PHYSIOPATHOLOGIE

**ANALYSE FONCTIONNELLE ET STRUCTURALE DU  
FACTEUR ANTIANGIOGÉNIQUE PF4v1**

Soutenue le : 18 décembre 2008

Après avis de :

Professeur Curzio Ruegg  
Docteur Georges Uzan

Devant la commission d'examen formée de :

Professeur Patrick J. Babin  
Professeur Curzio Ruegg  
Docteur Georges Uzan  
Professeur Hervé Prats  
Professeur Andréas Bikfalvi

Président  
Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Directeur de thèse



# RESUME

De nombreuses équipes se sont intéressées aux fonctions antiangiogéniques de PF4 (Platelet Factor 4 ou Facteur Plaquettaire 4). Ses capacités inhibitrices vis-à-vis de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales *in vitro* et son effet inhibiteur sur l'angiogenèse *in vivo* ne sont plus à démontrer. En revanche, il existe encore de nombreuses interrogations sur les mécanismes d'action responsables de son activité antiangiogénique. La chimiokine PF4v1 (Platelet Factor 4 variant 1) mature ne diverge de PF4 que par trois acides aminés mais son potentiel angiostatique est beaucoup plus élevé que celui de PF4. L'étude comparative de PF4 et PF4v1 est donc susceptible de fournir des éclairages intéressants sur les mécanismes d'action de l'activité antiangiogénique de PF4. La question se pose de savoir si la différence d'activité antiangiogénique entre ces deux chimiokines pourrait s'expliquer par des différences d'affinité aux GAGs (Glycoaminoglycans), à un récepteur ou bien aux voies de transduction utilisées pour médier leurs effets ? Comme les mécanismes d'action de PF4v1 demeurent très largement incompris (bien que son utilisation comme agent thérapeutique antiangiogénique soit très prometteuse), nous avons adopté plusieurs axes de travail pour élucider les caractéristiques spécifiques de cette chimiokine.

Dans un premier temps, nous avons étudié les caractéristiques de diffusibilité et de biodisponibilité des facteurs PF4 et PF4v1. Nous avons déterminé que ces paramètres étaient liés aux affinités de PF4 et PF4v1 pour l'héparine et les GAGs, et nous avons identifié l'acide aminé principalement responsable des différences observées.

Sur le plan de l'activité antiangiogénique de ces deux chimiokines, nous montrons une absence de corrélation avec l'affinité respective aux GAGs. Par contre, nous identifions que la liaison avec un récepteur spécifique pourrait être à l'origine de la différence d'activité antiangiogénique. Nous avons mené une étude permettant de comprendre le rôle de chaque acide aminé variant entre ces deux chimiokines dans la liaison spécifique au récepteur.

Enfin, nous avons développé le premier anticorps monoclonal spécifique de la protéine PF4v1 qui, de plus, neutralise son activité antiangiogénique. Ce nouvel outil apporte des informations sur la structure et sur l'activité biologique de PF4v1. Il nous a aussi permis de démontrer que la protéine PF4v1 est un nouveau biomarqueur du cancer du pancréas. Grâce à ce nouvel outil, nous avons aussi développé un dosage ELISA anti-PF4v1. Dans le cadre de la recherche de nouveaux biomarqueurs pour la détection précoce des cancers, nous pouvons envisager une utilisation de cet ELISA en collaboration avec des services cliniques.

Mots clés : PF4v1, PF4, GAG, RCPG, biodisponibilité, biomarqueur, angiogenèse.



## **TABLE DES MATIERES**



# Table des matières

|                                                                                                  |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>CHAPITRE I : INTRODUCTION</b>                                                                 | <b>19</b> |
| <b>PARTIE I. L'ANGIOGENESE</b>                                                                   | <b>21</b> |
| <b>1 - LE DEVELOPPEMENT DES VAISSEAUX SANGUINS</b>                                               | <b>23</b> |
| 1) STRUCTURE DES VAISSEAUX SANGUINS                                                              | 23        |
| 2) DE LA VASCULOGENESE A L'ANGIOGENESE                                                           | 25        |
| <b>2 - LE MECANISME MOLECULAIRE DE L'ANGIOGENESE</b>                                             | <b>26</b> |
| 1) LA VASODILATATION ET LA PERMEABILITE VASCULAIRE                                               | 26        |
| 2) LA DEGRADATION DE LA MEMBRANE BASALE ET DE LA MATRICE EXTRACELLULAIRE                         | 26        |
| 3) LA MIGRATION ET LA PROLIFERATION DES CELLULES ENDOTHELIALES                                   | 27        |
| 4) LA FORMATION DU LUMEN ET LA MATURATION DES VAISSEAUX                                          | 27        |
| <b>3 - LA REGULATION DE L'ANGIOGENESE</b>                                                        | <b>29</b> |
| 1) LES ACTIVATEURS DE L'ANGIOGENESE                                                              | 30        |
| 2) LES INHIBITEURS NATURELS DE L'ANGIOGENESE                                                     | 35        |
| <b>4 - L'ANGIOGENESE PATHOLOGIQUE</b>                                                            | <b>37</b> |
| 1) LA PROGRESSION Tumorale.                                                                      | 37        |
| 2) L'ANGIOGENESE Tumorale                                                                        | 39        |
| <b>5 - LA THERAPIE ANTI-ANGIOGENIQUE</b>                                                         | <b>43</b> |
| 1) L'ANGIOGENESE Tumorale COMME CIBLE THERAPEUTIQUE                                              | 45        |
| 2) LES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES                                                               | 47        |
| 3) UTILISATION DE BIOMARQUEURS POUR LE DEVELOPPEMENT DE THERAPIES ANTIANGIOGENIQUES EN ONCOLOGIE | 51        |
| <b>PARTIE II. LES PROTEOGLYCANNES (PGS)</b>                                                      | <b>55</b> |
| <b>1 - STRUCTURE DES PROTEOGLYCANNES</b>                                                         | <b>57</b> |
| 1) LES FAMILLES DE GLYCOSAMINOGLYCANNES (GAGs)                                                   | 57        |
| 2) BIOSYNTHESE DES CHAINES GLYCOSAMINOGLYCANNES                                                  | 61        |
| 3) LES NOYAUX PROTEIQUES                                                                         | 63        |
| 4) FONCTION DES PROTEOGLYCANNES                                                                  | 64        |
| <b>2 - IMPLICATION DES GAGs DANS LE CANCER</b>                                                   | <b>67</b> |
| 1) LES PHENOMENES D'INVASION ET DE METASTASE DES CELLULES CANCEREUSES                            | 68        |
| 2) LES GAGs ET L'ANGIOGENESE                                                                     | 69        |
| <b>PARTIE III. LES CHIMIOKINES</b>                                                               | <b>71</b> |
| <b>1 - GENERALITE</b>                                                                            | <b>73</b> |
| 1) NOMENCLATURE                                                                                  | 73        |
| 2) ROLE PHYSIOLOGIQUE DES CHIMIOKINES                                                            | 73        |
| 3) CLASSIFICATION DES CHIMIOKINES                                                                | 75        |
| 4) STRUCTURE TRIDIMENSIONNELLE DES CHIMIOKINES                                                   | 78        |
| <b>2 - LES RECEPTEURS AUX CHIMIOKINES</b>                                                        | <b>79</b> |
| 1) DES RECEPTEURS DE LA FAMILLE DES RECEPTEURS COUPLES AUX PROTEINES G (RCPGs)                   | 79        |
| 2) CLASSIFICATION DES RECEPTEURS DE CHIMIOKINES DE TYPE RCPG                                     | 81        |
| 3) SIGNALISATION DES RECEPTEURS DE CHIMIOKINES DE TYPE RCPG                                      | 83        |
| 4) LES GAGs                                                                                      | 83        |
| <b>3 - LES CHIMIOKINES ET CANCER</b>                                                             | <b>85</b> |
| 1) INFILTRATION DES LEUCOCYTES                                                                   | 85        |
| 2) LE MICROENVIRONNEMENT DES TUMEURS CONTRIBUE A L'ACTION DES CHIMIOKINES                        | 86        |
| 3) NOUVEAUX BIOMARQUEURS DES TUMEURS                                                             | 86        |
| <b>4 - LES CHIMIOKINES ET LES GAGs</b>                                                           | <b>86</b> |
| <b>5 - LES CHIMIOKINES DE TYPE CXC</b>                                                           | <b>87</b> |
| 1) CHIMIOKINE CXC ET ANGIOGENESE Tumorale                                                        | 87        |

|                                                                                                                        |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 2) RECEPTEURS AUX CHIMIOKINES CXC                                                                                      | 88         |
| <b>6 - LE FACTEUR PLAQUETTAIRE 4 : PF4</b>                                                                             | <b>89</b>  |
| 1) STRUCTURE                                                                                                           | 91         |
| 2) ACTIVITE BIOLOGIQUE                                                                                                 | 93         |
| 3) MECANISMES D'INHIBITION DE L'ANGIOGENESE                                                                            | 95         |
| 4) MOLECULES DERIVEES DU FACTEUR PLAQUETTAIRE 4                                                                        | 96         |
| <b>7 - LE VARIANT NATUREL DE PF4 : PF4v1</b>                                                                           | <b>97</b>  |
| 1) L'EVOLUTION DE PF4 VERS PF4v1                                                                                       | 97         |
| 2) ACTIVITE ANGIOSTATIQUE DE PF4v1                                                                                     | 101        |
| <b>CHAPITRE II : RESULTATS</b>                                                                                         | <b>105</b> |
| <b>PARTIE I. PF4v1, UNE MOLECULE ANTIANGIOGENIQUE PLUS DIFFUSIBLE ET PLUS BIODISPONIBLE QUE PF4</b>                    | <b>107</b> |
| <b>1 - ANALYSE IN VITRO DE L'AFFINITE DE PF4v1 POUR LES GAGS</b>                                                       | <b>109</b> |
| 1) PURIFICATION DES PROTEINES PAR AFFINITE A L'HEPARINE                                                                | 109        |
| 2) PURIFICATION DES PROTEINES RECOMBINANTES EN ABSENCE D'INTERACTION AVEC L'HEPARINE                                   | 111        |
| 3) ACTIVITE BIOLOGIQUE DES PROTEINES RECOMBINANTES GST-PF4 ET V1                                                       | 112        |
| 4) DETERMINATION DES CONSTANTES D'AFFINITES DE GST-PF4 ET V1 POUR LES GAGS PAR SPR                                     | 113        |
| <b>2 - ROLE DE L'HISTIDINE 67 DANS LES DIFFERENCES DE RETENTION MEMBRANAIRE ET DE DIFFUSIBILITE ENTRE PF4 ET PF4v1</b> | <b>115</b> |
| 1) PRESENTATION DES DIFFERENTS MUTANTS DE PF4                                                                          | 115        |
| 2) ROLE DE L'HISTIDINE 67 DANS L'INTERACTION PF4v1/GAGS                                                                | 117        |
| 3) RETENTION MEMBRANAIRE DE PF4 ET PF4v1 APRES LEUR SECRETION CELLULAIRE                                               | 119        |
| 4) LES PEPTIDES SIGNAUX DE PF4 ET PF4v1 SONT-ILS DIFFERENTIELLEMENT EFFICACES POUR LA SECRETION ?                      | 125        |
| 5) BIODISPONIBILITE DES FACTEURS PF4 ET PF4v1                                                                          | 127        |
| <b>3 - DISCUSSION</b>                                                                                                  | <b>129</b> |
| <b>PARTIE II. ROLE DE L'HISTIDINE 67 DANS L'ACTIVITE BIOLOGIQUE DE PF4v1</b>                                           | <b>133</b> |
| <b>1 - AFFINITE DES DIFFERENTS PEPTIDES DE PF4 POUR LES GAGS</b>                                                       | <b>135</b> |
| <b>2 - ACTIVITE BIOLOGIQUE DES MUTANTS DE PF4</b>                                                                      | <b>137</b> |
| <b>3 - DISCUSSION</b>                                                                                                  | <b>137</b> |
| <b>PARTIE III. PF4 ET PF4v1 : DES MECANISMES D'ACTION DIFFERENTS ?</b>                                                 | <b>139</b> |
| <b>1 - ACTIVITE ANTAGONISTE DE LA PROTEINE PF4 SUR LA PROTEINE PF4v1</b>                                               | <b>141</b> |
| <b>2 - HETERODIMERISATION DES PROTEINES PF4 ET PF4v1</b>                                                               | <b>143</b> |
| <b>3 - INTERACTION DES PROTEINES PF4 ET PF4v1 AVEC LES RECEPTEURS CXCR3A ET CXCR3B</b>                                 | <b>145</b> |
| <b>4 - DISCUSSION</b>                                                                                                  | <b>146</b> |
| <b>PARTIE IV. ROLE DE L'INTERNALISATION DU FACTEUR PF4 DANS SON ACTIVITE BIOLOGIQUE</b>                                | <b>151</b> |
| <b>1 - INTERNALISATION DES FACTEURS PF4 ET PF4v1 DANS LES CELLULES ENDOTHELIALES</b>                                   | <b>153</b> |
| <b>2 - PARTENAIRES INTRACELLULAIRES DE PF4</b>                                                                         | <b>155</b> |
| <b>3 - DISCUSSION</b>                                                                                                  | <b>155</b> |
| <b>PARTIE V. DEVELOPPEMENT D'UN NOUVEL OUTIL : UN ANTICORPS MONOCLONAL SPECIFIQUE DE PF4v1</b>                         | <b>157</b> |
| <b>1 - DEVELOPPEMENT D'UN ANTICORPS MONOCLONAL DE SOURIS SPECIFIQUE DE PF4v1 : MABV1</b>                               | <b>159</b> |

|                                                  |            |
|--------------------------------------------------|------------|
| <b>2 - CARACTERISATION DE L'EPITOPE DU MABV1</b> | <b>159</b> |
| <b>3 - ACTIVITE BLOQUANTE DU MABV1</b>           | <b>161</b> |
| <b>4 - DISCUSSION</b>                            | <b>161</b> |

**PARTIE VI. SUREXPRESSION DE PF4V1 DANS L'ADENOCARCINOME DE PANCREAS 163**

|                                                  |            |
|--------------------------------------------------|------------|
| <b>CHAPITRE III : CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> | <b>171</b> |
|--------------------------------------------------|------------|

|                                          |            |
|------------------------------------------|------------|
| <b>CHAPITRE IV : MATERIEL ET METHODE</b> | <b>181</b> |
|------------------------------------------|------------|

|                            |            |
|----------------------------|------------|
| <b>CHAPITRE V : ANNEXE</b> | <b>189</b> |
|----------------------------|------------|

|                                                                                                                                                                                                                                                            |            |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b><u>PARTIE I. PUBLICATION : DUBRAC A., QUEMENER C., LACAZETTE E., LOPEZ F., ZANIBELLATO C., WU W.G., PRATS H. AND BIKFALVI A. (2010). FUNCTIONAL DIVERGENCE BETWEEN 2 CHEMOKINES IS CONFERRED BY SINGLE AMINO ACID CHANGE. BLOOD 116, 4703-4711.</u></b> | <b>191</b> |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|

|                                            |            |
|--------------------------------------------|------------|
| <b><u>PARTIE II. OLIGOS PCR ET SPR</u></b> | <b>194</b> |
|--------------------------------------------|------------|

|                                           |            |
|-------------------------------------------|------------|
| <b><u>CHAPITRE VI : BIBLIOGRAPHIE</u></b> | <b>200</b> |
|-------------------------------------------|------------|



## **LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX**



Figure 1 : Présentation de la vasculogénèse et de l'angiogénèse.

Figure 2 : Structure des vaisseaux sanguins.

Figure 3 : Principales étapes de l'angiogénèse par bourgeonnement.

Table 1 : Liste des principaux régulateurs de l'angiogénèse.

Figure 4 : La progression tumorale.

Figure 5 : Modèle du « switch » angiogénique.

Figure 6 : Les principales étapes de l'angiogénèse tumorale.

Figure 7 : Architecture du réseau vasculaire normal et du réseau vasculaire tumoral anormal.

Figure 8 : Publications sur l'angiogénèse.

Figure 9 : Différentes étapes où l'activité du VEGF peut être bloquée.

Table 2 : Drogues utilisées en thérapie anti-VEGF en phase III d'essai clinique.

Table 3 : Drogues antiangiogéniques approuvées pour l'utilisation clinique.

Figure 10 : Normalisation de la vascularisation tumorale au cours d'un traitement antiangiogénique.

Figure 11 : Rationnel de l'utilisation de biomarqueurs dans le développement de thérapies antiangiogéniques.

Table 4 : Biomarqueurs et techniques de détection de l'angiogénèse en étude clinique et préclinique.

Figure 12 : Motifs disaccharidiques des différents GAGs et leurs modifications.

Figure 13 : Structure et localisation des HSPGs au sein des vaisseaux sanguins.

Table 5 : Classification et localisation des principaux types de protéoglycannes.

Table 6 : Classification des chimiokines.

Figure 14 : Représentation schématique des structures primaires des quatre familles de chimiokines.

Figure 15 : Structure tridimensionnelle des chimiokines.

Figure 16 : Structure et fonctionnement d'un RCPG.

Figure 17 : Classification des récepteurs RCPG aux chimiokines.

Figure 18 : Chimiokines et cancer.

Figure 19 : Structure secondaire de PF4

Figure 20 : Structure tridimensionnelle de PF4.

Figure 21 : Forme tétramérique de PF4.

Figure 22 : Mécanismes d'inhibition de l'angiogenèse par PF4.

Figure 23 : Organisation génique des chimiokines humaines.

Figure 24 : Arbre phylogénétique de la famille des chimiokines CXC.

Figure 25 : Alignement des orthologues de PF4 et PF4v1.

Figure 26 : Représentation schématique et comparaison des préARNm de PF4 et PF4v1.

Figure 27 : Comparaison des séquences en acides aminés de PF4 et PF4v1.

Figure 28 : Représentation schématique de la purification de PF4 et PF4v1 sur colonne d'affinité à l'héparine.

Figure 29 : Purification des protéines GST-PF4 et GST-PF4v1 sur colonne d'affinité au Glutathion.

Figure 30 : Test de prolifération et de migration de cellules endothéliales stimulées avec les protéines GST-PF4 et GST-PF4v1.

Table 7 : Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales BAEC par les protéines PF4 et PF4v1.

Figure 31 : Interaction des protéines PF4, PF4v1 avec les GAGs.

Table 8 : Constantes d'affinité de PF4 et PF4v1 pour les différents GAGs.

Figure 32 : Représentations schématiques des différents mutants de PF4.

Figure 33 : Purification des protéines mutantes sur colonne d'affinité au Glutathion.

Figure 34 : Interaction des protéines mutantes avec les GAGs.

Table 9 : Constantes d'affinité des mutants de PF4 pour les différents GAGs.

Figure 35 : Modèle de sécrétion et de rétention membranaire de PF4, PF4v1 et des mutants.

Figure 36 : Rétention membranaire de PF4, PF4v1 et des mutants exprimés par des HEK293T.

Figure 37 : La rétention des protéines PF4 et PF4v1 aux GAGs membranaires.

Figure 38 : Efficacité de sécrétion des peptides signaux de PF4 et PF4v1.

Figure 39 : Diffusibilité des protéines PF4 et PF4v1 après transfert de gènes dans la patte de la souris.

Figure 40 : Diffusibilité des protéines GST-PF4, GST-PF4v1 et des mutants après injection en intraveineuse dans la queue des souris.

Figure 41 : Interaction des peptides issus de PF4 avec les GAGs.

Table 10 : Constantes d'affinité des peptides issus de PF4 pour les différents GAGs.

Figure 42 : Test de prolifération de cellules endothéliales stimulées avec les protéines recombinantes des différents mutants.

Table 11 : Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales BAEC par les protéines PF4 et PF4v1.

Figure 43 : La protéine PF4 inhibe l'activité biologique de la protéine PF4v1.

Figure 44 : Hétérodimérisation des protéines PF4 et PF4v1.

Figure 45 : Etude de l'interaction de PF4 et PF4v1 avec les récepteurs CXCR3a et CXCR3b par BRET.

Figure 46 : Internalisation des facteurs PF4 et PF4v1 dans les cellules endothéliales.

Table 12 : Partenaires intracellulaires de PF4 purifiés par SPR.

Figure 47 : Caractérisation d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de PF4v1 : mabV1.

Figure 48 : Caractérisation de l'épitope du mabV1.

Figure 49 : Activité bloquante du mabV1 sur l'activité biologique de PF4v1.

Table 13 : Gènes surexprimés dans les tumeurs BxPC3, 6 jours après implantation des cellules sur la CAM de poulet.

Figure 50 : Surexpression de l'ARNm CXCL4L1 des tumeurs BxPC3 entre le 1er et le 6ème jour après implantation sur CAM.

Figure 51 : Immunomarquage de xénogreffes sur CAM, 6 jours après implantation de cellules de cancer pancréatique BxPC3 .

Figure 52 : Surexpression de l'ARNm CXCL4L1 dans des biopsies de pancréas de 12 patients atteints d'un cancer du pancréas.

Figure 53 : Marquage CXCL4L1 de cellules de pancréas humains sains ou cancéreux.

Figure 54 : Immunomarquage de xénogreffes de cellules pancréatiques BxPC3 implantées chez la souris et sur la CAM.

Figure 55 : Représentation schématique du modèle de diffusibilité des chimiokines PF4 et PF4v1.

Figure 56 : Représentation schématique du mécanisme d'action de la chimiokine antiangiogénique PF4v1.

# ABREVIATIONS

|                    |                                                  |
|--------------------|--------------------------------------------------|
| ADN                | Acide désoxyribonucléique                        |
| AMPc               | Adénosine 3',5'- monophosphate cyclique          |
| AngII              | Angiotensine II                                  |
| ARNm               | Acide Ribonucléique messenger                    |
| BAEC               | Bovine Aortic Endothelial Cell                   |
| BSA                | Bovin Serum Albumin                              |
| BRET               | Bioluminescence Resonance Energy Transfer        |
| CCL                | CC chemokine ligand                              |
| CS                 | Chondroïtine sulfate                             |
| CXCL               | CXC chemokine ligand                             |
| CXCR3              | CXC receptor 3                                   |
| DMEM               | Dulbecco's Modified Eagle Medium                 |
| DS                 | Dermatane sulfate                                |
| DTT                | DiThioThreitol                                   |
| ELISA              | Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay                |
| ECL                | Enhanced chemiluminescence                       |
| EC                 | Endothelial cell                                 |
| FITC               | Fluorescein isothiocyanate                       |
| FGF                | Fibroblast Growth Factor                         |
| GAG                | Glycosaminoglycane                               |
| GST                | Glutathione-S-transferase                        |
| GPCR               | G Protein Coupled Receptor                       |
| HEK                | Human Embryonic Kidney                           |
| HSPG               | Heparan Sulfate Proteoglycan                     |
| HS                 | Heparane sulfate                                 |
| HepII              | Heparinase II                                    |
| HIF                | Hypoxia Inducible Factor                         |
| HRP                | Horse Radish Peroxidase                          |
| HUVEC              | Human Umbilical Vein Endothelial Cells           |
| IL8                | Interleukin 8                                    |
| IP10               | Induced interferon Protein 10                    |
| INF- $\gamma$      | Interféron gamma                                 |
| Kb                 | Kilo base                                        |
| KDa                | Kilo Dalton                                      |
| NaCl               | Sodium chloride                                  |
| NaClO <sub>3</sub> | Sodium chlorate                                  |
| PAPS               | 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate synthétase |
| PDGF               | Platelet Derived Growth Factor                   |
| PFA                | Paraformaldéhyde                                 |
| PI3Kinase          | Phosphatidylinositol3-kinase                     |
| PF4                | Platelet Factor 4                                |
| PF4v1              | Platelet Factor 4 variant 1                      |
| qPCR               | Quantitative Polymerase Chain Reaction           |
| SDF-1              | Stromal cell-Derived Factor-1                    |
| SDS                | Sodium Dodécyl Sulfate                           |
| SPR                | Surface Plasmon Resonance                        |
| TBE                | Tris-borate EDTA                                 |

|               |                                    |
|---------------|------------------------------------|
| TBS           | Tris Buffered Saline               |
| TBST          | Tris Buffered Saline Tween         |
| TGF           | Transforming Growth Factor         |
| TIE           | TGF- $\beta$ inhibitory element    |
| TNF- $\alpha$ | TumorNecrosis Factor $\alpha$      |
| VEGF          | Vascular Endothelial Growth Factor |

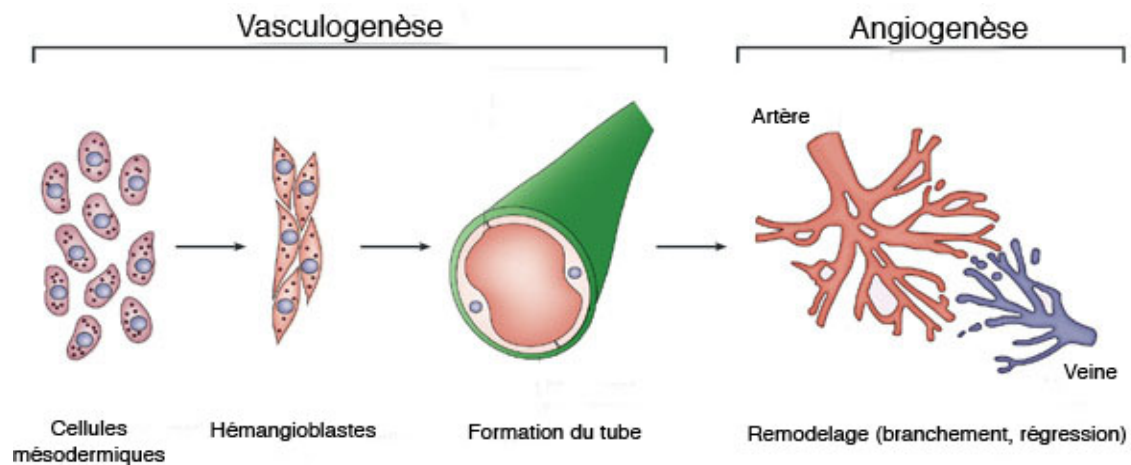
#### Abréviation acides aminés

|   |                        |
|---|------------------------|
| D | Acide aspartique (Asp) |
| E | Glutamate (Glu)        |
| K | Lysine (Lys)           |
| H | Histidine (His)        |
| L | Leucine (Leu)          |
| P | Proline (Pro)          |
| Q | Glutamine (Gln)        |
| R | Arginine (Arg)         |

## **Chapitre I : INTRODUCTION**

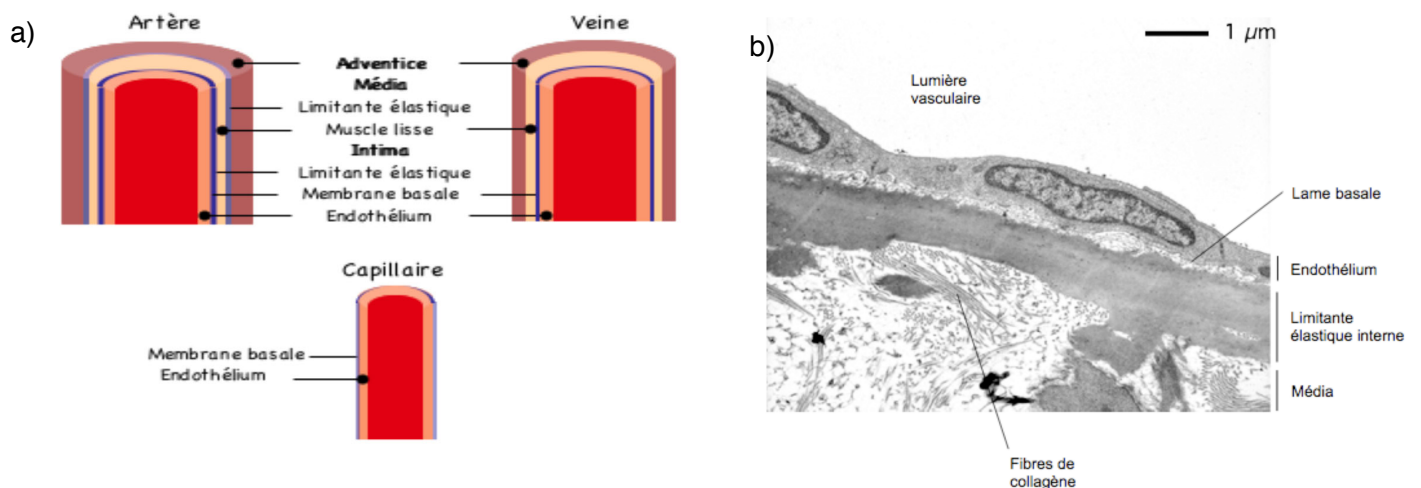


## **Partie I. L'angiogenèse**



**Figure 1:Présentation de la vasculogénèse et de l'angiogénèse.**

Les progéniteurs se différencient pour donner des cellules endothéliales qui forment, lors de la vasculogénèse, un labyrinthe vasculaire primaire d'artères et de veines. Lors de l'angiogénèse le réseau vasculaire se développe, les cellules musculaires lisses et péricytes viennent le stabiliser (adapté de Oliver, 2004).



**Figure 2: Structure des vaisseaux sanguins.**

a) Représentation schématique des vaisseaux. b) Intima en microscopie électronique à transmission. Coupe longitudinale obtenue à partir d'une section d'aorte thoracique de lapin.

## 1 - Le développement des vaisseaux sanguins

Au cours du développement embryonnaire, les vaisseaux sanguins peuvent se former selon plusieurs processus:

- par **vasculogenèse**, processus par lequel des précurseurs hémangioblastiques se différencient pour former un plexus vasculaire primitif;

- par **angiogenèse**, définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (Carmeliet, 2005) (Figure 1).

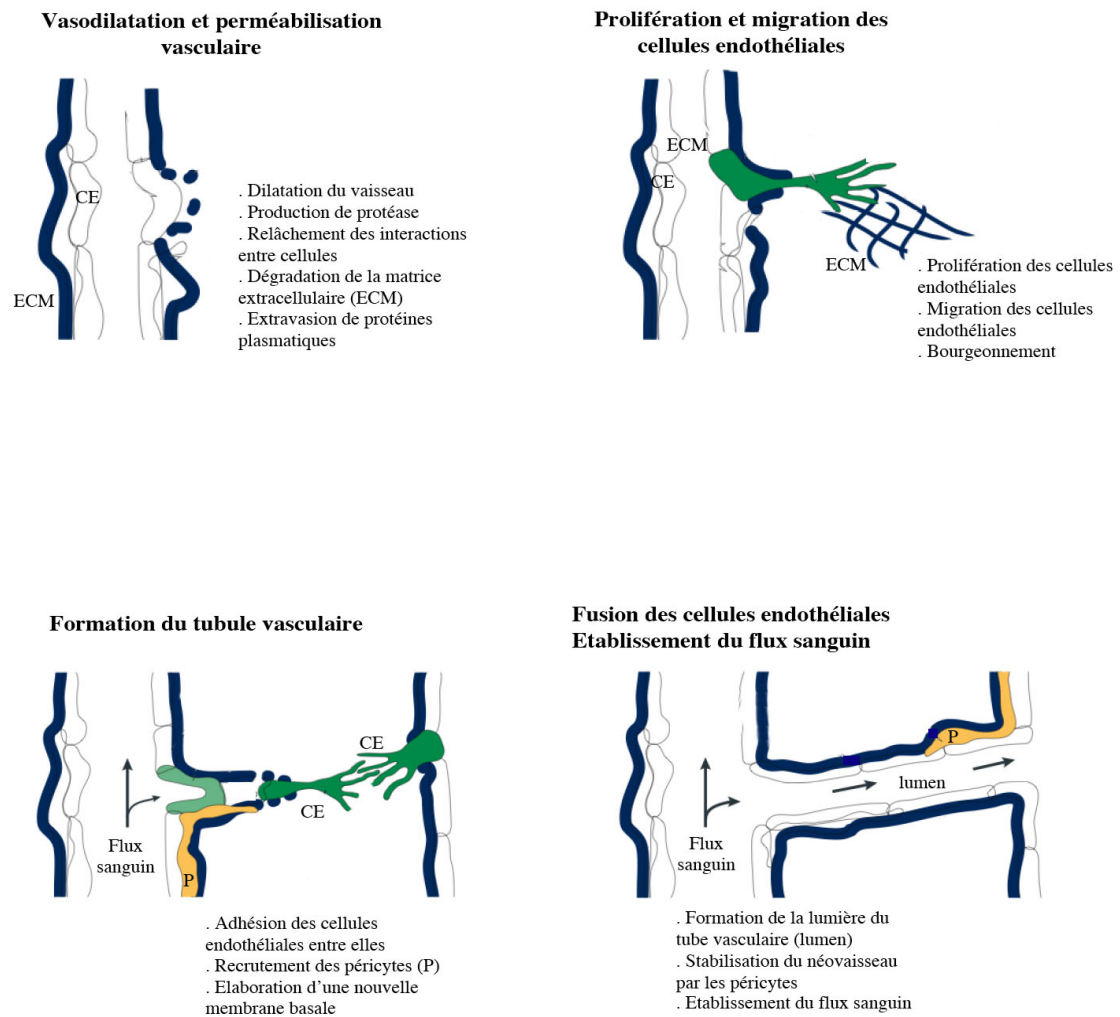
Lors de l'embryogenèse, le processus de néovascularisation dépend de l'origine de l'organe. Ainsi, la vasculogenèse est un mécanisme prépondérant dans les ébauches d'organes constitués de mésoderme et d'endoderme (poumon, pancréas, rate). En revanche, dans les organes composés de mésoderme et d'ectoderme (cerveau, rein), la vascularisation s'établit par angiogenèse (Ortega et al., 1997).

Au cours de la vie adulte, la néovascularisation est principalement effectuée par angiogenèse. Cependant, des cellules précurseurs de cellules endothéliales (angioblastes) identifiées dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique chez l'adulte peuvent également participer à la néovascularisation (Ferrara and Kerbel, 2005).

En plus de son rôle dans le développement embryonnaire, l'angiogenèse contribue aussi à la croissance des organes après la naissance. Cependant, durant la vie adulte, la plupart des vaisseaux sanguins restent quiescents (seulement 0.01% de cellules endothéliales sont en division) et l'angiogenèse se déroule alors seulement durant le cycle ovarien, dans le placenta pendant la gestation ou encore lors de processus de réparation tissulaire ou post-ischémique (Carmeliet, 2005; Hanahan and Folkman, 1996).

### 1) Structure des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins, à l'exception des capillaires, sont composés de tuniques concentriques qui sont, de l'intérieur vers l'extérieur : l'intima, la média,



**Figure 3: Principales étapes de l'angiogenèse par bourgeonnement.**

(adapté de Adams and Alitalo, 2007).

l'adventice. Etroitement réunies, elles assurent ensemble les différentes fonctions vasculaires (Figure 2).

- L'intima est constituée d'une couche de cellules endothéliales reposant sur la membrane basale et par le sous endothélium conjonctif qui peut contenir des cellules immunitaires.

- La média est constituée de cellules musculaires lisses entourées de fibres élastiques et de fibres de collagène.

- l'adventice est constitué de fibres de collagène, de fibres élastiques, de cellules musculaires lisses et de fibroblastes permettant l'ancrage du vaisseau dans le tissu.

## **2) De la vasculogenèse à l'angiogenèse**

Lors de la **vasculogenèse**, les hémangioblastes (progéniteurs communs des cellules endothéliales et hématopoïétiques) apparaissent dans les îlots sanguins de l'aire extraembryonnaire et sur la paroi ventrale de l'aorte mésodermique. Les cellules en périphérie des îlots sanguins donneront naissance aux angioblastes, tandis que celles au centre constitueront les progéniteurs hématopoïétiques. Les angioblastes s'assemblent en un plexus vasculaire primitif qui sera affiné en un réseau fonctionnel par angiogenèse et artériogenèse (Carmeliet, 2004).

L'**angiogenèse** peut se dérouler selon trois mécanismes: par bourgeonnement ("**sprouting**"), par élargissement et séparation des vaisseaux déjà formés ("**intussusception**") ou encore par septation où les cellules poussent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés ("**bridging**") (Carmeliet, 2000).

Le mécanisme le plus étudié est l'angiogenèse **bourgeonnante** qui est caractérisée par différentes étapes (Figure 3). L'initiation de l'angiogenèse, suite à un stimulus angiogénique local tel que l'hypoxie, débute par une **vasodilatation** et une **augmentation** de la **perméabilité** des vaisseaux via la dissolution des jonctions d'adhésion. La **dégradation** de la **membrane basale** et de la **matrice extracellulaire** environnante permet alors la **migration** et la **prolifération** des cellules endothéliales qui s'assemblent en tubes, formant ainsi des vaisseaux primitifs. Lors de la **maturation**, certains de ces vaisseaux deviennent des capillaires

après différenciation et association de cellules mésenchymateuses spécialisées, les péricytes; d'autres se transforment en vaisseaux de plus grands calibres (artères et veines) après la mise en place d'une paroi constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses (Pepper, 2000).

## **2 - Le mécanisme moléculaire de l'angiogenèse**

### **1) La vasodilatation et la perméabilité vasculaire**

Lors de la néovascularisation par bourgeonnement, les vaisseaux existants se dilatent sous l'action du monoxyde d'azote (NO) et deviennent perméables grâce au VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Cette augmentation de la perméabilité est due à la formation de fenestrations et d'organelles vésiculo-vacuolaires, à la redistribution des molécules d'adhésion intercellulaire telles que PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) et VE- cadhérine (*vascular endothelial-cadherin*) et à la modification des propriétés des membranes cellulaires lors de l'activation des Src kinases. L'augmentation de la perméabilité vasculaire permet alors l'extravasation des protéines plasmatiques, induite par le VEGF, qui serviront de matrice provisoire lors de la migration des cellules endothéliales (Carmeliet, 2000; Conway et al., 2001; Eliceiri et al., 1999; Jain, 2003).

### **2) La dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire**

La membrane basale et la matrice extracellulaire sont dégradées suite à l'activation de protéases telles que l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), les chymases ou héparanases, les métalloprotéinases MMP-2, -3 et -9 (*matrix metalloproteinase*) et à la suppression d'inhibiteurs de protéases (TIMP-2, *tissue inhibitor MMP-2*). Ces dégradations permettent ainsi la migration des cellules endothéliales dans la matrice interstitielle environnante. La dégradation de la matrice extracellulaire permet également d'activer ou de libérer des facteurs de croissance comme le FGF (*fibroblast growth factor*) ou le VEGF séquestrés dans cette matrice

(Carmeliet, 2000; Jain, 2003; Silvestre and Levy, 2002). L'angiopoïétine-2 (Ang-2) intervient aussi dans la déstabilisation des vaisseaux matures en détachant les cellules musculaires lisses et en relâchant la matrice, ce qui permet aux cellules endothéliales de migrer, les contacts cellulaires endothéliaux étant rompus (Carmeliet, 2000; Conway et al., 2001).

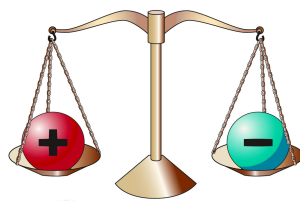
### **3) La migration et la prolifération des cellules endothéliales**

Les barrières physiques étant dissoutes, les cellules endothéliales peuvent migrer et proliférer vers les stimuli angiogéniques. Les cellules endothéliales forment de fins prolongements cytoplasmiques et les cellules migrantes s'allongent et s'alignent les unes avec les autres pour former un bourgeon capillaire. La division des cellules endothéliales augmente davantage la longueur du bourgeon (Pepper, 1997). L'activation de PI3K/Akt promeut la survie et la prolifération des cellules endothéliales via la modulation de nombreux régulateurs du cycle cellulaire, incluant cycline D1, p27 et Bcl-X2. De même, les voies de signalisation des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (ERK1/2 (*extracellular-regulated kinase*), p38 et JNK (*c-jun N-terminal kinase*)) médient l'effet des facteurs de croissance et la prolifération des cellules endothéliales (Milkiewicz et al., 2006).

Lors de la migration, les cellules endothéliales expriment à leur surface des intégrines qui facilitent leur adhésion à la matrice extracellulaire. Ainsi, l'expression des intégrines  $\alpha v \beta 3$  et  $\alpha v \beta 5$  augmente dans les cellules endothéliales en prolifération grâce à la stimulation du FGF (*basic FGF*) et du VEGF (Milkiewicz et al., 2006).

### **4) La formation du lumen et la maturation des vaisseaux**

Après avoir migré et proliféré, les cellules endothéliales s'assemblent en tubes et forment un lumen. Ce lumen peut s'établir par canalisation intracellulaire, qui se déroule *via* la fusion des vésicules cytoplasmiques, ou par un processus alternatif de canalisation intercellulaire, dans lequel un lumen est créé par apposition d'une membrane provenant de deux cellules différentes (Milkiewicz et al., 2006). Au niveau moléculaire, on distingue plusieurs facteurs impliqués dans la formation du lumen: les intégrines  $\alpha 5 \beta 1$  et  $\alpha v \beta 3$ , les VEGF (les isoformes VEGF<sub>121</sub> et VEGF<sub>165</sub> et leurs



| Régulateurs positifs                                                                                                                                                | Régulateurs négatifs                                                                                                                                                                                                                 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| FGF1 et FGF2<br>Ang 1<br>Angiogénine<br>EGF<br>HGF<br>Hypoxie<br>IL-8<br>PDGF-B<br>Prostaglandine<br>TGF- $\alpha$ et TGF- $\beta$<br>TNF- $\alpha$<br>PIGF<br>VEGF | Angiostatine<br>Endostatine<br>Inhibiteurs des MMPs et des PA<br>Interférons<br>Fragments 16K de la PRL, GII, GII-V et PL<br>PRP<br>TGF- $\beta$<br>Thrombospondine<br>Troponine<br>IP-10 (CXCL10)<br>PF4 (CXCL4)<br>PF4v1 (CXCL4L1) |

**Table 1: Liste des différents régulateurs de l'angiogenèse.**

Dans des conditions physiologiques, l'homéostasie angioénique peut être représentée par une balance. En fonction des conditions, la balance penchera en faveur ou non de l'angiogenèse. Ang: *angiopoïetin*, EGF: *epidermal growth factor*, FGF: *fibroblastes growth factor*, GH-V: *growth hormone variant*, HGF: *hhghv bvc* PDGF: *platelet-derived growth factor*, PF4: *platelet factor 4*, PF4v1: *platelet factor 4 variant 1*, IP10: *inflammatory protein 10*, PL: *placenta lactogen*, PRL: *prolactin*, PRP: *proliferin related peptide*, TGF: *transforming growth factor*, TNF: *tumor necrosis factor*, VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

récepteurs augmentent la formation du lumen tandis que VEGF189 diminue son diamètre), le récepteur EGD1 (endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor-1) et Ang-1 qui, en combinaison avec le VEGF, augmentent le diamètre du lumen (Conway et al., 2001).

Les vaisseaux nouvellement formés sont ensuite stabilisés, lors du processus de maturation, par recrutement des cellules mésenchymateuses qui se différencient en cellules péri-endothéliales (péricytes, cellules musculaires lisses) et par génération de la matrice extracellulaire. Plusieurs molécules sont impliquées dans la régulation de ce processus: le facteur PDGF-B (*platelet-derived growth factor-B*) et son récepteur PDGFR- $\beta$ ; la S1P1 (*sphingosine-1-phosphate-1*) et EDG1; Ang-1 et son récepteur à tyrosine kinase Tie-2 (*tyrosine kinase with immunoglobulin-2 and EGF-like domain*); le facteur TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) (Jain, 2003). Le facteur de croissance PlGF (*placental growth factor*) peut aussi assister le processus de stabilisation. PlGF présente une haute affinité pour le récepteur à tyrosine kinase VEGFR-1. L'activation de ce récepteur sur les péricytes ou les cellules musculaires lisses stimule le recouvrement et la stabilisation des capillaires (Milkiewicz et al., 2006).

Une fois assemblées en nouveaux vaisseaux, les cellules endothéliales deviennent quiescentes et survivent pendant des années. Les vaisseaux matures sont moins enclins à la déstabilisation et à la régression.

### **3 - La régulation de l'angiogenèse**

Chez les mammifères adultes, en conditions physiologiques normales, le réseau vasculaire est quiescent. L'angiogenèse est un processus finement contrôlé par une balance d'activateurs et d'inhibiteurs produits par des cellules normales (Table 1). Un changement dans l'équilibre de ces régulateurs peut induire une angiogenèse excessive ou insuffisante.

## **1) Les activateurs de l'angiogenèse**

Le processus d'angiogenèse est régulé à plusieurs niveaux et par différents facteurs. Ainsi, la dégradation de la membrane basale nécessaire à l'invasion et la migration des cellules endothéliales requiert l'activité des enzymes protéolytiques. Les facteurs angiogènes stimulent la migration et la prolifération des cellules endothéliales ; les molécules d'adhésion, quant à elles, régulent les interactions des cellules entre elles ou avec la matrice (Liekens et al., 2001).

### **a) Les enzymes protéolytiques**

La protéolyse extracellulaire joue un rôle essentiel dans le processus d'angiogenèse à différents niveaux. Elle permet la dégradation de la membrane basale sous-endothéliale, l'invasion de la matrice extracellulaire et la formation d'une lumière au sein d'un capillaire néoformé. Elle est également impliquée dans l'activation de facteurs angiogènes (comme la Plasmine et les MétalloProtéinases Matricielles (MMPs)), soit en activant les formes latentes (TGF- $\beta$ ), soit en relarguant les facteurs liés à la matrice (FGF2).

### **b) Les facteurs angiogènes**

#### **Le VEGF et ses récepteurs (VEGFR)**

Parmi les activateurs de l'angiogenèse, le VEGF et les angiopoïétines sont les plus connus car on a cru pendant longtemps qu'ils agissaient sélectivement sur les cellules endothéliales (Yancopoulos et al., 2000). La découverte de l'expression de leurs récepteurs dans d'autres types cellulaires, comme les neurones, les cellules de Sertoli et les cellules tumorales de rein, montre que leur pouvoir oncogénique est plus vaste.

La famille du gène VEGF comprend 6 membres: VEGF-A (ou VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et PlGF. Le VEGF, qui a d'abord été étudié pour sa capacité à induire la perméabilité et l'épanchement vasculaire, est principalement impliqué dans l'angiogenèse tandis que les VEGF-C et -D sont principalement

impliqués dans la lymphangiogenèse (Byrne et al., 2005).

Chez l'homme, le gène du VEGF (ou VEGF-A) est constitué de 8 exons dont l'épissage alternatif donne des variants qui se distinguent entre autres par leur capacité à lier l'héparine et les héparanes sulfates. Les isoformes les plus communes sont constituées de 121, 145, 165, 189, et 206 acides aminés (Bastide et al., 2008; Touriol et al., 2003). Toutes les isoformes montrent des activités biologiques identiques, mais après leur sécrétion les VEGF<sub>121</sub> et VEGF<sub>165</sub> diffusent à travers les tissus tandis que les VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub> restent associés à la cellule ou à la matrice *via* leur affinité pour les héparanes sulfates. L'isoforme prédominante est le VEGF<sub>165</sub> qui est également le plus puissant en terme de stimulation de l'angiogenèse (Milkiewicz et al., 2006; Papetti and Herman, 2002).

Les activités des VEGF sont transmises par trois récepteurs à tyrosine kinase, VEGFR-1 ou Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase 1*), VEGFR-2 ou KDR (*kinase insert domain-containing receptor*) ou Flk-1 (*fetal liver kinase 1*) et VEGFR-3 ou Flt-3. Le VEGFR-2 est le médiateur majeur des effets du VEGF (stimulation mitogène, angiogène, perméabilité). Le VEGFR-1 joue un rôle dans l'hématopoïèse, le recrutement des monocytes et autres dérivés de la moelle osseuse qui peuvent se diriger automatiquement vers le réseau sanguin vasculaire et promouvoir l'angiogenèse. De plus, le VEGFR-1 est impliqué dans l'induction des MMP et la libération paracrine des facteurs de croissance des cellules endothéliales (Ferrara and Kerbel, 2005).

Le récepteur Neuropiline-1 (NRP-1) identifié originellement sur les cellules neuronales, est aussi exprimé par les cellules endothéliales où il agit comme co-récepteur pour le VEGF. Le récepteur NRP-1, ne possédant pas de domaine à tyrosine kinase intracellulaire, peut s'associer aux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 pour transduire son signal (Byrne et al., 2005). Le récepteur NRP-1 est spécifique des artères, alors que le récepteur NRP-2 est spécifique des veines.

#### Les angiopoïétines et leurs récepteurs Tie

Les récepteurs Tie-1 et Tie-2 ainsi que leurs ligands Ang-1 et Ang-2 sont aussi des éléments critiques dans la formation et la stabilisation des vaisseaux. Les principales sources de Ang-1 et Ang-2 sont respectivement les cellules murales et

endothéliales (Jain, 2003).

Ang1 est une protéine glycosylée de 70 kDa qui se lie au récepteur à tyrosine kinase Tie-2 présent à la surface de cellules endothéliales. Par sa liaison à Tie-2, Ang-1 a pour effet de renforcer les vaisseaux en renforçant l'action des molécules de jonction et en favorisant les interactions entre les cellules endothéliales et murales. Elle agit aussi en induisant, au niveau des cellules endothéliales, des facteurs responsables du recrutement des cellules mésenchymateuses (cellules accessoires, péricytes) (Carmeliet, 2003; Pepper, 2000).

Ang-2, un deuxième ligand de Tie-2, se lie avec une affinité semblable à celle de Ang-1, mais inhibe l'activation de Tie-2 induite par Ang-1. Ang-2 serait donc un facteur proangiogénique qui, par sa fonction d'antagoniste à la fonction stabilisatrice de Ang-1, rendrait l'endothélium vasculaire plus susceptible de répondre à des facteurs angiogènes comme le VEGF (Pepper, 2000). En absence de VEGF, Ang-2 déstabilise les vaisseaux, entraînant finalement la régression des vaisseaux (Jain, 2003).

### Les FGFs

La famille des facteurs de croissance fibroblastiques (FGFs) est constituée de protéines de 18 à 30 kDa ayant une haute affinité pour l'héparine (Liekens et al., 2001). Cette famille comprend 23 membres dont 2 membres, FGF1 (*acidic* FGF) et FGF2 (*basic* FGF), qui ont des propriétés angiogènes particulièrement étudiées. FGF1 et FGF2 stimulent l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. FGF2 est impliqué dans l'angiogenèse tumorale et peut participer à la lymphangiogenèse en activant VEGF-C. FGF1 et FGF2 se lient à des récepteurs à activité tyrosine kinase dont 4 ont été décrits (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 et FGFR-4). La spécificité et l'affinité des récepteurs dépendent de l'épissage alternatif des exons. L'autophosphorylation de FGFR-1 et FGFR-2, exprimés par les cellules endothéliales, est stimulée par FGF1 et FGF2 (Bikfalvi, 2003; Bossard et al., 2004). En plus de son rôle sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales, l'équipe de M. Simons a démontré que le FGF2 est primordial pour la stabilité des vaisseaux (Murakami et al., 2008).

### Le PDGF

La famille PDGF est constituée de 4 membres (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et

PDGF- D) qui lie, avec une affinité différente, les récepteurs à tyrosine kinase PDGFR- $\alpha$  et PDGFR- $\beta$  exprimés sur les cellules endothéliales et sur les cellules musculaires lisses. Ces récepteurs jouent un rôle essentiel dans la stabilisation des vaisseaux sanguins naissants en permettant leur recouvrement par des cellules musculaires lisses. En sécrétant le PDGF-B, les cellules endothéliales stimulent la croissance et la différenciation des progéniteurs mésenchymateux PDGFR- $\beta$ <sup>+</sup> et les recrutent autour des vaisseaux naissants. PDGF-C promeut le développement vasculaire dans l'embryon, et chez l'adulte lors de la cicatrisation et dans l'angiogenèse des tissus avasculaires, tandis que PDGF-D stimule l'angiogenèse tumorale (Carmeliet, 2004).

### Le TGF- $\beta$

Le TGF- $\beta$  est une cytokine multifonctionnelle sécrétée sous forme inactive. Elle est activée par protéolyse. La dimérisation du TGF- $\beta$  actif entraîne l'hétérodimérisation des récepteurs de type I et II, ce qui conduit à la phosphorylation de TGF- $\beta$ -R1 (Bikfalvi, 2003).

Le TGF- $\beta$  est exprimé dans de nombreux types cellulaires, incluant les cellules endothéliales et murales. Selon le contexte et sa concentration, le TGF- $\beta$  est pro- ou antiangiogène (Jain, 2003). A faible concentration, le TGF- $\beta$  contribue à l'activation de l'angiogenèse en activant la production des facteurs angiogènes (VEGF) et des protéases. A forte dose, il inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales en stimulant la reconstruction de la membrane basale et la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules murales (provoquée par la surexpression de PDGF-B) (Carmeliet, 2004; Kantarci et al., 2006).

### c) Les intégrines: molécules d'adhésion

Les intégrines constituent un groupe de récepteurs d'adhésion cellulaire formés par les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  associées de façon non-covalente. Les cellules endothéliales expriment plusieurs intégrines distinctes qui permettent leur attachement aux protéines de la matrice extracellulaire.

L'intégrine  $\alpha v \beta 3$  est d'une importance particulière pour l'angiogenèse. Cette

intégrine sert de récepteur aux protéines extracellulaires contenant une séquence RGD (Arg-Gly-Asp), incluant la fibronectine, la vitronectine, la laminine, le facteur von Willebrand, le fibrinogène et le collagène dénaturé. *In vivo*,  $\alpha v\beta 3$  est peu exprimé par les cellules au repos, mais son expression est fortement augmentée au niveau des cellules endothéliales activées lors de l'angiogenèse (Liekens et al., 2001). Le rôle de  $\alpha v\beta 3$  dans l'angiogenèse n'est pas limité à la liaison de composés de la matrice extracellulaire.  $\alpha v\beta 3$  lie la MMP-2 et localise la forme active de cette enzyme sur les vaisseaux sanguins angiogènes. Ainsi, elle peut réguler la dégradation locale de la matrice extracellulaire et aider à la migration des cellules endothéliales en les adhérant à la matrice en remodelage. La liaison de  $\alpha v\beta 3$  inhibe l'apoptose des cellules endothéliales (Papetti and Herman, 2002). Récemment, l'équipe de T.V. Byzova a généré une souris transgénique exprimant un dominant négatif de  $\alpha v\beta 3$ . Les cellules endothéliales de ces souris montrent une incapacité à générer une néovascularisation *in vivo* et à faire de l'angiogenèse *in vitro*. Ces souris transgéniques ont aussi permis de démontrer une interaction entre le VEGFR2 et l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  (Murakami et al., 2008).

#### d) L'hypoxie

L'hypoxie stimule la formation de nouveaux capillaires et le recrutement des cellules endothéliales précurseurs. Elle fournit sa réponse par l'activation des facteurs de transcription HIF (*hypoxia inducible factor*) (ex. HIF-1 $\alpha$ , HIF-2  $\alpha$ , HIF-3  $\alpha$ ). Ces facteurs activent de nombreux gènes impliqués dans la croissance des cellules endothéliales, le recrutement des cellules musculaires lisses, la vasorégulation, l'attraction des leucocytes, etc., ... (VEGF, Ang-2, HGF, PlGF, Tie-2, Flt-1, PDGF-B, NOS (*nitric oxide synthase*), IL-6, IL-8, MMP-2, MMP-13, PAI-1, uPAR, etc.) (Carmeliet, 2004). L'activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  se déroule via sa dimérisation avec HIF-1 $\beta$  qui est constitutivement exprimé. Le dimère peut alors se lier aux régions HRE (*hypoxia response elements*). En conditions normoxiques, la demi-vie de la protéine HIF-1 $\alpha$  est de courte durée (< 5 min). Elle est ubiquitinée par VHL puis dégradée par le protéosome. Par contre, en conditions d'hypoxie, la dégradation de HIF-1 $\alpha$  est réduite (Milkiewicz et al., 2006).

## **2) Les inhibiteurs naturels de l'angiogenèse**

Parmi les molécules inhibitrices identifiées de l'angiogenèse, certaines sont des molécules endogènes de régulation comme la thrombospondine, ou des fragments cryptiques de molécules endogènes qui, elles-mêmes, ne présentent pas d'activité antiangiogène.

Actuellement, les fragments cryptiques représentent la moitié des inhibiteurs connus de l'angiogenèse: c'est le cas de l'angiostatine, de l'endostatine et de la tumstatine. Les fragments 16K de la famille prolactine/hormone de croissance/lactogène placentaire font également partie de ces inhibiteurs cryptiques. La plupart de ces fragments ne sont pas directement produits par les cellules hôtes. Les tissus et les cellules tumorales produisent des enzymes qui convertissent une protéine circulante ou de la matrice extracellulaire en un inhibiteur de l'angiogenèse suggérant que les processus protéolytiques jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'angiogenèse (Cao, 2001).

Enfin, en plus de son rôle positif dans l'angiogenèse, la protéolyse extracellulaire peut aussi intervenir dans la régulation négative de celle-ci en permettant la formation de fragments protéiques possédant des activités antiangiogènes (l'endostatine provient du clivage du collagène XVIII) (Pepper, 2000).

### L'endostatine.

L'endostatine est un produit de clivage de 20KDa de l'extrémité carboxyterminale du collagène XVIII généré par des enzymes protéolytiques telles que la cathépsine L et des métalloprotéases de la matrice. Elle a été découverte par O'Reilly en 1997 (O'Reilly et al., 1997). L'endostatine est un facteur anti-angiogénique naturel et il a été le premier à avoir été identifié comme tel.

Les mécanismes moléculaires de l'activité antiangiogénique de l'endostatine ne sont pas complètement élucidés. C'est un processus complexe résultant de l'inhibition de l'adhésion, de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales et de l'induction de l'apoptose de ces cellules (Abdollahi et al., 2005; Dhanabal et al., 1999; O'Reilly et al., 1997; Tabruyn and Griffioen, 2007). Des études *in vivo* ont montré que l'endostatine inhibe la croissance des tumeurs primaire et prévient la néovascularisation et la croissance des métastases.

### L'angiostatine.

L'angiostatine est le produit de clivage du plasminogène. Ce fragment est composé des trois ou quatre premiers domaines kringle du plasminogène (K1-3 ou K1-4). Il est généré par le clivage du plasminogène en plasmine, suivi par une réduction des ponts disulfures ainsi que le clivage protéolytique par les métalloprotéases de la matrice. L'angiostatine est un puissant inhibiteur de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. Il réduit la croissance tumorale et la dissémination des métastases (O'Reilly et al., 1994).

L'angiostatine, comme beaucoup d'autres facteurs antiangiogéniques, n'a pas encore de récepteur spécifique identifié. Plusieurs sites de liaison ont été identifiés mais leurs rôles dans l'angiogenèse ne sont toutefois pas encore bien définis. Ainsi, cet inhibiteur de l'angiogenèse induirait ses effets *via* de multiples sites de liaisons et plusieurs récepteurs dont notamment : l'intégrine  $\alpha v\beta 3$ , l'ATP synthase et l'angiomotine (Rege et al., 2005; Tabruyn and Griffioen, 2007; Wahl et al., 2005).

### Les thrombospondines.

La famille des thrombospondines (TSPs) est composée de cinq membres codés par des gènes différents. La TSP1 est la plus étudiée. C'est une grosse protéine composée de trois chaînes identiques de 180KDa reliées entre elles par des ponts disulfures. C'est une protéine de la matrice extracellulaire qui est synthétisée par de nombreux types cellulaires (Dawson et al., 1997). TSP1 est un inhibiteur naturel de l'angiogenèse (de Fraipont et al., 2001). TSP1 bloque la prolifération et la migration des cellules endothéliales en culture (Taraboletti, 2001). *In vivo*, TSP1 inhibe le développement des tumeurs par un mécanisme dépendant de l'angiogenèse (Bleuel et al., 1999), et induit l'apoptose des cellules endothéliales en se fixant sur le récepteur membranaire CD36 (Jimenez et al., 2000). Cette fixation de la TSP1 sur CD36 active  $p59^{fyn}$ , une kinase de la famille Src, qui induit l'apoptose des cellules endothéliales par l'intermédiaire des voies de signalisation impliquant les caspases et la  $p38MAPK$  (Jimenez et al., 2000; Nor et al., 2000).

Les chimiokines sont aussi des facteurs endogènes majeurs de l'angiogenèse. Dans cette vaste famille, on trouve aussi bien des facteurs proangiogéniques que des facteurs antiangiogéniques. Tout un chapitre leur sera consacré dans le

manuscrit.

L'homéostasie angiogénique est donc modulée par une balance contenant de nombreux facteurs de part et d'autre. Une dérégulation de cette balance peut donc engendrer des conditions physiopathologiques. Au laboratoire, nous nous intéressons à l'angiogenèse tumorale qui devient une cible thérapeutique majeure dans le traitement de la pathologie tumorale.

## 4 - L'angiogenèse pathologique

### 1) La progression tumorale.

La progression tumorale implique une succession d'évènements complexes au cours desquels les interactions entre les cellules tumorales, la matrice extracellulaire environnante et les cellules hôtes vont se trouver modifiées. En premier lieu, ce processus a pour origine l'exposition de cellules normales à des facteurs cancérigènes tels que des substances chimiques, des virus ou des rayonnements. L'exposition prolongée à ces facteurs, provoque des altérations au niveau du génome. Lorsque les systèmes de réparation sont débordés ou défectueux, ces mutations génétiques persistent et s'accumulent au fil des divisions cellulaires. C'est ce qu'on appelle la **phase d'initiation** de la cancérogenèse. Ces mutations peuvent survenir sur des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire (les proto-oncogènes) ou inactiver des gènes suppresseurs de tumeur. Les cellules entrent alors dans un cycle dans lequel elles échappent au contrôle normal de leur multiplication cellulaire et de leur mort cellulaire. En proliférant de manière anarchique, les cellules forment une micro-tumeur : c'est la **phase de promotion tumorale**.

Dès lors, les cellules tumorales perdent des propriétés et en acquièrent de nouvelles qui leur permettent ainsi de se propager au reste de l'organisme. La plupart des tumeurs, chez l'homme, demeurent *in situ* pendant une longue période (quelques mois à quelques années) dans un état quiescent avascularisé. En général, le développement de la tumeur est bloqué dès que celle-ci atteint une taille critique

d'environ 1-2 mm<sup>3</sup> en raison d'un manque d'apport en éléments nutritifs et d'oxygène. Par exemple, les mélanomes de moins de 0,76 mm d'épaisseur ne métastasent pratiquement jamais. Ils restent dans l'épiderme en dehors de la membrane basale, à distance du derme bien vascularisé. Les mélanomes dont l'épaisseur augmente sont associés à une néovascularisation au niveau du derme, avec souvent des images de cellules tumorales entourant les néo-vaisseaux capillaires. Ils ont alors acquis un pouvoir métastatique important. Une observation analogue peut être faite au niveau des cancers *in situ* du col utérin qui évoluent vers des cancers micro invasifs, non métastatiques jusqu'environ 3 mm d'épaisseur. Ainsi, les cellules cancéreuses ont un pouvoir de micro-invasion locale indépendant de leur pouvoir angiogénique.

Pendant la phase avasculaire, la croissance tumorale est faible, le temps de doublement est très long. Cependant, l'index de marquage à la thymidine peut être aussi élevé que dans les tumeurs vascularisées. Il existe un état d'équilibre entre une production élevée et une perte cellulaire, essentiellement par apoptose, très importante. La détection des cancers avasculaires est difficile, sauf sur une surface d'observation facile comme la peau, la rétine, la cavité buccale, le col de l'utérus, la vessie. Ces lésions sont planes ou exubérantes, fines, à croissance apparemment lente, et ne donnent pratiquement jamais de métastases. Les tumeurs (primitives ou métastatiques), qui ont acquis un phénotype angiogénique, peuvent croître, envahir localement et métastaser, ce qui définit la phase **d'invasion tumorale** (Figure 4). La néo-vascularisation joue un rôle prépondérant au cours de cette phase car elle permet les échanges de nutriments, d'oxygène, mais aussi l'évacuation des déchets cellulaires. À ce stade, il existe des échanges entre les cellules tumorales et les cellules avoisinantes du stroma. L'hypoxie relative, qui existe près du centre de la tumeur en raison de la compression par la masse cellulaire, entraîne la sécrétion par les cellules tumorales de facteurs de croissance proangiogéniques. En retour, les cellules endothéliales, qui sous l'action de ces facteurs de croissance se multiplient, fabriquent des facteurs tels que le FGF2, le PDGF, l'IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), des cytokines comme les interleukines IL-1, IL-6, IL-8, et GM-CSF (facteur de stimulation des granulocytes et des macrophages). Tous ces facteurs favorisent, à des degrés divers, selon le type cellulaire, la croissance des cellules tumorales. Les cellules tumorales croissent préférentiellement le long des travées endothéliales. Il en résulte un processus paracrine de stimulation réciproque des cellules

endothéliales et cancéreuses. Les cellules hôtes, et notamment les macrophages, participent également à ces régulations paracrines. Cette stimulation augmente la fuite des cellules tumorales vers la circulation sanguine, mais également vers le système lymphatique ce qui conduira ces cellules à former des métastases (Figure 4).

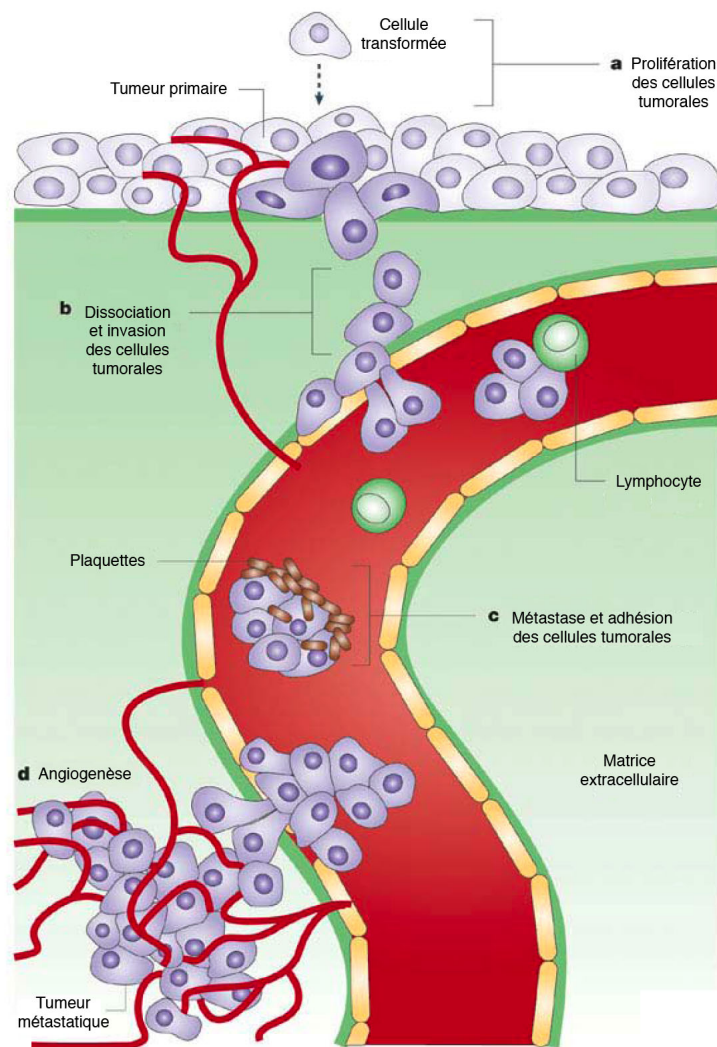
La formation de métastases dans des organes cibles est l'étape ultime de la progression tumorale. Au niveau clinique, c'est aussi une étape critique quant au pronostic de la pathologie cancéreuse (pour revue, (Almog et al., 2006; Bikfalvi, 2003; Fuster and Esko, 2005; Rajagopalan et al., 2003).

## **2) L'angiogenèse tumorale**

### **a) Le "switch" angiogénique**

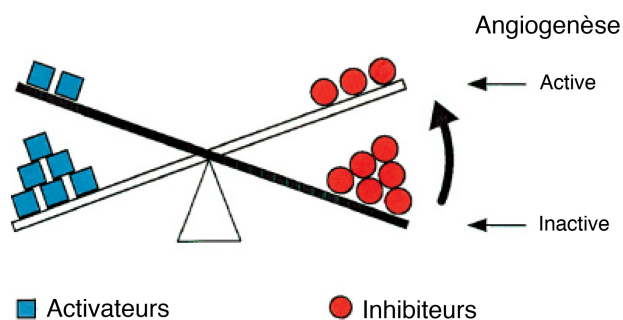
En 1971, Folkman a émis l'hypothèse que la croissance des tumeurs et des métastases était dépendante de l'angiogenèse (Folkman, 1971). En effet, les nouveaux vaisseaux sanguins approvisionnent la tumeur en oxygène et en nutriments permettant ainsi son expansion au-delà d'1 à 2 mm<sup>3</sup>. Ils éliminent les déchets métaboliques et fournissent également des cytokines et des facteurs de croissance qui stimulent directement la croissance des cellules cancéreuses (Algire et al 1954).

La progression tumorale est caractérisée par une phase prévasculaire suivie d'une phase vasculaire. Le passage de la phase prévasculaire à la phase vasculaire a été dénommé « switch » angiogénique (Figure 5). Il peut être déclenché par de nombreux signaux tels que des stress métaboliques (pO<sub>2</sub> faible, pH faible ou hypoglycémie) ou mécaniques (pression générée par des cellules en prolifération), une réponse immunitaire/inflammatoire (cellules immunitaires/inflammatoires qui ont infiltré le tissu) ou encore des mutations génétiques (activation d'oncogènes et délétion de gènes suppresseurs de tumeurs qui contrôlent la production de régulateurs de l'angiogenèse). Durant la phase vasculaire, qui est caractérisée par une croissance exponentielle, une invasion tissulaire et une dissémination des cellules tumorales, l'augmentation rapide de la croissance tumorale est due en



**Figure 4: La progression tumorale.**

La prolifération tumorale (a) est la première étape de la progression tumorale. Pendant l'invasion (b), les cellules tumorales dégradent et migrent à travers les membranes basales et les matrices extracellulaires. Les cellules tumorales disséminées dans le flux sanguin © s'aggrègent avec des cellules hôtes tels que les plaquettes et les lymphocytes et vont se loger dans des organes à distance. Cette nouvelle tumeur métastatique va stimuler l'angiogenèse pour se développer (d) (adapté de Fuster and Esko, 2005).



**Figure 5: Modèle du « Switch » angiogénique.**

L'induction de l'angiogenèse (ou « switch » angiogène) décrit la transition des cellules endothéliales de la phase quiescence à la phase d'activation angiogène. Dans les tissus normaux, les inhibiteurs de l'angiogenèse prédominent et les vaisseaux sont quiescents (adapté de Hanahan and Folkman, 1996).

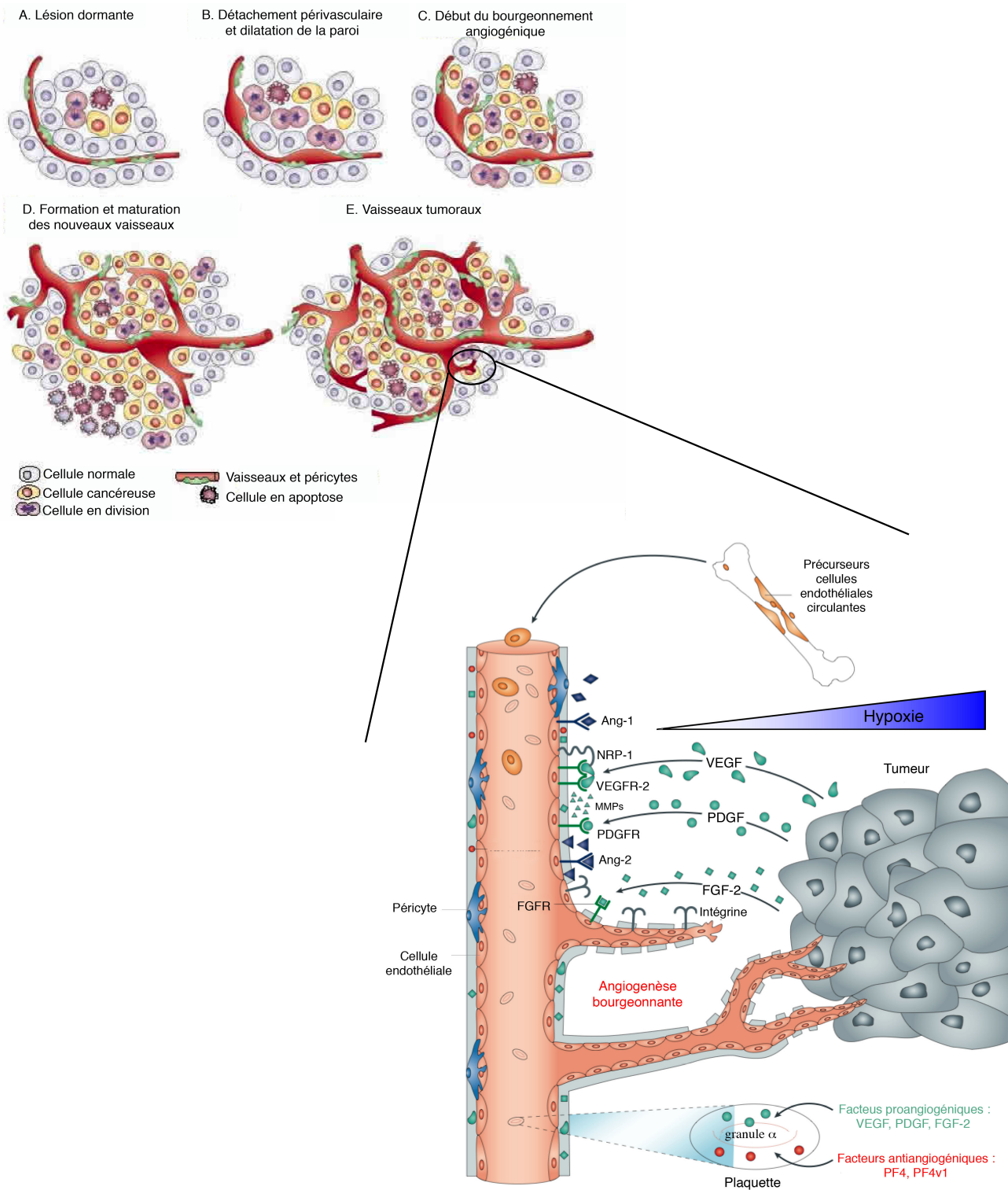
grande partie à une diminution du taux de cellules en apoptose (Figure 6) (Bergers and Benjamin, 2003; Carmeliet, 2000; Pepper, 1997).

#### b) La formation des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux sanguins tumoraux peuvent se former par angiogenèse mais aussi par vasculogenèse, processus par lequel les précurseurs de cellules endothéliales, issus la moelle osseuse, sont mobilisés, transportés par voie sanguine et incorporés dans les vaisseaux sanguins en croissance. Les facteurs angiogéniques (VEGF, PlGF et Ang-1) stimulent également ce processus. Le pourcentage d'incorporation des cellules endothéliales précurseurs est variable (de <0,1% à 50%), cette fluctuation dépendant probablement du type de tumeur et du modèle utilisé (Bergers and Benjamin, 2003; Carmeliet, 2004). Les tumeurs peuvent aussi, dans un premier temps, coopter des vaisseaux existants qui régressent ensuite, entraînant ainsi une nécrose massive. La tumeur est alors vascularisée par angiogenèse tumorale (Bergers and Benjamin, 2003; Holash et al., 1999). Il existe un autre phénomène, encore largement hypothétique, par lequel certaines tumeurs très agressives, tels certains mélanomes, développent une microcirculation indépendante de l'angiogenèse: la "**l'imitation de la vasculogenèse**". Dans ce cas, des cellules tumorales génèreraient des canaux composés de matrice extracellulaire et de cellules tumorales dont le phénotype prendrait alors des caractéristiques de cellules endothéliales (Maniotis et al., 1999).

#### c) La description des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux tumoraux diffèrent des vaisseaux normaux. Morphologiquement, les vaisseaux tumoraux sont hétérogènes, de forme irrégulière, dilatés, tortueux avec des branchements excessifs et des terminaisons aveugles. Le flux sanguin tumoral y est chaotique et variable générant ainsi des régions hypoxiques et acides au sein des tumeurs. Au niveau ultrastructural ces vaisseaux sont également anormaux: ces vaisseaux comportent de nombreuses « ouvertures » (« fenestrae » endothéliales, vésicules et trous transcellulaires), de larges jonctions inter-endothéliales et une membrane basale discontinue ou absente. De plus, les cellules endothéliales



**Figure 6: les principales étapes de l'angiogenèse tumorale.**

Afin de survivre et de se développer, la tumeur va stimuler l'angiogenèse sur les vaisseaux avoisinants. Pour cela, elle sécrète différents facteurs de croissance pro-angiogénique. Les cellules hématopoïétiques circulantes, comme les plaquettes, participent aussi à la formation de ces nouveaux vaisseaux. Les facteurs qu'elles sécrètent (PDGF, PF4,...), favorisent la fonctionnalité des vaisseaux (adapté d'après Bergers and Benjamin, 2003; Folkman, 2007).

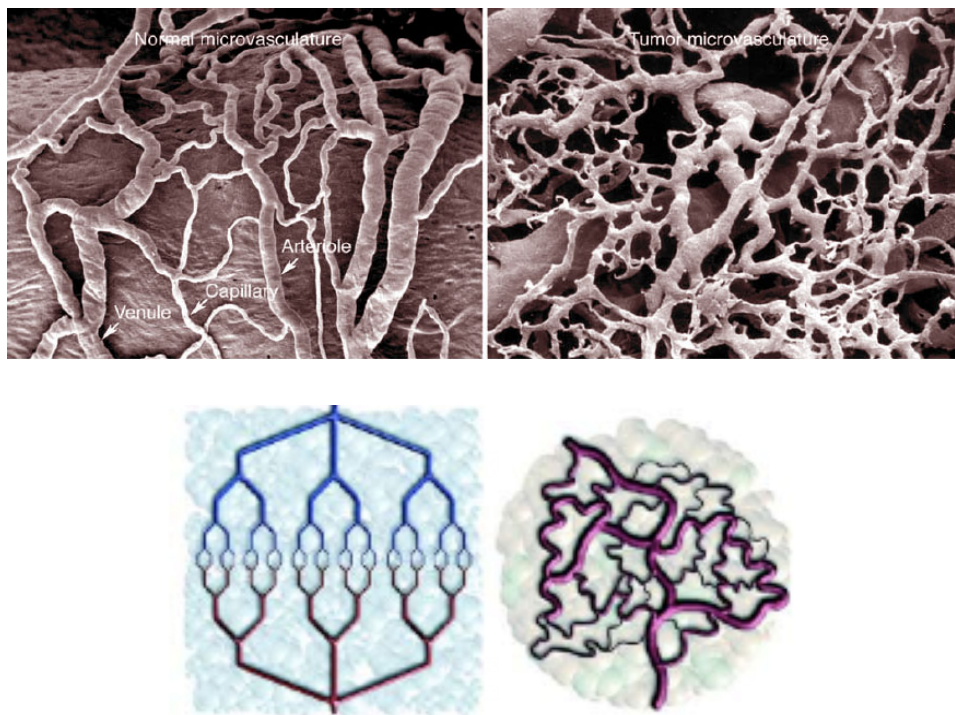
anormales, se chevauchent et occupent une partie du lumen. Toutes ces anomalies rendent les vaisseaux tumoraux très perméables (Figure 7) (Tozer et al., 2005). Les tumeurs sont aussi très hétérogènes; toutes les régions ne sont pas vascularisées de façon égale, certains vaisseaux tumoraux sont plus matures que d'autres, et la balance de molécules pro- et antiangiogènes diffère selon la région et selon le stade de la tumeur (Jain, 2005).

## **5 - La thérapie anti-angiogénique**

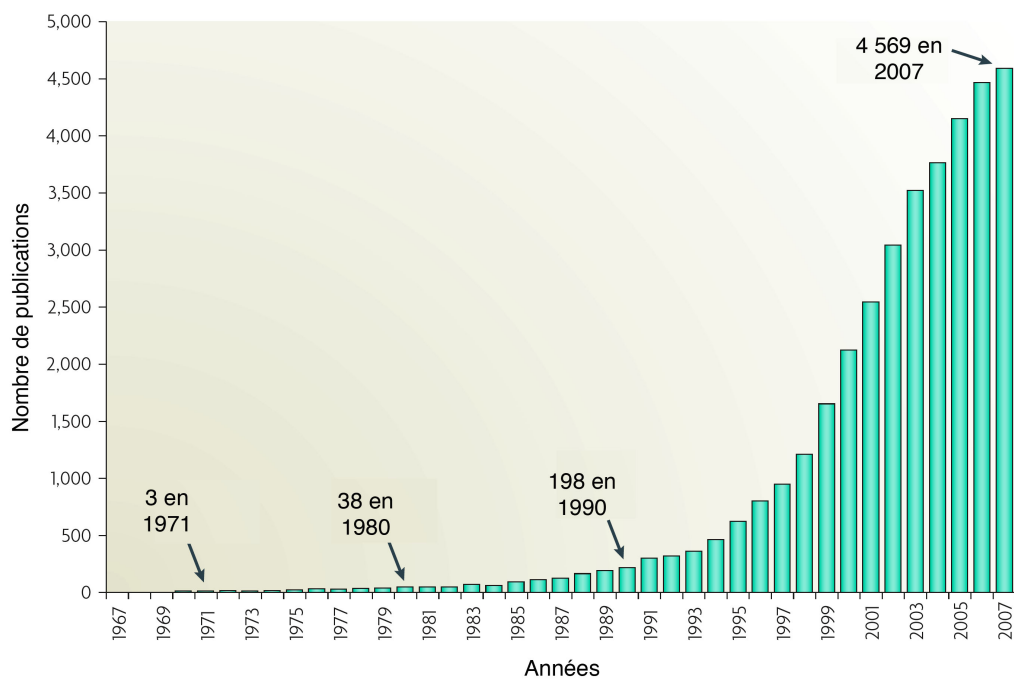
Des avancées cliniques importantes ont été réalisées récemment grâce à une meilleure compréhension de la régulation de l'angiogenèse. Depuis 1971, l'intérêt des laboratoires pour l'angiogenèse n'a cessé d'augmenter. On peut d'ailleurs observer que le nombre de publication sur l'angiogenèse a énormément augmenté ces 20 dernières années, de 198 en 1990 jusqu'à 4569 en 2007 (Figure 8) (pour revue Zetter, 2008). De plus, des efforts intenses ont été entrepris afin de développer des stratégies thérapeutiques pour promouvoir la revascularisation de tissus ischémiques ou pour inhiber l'angiogenèse dans les maladies cancéreuses, oculaires ou de la peau (Carmeliet, 2005). La dégénérescence maculaire liée à l'âge est notamment traitée par un aptamère du VEGF, le Macugène, qui a été approuvé par la FDA en décembre 2004. Cette molécule bloque le VEGF quand elle est injectée dans l'humeur vitrée et prévient la progression de la maladie (Folkman, 2006).

De plus, il a été suggéré que des biomarqueurs de l'angiogenèse faciliteraient le développement de thérapie antiangiogénique et le diagnostic clinique. Actuellement, il n'existe pas de biomarqueurs angiogéniques ou antiangiogéniques validés pour une utilisation clinique. Ainsi, la recherche de biomarqueurs validés dans des thérapies antiangiogéniques est le nouveau défi de la recherche anticancéreuse (pour revue (Bertolini et al., 2007; Sessa et al., 2008).

Les inhibiteurs de l'angiogenèse peuvent être classés en deux catégories. D'une part, les inhibiteurs directs qui inhibent la prolifération des cellules endothéliales, leur migration et leur différenciation (La plupart des essais cliniques antiangiogènes sont réalisés avec des inhibiteurs directs). D'autre part, les inhibiteurs



**Figure 7: Architecture du réseau vasculaire normal (images de gauche) et du réseau vasculaire tumoral anormal et chaotique (image de droite) ( adapté de Jain, 2003).**



**Figure 8: Publication sur l'angiogénèse.**

Graphique représentatif de l'augmentation du nombre de publication sur l'angiogénèse depuis 1971. 33349 papiers sont parus depuis 1971 (adapté de Zetter, 2008).

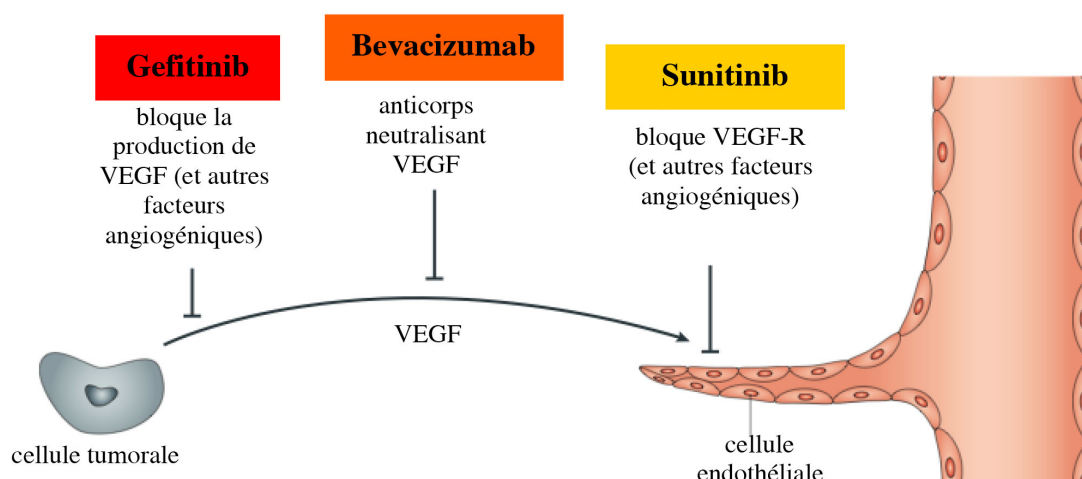
indirects qui interfèrent avec des ligands angiogènes, leurs récepteurs ou leur voie de signalisation (Cao, 2004).

### **1) L'angiogenèse tumorale comme cible thérapeutique**

La stratégie thérapeutique antiangiogénique dans le traitement des cancers offre de nombreux avantages par rapport aux thérapies ciblant directement les cellules tumorales. Les vaisseaux sanguins tumoraux sont une cible attractive pour la thérapie car, chez l'adulte sain, les cellules endothéliales sont en majorité quiescentes. Un traitement antiangiogénique ciblant principalement les cellules endothéliales du stroma tumoral, donc en prolifération, ne devrait avoir que peu d'effets toxiques sur le reste de l'organisme. De plus, un seul vaisseau peut supporter la survie de beaucoup de cellules tumorales et procurer également une route principale pour la dissémination des métastases. Le traitement antiangiogénique possède un champ d'application vaste car la plupart des tumeurs solides sont dépendantes de l'angiogenèse pour leur survie. Ensuite, contrairement aux cellules tumorales qui sont sujettes aux mutations spontanées, les cellules endothéliales sont génétiquement stables, réduisant les risques de résistance par adaptation génétique au traitement antiangiogénique (Hanahan and Weinberg, 2008). Enfin, les cellules endothéliales sont facilement accessibles car elles sont en contact direct avec la circulation sanguine (Feron, 2004).

Actuellement, de nombreux inhibiteurs de l'angiogenèse sont en essais cliniques, comme le Neri, un anticorps qui cible le domaine EDB de la fibronectine (VTA (Vascular Targeting Agents)), et le Combrestatin A4, une drogue qui inhibe la polymérisation de la tubuline (VDA (Vascular Disruptive Agent)). Une vue d'ensemble de ces essais est reprise sur le site internet [www.cancer.gov/clinicaltrials/developments/anti-angio-table](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/developments/anti-angio-table).

Parmi les angiogènes cibles des traitements antitumoraux, la famille du VEGF prédomine car la plupart des tumeurs, si ce n'est pas toutes, expriment des niveaux élevés de VEGF (Cao, 2004). Trois classes d'inhibiteurs du VEGF et de sa voie de signalisation sont employées en clinique (Figure 9, Table 2) (Duda et al., 2007). La première classe, dont fait partie le Gefitinib, bloque la production du VEGF par les cellules (Folkman, 2007). La seconde classe de molécules est celle des anticorps



**Figure 9: Différentes étapes où l'activité biologique de VEGF peut être bloquée.**

La première classe de molécules bloque la production du VEGF, la seconde neutralise le VEGF circulant et enfin la dernière bloque la voie de signalisation du VEGF en agissant directement sur le récepteur (adapté de Folkman, 2007).

|                                          | Type de cancer     | Ligne de réaction     | Résultats préliminaires obtenus | Changement avec l'addition d'une thérapie anti-VEGF (%) | Changement en survie (mois) |
|------------------------------------------|--------------------|-----------------------|---------------------------------|---------------------------------------------------------|-----------------------------|
| <b>Combinaisons des essais cliniques</b> |                    |                       |                                 |                                                         |                             |
| Capecitabine+/-BEV                       | mBreast cancer     | Réfractaire           | Non                             | 10                                                      | 0,7                         |
| Paclitaxel+/-BEV                         | mBreast cancer     | 1 <sup>er</sup> ligne | Oui                             | 22                                                      | 5,9                         |
| Docetaxel+/-BEV                          | mBreast cancer     | 1 <sup>er</sup> ligne | Oui                             | 11                                                      | 0,7-0,8                     |
| Carboplatine + Paclitaxel+/-BEV          | NSCLC              | 1 <sup>er</sup> ligne | Oui                             | 15                                                      | 1,9                         |
| Gemcitabine = cisplatine+/-BEV           | NSCLC              | 1 <sup>er</sup> ligne | Oui                             | 10-14                                                   | 0,4-0,5                     |
| 5-fluorouracil + leucovorin+/-SUS5416    | mCRC               | 1 <sup>er</sup> ligne | Non                             | Non rapporté                                            | Non rapporté                |
| IFL+/-BEV                                | mCRC               | 1 <sup>er</sup> ligne | Oui                             | 10                                                      | 4,4                         |
| FOLFOX+/-PTK787/ZK222584                 | mCRC               | 1 <sup>er</sup> ligne | Non                             | -4                                                      | 0,2                         |
| XELOX + FOLFOX +/-BEV                    | mCRC               | 1 <sup>er</sup> ligne | Oui                             | 8                                                       | 1,4                         |
| FOLFOX+/-BEV                             | mCRC               | Réfractaire           | Oui                             | 14                                                      | 2,6                         |
| FOLFOX+/-PTK787/ZK222584                 | mCRC               | Réfractaire           | Non                             | 1                                                       | 1,5                         |
| Gemcitabine+/-BEV                        | Cancer du pancréas | 1 <sup>er</sup> ligne | Non                             | 1                                                       | 0                           |
| Interferon+/-BEV                         | RCC                | 1 <sup>er</sup> ligne | Oui                             | 18                                                      | 4,8                         |
| <b>Un seul agent thérapeutique</b>       |                    |                       |                                 |                                                         |                             |
| Sorafenid versus placebo                 | RCC                | Réfractaire           | Oui                             | 8                                                       | 2,7                         |
| Sunitinib versus interféron              | RCC                | 1 <sup>er</sup> ligne | Oui                             | 31                                                      | 5,9                         |
| Sorafenid versus placebo                 | HCC                | 1 <sup>er</sup> ligne | Oui                             | 2                                                       | 3,0                         |
| Sunitinib versus interféron              | HCC                | 1 <sup>er</sup> ligne | oui                             | 2                                                       | 1,4                         |

**Table 2: Drogues utilisées en thérapie anti-VEGF en phase III d'essai clinique (adapté de Ellis and Hicklin, 2008).** BEV: bevacizumab, CRC: cancer colorectal, FOLFOX: « acide folinic (leucovorin) fluorouracile oxaliplatine », HCC: carcinome hépatocellulaire, IFL: « irinotecan fluorouracile et leucovorin », m: métastatique, NSCLC: cancer des poumons a non petites cellules, RCC: cancer des cellules rénales, XELOX: « capecitabine (Xeloda) et oxaliplatine ».

anti-VEGF, comme le Bevacizumab (Ellis, 2005). Il est utilisé en même temps que les chimiothérapies pour le cancer colorectal ou celui du poumon. Viennent ensuite les inhibiteurs des tyrosines kinases : le Sorafenib (Escudier et al., 2007) et le Sunitinib (Motzer et al., 2006) qui ciblent les récepteurs du VEGF. Ils sont employés pour le traitement des carcinomes rénaux. Enfin, d'autres molécules comme le Cediranib (Dreys et al., 2007; Wedge et al., 2005), le Vandetanib (Sathornsumetee and Rich, 2006) ou le Vatalanib (Roboz et al., 2006) sont en cours de validation (Jain et al., 2006).

La validation clinique de la thérapie antiangiogénique antitumorale a été acquise. Ainsi, en février 2004, la FDA (*US Food and Drug Administration*) a approuvé aux Etats-Unis l'utilisation du Bevacizumab (ou Avastin) pour le traitement du cancer colorectal métastatique en combinaison avec une chimiothérapie basée sur le 5-fluorouracil. L'Avastin est aussi étudié dans de nombreux essais cliniques chez des patients atteints d'autres types de cancers et est administré en combinaison avec le Tarceva, une molécule qui cible la voie de signalisation du récepteur du facteur de croissance épidermique humain (EGFR). En plus du cancer colorectal, la thérapie antiangiogénique augmenterait la survie des patients atteints du cancer du poumon et du sein. Depuis l'Avastin, d'autres inhibiteurs de l'angiogenèse ont été approuvés par la FDA aux Etats-Unis et dans 28 autres pays (Table 3) (Folkman, 2006).

## **2) Les perspectives thérapeutiques**

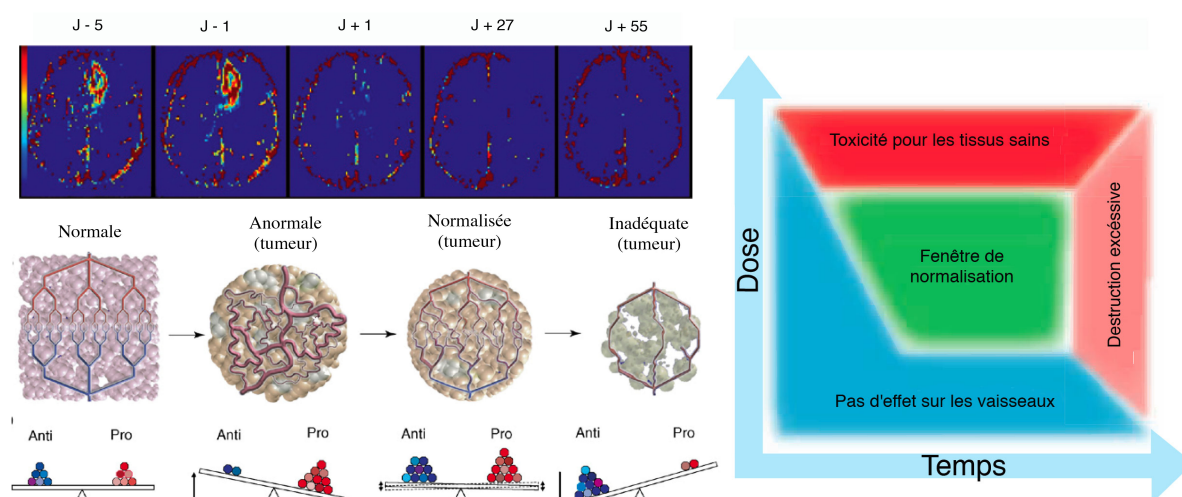
La thérapie antiangiogénique, à elle seule, ne permet pas d'éradiquer complètement les tumeurs mais est un complément potentialisant les thérapeutiques cytotoxiques (chimiothérapie ou radiothérapie). Ainsi, de multiples études précliniques ont montré que la coadministration d'agents antiangiogènes avec des agents cytotoxiques conventionnels ou une radiothérapie augmentait considérablement l'effet antitumoral global.

### **L'hypothèse de la « normalisation vasculaire » :**

L'équilibre entre facteurs pro et anti-angiogéniques maintient la vascularisation dans un état normal (vaisseaux matures) (Figure 10). Lorsque cette balance penche

| Date           | Drogue      | Lieu             | Maladie                  |
|----------------|-------------|------------------|--------------------------|
| Décembre 2003  | Thalidomide | Australie        | Myélome multiple         |
| Février 2004   | Avastine    | Etats-Unis       | Cancer colorectal        |
| Novembre 2004  | Tarceva     | Etats-Unis       | Cancer du poumon         |
| Décembre 2004  | Avastine    | Suisse           | Cancer colorectal        |
| Décembre 2004  | Macugène    | Etats-Unis       | Dégénérescence maculaire |
| Janvier 2005   | Avastine    | Union Européenne | Cancer colorectal        |
| Septembre 2005 | Endostatine | Chine            | Cancer du poumon         |

**Table 3: Drogues antiangiogéniques approuvées pour l'utilisation clinique aux Etats-Unis et dans 28 autres pays** (adapté de Folkman, 2006).



**Figure 10: Normalisation de la vascularisation tumorale au cours d'un traitement anti-angiogénique.**

a) IRM de patient atteint de glioglastome recevant un traitement anti-VEGFR. On peut observer une rapide diminution de la perméabilité vasculaire. L'évolution de la vascularisation tumorale au cours du traitement est représentée en dessous. b) Représentation schématique de l'effet d'un traitement antiangiogénique en fonction du temps et de la dose délivrée. Une fenêtre de normalisation est proposée pour un traitement combiné avec des drogues cytotoxiques optimum (adapté de Ellis and Hicklin, 2008; Duda et al., 2007).

en faveur des facteurs pro-angiogéniques alors la vascularisation devient anormale avec de larges vaisseaux immatures dont la perméabilité, le diamètre, la longueur et la densité sont augmentés. Cela entraîne des changements de pression interstitielle et compromet l'apport de nutriments ainsi que d'agents thérapeutiques. L'apport de molécules antiangiogéniques, contrebalançant les facteurs pro-angiogéniques produits par la tumeur, permet de normaliser la vascularisation de la tumeur et donc d'augmenter l'apport des nutriments et composés cytotoxiques. Ainsi des observations cliniques montrent qu'une chimiothérapie couplée à l'anticorps anti-VEGF, le Bevacizumab (Avastin), permet d'accroître les effets du traitement cytotoxique. Cet anticorps permet de diminuer la perméabilité vasculaire et de réduire la pression des fluides interstitiels de la tumeur (Willett et al., 2005). De plus, cela suggère que les anti-VEGF inhibent le recrutement des précurseurs endothéliaux au niveau de la tumeur et normalisent sa vascularisation, permettant ainsi une meilleure entrée des produits cytotoxiques dans la tumeur (Duda et al., 2007; Jain, 2005). Enfin, si les molécules anti-angiogéniques sont plus nombreuses que les pro-angiogéniques alors la vascularisation de la tumeur devient aussi anormale, la densité vasculaire diminue.

Par ailleurs, Browder et ses collaborateurs ont montré qu'une chimiothérapie délivrée à faible dose et à intervalle de temps régulier et rapproché (appelée chimiothérapie métronomique) endommage préférentiellement les cellules endothéliales dans les vaisseaux tumoraux (Browder et al., 2000). L'efficacité de la chimiothérapie métronomique peut-être augmentée quand elle est administrée en combinaison avec des drogues antiangiogènes telles que des anticorps dirigés contre le VEGF ou le VEGFR-2 (Kerbel and Kamen, 2004). Des essais cliniques testant ces combinaisons sont en cours.

L'acquisition d'une résistance aux traitements antiangiogéniques est un événement de moindre fréquence mais existant. Ainsi, certaines tumeurs humaines deviennent résistantes aux antagonistes d'un seul angiogène car durant le développement tumoral, les cellules cancéreuses produisent d'autres facteurs antiangiogéniques. Par exemple, au début de la maladie, 50% des cancers du sein produisent seulement du VEGF mais durant la progression tumorale ils produisent d'autres facteurs comme le FGF2, le TGF- $\beta$ , le PlGF,... (Cao, 2004). Une thérapie antiangiogénique qui combine différents inhibiteurs ciblant différentes voies

angiogéniques semble donc être une approche indispensable pour espérer une efficacité optimale. Ces approches incluent l'Avastin et le Tarceva ou l'Avastin combinée avec une chimiothérapie antiangiogène.

Récemment, une autre classe d'inhibiteurs de l'angiogenèse comprenant le Sugen11248, permet d'inhiber plusieurs facteurs angiogéniques. Celui-ci peut interagir avec trois angiogènes (VEGF, FGF2 et TGF- $\alpha$ ) et les essais sont en phase clinique (Folkman, 2006). L'action potentielle de médicaments antiangiogéniques pourrait également s'exercer comme thérapie préventive chez des patients ayant des risques élevés de développer un cancer ou une récurrence de cancer. Une étude expérimentale portant sur le cancer du sein induit spontanément chez le rat, a révélé que l'Endostatine pouvait prévenir la formation du cancer du sein et prolonger la survie des animaux traités. Un essai clinique mené dans le but de prévenir une récurrence est en cours chez des patients en rémission d'un cancer rectal. Dans cet essai, la thalidomide est administrée après une complète résection chirurgicale de la tumeur (Kerbel and Folkman, 2002).

Par ailleurs, certaines petites drogues administrées oralement peuvent induire une élévation du niveau d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse dans le sérum, mimant ainsi l'administration en continu de l'inhibiteur. Par exemple, le celecoxib peut augmenter le niveau d'endostatine dans le sérum ou la doxycycline et le rosiglitazone peuvent augmenter l'expression de TSP-1 (Folkman, 2004). Ces résultats suggèrent la possibilité d'un nouveau champ d'action par certains produits pharmaceutiques.

À côté des agents antiangiogéniques qui affectent directement les cellules endothéliales, il existe des stratégies qui ont pour but d'interférer avec certaines cellules non endothéliales (cellules stromales et murales, cellules hématopoïétiques et cellules tumorales) impliquées dans l'angiogenèse tumorale. Ainsi, le ciblage des vaisseaux tumoraux établis représente une thérapie alternative, probablement complémentaire à la thérapie antiangiogénique. Des agents anti-vasculaires (toxine, cytokine, etc.) sont délivrés spécifiquement aux vaisseaux tumoraux grâce à des molécules (anticorps, peptides, aptamères) qui lient des marqueurs vasculaires spécifiquement exprimés sur les vaisseaux sanguins tumoraux. Ces agents anti-

vasculaires induisent une hémorragie ou la formation de thrombus au sein de la tumeur entraînant une réduction de la perfusion de la tumeur et ensuite une nécrose (Neri and Bicknell, 2005; Tozer et al., 2005). **Il est donc très important de caractériser et développer de nouveaux biomarqueurs antiangiogéniques** (pour revue Bertolini et al., 2007; Sessa et al., 2008).

### **3) Utilisation de biomarqueurs pour le développement de thérapies antiangiogéniques en oncologie**

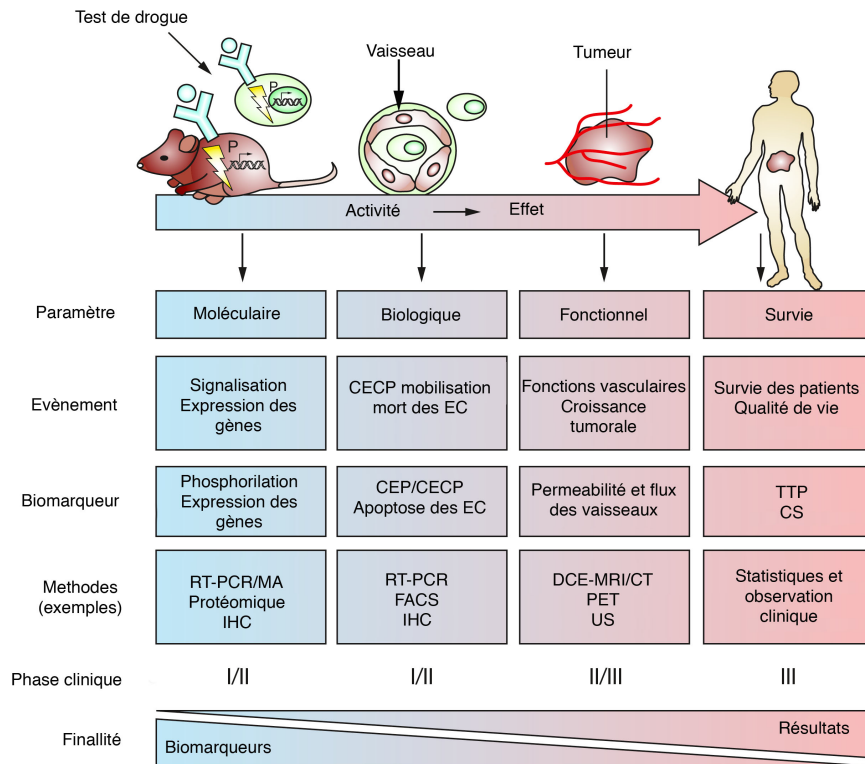
La quantification de l'angiogenèse tumorale et la mesure des activités antiangiogéniques des drogues chez les patients traités sont encore non résolues. Pour l'instant, aucune approche expérimentale n'a été validée pour une utilisation clinique courante. Il n'est pas clair qu'il existe un biomarqueur spécifique de l'angiogenèse. La complexité intrinsèque de l'angiogenèse tumorale et les mécanismes d'adaptation de l'angiogenèse pendant la thérapie, suggèrent qu'il est nécessaire d'utiliser plusieurs biomarqueurs. Cette approche de la recherche anticancéreuse est difficile. Elle nécessite la validation de multiples marqueurs différents selon la tumeur d'intérêt, son étape de développement, la drogue expérimentée, la question posée et l'étape du développement clinique (phase I/II/III) (Figure 11). On peut distinguer trois genres de biomarqueurs :

#### **i) Biomarqueurs moléculaires**

Ces marqueurs se composent de molécules comme les facteurs de croissance (par exemple VEGF, FGF), les récepteurs membranaires (par exemple VEGFR2, les intégrines), les molécules de signalisation (par exemple ERK, Akt) et leurs modifications (par exemple activation, phosphorylation), ou la transcription de gènes et de leurs modifications (Table 4). Les biomarqueurs moléculaires sont indicatifs des événements moléculaires liés à l'angiogenèse ou à l'activité de drogue.

#### **ii) Biomarqueurs biologiques**

Ils nous apportent les premières informations sur les événements moléculaires de l'angiogenèse (Table 4). Les cellules associées à l'angiogenèse (par exemple les cellules endothéliales circulantes et progéniteurs endothéliaux circulants) peuvent refléter des changements et servir de biomarqueurs facilement accessibles. Les



**Figure 11: Rationnel de l'utilisation de biomarqueurs dans le développement de thérapie antiangiogénique.** EC: cellule endothéliale, CEC: cellule endothéliale circulante, CEP: cellule endothéliale précurseur circulante, CT: « computer tomography », DCE-MRI: « dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging », IHC: immunohistochimie, OS: « overall survival », PET: « positron emission tomography », TTP: temps de progression, US: ultrason (adapté de Sessa et al., 2008).

| Biomarqueurs                                                          | Technique pour quantifier l'angiogenèse                                | Exemples                                                                    | Commentaires                                                                                   |
|-----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Moléculaire</b>                                                    |                                                                        |                                                                             |                                                                                                |
| Facteurs angiogéniques circulants                                     | ELISA, WB, protéomique, Luminex Multiplex ou la technologie FACS array | VEGF, FGF2, MMP-9, IL-8, HGF                                                | Valeur de pronostique dans plusieurs cancers                                                   |
| Molécules dérivées des EC                                             | ELISA, WB, protéomique, antibodies arrays                              | sVEGFR1, sVEGFR2, sVEGFR3, sTie2, VCAM1                                     | Limité à la connaissance des molécules                                                         |
| Protéines ou peptides circulants                                      | ELISA, WB, protéomique, antibodies arrays                              | Endostatine, Tumstatine                                                     | Approche prometteuse pour identifier de nouvelles molécules dans le sérum ou au sein de tumeur |
| Signalisation                                                         | Immunofluorescence, immunohistochimie                                  | P-Erk, P-Akt                                                                | Faisabilité limitée en essai clinique                                                          |
| <b>Biologique</b>                                                     |                                                                        |                                                                             |                                                                                                |
| Densité microvasculaire Prolifération/mort des cellules endothéliales | Immunofluorescence, immunohistochimie                                  | CD31+, CD34+, VEGFR2+, CD105+ Vaisseaux avec CD31/Ki67 Tunel/CD31           | Valeur de pronostique dans plusieurs cancers Faisabilité limitée en essai clinique             |
| CEC ou CEP                                                            | Cytométrie en flux, la technologie Veridex                             | EC :CD45+, CD31+, CD146+, CD144+, VEGFR2+ ECP :CD133 CD34+, CD144+, VEGFR2+ | Approche prometteuse mais protocoles non-standardisés                                          |

**Table 4: Biomarqueurs et technique de détection de l'angiogenèse en étude clinique et préclinique** (adapté d'après Sessa et al., 2008). CEC: cellules endothéliale circulante, CEP: cellule endothéliale précurseur circulante, EC: cellule endothéliale, WB: western blotting.

biomarqueurs moléculaires et cellulaires sont importants pour les études cliniques de phase I/II, là où l'objectif est la démonstration de l'activité de drogue.

### iii) Biomarqueurs fonctionnels

Des modifications de la perfusion des tumeurs sont susceptibles de refléter des changements cruciaux de la vascularisation des tumeurs. Cependant, l'utilisation de ces marqueurs fonctionnels reste limitée. Une interprétation pertinente des données est difficile puisque les changements peuvent être seulement passagers, ou peuvent se produire en décalage avec l'administration de la drogue, ou peuvent être des effets indirects de la drogue (par exemple des inhibiteurs des tyrosine-kinase visent simultanément la tumeur et les cellules stromales). La mesure des paramètres de perfusion (rBV, MTT, RBF, Ktrans), par des techniques d'imagerie, est plus utile à des stades tardifs du développement d'une drogue (phase III). En outre, ces techniques d'imagerie peuvent être employées pour surveiller le développement des tumeurs traitées.

Les avancées des travaux cliniques (par exemple la progression de la survie des patients) sont utilisées pour valider l'impact de la drogue sur la progression de la maladie et sur la survie des malades. Les données produites par les biomarqueurs doivent être comparées entre elles et aux données disponibles des études pré-clinique. Par exemple, les agents antivasculaires qui inhibent la vascularisation des tumeurs provoquent aussi une mobilisation des progéniteurs endothéliaux de la moelle par les tumeurs qui ont survécu à la thérapie, contribuant ainsi à leur croissance. Cette étude suggère qu'une combinaison des drogues antivasculaires et antiangiogéniques permettra une meilleure réponse thérapeutique.



## **Partie II. Les ProteoGlycannes (PGs)**



Les protéoglycannes (PGs) sont des macromolécules hydrophiles majoritairement situées à la surface des cellules, dans les matrices extracellulaires, et ils peuvent être dans certains cas intracellulaires voire circulants. **Ils sont constitués d'un "noyau " (core) protéique sur lequel sont greffés un ou plusieurs polysaccharides, principalement des glycosaminoglycannes (GAGs).** Le noyau protéique joue un rôle principalement dans la localisation, alors que les glycosaminoglycannes modulent les interactions avec diverses protéines. Les protéines qui interagissent avec les GAGs comportent des domaines riches en acides aminés basiques, comme c'est le cas pour les chimiokines. La gamme de partenaires protéiques avec lesquels les GAGs sont amenés à interagir est si large (facteurs de croissance, cytokines, chimiokines, enzymes et autres protéines de la matrice extracellulaire) que les PGs sont impliqués dans de nombreux processus essentiels tels que la prolifération, le remodelage des matrices extracellulaires, la migration, l'angiogenèse, etc. Beaucoup de ces processus se trouvent être déréglés lors de maladies et notamment au cours du développement tumoral ((Delehedde et al., 2002b; Iozzo et al., 2001; Iozzo and Cohen, 1993; Sanderson et al., 2004; Santiard-Baron et al., 2005; Sarrazin et al., 2006; Teruya-Feldstein et al., 1997).

## **1 - Structure des protéoglycannes**

### **1) Les familles de glycosaminoglycannes (GAGs)**

Les GlycosAminoGlycannes (GAGs) sont de longs polysaccharides non-ramifiés, constitués par polymérisation d'unités répétitives de disaccharides. Les disaccharides qui constituent les chaînes de GAGs, peuvent être plus ou moins sulfatés, et sont composés d'une manière générale (exception faite pour les kératanes sulfates) d'un acide hexuronique (soit un acide glucuronique (GlcA) ou un acide iduronique (IdoA)) et d'une hexosamine (soit une glucosamine (GlcN) ou une galactosamine (GalN)).

Une des caractéristiques de ces chaînes oligosaccharides est leur importante hétérogénéité. En effet, la longueur des chaînes de GAGs pouvant être très variable, et les modifications structurales nombreuses (sulfatations, épimérisations), le nombre de combinaisons de structures possibles pour une chaîne oligosaccharidique

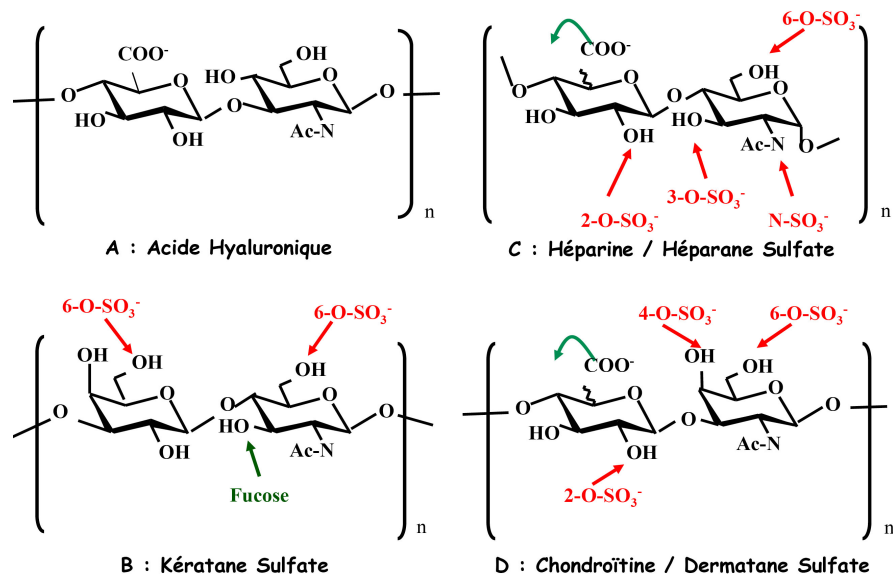


Figure 12: Motifs disaccharidiques des différents GAGs et leurs modifications.

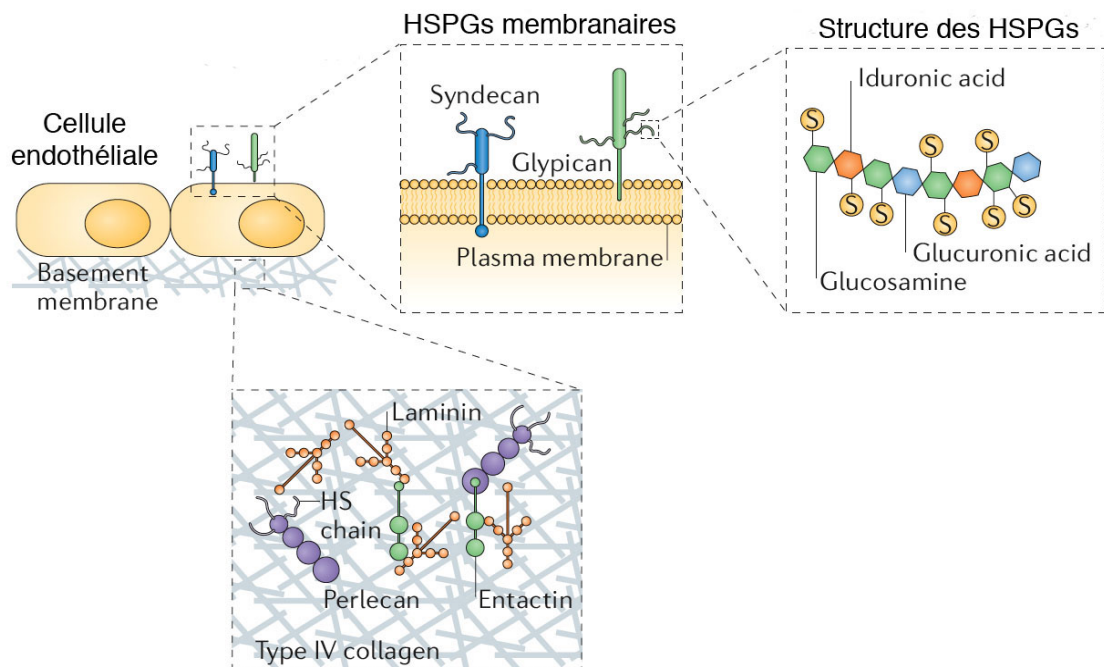


Figure 13: Structure et localisation des HSPGs au sein des vaisseaux sanguins.

Dans les vaisseaux, les héparanes sulfates (HS) sont exprimés sur les membranes des cellules endothéliales fixés à des protéoglycans (HSPGs). On les retrouve aussi au niveau de la membrane basale et de la matrice extracellulaire. Les héparanes sulfates sont des polysaccharides linéaires constitués de résidus d'N-acetylglucosamines et d'acides glucuroniques qui peuvent être N- et O-sulfatés (adapté d'après Parish, 2006).

apparaît infini.

Selon la nature des oses et la façon dont les disaccharides sont reliés entre eux, les GAGs peuvent être classés en différentes familles que nous allons détailler (Figure 12).

a) L'acide hyaluronique (AH)

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane largement réparti dans les tissus conjonctifs, épithéliaux et nerveux. Il constitue également l'un des principaux composants de la matrice extracellulaire. Il a la particularité de n'être jamais relié à un corps protéique (il ne forme donc pas de protéoglycane en tant que tel), de n'être jamais sulfaté, et d'être parfois présent dans certaines bactéries (Fraser et al., 1997). L'AH est souvent défini comme un GAG qui permet le maintien de l'hydratation de la matrice extracellulaire cutanée.

b) Les kératanes sulfates (KS)

Les kératanes sulfates (KS) ont été identifiés pour la première fois en 1939 (Suzuki, 1968) dans des extraits de cornée, mais réellement caractérisés bien plus tard (Meyer et al., 1953). Chaque unité disaccharidique de KS est constituée d'un galactose (à la place d'un acide hexuronique) et d'un glucose N-acétylé. Ces disaccharides ( $3\text{Gal}\beta 1-4\text{GlcNac}\beta 1$ ) peuvent être sulfatés en C6 sur les deux oses.

c) L'héparine et les héparanes sulfates (Hp et HS)

L'héparine a en fait été découverte en 1916 par Mc Lean qui, lors d'une expérience inattendue, a pu mettre en évidence l'effet anti-coagulant de ce polysaccharide (Mc, 1959).

L'héparine (Hp) ou les héparanes sulfates (HS) sont des GAGs dont les unités disaccharidiques sont composées d'un acide hexuronique et d'une glucosamine N-acétylée. La glucosamine peut être soit N-acétylée (GlcNAc), soit N-sulfatée (GlcNS). Une 6-O-sulfatation (GlcNAc(6S) ou GlcNS(6S)) et même une 3-O-sulfatation sur les

GlcNS (GlcNS(3S) ou GlcNS(3,6S)) peuvent également avoir lieu. Au cours de la synthèse sur laquelle nous reviendrons, l'acide glucuronique (GluA) peut être épimérisé en C5 pour donner l'acide iduronique (IdoA). Les deux formes épimérisées peuvent également subir ensuite une 2-O-sulfatation : IdoA(2S) et GlcA(2S). Il est rare, mais possible de trouver la glucosamine sous forme non glycosylée (GlcNH<sub>2</sub>) (Rabenstein, 2002).

Toutes ces modifications génèrent, le long d'une chaîne oligosaccharidique de ce type, une hétérogénéité et donc une variabilité de structure quasiment infinie. En effet, 48 disaccharides différents sont théoriquement possibles, et c'est leur combinaison qui va engendrer cette diversité structurale. L'héparine est le GAG le plus sulfaté.

Originellement identifiés comme étant des impuretés d'héparines (appelées heparitin sulfate) (Linker et al., 1958), les héparanes sulfates (HS) comportent en fait bien plus de variabilités dans leur composition et organisation structurale que l'Hp. En effet, les HS se composent de régions dites de type héparine et de régions bien moins sulfatées (Esko and Lindahl, 2001; Gallagher, 2001; Lindahl et al., 1998).

L'héparine et les héparanes sulfates n'ont pas le même lieu de synthèse et n'ont pas les mêmes fonctions. L'héparine est uniquement exprimée par les mastocytes situés dans les tissus conjonctifs. Elle est synthétisée sous forme de protéoglycane (PM : 750000 à 1000000 kDa) dont le core protéique est la serglycine. Plusieurs chaînes d'Hp (PM : 60000 à 100000 kDa) sont liées à ce core protéique. Une fois cette synthèse terminée, les chaînes d'Hp sont clivées aléatoirement pour donner des fragments d'Hp plus petits (PM : 5000 à 25000 kDa) qui vont être stockés dans des granules de sécrétion du cytoplasme des mastocytes. Les héparanes sulfates, quant à eux, sont exprimés par la plupart, voire toutes les cellules. Ils se trouvent rarement sous forme libre mais en liaison avec divers cores protéiques pour former les protéoglycannes à héparanes sulfates (HSPGs). Ces HSPGs se trouvent soit dans les matrices extracellulaires, soit à la surface des cellules (Figure 13) (Rabenstein, 2002).

#### d) Les chondroïtines sulfates (CS)

Le chondroïtine sulfate (CS) ou sulfate de chondroïtine, est un GAG que l'on

retrouve principalement dans les tissus conjonctifs. Comme les autres GAGs, il peut subir des modifications en fonction des cellules qui le synthétisent, de leur état d'activation ou du contexte physiologique (normal ou pathologique). Ainsi, sur des chaînes entières, la N-acétyl- galactosamine peut être sulfatée en position C4 pour donner le chondroïtine sulfate de type A (**CS A**) ou en position C6 pour donner la **CS C**.

#### e) Le dermatane sulfate (DS)

Les dermatanes sulfates (DS) sont souvent classés comme étant une sous-classe des chondroïtines sulfates. On peut d'ailleurs les trouver sous le nom de **CS B**. En fait, on pourrait définir un DS comme une chaîne de CS qui comporte au minimum un acide iduronique issu de l'épimérisation en C5 d'un acide glucuronique d'un CS.

Ainsi, l'information structurale que peut contenir une chaîne de DS est plus diversifiée que celle d'un CS puisque l'acide glucuronique peut être épimérisé pour donner l'acide iduronique. Ce dernier peut alors être 2-O-sulfaté (la réaction d'épimérisation ayant préférentiellement lieu lorsque la galactosamine est 4-O-sulfatée).

L'épimérisation de l'acide uronique qui distingue les CS (A ou C) des DS n'est pas une modification anodine. En effet, la caractérisation d'interaction protéines-GAGs a permis de démontrer que cette épimérisation pouvait apporter une certaine spécificité aux DS. Les DS, par exemple, vont interagir avec l'héparine cofacteur II alors que les CS ne le peuvent pas (Mascellani et al., 1993). Il en est de même pour les interactions avec un facteur de croissance tel que le HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor / Scatter Factor) (Lyon et al., 1998). Plus spécifiquement encore, seuls les DS parmi les GAGs sont capables d'activer le NF-kb et d'induire l'expression d'ICAM-1 circulant et endothélial (Penc et al., 1999).

## 2) Biosynthèse des chaînes glycosaminoglycannes

La biosynthèse de la chaîne GAG se déroule essentiellement dans l'appareil de Golgi (Silbert and Freilich, 1980; Sugumaran and Silbert, 1991). Elle implique l'action

|                                  | Nom                    | Type de GAG             |
|----------------------------------|------------------------|-------------------------|
| PG membranaires                  | Syndécans              | Principalement HS et CS |
|                                  | Glypicans              | Principalement HS       |
|                                  | Bétaglycan             | Principalement HS       |
|                                  | Les isoformes de CD44  | HS ou CS                |
| PG de la matrice extracellulaire | Collagènes XVIII et XV |                         |
|                                  | Agrine                 |                         |
|                                  | Bamacan                |                         |
|                                  | Famille du Perlecan    |                         |
|                                  | Versican               | Principalement CS       |
|                                  | Aggrécan               | CS et KS                |
|                                  | Neurocan               | CS                      |
|                                  | Brévican               | CS                      |
|                                  | Perlécane              | Principalement HS       |
|                                  | Decorine               | DS                      |
|                                  | Biglycan               | DS ou KS                |
|                                  | Lumican                | KS                      |
|                                  | Fibromoduline          | KS                      |
|                                  | Serglycine             | HS ou CS                |
| PG intracellulaires              | Bikunine               | CS                      |
| PG circulants                    | PG100 ou MCSF1         | Unique chaîne de CS     |
|                                  | ApoO                   | CS                      |
|                                  | Endocan                | Unique chaîne de CS     |

**Table 5: Classification et localisation des principaux types de Protéoglycannes.**

ordonnée et concertée d'un grand nombre d'enzymes telles que des glycosyltransférases, épimérases et sulfotransférases (Silbert et al., 1997). La biosynthèse des chaînes héparanes sulfates est la plus détaillée dans la littérature.

La première étape dans la voie de biosynthèse est l'attachement au core protéique de la séquence saccharidique :  $\beta$ -GlcA(1-3)- $\beta$ -GlcA(1-3)- $\beta$ -GlcA(1-4)- $\beta$ -Xyl-1-Ser/Thr. Le xylose est lié de façon covalente au groupement hydroxyl d'un résidu de sérine ou de thréonine de la protéine (Esko and Lindahl, 2001; Lyon et al., 2000; Sugahara and Kitagawa, 2000). Des unités disaccharidiques constituées d'acide glucuronique et de N-acétylglucosamine sont ensuite polymérisées de façon séquentielle sur ce tétrasaccharide pour aboutir ainsi à la formation d'un polymère linéaire N-acétylé (Esko and Lindahl, 2001).

Ce polymère (acide glucuronique  $\beta$ -1-4-N-acétylglucosamine) est ensuite modifié par une série de réactions enzymatiques, initiée par une N-déacétylase/N-sulfotransférase qui agit sur les résidus N-acétylglucosamine (Habuchi, 2000; Lyon et al., 2000; Pikas et al., 2000; Ringvall et al., 2000). Les glucosamines se retrouvent N-sulfatées, ce qui constitue un signal pour l'action des autres enzymes de biosynthèse, notamment les glucosaminyl (6 ou 3)-O-sulfotransférases. Toutes les enzymes impliquées dans le transfert de sulfates utilisent le 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate (PAPS) comme donneur de sulfate.

L'ensemble de ces modifications génère un grand nombre de structures différentes à l'intérieur même des chaînes héparanes sulfates. Par exemple, il existe 15 unités disaccharidiques possibles pour les chaînes héparanes sulfates et au moins  $10^{16}$  chaînes différentes de 100 unités dissaccharidiques (Delehedde et al 2001). Par ailleurs, la conséquence du regroupement des N- et O-sulfatations est la formation d'une chaîne polysaccharidique composée de domaines faiblement sulfatés séparés par des domaines NS, qui sont enrichis en groupements sulfates et en acides iduroniques (Gallagher, 2001; Lyon et al., 1998).

La variabilité structurale du polymère d'héparine/d'héparane sulfate est donc le résultat de modifications incomplètes par différentes enzymes de biosynthèse.

### **3) Les noyaux protéiques**

La partie protéique ou noyau protéique des protéoglycannes constitue la

structure de base sur laquelle sont ajoutés les GAGs. Comme pour la majorité des protéines, l'expression des cores protéiques est régulée en fonction des besoins des cellules ou de leur environnement. Ils permettent, grâce à leur composition polypeptidique, l'initiation de la synthèse de GAGs qui leur sont spécifiques. D'une manière générale, ils guident la localisation spatio-temporelle des PGs. Les PGs sont généralement classés en quatre grandes familles : les PGs intracellulaires, les PGs membranaires (ou péri-cellulaires), les PGs extracellulaires et, depuis peu, les PGs circulants (Table 5).

#### **4) Fonction des protéoglycannes**

Des approches utilisant l'héparine comme compétiteur, de l'héparinase I ou encore des traitements au sodium chlorate pour modifier les chaînes GAGs ont permis de définir un nombre important de ligands pour les HSPG (HBPs :Heparin Binding Proteins, comme des facteurs de croissance et des chimiokines), impliquant ainsi les HSPGs dans des processus biologiques très variés (Bernfield et al., 1999; Couchman et al., 2001; Rapraeger, 2000; Tumova et al., 2000; Woods and Couchman, 2000).

##### **a) Interaction GAG / protéine**

###### **i. Protection et stockage des HBPs**

Un rôle majeur des GAGs est la protection des facteurs extracellulaires de la dégradation par des protéases. Ces dernières sont très importantes au niveau des sites de néovascularisation, d'invasion cellulaire et d'inflammation. Le rôle protecteur des GAGs contre la protéolyse est commun à plusieurs facteurs de croissance. Par exemple, le FGF2 fixé à l'héparine ou aux héparanes sulfates est protégé de la protéolyse par la plasmine (Saksela, 1998).

Durant l'inflammation, l'héparine et les héparanes sulfates peuvent inactiver l'élastase relarguée par les neutrophiles (Flaumenhaft et al., 1990), protégeant ainsi l'IL-8 d'une dégradation rapide par les protéases relarguées (Cadene et al., 1995; Webb et al., 1993). De plus, les héparanes sulfates peuvent protéger les facteurs de croissance de la dénaturation thermique (Gospodarowicz and Cheng, 1986).

## ii. Régulation de la diffusion des HBPs

Les HSPGs exprimés à la surface cellulaire peuvent être coupés et relargués comme des HSPGs solubles. Ces derniers gardent les mêmes propriétés que leur précurseur cellulaire pour la fixation des facteurs de croissance, suggérant qu'ils puissent jouer un rôle important dans la régulation de leurs activités biologiques. Dans le cas du FGF2, les héparanes sulfates solubles peuvent agir comme des transporteurs et empêcher l'interaction du FGF2 avec les HSPGs membranaires, et par conséquent assurer la dissémination du facteur très loin du site de sécrétion (Flaumenhaft et al., 1990).

La séquestration des facteurs de croissance par les héparanes sulfates a été proposé comme un mécanisme prévenant leur diffusion. Elle crée une réserve locale des facteurs de croissance leur permettant d'agir sur un nombre restreint de cellules. Ce réservoir constitue un moyen de localiser et de limiter la diffusion des facteurs de croissance tels que le FGF2 (Colin et al., 1999; Flaumenhaft et al., 1990), le TGF $\beta$  (Lyon et al., 1997), le VEGF (Houck et al., 1992) et IL-8 (Webb et al., 1993). Par ailleurs, les GAGs de la matrice extracellulaire et de la membrane basale constituent un réservoir pour de nombreux facteurs extracellulaires qui peuvent être alors présentés aux cellules cibles (Gallagher and Turnbull, 1992). Par conséquent, un modèle a été proposé où les protéines « sauteraient » de chaînes GAGs en chaînes GAGs. Tout se passerait comme si les molécules effectrices ne quittaient jamais les GAGs.

Par ailleurs, la biodisponibilité de différents facteurs est associée à des changements dans l'environnement extracellulaire relatifs ou non à l'action d'endoglycosidases (par exemple les élastases et les MMPs) dégradant les héparanes sulfates ou à l'action des protéases clivant le core protéique des HSPGs. Ce processus existe dans des conditions physiologiques, mais est aussi fortement amplifié dans des conditions pathologiques impliquant un remodelage intense des tissus, comme pour le cancer (Bame, 2001; Vlodavsky and Friedmann, 2001). L'activité des héparanases est d'ailleurs en corrélation avec le potentiel métastatique des cellules tumorales (Vlodavsky et al., 1990). D'autre part, la mobilisation du FGF2 de la matrice extracellulaire et de la membrane basale par les héparanases joue un rôle dans le remodelage tissulaire ou l'invasion tumorale.

### iii. Présentation des HBPs

Une propriété commune des HBPs est leur capacité à interagir avec un récepteur fonctionnel et des GAGs sulfatés, par l'intermédiaire de deux régions distinctes de la molécule (Capila et al., 2002; Silbert et al., 1997; Tanaka et al., 1993b; Turnbull et al., 2001). Ainsi, la fixation de ces facteurs aux HSPGs permettrait leur présentation au récepteur fonctionnel et modulerait leurs activités. Par exemple, les HSPGs exprimés à la surface luminale des cellules endothéliales peuvent fixer les chimiokines produites au niveau des sites de l'inflammation (Tanaka et al., 1998), évitant ainsi leur dilution dans le flux sanguin et permettant d'autre part la formation d'un gradient (Najjam et al., 1997; Tanaka et al., 1993a). Selon ce modèle, les cellules circulantes vont pouvoir remonter vers le site de l'inflammation en suivant un gradient solide de facteurs chimio-attractants présents sur l'endothélium et dans la matrice extracellulaire (Gilat et al., 1994; Kuschert et al., 1999; Tanaka et al., 1993a). Les chimiokines immobilisées aux GAGs des cellules endothéliales modulent ainsi l'adhésion des cellules immunes à l'endothélium vasculaire et favorisent leur extravasation dans les tissus (Hoogewerf et al., 1997; Rot, 1992).

La présentation de certaines HBPs par les GAGs apparaît aussi nécessaire pour induire des réponses cellulaires optimales. Selon ce modèle, les HSPGs présents à la surface des cellules pourraient stabiliser les interactions entre un ligand et son récepteur, conduisant à la persistance ou à l'amplification des signaux intracellulaires.

### b) Spécificité de reconnaissance

Les héparanes sulfates sont des polysaccharides linéaires sur lesquels ont lieu des modifications spécifiques telles que l'ajout de groupements sulfates. Les charges négatives des groupements sulfates ( $pK_a=2$ ) et des groupements carboxyliques ( $pK_a=4$ ) forment des interactions électrostatiques avec des acides aminés de la protéine (Cardin and Weintraub, 1989). Toutefois, il semble que ces interactions soient plus spécifiques qu'une simple interaction charge-charge.

Les héparanes sulfates présentent un polymorphisme élevé qui résulte de l'action coordonnée de toutes les enzymes de biosynthèse. Ce polymorphisme repose sur la longueur des chaînes, le degré de polymérisation, le degré de

sulfatation et l'organisation des différentes régions sulfatées.

On sait aussi que l'héparine adopte la conformation d'une hélice relativement rigide, dont le plan de rotation place les groupements sulfates à des intervalles réguliers d'environ 17Å de chaque côté de l'hélice (Mulloy et al., 1993), soit une distance qui correspond à l'espace entre les groupements positifs des résidus d'acides aminés de plusieurs HBPs. Il semble donc que l'existence d'un épitope unique de fixation spécifique d'une HBP repose sur une combinaison de O et de N-sulfatations, sur la longueur et sur les positions relatives des domaines NA, NS et NA/NS (Lindahl et al., 1998). Le facteur plaquettaire 4 (PF4) nécessite la présence de groupements O-sulfates pour se fixer aux GAGs (Stringer and Gallagher, 1997).

Toutefois, les arguments pour une spécificité de séquence aussi stricte sont moins évidents pour d'autres molécules telles que les FGFs qui ont pourtant largement été étudiés ces dernières années.

De plus, les caractéristiques générales des héparanes sulfates sont compatibles avec la structure d'un polymère qui est capable d'adopter des configurations de fixations variables selon les besoins de reconnaissance des protéines. Cette accommodation de la chaîne glycanique a déjà été mise en évidence pour l'héparine. L'analyse de structures cristallines de plusieurs complexes héparine/protéine a révélé en effet une distorsion dans l'axe de l'hélice s'ajustant ainsi aux caractéristiques topologiques des régions de fixation de la protéine (Pellegrini et al., 2000; Sasisekharan and Venkataraman, 2000).

**La spécificité d'interaction entre les chaînes GAGs et les HBPs peut être utilisée par la cellule pour moduler son état.** En effet, les changements de structure fine de ces chaînes héparanes sulfates lors du développement, de la différenciation cellulaire ou de processus pathologiques influencent les capacités de fixation de leur ligand et par conséquent les activités physiologiques de ces derniers (Delehedde et al., 2002a).

## **2 - Implication des GAGs dans le cancer**

Les GAGs et les PGs ont une importance majeure dans les processus liés au développement et à la progression des cancers. Des changements dans leur niveau

d'expression, ou dans celui des enzymes responsables de leur biosynthèse ou de leur dégradation (Narita et al., 2006) ont souvent été corrélés aux différents stades de la progression tumorale. De nombreuses données mettent en évidence l'implication des GAGs dans les cancers (Pour revue (Filmus, 2001; Iozzo, 2005; Sanderson et al., 2004; Sasisekharan et al., 2002; Toole, 2004; Yip et al., 2006).

### **1) Les phénomènes d'invasion et de métastase des cellules cancéreuses**

Les capacités des cellules cancéreuses à migrer et à venir se loger dans les tissus avoisinants impliquent des changements dans l'expression des molécules de la surface cellulaire, ainsi que dans l'expression des enzymes responsables de la dégradation de la matrice extracellulaire.

Comme nous l'avons dit, les PGs et les GAGs sont des constituants majeurs de la matrice extracellulaire et l'expression des PGs à la surface des cellules permet les interactions cellules/matrice extracellulaire. Ainsi, des changements de leur expression peuvent réduire les interactions des cellules et promouvoir l'invasion des cellules cancéreuses. Par exemple, les syndécans, surexprimés en condition d'hypoxie (Alexopoulou et al., 2007), en relation avec les intégrines (Bernfield et al., 1999) et l'acide hyaluronique via le CD44 (Toole, 2004) contribuent à la mobilité des cellules cancéreuses, notamment grâce à l'activation du cytosquelette. Le syndécan-4 participe à l'activité angiogénique du FGF-2 (Murakami et al., 2008). De plus, les cellules cancéreuses ont la particularité de sécréter des enzymes telles que les metalloprotéinases, les héparanases ou les hyaluronidases pour pénétrer dans les membranes basales et dans les matrices extracellulaires afin d'atteindre les tissus avoisinants (Cohen et al., 2006; Sanderson et al., 2004).

Les métastases résultent de la dissémination de cellules cancéreuses dans la circulation et notamment des interactions que ces dernières peuvent créer avec les cellules endothéliales, les leucocytes ou encore les plaquettes. Toutes ces interactions guident la colonisation des organes ou tissus par les cellules tumorales. L'héparanase, par exemple, facilite les métastases en dégradant les HS (Marchetti and Nicolson, 2001; Maxhimer et al., 2002; Murry et al., 2006; Vlodavsky et al., 2006). La dégradation partielle du syndécan-1 rend ce PG soluble et circulant. Cet

ectodomaine ou forme non-glycosylée lui permet de contrôler l'adhésion de cellules cancéreuses aux endothéliales des vaisseaux sanguins ou lymphatiques et, ainsi, de promouvoir leur association avec différentes cellules hôtes initiant les métastases (Gotte et al., 2002; Ma et al., 2006; Sanderson et al., 2005). En revanche, *in vivo*, l'effet antimétastatique de l'héparine a été attribué à l'interférence qu'elle générerait avec les P-sélectines endothéliales (Ludwig et al., 2004).

## **2) Les GAGs et l'angiogenèse**

Les principaux facteurs guidant le processus d'angiogenèse sont les VEGFs (Vascular Endothelial Growth Factors), les FGFs (Fibroblasts Growth Factors) et les angiopoïétines. Cependant, les PGs et les GAGs sont également impliqués, puisque chacun des facteurs cités se lie à l'héparine ou aux HS. Ils pourront ainsi participer à l'activation des récepteurs spécifiques aux facteurs de croissance. Les GAGs sont aussi nécessaires pour la formation de gradient des facteurs proangiogéniques, processus indispensable pour la guidance des vaisseaux. L'héparanase permet aussi l'induction de l'angiogenèse en libérant les facteurs angiogéniques tels que le FGF2 et le VEGF (Zetser et al., 2006). L'inhibition de l'expression du perlécan par un anti-sens ou l'observation de souris déficientes en perlécan révèle une diminution de l'angiogenèse autour des tumeurs et une baisse de la croissance tumorale (Sharma et al., 1998; Zhou et al., 2004).

Le rôle régulateur des HS dans l'angiogenèse est d'autant plus important que les facteurs antiangiogéniques les lient eux aussi. Cette liaison est importante pour leur activité biologique et fait intervenir les mêmes mécanismes que pour les facteurs proangiogéniques. Ainsi, il y aura compétition entre les différents facteurs régulateurs de l'angiogenèse. Les CS peuvent, eux aussi, avoir un effet anti-angiogénique en inhibant la migration transendothéliale de monocytes (Liu et al., 2005).

**Donc, la spécificité de liaison des HS, c'est-à-dire leur composition et/ou la nature du proréoglycane associé, joue un rôle très important dans la régulation de l'angiogenèse.**



## **Partie III. Les chimiokines**

| Famille     | Nom officiel | Non commun              | Famille   | Nom officiel | Non commun    |
|-------------|--------------|-------------------------|-----------|--------------|---------------|
| <b>CXC</b>  | CXCL1        | GRO $\alpha$            | <b>CC</b> | CCL1         | I309          |
|             | CXCL2        | GRO $\beta$             |           | CCL2         | MCP1          |
|             | CXCL3        | GRO $\gamma$            |           | CCL3         | MIP1 $\alpha$ |
|             | CXCL4        | PF4                     |           | CCL4         | MIP1 $\beta$  |
|             | CXCL4L1      | PF4v1                   |           | CCL5         | RANTES        |
|             | CXCL5        | ENA78                   |           | CCL6         | C10           |
|             | CXCL6        | GCP2                    |           | CCL7         | MCP3          |
|             | CXCL7        | NAP2                    |           | CCL8         | MCP2          |
|             | CXCL8        | IL8                     |           | CCL9         | MIP1 $\gamma$ |
|             | CXCL9        | MIG                     |           | CCL10        | CCL10         |
|             | CXCL10       | IP10                    |           | CCL11        | Eotaxine      |
|             | CXCL11       | ITAC                    |           | CCL12        | MCP5          |
|             | CXCL12       | SDF1                    |           | CCL13        | MCP4          |
|             | CXCL13       | BCA1                    |           | CCL14        | CC1           |
|             | CXCL14       | BRAK                    |           | CCL15        | Leukotactine1 |
|             | CXCL15       | Lungkine                |           | CCL16        | LEC           |
|             | CXCL16       | CXCL16                  |           | CCL17        | TARC          |
| <b>XC</b>   | CL1          | Lymphotactine $\alpha$  |           | CCL18        | PARC          |
|             | CL2          | Lymphotactine $\beta$   |           | CCL19        | ELC           |
| <b>CX3C</b> | CX3CL        | Fraktaline/Neurotactine |           | CCL20        | LARC          |
|             |              |                         |           | CCL21        | SLC           |
|             |              |                         |           | CCL22        | MDC           |
|             |              |                         |           | CCL23        | MPIF1         |
|             |              |                         |           | CCL24        | MPIF2         |
|             |              |                         |           | CCL25        | TECK          |
|             |              |                         |           | CCL26        | Eotaxine3     |
|             |              |                         |           | CCL27        | ESkine        |
|             |              |                         |           | CCL28        | MEC           |

**Table 6: Classification des chimiokines.**

## **1 - Généralité**

### **1) Nomenclature**

Les chimiokines constituent une large famille de petites protéines (de 6 à 15 kDa) sécrétées par un grand nombre de cellules, principalement les globules blancs ou leucocytes. On connaît à l'heure actuelle plus de 40 chimiokines humaines différentes, ayant 20 à 90% d'homologie (Rossi and Zlotnik, 2000). Toutes les protéines de cette famille ont en commun certaines propriétés particulières. En premier lieu le chimiotactisme : elles sont capables d'attirer leurs cellules-cibles, en particulier les leucocytes, proportionnellement au gradient de concentration qu'elles forment à partir de leur lieu de production. C'est cette capacité qui leur a donné leur premier nom de cytokines chimioattractantes. Le nom de chimiokines a été adopté définitivement en 1992 lors du troisième congrès international sur les cytokines en tant que néologisme pour cytokine chimioattractante (de l'Anglais CHEMOattractant cytoKINE) (Table 6).

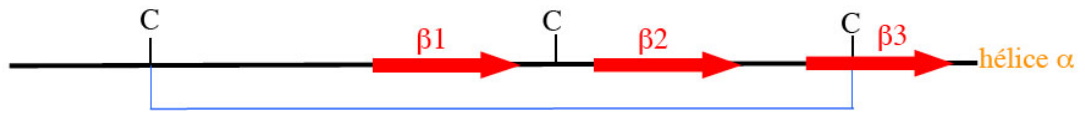
De nombreuses chimiokines avaient été identifiées auparavant et dénommées en fonction de leur localisation tissulaire ou de leur rôle physiologique. En 1995, le comité NC-IUPHAR a organisé la nomenclature des chimiokines. Même si le terme de chimiokines est communément accepté et retrouvé dans la littérature, la nomenclature officielle des chimiokines l'est, elle, beaucoup moins, et l'ancienne nomenclature reste communément utilisée dans les publications scientifiques.

### **2) Rôle physiologique des chimiokines**

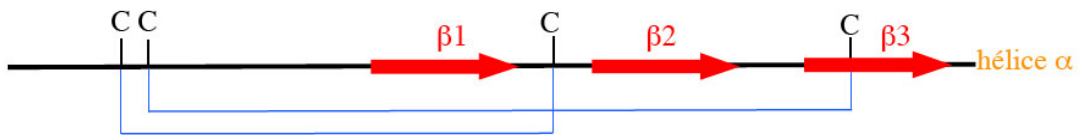
#### **a) Chimiotactisme**

Le premier rôle mis en évidence pour cette famille de protéines est le chimiotactisme des leucocytes. En effet, les chimiokines ont la capacité de mobiliser les leucocytes pour faire en sorte que ces derniers quittent rapidement les vaisseaux sanguins pour venir s'accumuler sur les sites où se produit une infection ou une inflammation. La forte augmentation de la sécrétion des chimiokines pendant

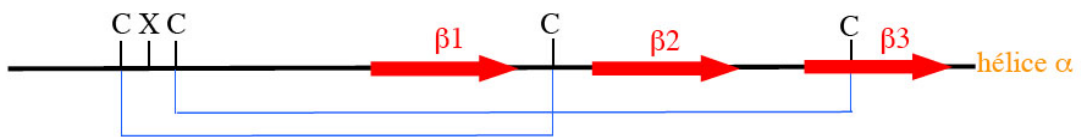
Chimiokine C (lymphotactine)



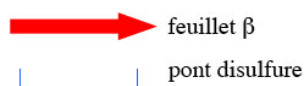
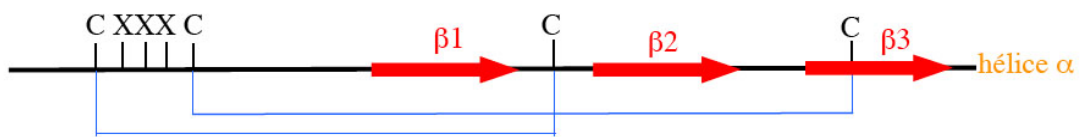
Chimiokine CC (CCL11, CCL16, CCL21)



Chimiokine CXC (CXCL4, CXCL8, CXCL9)



Chimiokine CX<sub>3</sub>C (fractalkine)



**Figure 14: Représentation schématique des structures primaires des quatre familles de chimiokines.**

l'inflammation résulte dans le recrutement sélectif de certains leucocytes, notamment les lymphocytes T au niveau des tissus lésés. Le potentiel des lymphocytes T à sécréter des chimiokines suggère que les lymphocytes T eux-mêmes jouent un rôle actif dans le recrutement d'autres types de leucocytes sur le locus de l'infection ou de l'inflammation (Mackay, 2001). Ce mécanisme implique une série d'interactions coordonnées entre les leucocytes et les cellules endothéliales qui nécessite une interconnexion très régulée entre les sélectines, les intégrines et les chimiokines. La migration de ces cellules entraîne une profonde transformation qui induit la redistribution des récepteurs de chimiokines, des intégrines, des protéines du cytosquelette et de différentes molécules intracellulaires (Kunkel and Godessart, 2002).

#### b) Autres fonctions des chimiokines

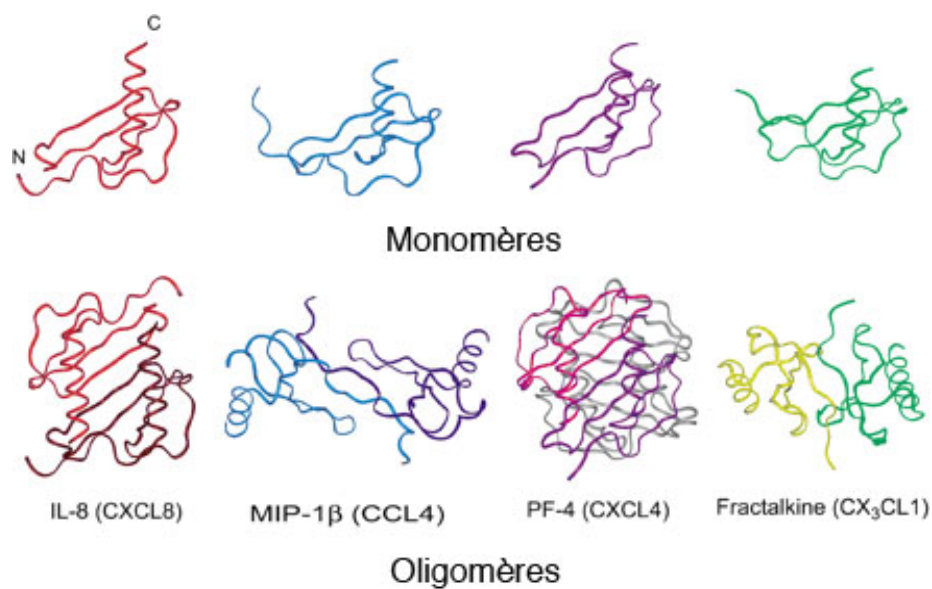
Des études ultérieures ont mis en évidence leurs fonctions et leur implication directe ou indirecte dans d'autres processus biologiques. Les chimiokines sont sécrétées par un grand nombre de cellules : globules blancs (monocytes, macrophages, éosinophiles, lymphocytes T), plaquettes sanguines, fibroblastes, cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et kératinocytes de la peau.

Cette découverte a permis de mettre en évidence leur rôle dans des processus biologiques aussi divers que le développement embryonnaire, l'athérosclérose, l'angiogenèse, l'inflammation, la pathogenèse de virus ou encore l'ouverture du col de l'utérus au moment de l'accouchement.

### **3) Classification des chimiokines**

Les chimiokines forment une famille de ligands très complexes, de par leur diversité, leur sélectivité pour leurs récepteurs et leur divergence phylogénétique. Ce sont de petites protéines de 6 à 15 kDa, composées de 70 à 80 acides aminés.

La classification des chimiokines se fait traditionnellement en fonction d'un motif d'acides aminés de l'extrémité amino-terminale, incluant quatre (ou deux) cystéines conservées. La première forme un pont disulfure avec la troisième, tout comme la deuxième avec la quatrième (Figure 14).



**Figure 15: Structure tridimensionnelle des chimiokines.**

Les chimiokines ont toutes une structure très similaire, trois feuillets  $\beta$ , une hélice  $\alpha$  et un ou deux ponts disulfures. Toutes les chimiokines ont la capacité de s'oligomériser, c'est une caractéristique importante pour leur activité biologique.

- **Les chimiokines du groupe CXC (ou  $\alpha$ )** sont caractérisées par la présence d'un acide aminé entre les deux premières cystéines conservées. A l'intérieur de ce groupe, on distingue deux sous-catégories liées à la présence ou non du motif tripeptidique ELR, immédiatement adjacent au motif CXC. La signification de ce motif n'est pas simplement structurelle.

Les chimiokines ELR+ (CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8 et CXCL15) sont produites par une grande variété de cellules et leur principal rôle est de promouvoir l'adhérence des neutrophiles aux cellules endothéliales ayant pour conséquence leur migration vers les sites inflammatoires. Ce motif confère à cette famille de chimiokines leurs propriétés angiogéniques.

Les chimiokines ELR- (CXCL4, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14 et CXCL16) attirent les leucocytes et les monocytes, mais présentent une faible capacité à attirer les neutrophiles. Elles sont considérées comme ayant des propriétés antiangiogéniques (Strieter et al., 1995).

- Lorsque les deux cystéines sont adjacentes, on parle de **chimiokines du groupe CC (ou  $\beta$ )**. Ces chimiokines exercent principalement leur action sur les lymphocytes, les monocytes, les basophiles et les éosinophiles. On dénombre également un petit groupe de CC chimiokines qui possèdent six cystéines conservées, les deux cystéines supplémentaires formant également un pont disulfure (CCL1, CCL15, CCL21, CCL23 et CCL28).

- Dans le **groupe CX3C (ou  $\gamma$ )** qui ne compte qu'un membre, les résidus cystéines sont séparés par trois acides aminés. On connaît néanmoins deux formes distinctes de cette chimiokine : la forme soluble présente une activité chimioattractante pour les lymphocytes T et les monocytes, alors que la forme liée à la membrane induit une forte adhésion des leucocytes.

- A l'inverse, **les chimiokines du groupe C (ou  $\delta$ )** ne possèdent que deux cystéines conservées, correspondant aux deuxième et quatrième cystéines des trois premiers groupes. Cette famille compte deux membres très similaires XCL1 et XCL2 qui ne diffèrent que par la nature des acides aminés 7 et 8. XCL1 a la capacité d'induire le chimiotactisme des lymphocytes. (pour revue (Laing and Secombes, 2004)).

#### **4) Structure tridimensionnelle des chimiokines**

La structure tridimensionnelle de plusieurs chimiokines a été résolue et montre un repliement caractéristique et commun à cette famille de protéines. Elle consiste en une région amino-terminale flexible structurellement désordonnée qui précède la première cystéine. Ce domaine est suivi d'une région en boucle appelée boucle N (N loop) suivie d'un feuillet constitué de trois brins  $\beta$  antiparallèles reliés entre eux par les boucles 30s, 40s et 50s. Ce motif en clé grecque fournit une base solide sur laquelle s'ancre le domaine carboxy-terminal organisé en hélice  $\alpha$  qui suit la dernière cystéine. La structure tridimensionnelle est stabilisée à la fois par les deux ponts disulfures mais également par des liaisons hydrophobes entre des résidus de l'hélice  $\alpha$  carboxy-terminale et des résidus du feuillet  $\beta$ .

La plupart des analyses de structure montrent que les chimiokines sont associées en multimères dans les conditions requises pour la cristallisation. Dans le cas des chimiokines CXC, l'interface de dimérisation se situe au niveau de l'angle du premier brin  $\beta$  alors que dans le cas des chimiokines CC, l'interface se situe plutôt à proximité de l'extrémité amino-terminale d'où la formation de dimères non équivalents (Figure 15).

Malgré le fait qu'aux fortes concentrations nécessaires aux études cristallographiques on observe des dimères voire des multimères, les chimiokines semblent agir à l'état monomérique (Baggiolini et al., 1997). Néanmoins, la plupart des chimiokines se lient aux GAGs ce qui favorise la dimérisation des chimiokines.

Les études structure/fonction indiquent que les chimiokines ont deux sites d'interaction majeurs avec leurs récepteurs. Le premier implique la portion amino-terminale flexible qui précède la première cystéine. Cette région ne semble pas nécessaire à la liaison de la chimiokine avec une haute affinité à son récepteur, mais joue visiblement un rôle dans l'activation du récepteur. Ce segment est également important dans la spécificité de liaison de la chimiokine à un récepteur donné. La deuxième comprend la boucle rigide qui suit immédiatement la deuxième cystéine.

L'importance relative de ces deux régions de contact dépend toutefois du récepteur considéré et reflète l'importance de la synergie de contact. La boucle amino-terminale qui suit immédiatement les deux premières cystéines conservées et qui relie l'extrémité amino-terminale flexible au feuillet  $\beta$  semble elle aussi capitale

pour la liaison au récepteur, mais elle détermine également la spécificité de liaison.

En résumé, ces résultats expérimentaux suggèrent un modèle d'activation général dans lequel la boucle N de la chimiokine établit un contact initial avec le récepteur suivi par une activation du récepteur via la région amino-terminale de la chimiokine.

## **2 - Les récepteurs aux chimiokines**

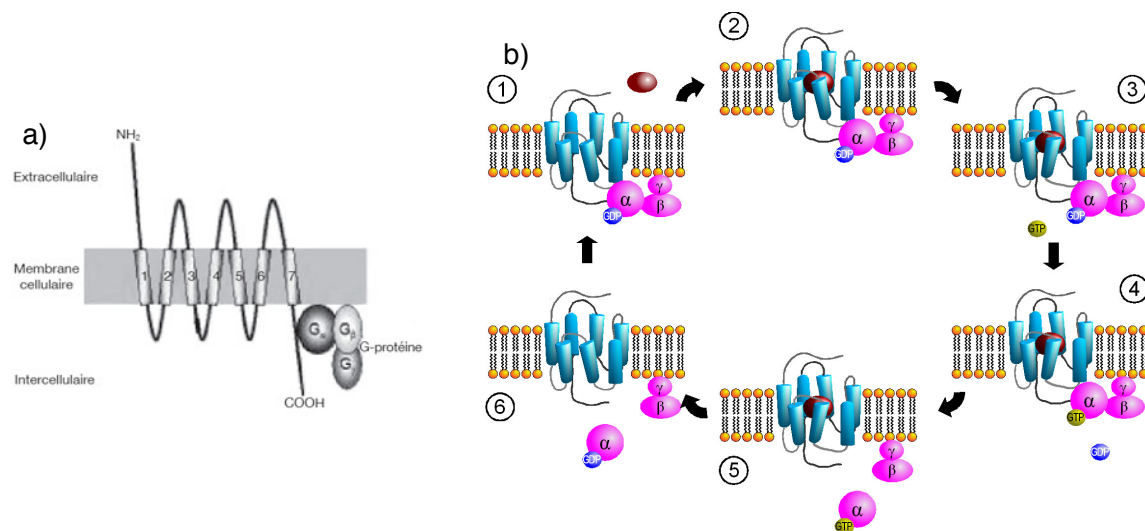
### **1) Des récepteurs de la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPGs)**

Les chimiokines exercent leur activité en interagissant avec des récepteurs de chimiokines, appartenant à la superfamille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G, plus précisément à la famille 1 (protéine G de la famille Gi/Go), dont le modèle est la rhodopsine.

Les RCPG sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques naturelles aussi diverses et variées que la phototransduction, l'olfaction, l'immunité, la digestion. Une comparaison directe entre les RCPG humains et murins révèle un degré d'homologie très élevé : la préservation de cette famille de récepteurs au cours de l'évolution est aussi un argument allant dans le sens de leur importance pour la cellule (Vassilatis et al., 2003).

Les premiers RCPG ont été clonés dans les années 80 (Nathans et Hogness, 1983 ; Dixon et al, 1986). Les méthodes de clonage par homologie développées ultérieurement ont permis d'identifier plusieurs centaines de nouveaux récepteurs grâce à leur caractéristique structurelle commune qui consiste en la présence de sept séquences hydrophobes d'environ 20 à 25 résidus (Baldwin et al., 1997) séparées par des boucles hydrophiles de taille variable (Figure 16).

Ces récepteurs sont tous organisés de la même manière : l'extrémité amino-terminale est exposée à l'extérieur de la cellule, les sept segments transmembranaires (TMI à TMVII) sont reliés entre eux par trois boucles extracellulaires (e1, e2, e3) et trois boucles intracellulaires (i1, i2 et i3) de taille variable, pour aboutir à une extrémité carboxy-terminale située du côté cytoplasmique. Hormis ces éléments structuraux, une autre caractéristique commune



**Figure 16: Structure et fonctionnement d'un RCPG.**

a) Les récepteurs couplés aux protéines G sont des récepteurs à sept domaines transmembranaires repliés entre eux par trois boucles extracellulaires et trois boucles intracellulaires. L'extrémité N-terminale extracellulaire est importante pour la liaison des ligands, alors que l'extrémité C-terminale intracellulaire interagit avec les protéines G. Les protéines G sont des molécules hétérotrimériques formées par l'association des sous unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . b) L'activation du récepteur par son ligand (1) entraîne une dissociation de l'hétérotrimères. Le GDP associé à la sous unité  $\alpha$  est remplacé par du GTP et le rend ainsi moins affiné au complexe  $\beta/\gamma$  (5). La sous unité  $\alpha$  va ensuite interagir avec ses effecteurs et hydrolyser le GTP en GDP, ce qui permet à l'hétérotrimère de se reformer (6).

à cette famille de récepteurs est que l'initiation de la cascade de signalisation se produit en réponse à l'interaction avec les protéines G hétérotrimériques. La liaison du ligand induit des changements conformationnels au niveau de la poche formée par les sept domaines transmembranaires. Ce remodelage de la structure du récepteur permet son interaction avec les protéines G. Ce sont donc les protéines G qui assurent la transduction de l'activation d'un récepteur par un agoniste, c'est-à-dire le couplage du récepteur à un effecteur pour aboutir à une réponse cellulaire particulière (Figure 16).

La transduction d'un signal par le système RCPG/protéineG/effecteur s'accompagne d'un processus d'amplification du message. L'activation de l'effecteur se traduit par la synthèse de nombreuses molécules de seconds messagers dont chacun ira à son tour activer d'autres protéines. (pour revue (Hermans, 2003; Robishaw and Berlot, 2004).

Toutes les protéines G sont formées de l'association d'une sous-unité  $\alpha$  avec un complexe  $\beta/\gamma$ . L'association des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  constitue la forme inactive de la protéine G. L'activation du récepteur par un agoniste entraîne une dissociation de l'hétérotrimère, ce qui permet à la sous-unité  $\alpha$  mais aussi au complexe  $\beta/\gamma$  d'interagir avec des effecteurs.

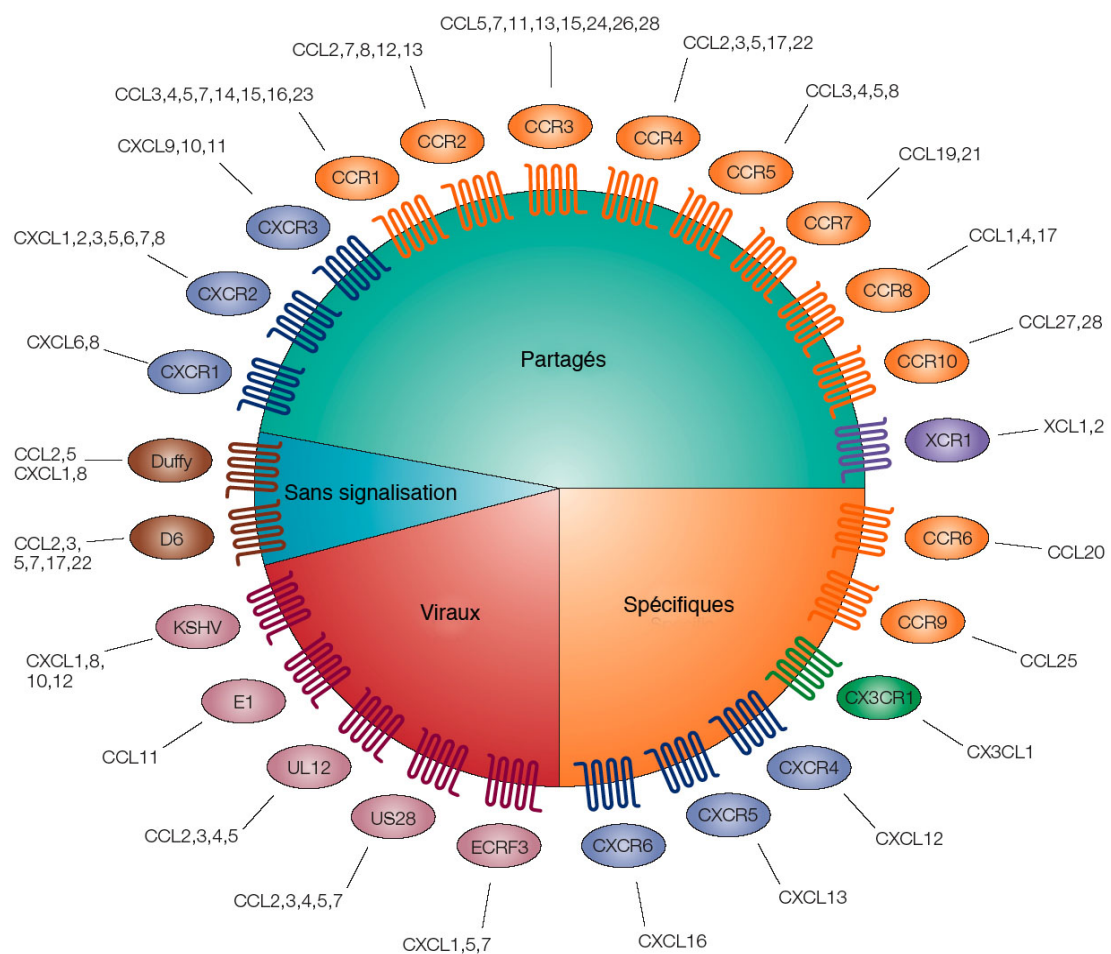
La complexité et la spécificité de la signalisation induite par les RCPG repose sur la grande variété de protéines G. Une quarantaine de sous-unités ont été clonées :

- 23 sous-unités  $\alpha$  de 39 à 46 kDa codées par 17 gènes (Gudermann et al., 1997) et classées en quatre familles (Gai/o, Gas, G $\alpha$ q/11 et G $\alpha$ 12),
- 6 sous-unités  $\beta$  de 35 à 37 kDa et 12 sous-unités  $\gamma$  de 6 à 8 kDa (Gudermann et al., 1997).

Une grande variété d'effecteurs a été identifiée. Même si toutes les combinaisons n'ont pas encore été démontrées, le nombre théorique d'associations en trimères entre les différentes sous-unités contribue à la diversité et à la spécificité des signaux activés par les RCPG.

## **2) Classification des récepteurs de chimiokines de type RCPG**

Les récepteurs de chimiokines sont dénommés d'après la classe de chimiokines qu'ils lient. La nomenclature communément acceptée compte donc quatre familles de récepteurs de chimiokines : CCR, CXCR, CX3CR et XCR (cette



**Figure 17: Classification des récepteurs RCPGs aux chimiokines** (adapté d'après Balkwill, 2004). Le récepteur CXCR3b n'est pas représenté car il a été caractérisé après la publication de cette revue. De plus, les interactions des récepteurs CXCR3a (CXCR3) et CXCR3b avec les chimiokines PF4 et PF4v1 n'ont été démontré que récemment.

écriture constitue une exception à la nomenclature afin de différencier les récepteurs de chimiokines des récepteurs du complément dénommés CR). On compte actuellement six récepteurs de la famille CXC (CXCR1 à CXCR6), onze récepteurs pour les chimiokines CC (CCR1 à CCR11), un récepteur pour la lymphotactine (XCR1) et le récepteur de la fraktaline (CX3CR1).

A ces récepteurs classiques on peut ajouter D6 et Duffy (Duffy antigen receptor for chemokine ou DARC) qui sont également des RCPG mais qui ne sont visiblement pas capables de signaler et sont donc exclus du système conventionnel classique.

**Chez l'homme, la plupart des récepteurs connus peuvent interagir avec plusieurs chimiokines d'un même groupe, et réciproquement une chimiokine peut se lier à plusieurs récepteurs** (Figure 17).

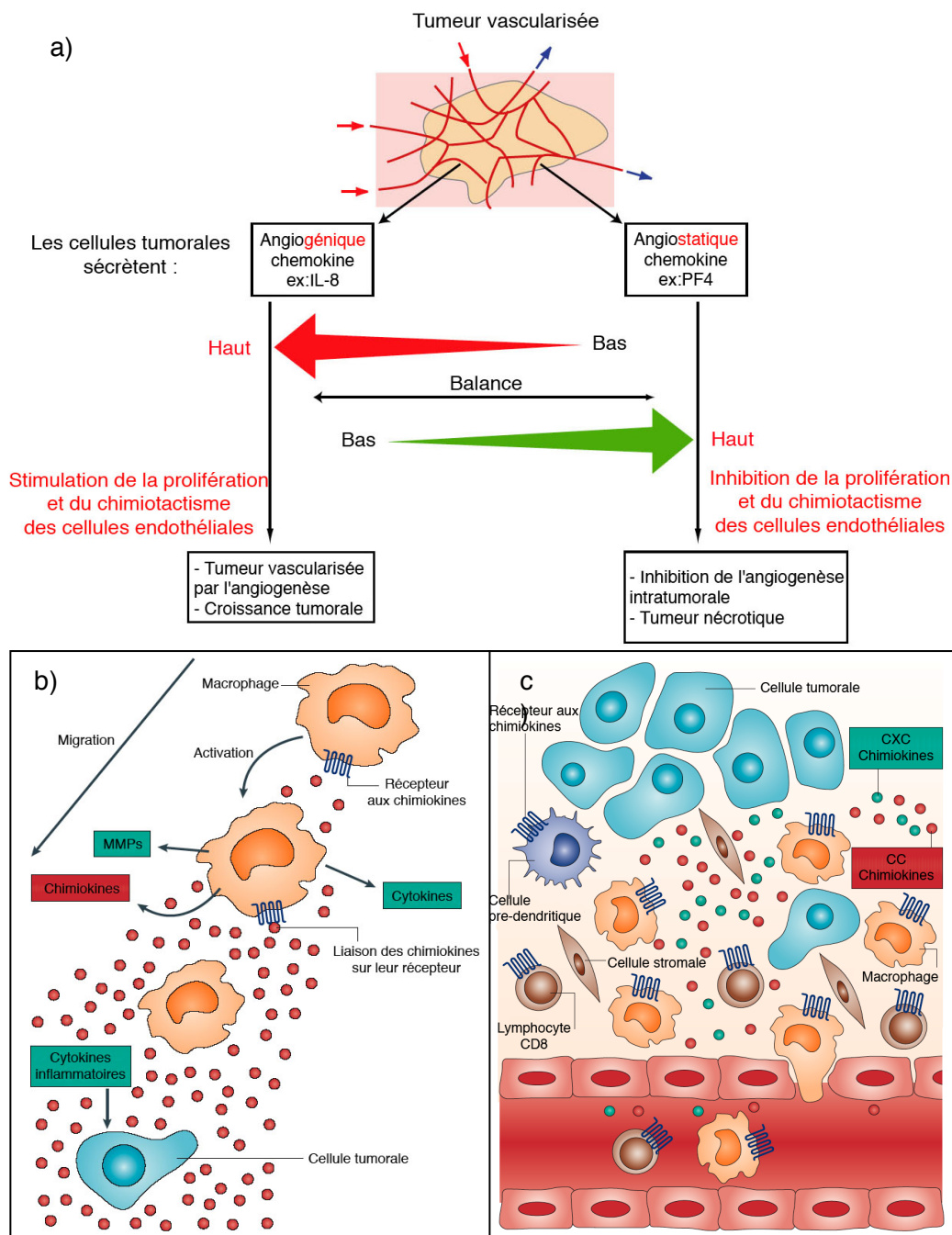
### **3) Signalisation des récepteurs de chimiokines de type RCPG**

Les récepteurs de chimiokines sont souvent donnés en exemple de RCPG qui interagissent avec les protéines G de la famille  $\alpha_i/\alpha_o$  (Baggiolini et al., 1997; Murphy et al., 2000). Néanmoins, on recense plusieurs exemples pour lesquels d'autres types d'interactions ont été observés.

Toutes exceptions mises à part, la littérature montre que les chimiokines peuvent activer la plupart des voies de signalisations liées aux RCPG connus. Grâce à leur couplage aux protéines de la famille  $G_i$ , on observe, bien entendu, une baisse d'AMPc liée à l'inhibition de l'adénylate cyclase, une mobilisation de calcium et l'activation de kinase comme les ERK (1 et 2), p38MAPK, la phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K), RAS, p21 activated kinase (PAK) (Balkwill, 2004; Murphy et al., 2000).

### **4) Les GAGs**

Les chimiokines peuvent aussi se lier aux glycosaminoglycans pour créer un gradient de chimiokine ou bien entrer en compétition avec un facteur de croissance. Les chimiokines de point isoélectrique hautement basique comme PF4 (CXCL4) et CXCL8 peuvent se lier, avec des affinités de l'ordre du nanomolaire, à des glycosaminoglycans chargés négativement pour créer un gradient de chimiokines immobilisées (Kuschert et al., 1999). Elles peuvent aussi entrer en compétition avec des facteurs de croissance comme FGF-1, FGF2 et VEGF et déplacer leurs liaisons



**Figure 18: Chimiokines et cancer.**

Les chimiokines peuvent stimuler la progression tumorale en modulant l'angiogenèse tumorale. a) Elles agissent directement sur les Ecs en activant leur prolifération. b) Les chimiokines recrutent les leucocytes aux sites d'inflammation en formant des gradients dans le flux sanguin. c) Enfin, au sein même de la tumeur, les chimiokines exprimées par les cellules du stroma, les TAMs (tumor associated macrophages) et les CAFs (cancer associated fibroblastes), vont favoriser l'angiogenèse et la prolifération des cellules tumorales (adapté d'après Balkwill, 2004; Frederick and Clayman, 2001).

aux glycosaminoglycans (Francis et al., 2003; Khachigian and Parish, 2004; Parish et al., 1999).

### **3 - Les chimiokines et cancer**

Les chimiokines peuvent participer à la progression tumorale de plusieurs façons. Certaines vont participer à l'angiogenèse tumorale en agissant directement sur les cellules endothéliales (cette partie sera développée ultérieurement) et d'autres vont favoriser la prolifération des cellules tumorales en agissant directement sur celles-ci.

En participant à l'infiltration des leucocytes au sein même des tumeurs, notamment les macrophages, les chimiokines peuvent aussi favoriser indirectement la progression tumorale (Figure 18).

#### **1) Infiltration des leucocytes**

Les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) sont importants dans le développement des cancers. Une quantité importante de macrophages au sein même des tumeurs est fréquemment corrélée avec un mauvais pronostic. Les macrophages sont classés dans deux catégories : M1 et M2. Les TAMs exposés à l'interleukine 4 (IL-4) sont des macrophages polarisés M2 (Lin and Pollard, 2004; Mills et al., 2000). Les macrophages M2 sont impliqués dans la réponse inflammatoire, dans l'immunité adaptative Th1 et peuvent stimuler l'angiogenèse. Les TAMs sont immobilisés au sein de tumeurs peu vascularisées et plus précisément au niveau de régions nécrotiques hypoxiques. Dans des conditions d'hypoxie, les TAMs coopèrent avec les cellules tumorales pour stimuler l'angiogenèse en enrichissant le milieu en cytokines comme IL-6 (interleukine 6), EGF (epidermal growth factor), TGF (transforming growth factor), TNF (tumor necrosis factor) et les VEGFs (Carmeliet, 2000; Scotton et al., 2001).

## **2) Le microenvironnement des tumeurs contribue à l'action des chimiokines**

En plus de recruter les TAMs les chimiokines participent directement au recrutement des progéniteurs endothéliaux et au processus de métastase. Donc, l'étude du microenvironnement tumoral est essentielle pour apprécier plus précisément le rôle des chimiokines dans cette cascade d'évènements complexes. Le microenvironnement tumoral, qui comprend les fibroblastes associés au cancer (CAFs), les cellules endothéliales et les leucocytes, est une source importante de chimiokines et stimule la progression tumorale de la plupart des cancers grâce à son action paracrine (Bhowmick et al., 2004; Orimo and Weinberg, 2006). Par exemple, les CAFs vont sécréter différents types de chimiokines incluant CXCL12, lequel agit directement sur les cellules cancéreuses en stimulant leur prolifération mais aussi sur l'angiogenèse en recrutant les cellules endothéliales (Orimo et al., 2005).

## **3) Nouveaux biomarqueurs des tumeurs**

Dans les dernières années de sa vie, Judah Folkman s'est intéressé à l'accumulation des facteurs angiogéniques dans les plaquettes. Avec son équipe, il a mis en évidence une accumulation du facteur plaquettaire 4 (PF4) dans les plaquettes recrutées au niveau des tumeurs primaires et des tumeurs métastatiques. Cette quantité importante de PF4 à un stade très précoce de la croissance tumorale peut être détecté très aisément. Cette nouvelle découverte a des implications autant pour la biologie des métastases que pour le diagnostic précoce des tumeurs.

## **4 - Les chimiokines et les GAGs**

**L'interaction des chimiokines avec les GAGs est cruciale pour leur fonction biologique, en particulier les héparanes sulfates qui modulent l'activité des chimiokines *in vivo*.** Les chimiokines sont connues pour lier les GAGs *in vitro* (Kuschert et al., 1999) et *in vivo* (Middleton et al., 1997), toutefois, ce n'est que récemment qu'il a été démontré que cette interaction était nécessaire pour leur activité *in vivo* (Ali et al., 2005; Johnson et al., 2004; Proudfoot et al., 2003). De plus, la diversité des interactions chimiokine/GAG étudiées jusqu'ici ont mis en

évidence des rôles multiples.

L'immobilisation des chimiokines sur les GAGs permet de faciliter leur rétention sur la surface des cellules, c'est-à-dire former un gradient, pour fournir un signal directionnel pour les cellules (Johnson et al., 2005). Mais de récents travaux ont montré que la chimiokine CCL7 mutée pour sa liaison aux GAGs conserve son activité de chimiotactisme *in vitro*, alors qu'elle n'induit plus la migration des leucocytes et des cellules endothéliales *in vivo*.

L'oligomérisation est requise pour l'activité de la plupart des chimiokines. L'interaction chimiokine/GAG favorise l'oligomérisation et est importante pour stabiliser l'oligomère (Hoogewerf et al., 1997; Lau et al., 2004).

De plus, l'interaction des chimiokines avec les GAGs module la présentation des ligands pour leur récepteur (Netelenbos et al., 2001; Netelenbos et al., 2002), et les protège de la dégradation par les enzymes (Sadir et al., 2004; Webb et al., 1993).

## **5 - Les chimiokines de type CXC**

### **1) Chimiokine CXC et angiogenèse tumorale**

Comme expliqué dans la partie 1.3, cette famille peut être subdivisée en deux sous-familles : ELR+ et ELR- (Strieter et al., 1995). Les protéines CXC contenant ce motif ELR (Glutamate, Leucine, Arginine) favorisent l'angiogenèse associée à la tumorigenèse (Belperio et al., 2000; Salcedo and Oppenheim, 2003; Strieter et al., 1995). Par exemple, CXCL8 (IL8) est fortement exprimée dans les cancers de poumon de type NSCLC (non-small-cell lung cancer) (Smith et al., 1994). Il a été montré *in vivo* (NSCLC/souris SCID) que la taille des tumeurs générées chez des souris déplétées en IL8 est réduite de 40 %. De plus, ces animaux développent moins de métastases (Arenberg et al., 1996). Dans le cancer de la prostate, cancer dont la tumorigenèse et la formation de métastases sont liées à l'angiogenèse, les niveaux élevés d'IL8 dans le sérum sont corrélés avec l'avancement de la maladie (Veltri et al., 1999). De plus IL8 induit l'angiogenèse lors d'expériences sur la cornée de rat (Strieter et al., 1995).

Les chimiokines CXC ELR- quant à elles ont des propriétés anti-angiogéniques

(Strieter et al., 1995). Ainsi CXCL10 (IP10) inhibe l'effet angiogénique de IL8 ou de FGF2 sur la cornée de rat (Strieter et al., 2005). IP10 et CXCL9 (MIG) sont deux chimiokines surexprimées dans les tumeurs régressant spontanément et dont l'angiogenèse est altérée (Sgadari et al., 1996). Des xénogreffes de cellules de lymphome de Burkitt ont été réalisées chez les souris nudes. Lorsque MIG et/ou IP10 sont injectées directement dans les tumeurs, l'angiogenèse associée à la tumeur régresse (Teruya-Feldstein et al., 1997) (Sgadari et al., 1997). Il a été montré que cet effet, indépendant des lymphocytes T, passe par le recrutement de cellules mononucléaires après liaison de ces chimiokines à un récepteur, le CXCR3 (Baggiolini, 1998; Farber, 1997).

## **2) Récepteurs aux chimiokines CXC**

### **a) Chimiokines CXC-ELR+**

Les chimiokines humaines CXC-ELR<sup>+</sup>, comme IL8, se lient aux récepteurs CXCR2 et CXCR1. Ce dernier n'a pas d'équivalent chez la souris. Les cellules endothéliales humaines expriment ces deux types de récepteurs (Murdoch et al., 1999; Salcedo et al., 2000) mais, seul CXCR2 est nécessaire au chemotactisme de ces cellules (Addison et al., 2000). Il semble que les propriétés pro-angiogéniques des chimiokines CXC ELR<sup>+</sup> passent par ce récepteur. L'implication de CXCR2 dans la liaison des chimiokines pro-angiogéniques a été mise en évidence par des expériences de néovascularisation de la cornée chez le rat (Addison et al., 2000) et de réparation de blessures chez la souris knock-out CXCR2 (Devalaraja et al., 2000).

### **b) Chimiokines CXC-ELR-**

Les chimiokines angiostatiques comme MIG et IP10 lient le récepteur CXCR3. Les cellules endothéliales expriment ce récepteur (Soto et al., 1998). La liaison des chimiokines MIG et IP10 sur ce dernier conduit à l'inhibition de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales (Romagnani et al., 2001; Salcedo et al., 2000). En 2003, un récepteur spécifique de PF4, CXCR3-B, est mis en évidence à partir de

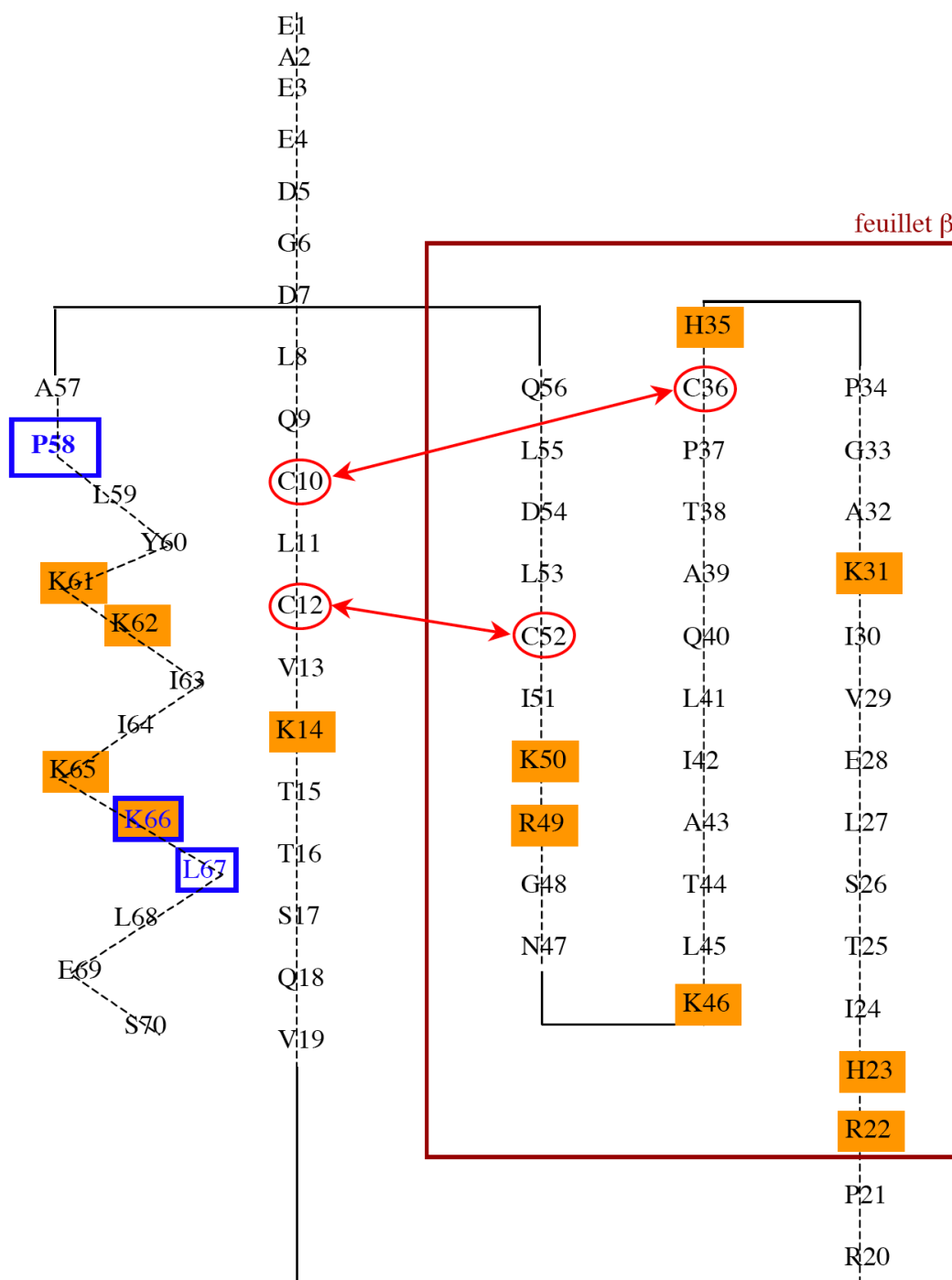
culture primaire de cellules endothéliales microvasculaires humaines (HMEC-1) (Lasagni et al., 2003). Lorsque le facteur plaquettaire 4 se lie avec une forte affinité (de l'ordre du nM) à CXCR3-B, il en résulte une augmentation du taux d'adénosine monophosphate (AMP) cyclique intracellulaire. Ce récepteur est codé par le même gène que CXCR3 (nommé depuis CXCR3-A). Par un mécanisme d'épissage alternatif, le pré-ARN messenger CXCR3 donne les ARN messagers CXCR3-A et CXCR3-B. Aucune étude à ce jour n'a mis en évidence l'existence de ce nouveau récepteur chez la souris. L'expression de CXCR3-A et CXCR3-B dans des cellules HMEC-1 aboutit à des morphologies cellulaires, une viabilité et des capacités apoptotiques et angiogéniques différentes. Ainsi la surexpression de CXCR3-A permet d'augmenter la viabilité des cellules en agissant sur l'apoptose alors que celle de CXCR3-B entraîne une apoptose massive de ces cellules. Cela suggère deux voies différentes de transduction du signal et que CXCR3-B et CXCR3-A ne sont pas couplées aux mêmes types de protéines G.

**CXCR3-B semble moduler l'activité de MIG et IP10 sur les cellules endothéliales. Par contre, il n'est pas encore clair que l'activité antiangiogénique de PF4 passe par ce récepteur** (Sulpice et al., 2004).

PF4 est un facteur majeur endogène de la régulation de l'angiogenèse. Malgré des connaissances limitées sur le récepteur spécifique de PF4, le laboratoire du Pr Bikfalvi a largement participé à la compréhension des mécanismes d'action par lesquels il inhibe l'angiogenèse. Nous nous intéressons maintenant aux dernières zones obscures de ses mécanismes et pour cela le laboratoire étudie en parallèle son paralogue, PF4v1.

## **6 - Le facteur plaquettaire 4 : PF4**

Le facteur plaquettaire 4 (CXCL4 ou PF4), polypeptide de 7,8 kDa pour un point isoélectrique de 7,6, fait partie de la sous-famille des chimiokines CXC-ELR<sup>+</sup>. Son gène, localisé sur le chromosome 4, appartient à la famille multigénique regroupée sous le terme de « small inducible genes » (SIG). Les protéines codées par ces gènes sont importantes dans les phénomènes de coagulation, d'inflammation et de



**Figure 19: Structure secondaire de PF4.**

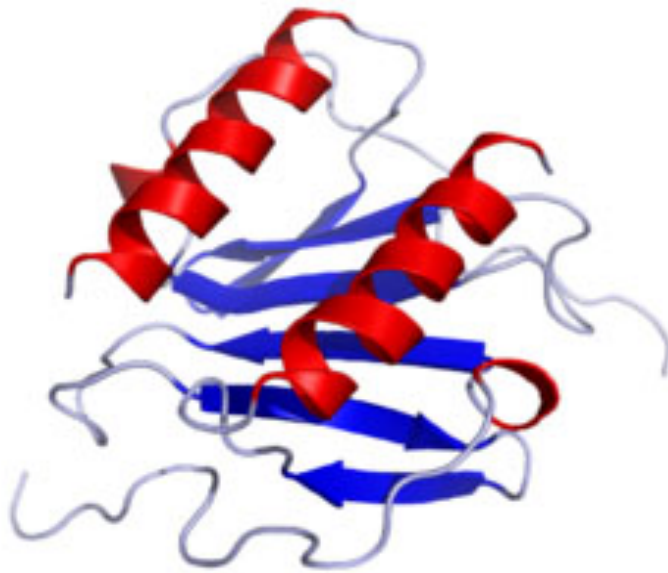
croissance cellulaire.

L'organisation des exons de cette famille de gènes suggère qu'ils dérivent d'un gène ancestral commun (Eisman et al., 1990). PF4 a été longtemps décrit comme exprimé exclusivement par les mégacaryocytes (Slungaard, 2005). Une fois synthétisé par ces derniers, il est adressé dans des vésicules avant d'être stocké dans les granules alpha des plaquettes sanguines. Le facteur plaquettaire 4 représente à peu près 25% des protéines des granules  $\alpha$ , soit une concentration d'environ  $20\mu\text{g}/10^9$  plaquettes (Rucinski et al., 1979; Zucker and Katz, 1991). En réponse à un stimulus externe, lors de l'activation plaquettaire, il est sécrété sous forme d'un complexe tétramérique lié à la chondroïtine-4-sulfate (Huang et al., 1982). Son taux plasmatique, dans des conditions basales, est de 15 ng/ml (McLaren et al., 1980) et sa demie vie dans la circulation sanguine est très courte, de l'ordre de trois minutes (Rucinski et al., 1987). Au niveau des sites d'activation des plaquettes, la concentration de PF4 peut atteindre  $170\mu\text{M}$  contre une concentration de 0,45 nM en situation normale. Plus récemment il a été montré, par différentes méthodes, que les monocytes expriment l'ARN messenger et la protéine PF4. Dans ce type cellulaire, il apparaît que la thrombine stimule la surexpression de l'ARNm et de la protéine, médiée par les « proteinase-activated receptors » (PARs) (Schaffner et al., 2005).

### **1) Structure**

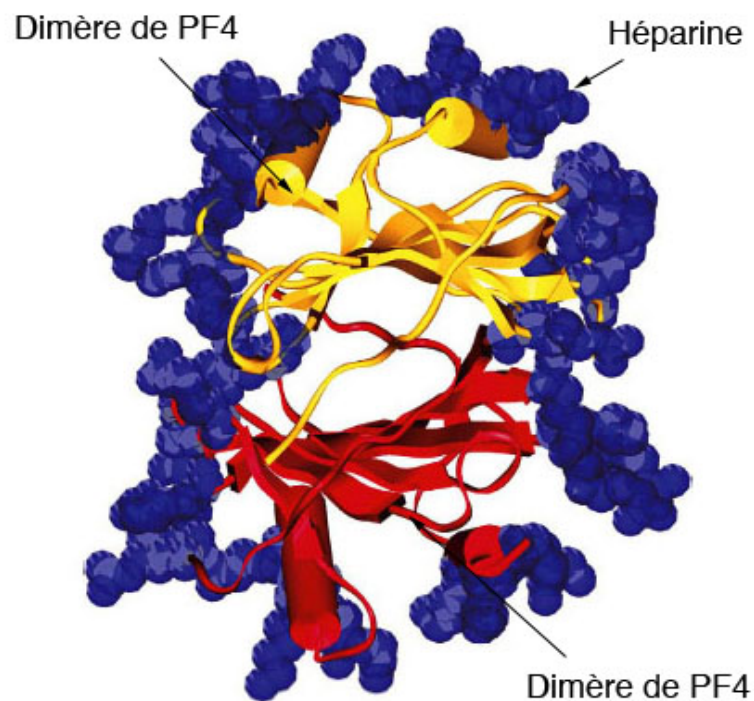
PF4 appartient à la sous-famille des chimiokines CXC dépourvue du motif ELR. Il possède à la place un motif DLQ (aspartate<sup>7</sup>, leucine<sup>8</sup>, glutamine<sup>9</sup>). PF4 possède également un deuxième motif DLQ (aspartate<sup>54</sup>, leucine<sup>55</sup>, glutamine<sup>56</sup>). Les deux cystéines en position 10 et 12 sont respectivement associées par des ponts disulfures intra-chaînes avec les cystéines 36 et 52 (Mayo et al., 1992). A son extrémité C-terminale, PF4 contient deux doublets de lysine, conférant une charge positive à la protéine et responsables en grande partie de la liaison à l'héparine (pour le peptide 47-70,  $K_d = 2,7 \cdot 10^{-8}\text{M}$ ) ou aux HSPGs (Petersen et al., 1999; Zhang et al., 1994). D'autres acides aminés basiques (Arg<sup>20</sup>, Arg<sup>22</sup>, His<sup>23</sup>, Arg<sup>49</sup> et Lys<sup>50</sup>) pourraient également participer à ces interactions (Rucinski et al., 1990) (Figure 19).

Les études de résonance magnétique nucléaire (RMN) et de cristallographie révèlent une région centrale de PF4 repliée en trois feuillets  $\beta$  antiparallèles, et une



**Figure 20: Structure tertiaire de PF4.**

Deux molécules de PF4 peuvent s'associer au niveau du premier feuillet- $\beta$ , en antiparallèle.



**Figure 21: Forme tétramérique de PF4.**

Deux dimères de PF4 vont s'associer grâce aux extrémités N-terminales flexibles des protéines. Les hélices  $\alpha$  se retrouvent à l'extérieur formant ainsi un anneau de charges positives pouvant interagir avec l'héparine.

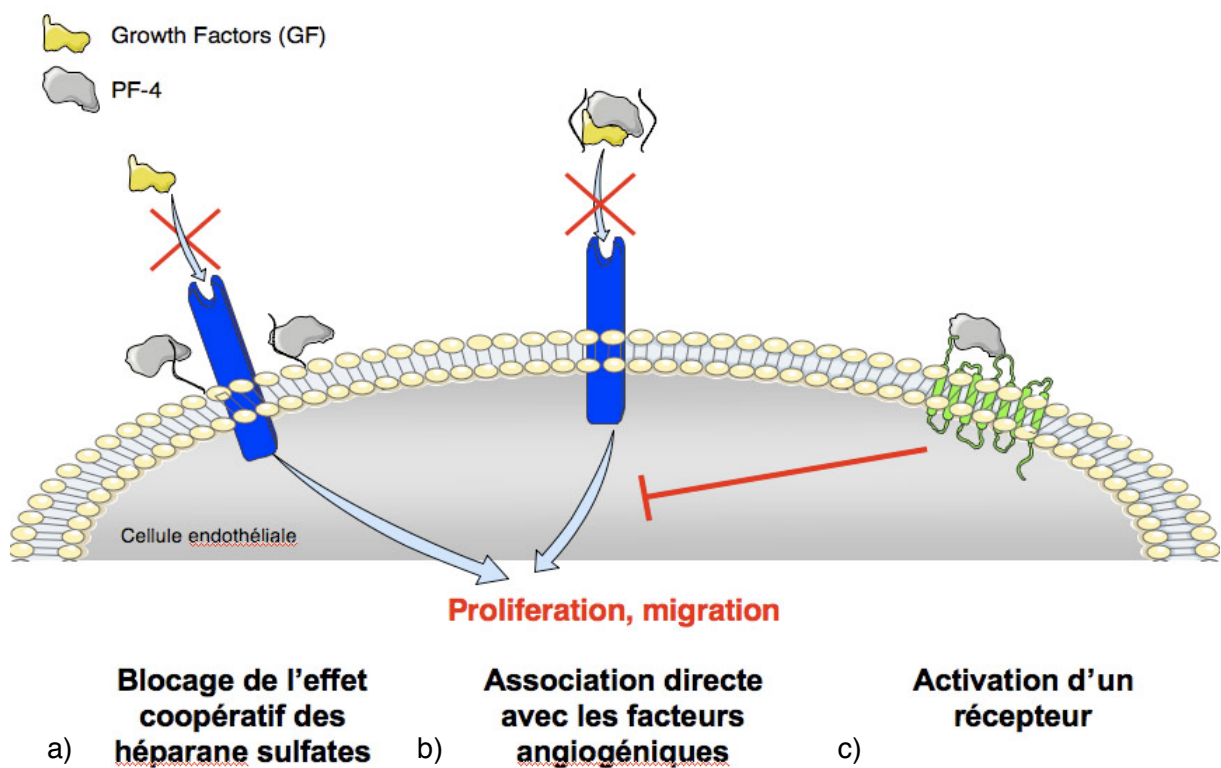
extrémité C-terminale organisée en hélice  $\alpha$  (St Charles et al., 1989; Zhang et al., 1994). L'extrémité N-terminale est moins structurée et semble beaucoup plus flexible (Mayo and Chen, 1989) (Figure 20).

A pH physiologique, PF4 se présente sous la forme d'une structure tétramérique. Dans un premier temps PF4 se dimérise, deux monomères s'assemblent de façon antiparallèle. Ces dimères vont ensuite se coller dos-à-dos pour former un tétramère. Dans cette structure, les hélices  $\alpha$  exposées à l'extérieur de la molécule forment un anneau de charges positives, alors que les feuilletts  $\beta$  hydrophobes se retrouvent masqués au centre du tétramère et forment un noyau (Stringer and Gallagher, 1997) (Figure 21). Le pH et la force ionique influencent fortement ces associations. Ces deux paramètres, de même que la concentration de PF4, interviennent dans la distribution entre monomères, dimères et tétramères (Mayo and Chen, 1989).

Dans la circulation sanguine, quatre tétramères de PF4 sont associés à un protéoglycane (constitué de chondroïtine-4-sulfate) et ce protéoglycane peut, à son tour, s'associer en dimère.

## **2) Activité biologique**

De par son activité anti-héparine, premier rôle trouvé au facteur plaquettaire 4 (Lane et al., 1984), PF4 joue un rôle important dans les processus de coagulation en empêchant la formation du complexe héparine-antithrombine III-thrombine (Eitzman et al., 1994; Lane et al., 1984). Le site majeur de liaison de cette chimiokine à l'héparine se situe entre les résidus 61 et 70 de l'hélice  $\alpha$  de PF4 (Stuckey, St Charles et al. 1992). Cette chimiokine et les peptides produits à partir de son extrémité C-terminale peuvent aussi inhiber le développement des progéniteurs mégacaryocytaires. Cette propriété peut être utilisée afin de les protéger des agents cytotoxiques utilisés lors de chimiothérapies (Han et al., 1997; Han et al., 1990). Des souris n'exprimant pas le facteur plaquettaire 4 ont été générées et sont viables (Eslin et al., 2004). L'inactivation du gène pf4 n'affecte pas la fertilité ni la longévité des souris. Les animaux ne font ni hémorragies ni thromboses, par contre leur sang contient moins de plaquettes (15%) que chez les animaux sauvages. De plus, les plaquettes des animaux transgéniques ne s'agrègent pas en réponse à de faibles



**Figure 22: Mécanisme d'inhibition de l'angiogenèse par PF4.**

Trois mécanismes d'inhibition de l'angiogenèse ont été proposés pour PF4. Les deux premiers (a et b) utilisent les capacités d'interaction de PF4 avec les héparines et les facteurs de croissance. Un troisième mécanisme (c) fait intervenir un récepteur spécifique qui induirait une voie de signalisation inhibitrice des voies induites par les facteurs de croissance (adapté d'après Bikfalvi, 2004).

doses de thrombine. Ce défaut d'agrégation n'est plus observé lorsque de fortes doses de thrombine sont utilisées.

Ses effets ne se limitent pas uniquement à cela. PF4 est la première chimiokine décrite comme pouvant inhiber la néovascularisation (Maione et al., 1990). Plusieurs études mettent en évidence le rôle, *in vitro* et *in vivo*, du facteur plaquettaire 4 sur l'angiogenèse. Par exemple, il peut inhiber la prolifération des cellules endothéliales *in vitro* (Luster et al., 1995). PF4 bloque la migration des cellules endothéliales mais aussi la tubulogenèse, dans du collagène de type I, lors de tests *in vitro* (Feraud et al., 2001). *In vivo*, le facteur plaquettaire 4 peut inhiber l'angiogenèse de la membrane choriollantoïdienne de poulet. Chez la souris, l'implantation de matrigel ou de collagène contenant PF4 produit aussi cet effet (Maione et al., 1990). En revanche, il ne bloque pas la prolifération des cellules tumorales *in vitro* (Sharpe et al., 1990). Le facteur plaquettaire 4 recombinant bloque le développement, chez la souris, des métastases pulmonaires (Kolber et al., 1995). Il inhibe significativement l'angiogenèse, la croissance tumorale et permet ainsi une meilleure survie des souris auxquelles il a été injecté des cellules LLC (Lewis lung carcinoma) transfectées avec un plasmide exprimant PF4 par rapport aux cellules LLC sauvages (Yamaguchi et al., 2005). Enfin, il peut se lier de manière sélective *in vitro*, aux cellules endothéliales et *in vivo* au niveau des neovaisseaux tumoraux, (Borgstrom et al., 1998; Hansell et al., 1995). PF4 peut aussi intervenir au niveau d'un point spécifique du cycle cellulaire et bloquer ainsi la progression des cellules endothéliales en phase S (Gupta and Singh, 1994). Il réduit l'activité de la cycline E-CDK2 ce qui a des conséquences sur la liaison de p21<sup>Cip/WAF1</sup> au complexe cycline E-CDK2 (Gentilini et al., 1999).

### **3) Mécanismes d'inhibition de l'angiogenèse**

Compétition entre les facteurs de croissance (FCs) et PF4 (figure 22 a) : Une caractéristique biologique majeure du facteur plaquettaire 4 est sa haute affinité pour l'héparine et autres glycosaminoglycans anioniques (Slungaard, 2005). Par ce premier mécanisme, PF4 rentre en compétition avec des facteurs de croissance, comme le FGF2 . Ce dernier est alors déplacé de ses sites de liaison, de faible affinité, aux héparanes sulfates (Bikfalvi, 2004; Perollet et al., 1998).

Interaction entre PF4 et les FCs (figure 22 b) : PF4 peut aussi interagir directement avec les facteurs de croissance angiogéniques FGF2 et VEGF<sub>165</sub>. Cette interaction induit un changement de la structure tridimensionnelle du facteur angiogénique ce qui a pour conséquence l'inhibition de la liaison de ce dernier sur son récepteur, de haute affinité, présent à la surface des cellules endothéliales (Gengrinovitch et al., 1995). De plus, PF4 en se liant à FGF2 empêche sa dimérisation puis sa liaison à son récepteur ce qui a aussi des conséquences sur l'internalisation de ce facteur de croissance et sa dégradation.

Liaison de PF4 à un récepteur spécifique (figure 22 c) : Sulpice *et al.* ont émis l'hypothèse que PF4 pouvait, en plus de ses effets anti-angiogéniques indirects, se lier à un récepteur spécifique. Le facteur plaquettaire 4, utilisé à des doses permettant d'inhiber la prolifération cellulaire (10  $\mu$ M), réduit de 95% l'effet activateur de la kinase ERK par FGF2 mais n'affecte pas la voie de signalisation PI3K. Ceci exclut donc la présence d'un simple mécanisme de compétition (Sulpice et al., 2002; Sulpice et al., 2004).

#### **4) Molécules dérivées du facteur plaquettaire 4**

Les formes clivées du facteur plaquettaire 4, PF4<sub>17-70</sub> et PF4<sub>47-70</sub>, demeurent angiostatiques. En effet, le fragment de PF4<sub>17-70</sub> généré par le clivage du facteur plaquettaire 4 par une élastase, au niveau des leucocytes, inhibe efficacement *in vitro* la prolifération des cellules endothéliales mais également l'angiogenèse (Gupta et al., 1995). Le peptide PF4<sub>47-70</sub> affecte lui aussi la prolifération des cellules endothéliales mais également leur migration, l'assemblage et le développement des vaisseaux et l'angiogenèse tumorale (Hagedorn et al., 2001; Jouan et al., 1999). Les mutations du facteur plaquettaire 4, au niveau de motifs basiques, n'affectent pas son pouvoir angiostatique. PF4-241, la forme mutée de PF4 au niveau des quatre lysines carboxy-terminales (lysines 61, 62, 65 et 66 en glutamines), impliquées dans la liaison à l'héparine, est aussi angiostatique que la forme sauvage (Maione et al., 1991). Lorsque le motif DLQ N-terminal (acide aspartique, leucine, glutamine) est remplacé par le motif ELR caractéristique de chimiokines angiogéniques (IL8), ou DLR (acide aspartique, leucine, arginine), cela n'affecte pas le pouvoir angiostatique

de PF4 mais au contraire le renforce (Hagedorn et al., 2002).

## **7 - Le variant naturel de PF4 : PF4v1**

PF4v1, variant naturel de PF4 à été découvert en 1989 par Southern-blot (Green et al., 1989). L'équipe de Paul Johnson a synthétisé une sonde reconnaissant aussi bien PF4 qu'une autre chimiokine de type CXC exprimée elle aussi par les mégacaryocytes : le facteur de croissance plaquettaire CTAP-III (Chemokine connective Tissue Activating Peptide-III) (Deutsch et al., 2000). Cette sonde a permis d'identifier d'autres séquences homologues à PF4 et CTAP-III dont un variant du facteur plaquettaire 4 appelé PF4v1 (ou encore CXCL4L1, PF4<sub>var1</sub>, PF4<sub>alt</sub>, PF4A) (Eisman et al., 1990).

### **1) L'évolution de PF4 vers PF4v1**

Les gènes codants pour PF4 et PF4v1 sont situés sur le chromosome 4q12-21 (Griffin et al., 1987; O'Donovan et al., 1999). La région 4q21 comporte d'autres gènes de chimiokines comme par exemple celui de IL-8 (Modi et al., 1990) ou bien celui de CXCL1 (GRO $\alpha$ ) (Richmond et al., 1988) (Figure 23). De par cette proximité Modi et Chen suggèrent que les gènes de ces chimiokines, ainsi que cinq autres, proviennent d'un tandem de gènes dupliqués à partir d'un gène ancestral localisé sur le chromosome 10, CXCL12 (SDF1) (Figure 24) (Modi et al., 1990).

Le gène pf4v1 est le paralogue de pf4 et il est issu d'une duplication récente car on ne retrouve le gène que dans le génome du singe, du chimpanzé et de l'homme. Le gène pf4v1 est absent chez la souris (Figure 25).

Les ARN pré-messagers PF4 et PF4v1 sont organisés en trois exons et deux introns (Green et al., 1989). Pour le facteur plaquettaire 4, le premier exon de 90 nucléotides est séparé du second (126 bases) par un intron de 319 nucléotides. Le troisième exon, de 84 bases, est quant à lui distant du précédent de 125 nucléotides. Le premier exon codant PF4v1, de 99 nucléotides, est identique à 78,4% à celui de PF4. Il est séparé du second exon par un intron de 320 bases semblable à 87,5% à celui du facteur plaquettaire 4. Le deuxième exon est totalement identique entre les

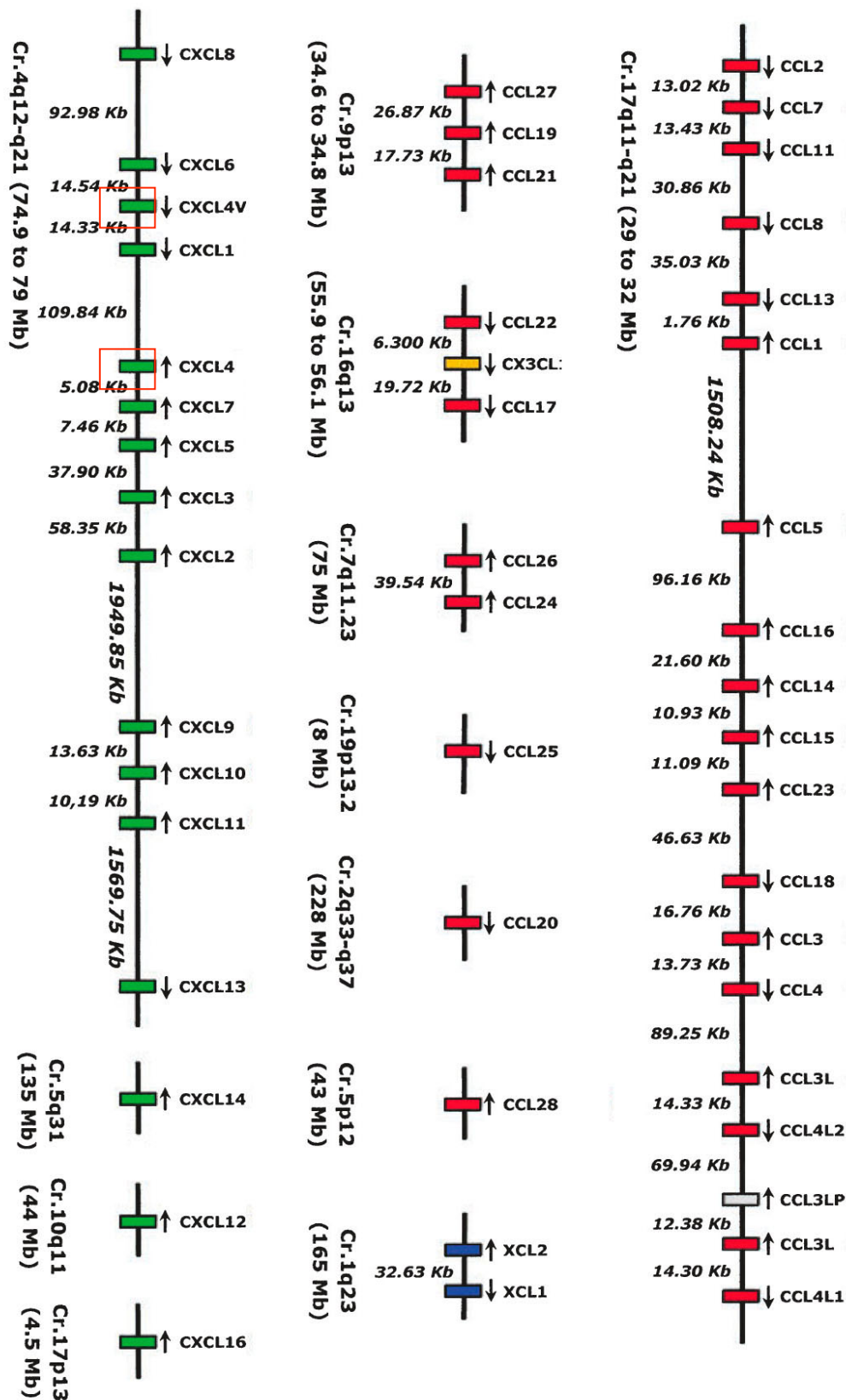


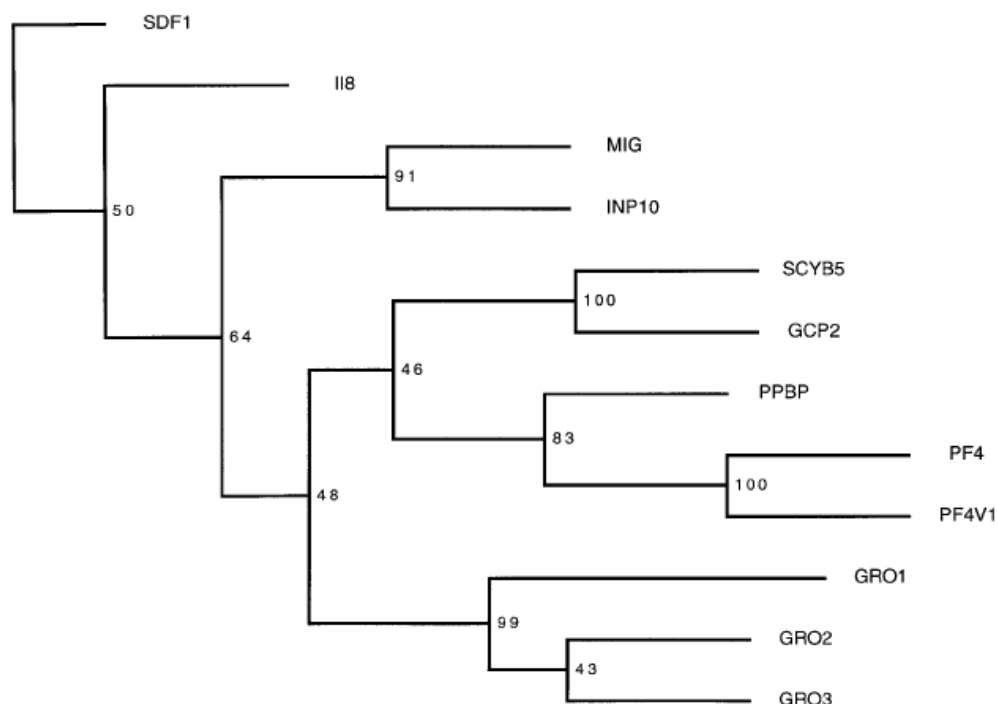
Figure 23: Organisation génique des chimiokines humaines.

Les chimiokines CC sont en rouge, les CXC en vert, les CX3C en jaune et les C en bleu. La distance entre les gènes est exprimée en Kb. Les positions des gènes ou des groupes de gènes, par rapport au commencement du chromosome, sont indiquées en Mb. L'orientation des gènes est indiquée par une flèche.

deux ARN messagers. Pour PF4v1, il est aussi séparé du troisième et dernier exon par un intron de 125 bases. Là aussi les deux séquences nucléiques sont proches puisqu'elles ne diffèrent que de 4%. Enfin, le dernier exon de pf4v1 contient 84 nucléotides codants et seules 6 bases diffèrent par rapport à celui du facteur plaquettaire 4 (Figure 26). L'étude de Cui (Cui et al., 1998) montre que la région promotrice à partir de la position -245 bp du gène pf4 est suffisante, *in vivo*, pour exprimer de façon spécifique la protéine dans les mégacaryocytes. On ne connaît toujours pas celui du gène pf4v1. Les ARN pré-messagers PF4 et PF4v1 ont donc une organisation très proche, ils ne divergent que de 14%. Les ARN messagers matures de PF4 (n° d'accension NCBI: NM\_002619) et de PF4v1 (n° accession NCBI : NM\_002620), sans prendre en compte les régions non traduites, sont quant à eux identiques à 97,4% (Eisman et al., 1990).

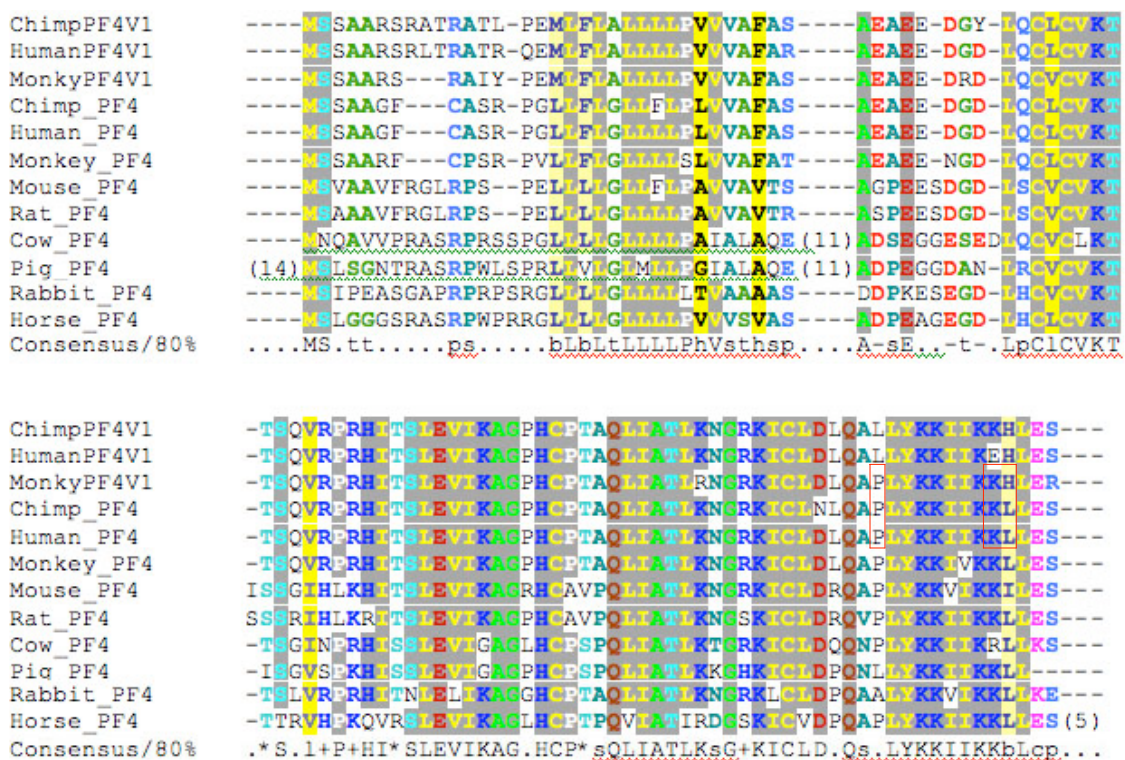
Le premier exon code les 30 acides aminés du peptide signal clivé lors de la maturation de la protéine (Poncz et al., 1987). Les peptides signaux de ces deux protéines divergent de 39%, et la majeure partie est hydrophobe (65% pour PF4 et 69% pour PF4v1). Malgré une hydrophobicité proche, l'équipe de P. Romagnani leur confère des caractéristiques de sécrétion différentes (Lasagni et al., 2007).

Les 70 acides aminés des deux protéines matures quant à eux correspondent aux résidus codés par le second et le troisième exon (Figure 26). **Seuls trois résidus diffèrent entre le facteur plaquettaire 4 et son variant naturel mature** (Figure 19 et Figure 27). Ainsi, la proline 58, la lysine 66 et la leucine 67 de PF4 sont respectivement remplacées par une leucine, un acide glutamique et une histidine pour PF4v1. La proline 58 induit une cassure dans la structure secondaire du facteur plaquettaire 4. Ce résidu est substitué par une leucine chez PF4v1 ce qui doit prolonger l'hélice d'acides aminés dans la direction C-terminale. La substitution de la lysine 66 du facteur plaquettaire 4 par un acide glutamique a pour conséquence la réduction de la charge positive de la région C-terminale de PF4v1 par rapport à PF4, ce qui entraînerait une diminution de la liaison de PF4v1 à l'héparine (Green et al., 1989). Par contre, la présence d'une histidine en position 67 dans PF4v1 à la place d'une leucine dans PF4 ne devrait pas avoir de conséquence majeure et pourrait compenser la charge basique de la lysine substituée. **Néanmoins, on peut observer (Figure 25) que l'histidine est la première variation apparue chez le singe, on peut donc se demander quel a été le gain de fonction ?**



**Figure 24: Arbre phylogénétique des chimiokines de la famille des CXC .**

Cet arbre est basé sur l'alignement des séquences des régions de 66 à 70 acides aminés des protéines matures. Les valeurs aux nœuds représentent les valeurs de « bootstrap » basées sur 1000 réplifications (adapté d'après Modi and Chen, 1998).



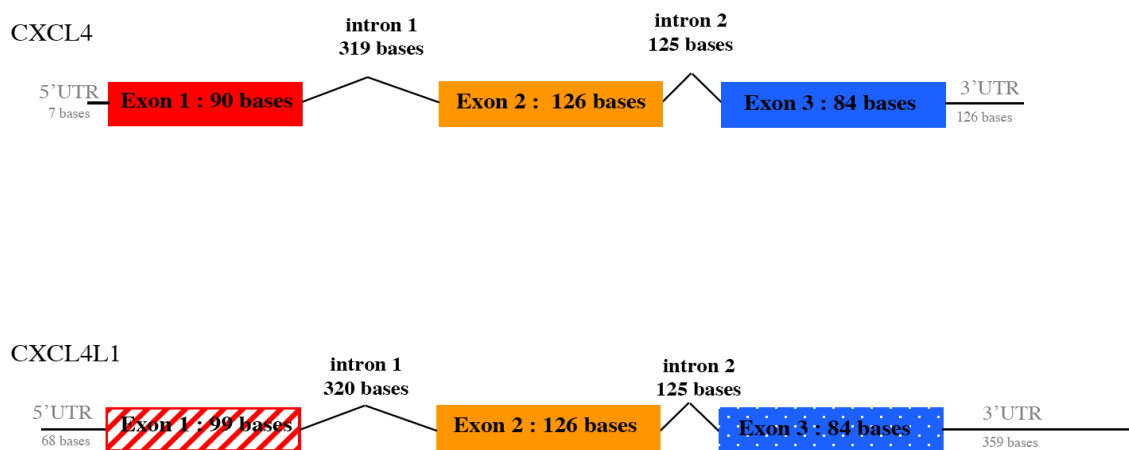
**Figure 25: Alignement des orthologues de PF4 et PF4v1.**

Les modifications, apparues au cours de l'évolution, en acides aminés du domaine C-terminal sont encadrées en rouge.

## **2) Activité angiostatique de PF4v1**

PF4v1 est une chimiokine angiostatique active pouvant peser dans la balance régulant l'angiogenèse. En 2004, l'équipe de Struyf purifie PF4v1 (ainsi que PF4), à partir de plaquettes humaines activées par la thrombine. *In vitro*, il apparaît que PF4v1 (10 à 100 ng/ml) inhibe le chimiotactisme des cellules endothéliales induit par FGF2 ou IL-8, alors que 300 ng/ml de PF4 ne l'affecte pas. Lorsque PF4v1 ou PF4 sont déposées sur la cornée de rat avec IL-8 alors l'effet angiogénique de cette chimiokine est inhibé dans 76% des cas par PF4v1 et seulement dans 22% des cas par PF4 (Struyf et al., 2004).

En 2007 Struyf utilise la protéine PF4v1 recombinant dans différents tests *in vitro* (« wound-healing » et chambre de Boyden), et montre que 50 ng/ml de cette protéine recombinante suffisent à inhiber la migration de cellules endothéliales alors que cet effet n'est obtenu qu'à partir de 200 ng/ml de facteur plaquettaire 4 (Struyf et al., 2007). Des xénogreffes de cellules de carcinomes de poumon et de mélanomes ont été réalisées sur des souris nudes et des souris SCID. Les protéines PF4 et PF4v1 recombinantes ont été injectées à ces souris afin de voir si ces deux chimiokines ont la même activité antitumorale, et ce, indépendamment des leucocytes (souris nude). L'inhibition de la croissance des tumeurs et du pouvoir métastatique des cellules est indépendante du recrutement de lymphocytes B et T (souris SCID). Les différents modèles murins permettent donc de démontrer que PF4v1 recombinante a une activité anti-tumorale plus importante que celle de PF4. Ainsi un retard de croissance des tumeurs et des métastases, mais également une micro vascularisation peu présente due à l'inhibition de l'angiogenèse sont observés. Aucune différence significative du nombre de granulocytes et de monocytes n'est constatée lorsque les tumeurs sont ou non traitées avec PF4 ou PF4v1. Pourtant une étude récente met en évidence le faible pouvoir chimioattractif, pour les neutrophiles et monocytes, du variant naturel de PF4 (Vandercappellen, Noppen et al. 2007). Dans un modèle de souris syngéniques LLC (Lewis lung carcinoma) une diminution de la croissance des tumeurs et du nombre de cellules endothéliales est observée lorsque ces tumeurs sont traitées avec PF4v1 ou CXCL9 (Struyf et al., 2007). Le fait que PF4v1 tout comme CXCL10 et CXCL9 puisse inhiber les effets angiogéniques



|          | CXCL4     | CXCL4L1   | % homologie |
|----------|-----------|-----------|-------------|
| Exon 1   | 90 bases  | 99 bases  | 78,4 %      |
| Intron 1 | 319 bases | 320 bases | 87,5 %      |
| Exon 2   | 126 bases | 126 bases | 100 %       |
| Intron 2 | 125 bases | 125 bases | 96 %        |
| Exon 3   | 84 bases  | 84 bases  | 92,8 %      |

**Figure 26: Représentation schématique et comparaison des préARNm de PF4 et PF4v1.**

CXCL4 : **MSSAA - - - GF CASRPGLLFL GLLLLPLVVA FAS**  
CXCL4L1 : **MSSAARSRLT RATRQEMLFL ALLLLPYVVA FAR**

CXCL4 : **A/EAEEDGDLQ CLCVKTTTSQV RPRHITSLEV IKAGPHCPTA QLI**  
CXCL4L1 : **A/EAEEDGDLQ CLCVKTTTSQV RPRHITSLEV IKAGPHCPTA QLI**

CXCL4 : **ATLKNGRKIC LDLQAPLYKK IKKLLLES**  
CXCL4L1 : **ATLKNGRKIC LDLQALLYKK IKKEHLES**

**Figure 27: Comparaison des séquences en acide aminé de PF4 et PF4v1.**

Respectivement en rouge, orange et bleu les acides aminés codés par le premier, le deuxième et le troisième exon. Les résidus qui diffèrent entre PF4 et P4v1 sont soulignés. La barre oblique indique le site de clivage du peptide signal (adapté d'après Green et al, 1989).

dus à IL-8 indique que des GPCR doivent entrer en jeu (Conti and Rollins, 2004).

L'affinité de PF4v1 pour l'héparine est moins forte que celle du facteur plaquettaire 4. Les études menées sur ce dernier montrent que cette chimiokine se lie à l'héparine majoritairement grâce aux résidus C-terminaux (61 à 70) (Stuckey et al., 1992). Or ces derniers ne sont pas homologues à 100% entre PF4 et PF4v1. Par contre ce variant naturel a des propriétés angiostatiques plus importantes. Cette caractéristique doit impliquer des liaisons de PF4v1 à des RCPGs mais aussi à des glycosaminoglycans. **Les mécanismes moléculaires qui permettent à PF4v1 d'inhiber l'angiogenèse de manière plus efficace que PF4 restent à déterminer.**

**À la suite des travaux que je viens de citer, les questions qui restaient ouvertes étaient :**

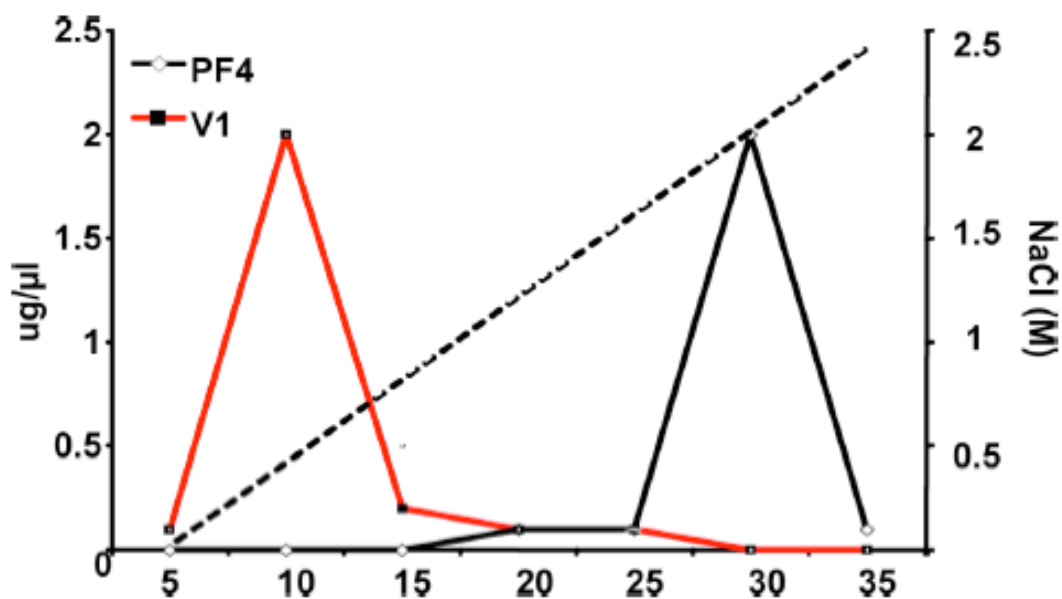
- **Quels sont les déterminants qui font que PF4 et PF4v1 présentent tant de différences quant à leur association aux GAGS ?**
- **En quoi les associations aux GAGs sont-elles déterminantes pour l'activité biologique des deux facteurs ?**
- **Bien que très proches, ces deux facteurs utilisent-ils les mêmes voies de signalisation ?**



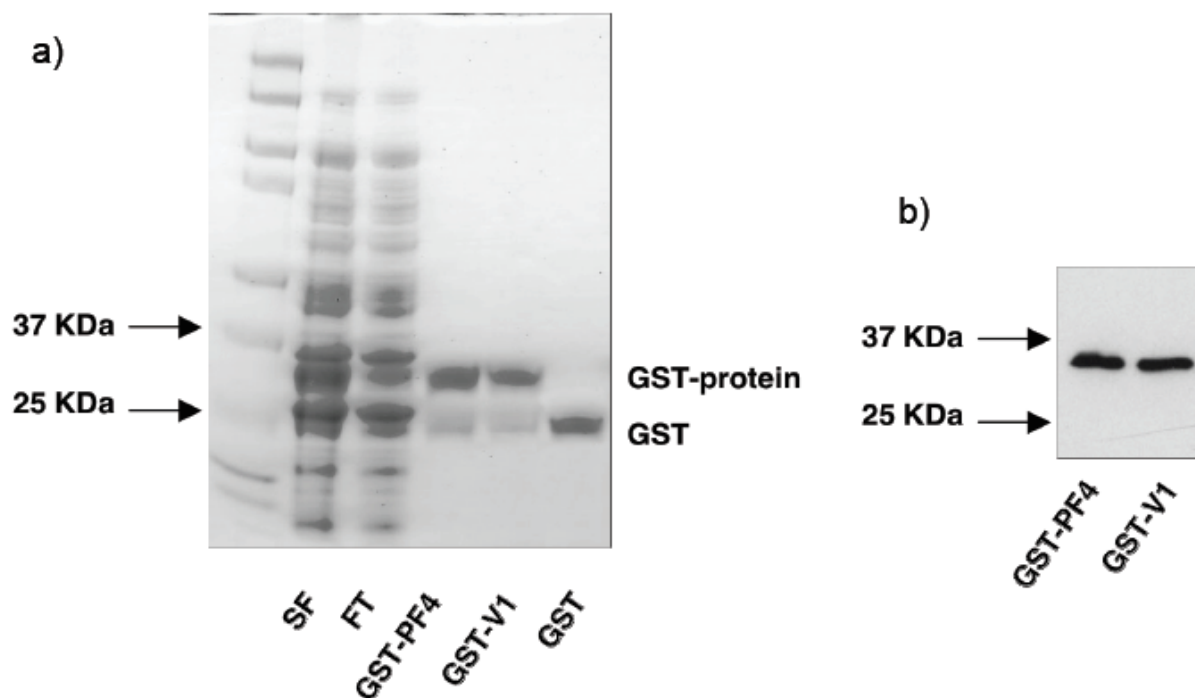
## **Chapitre II : RÉSULTATS**



**Partie I.      PF4v1, une molécule antiangiogénique plus  
diffusible et plus biodisponible que PF4**



**Figure 28 : Représentation schématique de la purification de PF4 et PF4v1 sur colonne d'affinité à l'héparine.** Les lysats bactériens contenant PF4 ou PF4v1 sont injectés au travers d'une colonne d'héparine sépharose. La colonne est ensuite lavée avec un gradient croissant de NaCl (pointillés). Les protéines recombinantes PF4 (noir) et PF4v1 (rouge) contenues dans les différentes fractions d'élution (5 à 35) sont dosées par ELISA anti-PF4, qui reconnaît les deux protéines.



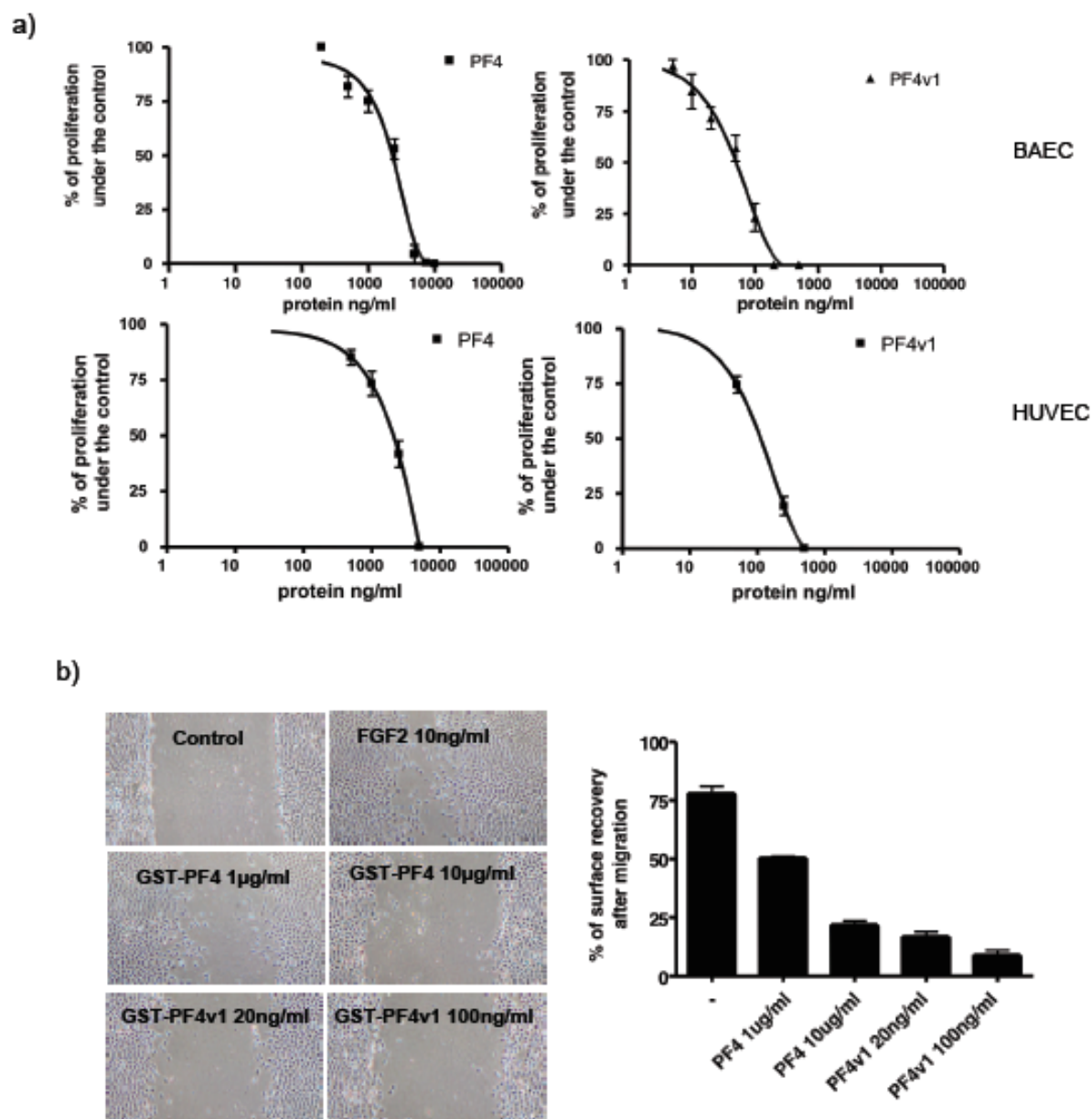
**Figure 29 : Purification des protéines GST-PF4 et GST-PF4v1 sur colonne d'affinité au Glutathion.** Les protéines recombinantes GST-PF4 et GST-V1 sont purifiées sur colonne d'affinité au glutathion et concentrées. La purification est vérifiée en déposant 1ug de protéines sur gel SDS-Pages. Les protéines sont ensuite révélées par coloration au bleu de coomassie (a) ou transférées sur membrane de nitrocellulose et révélées par l'anticorps mabPF4(R&D System) (b). Les protéines contaminantes ne sont contaminées que par un peu (<5%) de protéines GST libre (25KDa), les protéines recombinantes ont la taille attendue de 34 KDa et elles sont bien reconnues par l'anticorps monoclonal, qui reconnaît les deux protéines. SF : Fraction Soluble, FT : Flow Through, ces fractions sont issues de la purification de la protéine GST-PF4.

## **1 - Analyse in vitro de l'affinité de PF4v1 pour les GAGs**

### **1) Purification des protéines par affinité à l'héparine**

Pour étudier les différences de mécanismes d'inhibition de l'angiogenèse par les deux facteurs antiangiogéniques PF4 et PF4v1, nous avons produit les protéines recombinantes chez *E.Coli*. Le facteur PF4 est connu pour son affinité importante pour l'héparine même si elle n'a jamais été précisément déterminée. Il semblait donc judicieux de purifier les protéines recombinantes par affinité à l'héparine (Figure 28). L'utilisation d'un gradient de NaCl permet une élution rapide des protéines qui ont le moins d'affinité et une élution plus tardive des protéines qui ont une affinité importante. Nous avons ainsi pu observer que les deux protéines recombinantes PF4 et PF4v1 étaient éluées par des concentrations de NaCl très différentes. PF4 (élution : 2M NaCl) interagit aussi fortement que prévu alors que PF4v1 (élution : 0,5M NaCl) interagit plus faiblement mais spécifiquement. Les différentes fractions obtenues sont dosées par le test ELISA commercial qui ne distingue pas PF4v1 de PF4. Nous obtenons des fractions éluées de concentration équivalente en protéines.

La différence d'affinité pour l'héparine entre les deux facteurs PF4 et PF4v1 avait été observée lors de la purification des deux protéines, à partir d'extrait de plaquettes, par l'équipe de Strieter (Struyf et al., 2004). De plus, les différences en acides aminés entre les deux protéines matures nous permettaient de postuler une différence d'affinité mais nous ne nous attendions pas à une telle différence. Le facteur PF4v1, le plus antiangiogénique des deux protéines, semble donc avoir beaucoup moins d'affinité pour l'héparine. Il était donc intéressant de savoir en quoi l'importance de cette différence d'affinité pour l'héparine pouvait être reliée aux différences d'activité antiangiogénique observées entre PF4 et PF4v1. En effet, il est admis qu'un facteur antiangiogénique doit être très diffusible et biodisponible pour avoir un pouvoir antiangiogénique à distance et particulièrement lorsque son action se produit sur le développement des métastases. On peut aussi se demander si la forte affinité de PF4 pour l'héparine est nécessaire pour son activité biologique, notamment pour son activité antiangiogénique. Enfin, la détermination précise des



**Figure 30 : Test de prolifération et de migration de cellules endothéliales stimulées avec les protéines GST-PF4 et GST-PF4v1.** Les BAEC (Bovine Aortic Endothelial Cell) et les HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) sont cultivées en présence de FGF2 (10ng/ml) et de différentes quantités de protéines recombinantes. Après 48h, la prolifération est quantifiée par dosage MTT. Le pourcentage de prolifération est déterminé par rapport au témoin cultivé en présence de FGF2 (a). L'effet des protéines recombinantes sur la migration des cellules BAEC est représenté par le pourcentage de surface recouverte par les cellules après 18h de stimulation par rapport à la surface initiale de la plaie (b). - : FGF2 à 10ng/ml. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes réalisées en triplicates.

a)

| ng/ml | PF4  | PF4v1 |
|-------|------|-------|
| IC50  | 2253 | 52.46 |
| Imax  | 5000 | 200   |

b)

| ng/ml | PF4  | PF4v1 |
|-------|------|-------|
| IC50  | 2500 | 110   |
| Imax  | 5000 | 200   |

**Table 7 : Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales BAEC (a) et HUVEC (b) par les protéines PF4 et PF4v1.** IC50 : concentration de protéines pour inhiber 50% de la prolifération. Imax : concentration maximale de protéines pour inhiber totalement la prolifération. Les concentrations sont ng/ml.

constantes affinités des deux facteurs PF4 et PF4v1 pour les GAGs (GlycoAminoGlycannes) est un paramètre important pour aborder ces questions de diffusibilité et surtout de biodisponibilité qui pourraient expliquer les différences d'activité antiangiogénique.

## **2) Purification des protéines recombinantes en absence d'interaction avec l'héparine**

Pour l'étude des interactions des facteurs PF4 et PF4v1 avec les GAGs, il est préférable d'utiliser des protéines recombinantes purifiées par une méthode qui ne fait pas intervenir des interactions avec l'héparine. En effet, lors de ce type de purification, la conformation des protéines est modifiée et, surtout, des fragments d'héparine peuvent être co-élus avec les protéines recombinantes. Nous avons donc fusionné les protéines à la Glutathion-S-Transférase (GST) pour ensuite les purifier sur colonne de glutathion-sépharose. Le vecteur d'expression procaryote dans lequel nous avons cloné l'ADNc des protéines matures PF4 et PF4v1 permet l'expression de protéines recombinantes fusionnées à la GST et possédant un site de clivage par la protéase PreScission pour purifier la protéine d'intérêt, seule. Cette purification nous a permis d'obtenir des quantités importantes de protéines recombinantes, 10mg/ml de GST-PF4 et 5mg/ml de GST-PF4v1 dans 500µl. L'intégrité et la pureté (> 95%) des protéines ont été vérifiées sur gel SDS-PAGE suivi soit d'une coloration au bleu de Coomassie soit d'un Western-blot utilisant un anticorps anti-PF4 qui révèle de façon identique les deux protéines (Figure 29). Les poids moléculaires (33KDa) ainsi que la pureté des deux protéines de fusion sont corrects même si on peut observer une faible contamination (< 5%) par de la GST seule (25KDa).

L'étape de clivage des protéines recombinantes par protéase PreScission rallonge considérablement le temps de purification des protéines recombinantes et il en résulte une augmentation de la dégradation de nos protéines et un rendement très décevant (données non montrées). Il était donc nécessaire de disposer de données permettant de savoir si nous pouvions utiliser les protéines de fusion au même titre que les protéines « normales ». La façon la plus « globale » était donc de

tester nos protéines recombinantes pour leur capacité à inhiber la prolifération et la migration de cellules endothéliales *in vitro*.

### **3) Activité biologique des protéines recombinantes GST-PF4 et V1**

Les facteurs PF4 et PF4v1 sont des inhibiteurs de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*, mais qui ont des efficacités relatives très différentes. En effet, pour inhiber la **migration** *in vitro* de cellules endothéliales stimulées par du FGF2 ou IL8, la quantité optimum de facteur PF4 à utiliser est de 10ug/ml alors que pour le facteur PF4v1, il suffit de 20ng/ml pour obtenir des résultats comparables (Struyf et al., 2007). Pour inhiber la prolifération *in vitro* de cellules endothéliales stimulées par du FGF2 ou du VEGF, il faut traiter les cellules avec 5ug/ml de PF4 (Perollet et al., 1998; Sulpice et al., 2002; Sulpice et al., 2004). Par contre, le potentiel inhibiteur de la prolifération *in vitro* de PF4v1 n'a pas été déterminé.

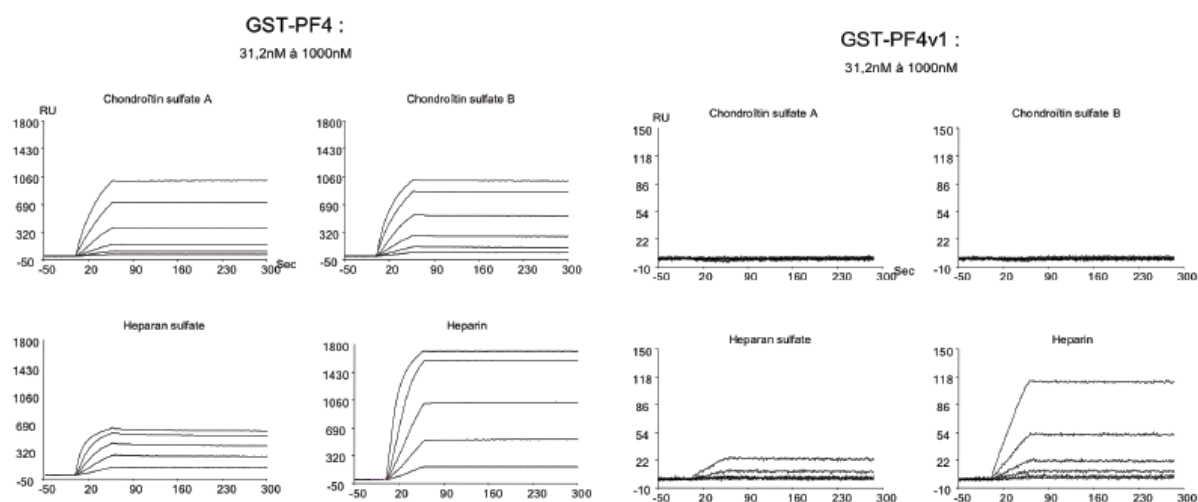
Pour étudier les activités biologiques des protéines recombinantes GST-PF4 et GST-PF4v1 nous avons déterminé le potentiel de chacune de ces protéines à inhiber la prolifération *in vitro* de cellules endothéliales bovine (BAEC) et de cellules endothéliales humaines de veine ombilicale (HUVEC) stimulées par du FGF2 (Figure 30). Nous obtenons des résultats identiques entre les deux lignées. La protéine GST-PF4 inhibe la prolifération avec une efficacité maximum (Imax) à 5ug/ml (Table 7) et un IC50 de 2,3ug/ml, ainsi que la migration des cellules BAEC, induite par le FGF2 pendant 18h, comme décrit précédemment (<80%). Pour la protéine GST-PF4v1, nous retrouvons les différences d'efficacité relative abordées précédemment. L'inhibition de la prolifération et de la migration *in vitro* des cellules endothéliales est plus importante avec PF4v1 qu'avec PF4. Il suffit de 40 fois moins de protéines (IC50 = 53ng/ml) pour inhiber la prolifération et de 500 fois moins de protéines (20ng/ml de PF4v1 contre 10ug/ml de PF4) pour inhiber la migration.

Les protéines de fusion GST-PF4 et GST-PF4v1 produites ont des activités biologiques *in vitro* identiques aux activités décrites pour les protéines natives purifiées à partir de plaquettes (Struyf et al., 2007), alors que la GST seule (utilisée jusqu'à 100ug/ml, données non montrées) n'a aucune activité antiangiogénique sur les lignées utilisées dans cette étude. Ces protéines de fusion pourront être utilisées pour étudier les interactions *in vitro* de PF4 et PF4v1 avec les GAGs.

#### **4) Détermination des constantes d'affinités de GST-PF4 et V1 pour les GAGs par SPR**

Le premier rôle décrit pour le facteur PF4 a été son activité anti-héparine. Depuis, son affinité à l'héparine a été largement étudiée. Elle est impliquée dans l'agrégation plaquettaire (donc dans la coagulation), dans la fixation des neutrophiles aux membranes des cellules endothéliales, dans le recrutement des macrophages au sein des stries lipidiques des plaques d'athéromes et dans son activité antiangiogénique. Enfin, l'interaction de PF4 avec l'héparine est la cause d'une pathologie appelée HIT, pour Thrombopénie Induite par l'Héparine, qui survient chez les patients traités à l'héparine (Linkins and Warkentin, 2008; Piccin et al., 2007). Cette pathologie auto-immune est causée par un anticorps dirigé contre le complexe PF4-héparine. Les symptômes sont une thrombopénie, soit une diminution drastique du nombre de plaquettes, et paradoxalement une hypercoagulabilité. L'incidence de cette maladie varie de 0.1% à 5% des patients traités, en fonction du type d'héparine utilisé. On comprend donc l'importance accordée à l'affinité du facteur PF4 pour les GAGs. Malgré cela, la constante d'affinité n'a jamais été déterminée précisément.

Pour étudier les interactions des facteurs PF4 et PF4v1 avec les GAGs nous avons utilisé la technologie SPR (Surface Plasmon Resonance), qui permet de visualiser des interactions en temps réel (Beattie et al., 2008; Yu et al., 2005). Cette expérience de SPR permet de confirmer que notre protéine recombinante GST-PF4 interagit avec l'héparine immobilisée mais aussi avec d'autres GAGs, héparanes sulfates et chondroïtines sulfates, qui constituent les motifs glycosylés majeurs des membranes cellulaires. Nous avons ensuite réalisé une analyse des cinétiques des interactions en injectant différentes concentrations de protéines recombinantes (Figure 31). Grâce à l'utilisation du logiciel BIAevaluation et en choisissant le modèle d'interaction Langmuir, nous avons pu déterminer les différentes constantes d'association et de dissociation, et donc les constantes d'affinités, pour chacun des GAGs immobilisés (Table 8). Comme contrôle, nous montrons que la protéine GST ne lie pas les différents GAGs (données non montrées). La protéine GST-PF4, quant à elle, lie les GAGs avec de très fortes affinités, de  $800\text{nM}^{-1}$  pour les chondroïtines sulfates A à  $1.59\text{nM}^{-1}$  pour l'héparine. Les complexes formés avec les différents GAGs ont une stabilité remarquable et comparable car les constantes de dissociation sont pratiquement identiques (de  $1.55 \times 10^{-3}$  à  $1.58 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Les constantes



**Figure 31 : Interaction des protéines PF4, PF4v1 avec les GAGs.** Sensogrammes résultant de l'injection de différentes concentrations des protéines recombinantes GST-PF4 et GST-PF4v1 (de 31,2nM à 1uM) sur les GAGs immobilisés (90 RU). Ces sensogrammes résultent du différentiel entre le canal d'intérêt et le canal de référence.

| KD (M)    | Heparin  | Heparan Sulfate | Chondroitin Sulfate A | Chondroitin Sulfate B |
|-----------|----------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| GST-PF4   | 1.59E-09 | 8.50E-09        | 8.02E-07              | 6.16E-08              |
| GST-PF4v1 | 5.34E-06 | 9.06E-04        | 0                     | 0                     |

**Table 8 : Constantes d'affinité de PF4 et PF4v1 pour les différents GAGs.** Ces constantes sont obtenues grâce aux sensogrammes résultant de l'injection de différentes concentrations (31.2nM à 1uM) des protéines recombinantes sur les GAGs immobilisés. Les cinétiques d'interaction sont analysés selon le modèle Langmuir et les constantes d'association et de dissociation sont obtenues par le logiciel BIAevaluation.

d'association sont donc les paramètres qui varient dans la détermination des affinités (de  $1.93 \times 10^4$  à  $9.94 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ).

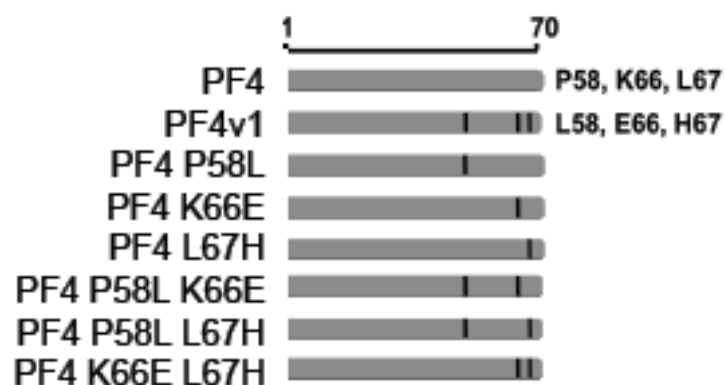
Par contre, comme nous l'avions observé précédemment, la protéine recombinante GST-PF4v1 se lie à l'héparine et aux héparanes sulfates avec des affinités beaucoup plus modérées. Ses constantes d'affinités sont de  $5.34 \mu\text{M}$  pour l'héparine et de  $9.06 \mu\text{M}$  pour les héparanes sulfates. De plus, GST-PF4v1 ne lie pas les chondroïtines sulfates. Les complexes formés avec les différents GAGs sont stables car les constantes de dissociation sont pratiquement identiques à ceux de PF4 (de  $3.3 \times 10^{-3}$  à  $9.49 \times 10^{-3} \text{ S}^{-1}$ ). Le critère majeur distinguant PF4v1 et PF4 est donc relié aux constantes d'association (de  $3.6$  à  $1.78 \times 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ).

La protéine GST-PF4v1 a beaucoup moins d'affinité pour les GAGs que la protéine GST-PF4 alors que ces deux protéines n'ont que trois acides aminés de différence. L'enjeu suivant a donc été de déterminer l'acide aminé responsable de la différence d'affinité pour les GAGs apparus au cours de l'évolution de PF4 vers PF4v1.

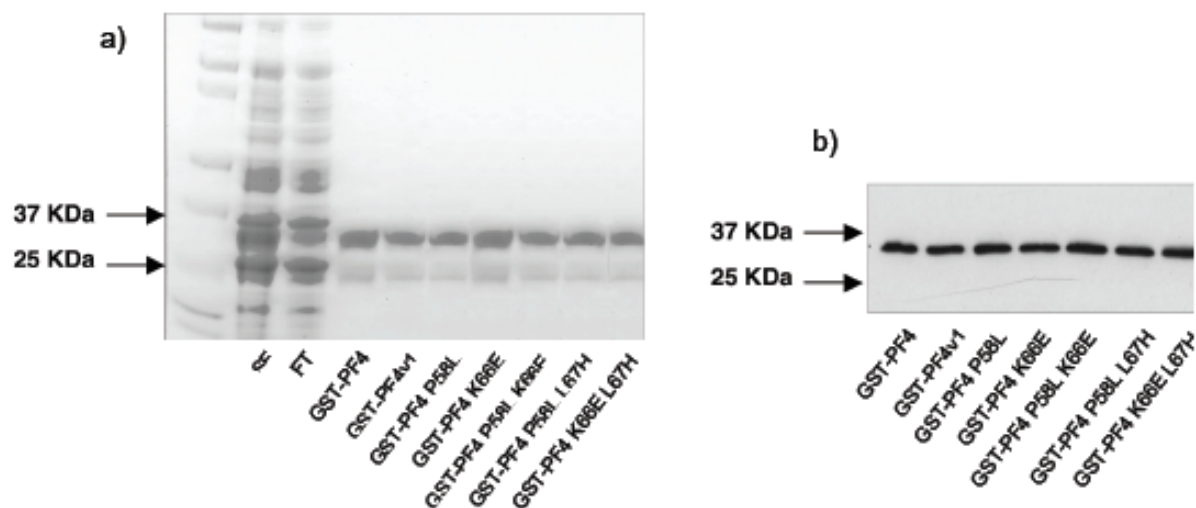
## **2 - Rôle de l'histidine 67 dans les différences de rétention membranaire et de diffusibilité entre PF4 et PF4v1**

### **1) Présentation des différents mutants de PF4**

Une modification des affinités pour les GAGs était prévisible car ces acides aminés sont situés au niveau de l'hélice alpha C-terminale de PF4, laquelle contient le domaine, déjà cartographié, de liaison aux GAGs. L'équipe de M. Poncz, qui a caractérisé PF4v1, a émis l'hypothèse que la substitution de la proline 58 et de la lysine 66 de PF4 par une leucine et un glutamate dans PF4v1, pourrait modifier l'affinité de la protéine pour les GAGs. Pour vérifier cela, nous avons généré les ADNc de différents mutants de PF4 codant pour les différentes combinaisons possibles des acides aminés qui diffèrent entre PF4 et PF4v1 (Figure 32). Nous avons aussi généré l'ADNc de la protéine PF4-241, créé par l'équipe de R.J. Sharpe, dont les quatre lysines C-terminales sont substituées par des glutamates et qui ne lie plus que très faiblement les GAGs (Maione et al., 1991). Ces ADNcs ont été clonés



**Figure 32 : Représentations schématiques des différents mutants de PF4.** Les acides aminés communs entre les différentes protéines sont représentés par un rectangle gris et les acides aminés qui varient sont représentés par des traits noirs.



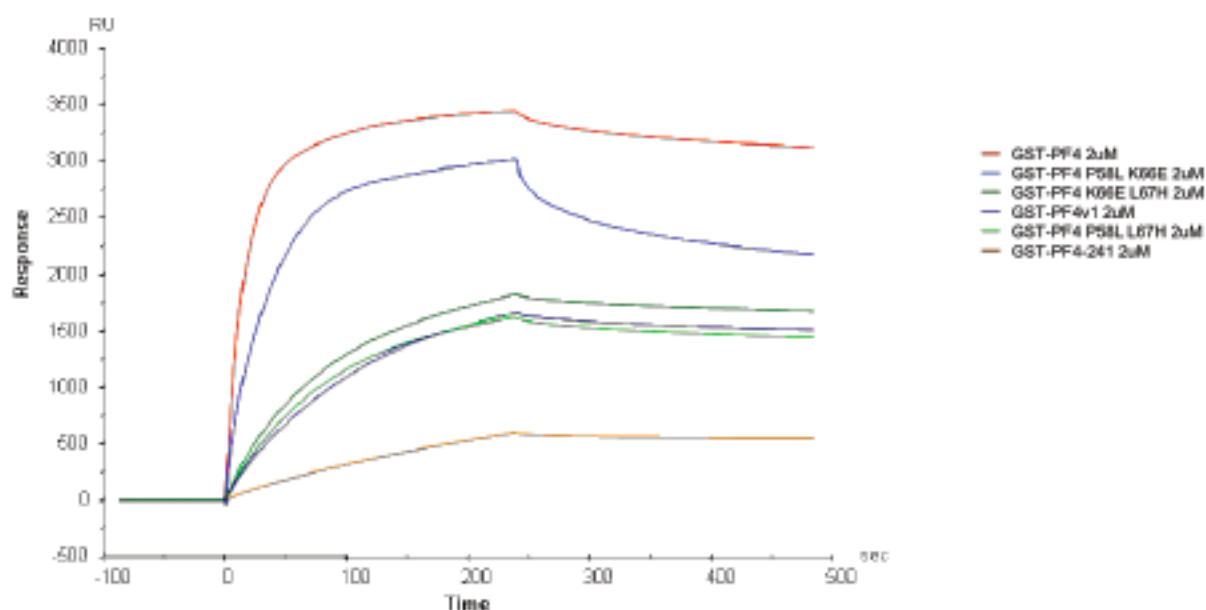
**Figure 33 : Purification des protéines mutantes sur colonne d'affinité au Glutathion.** Gel de coomassie et western-blot des protéines recombinantes après purification sur colonne d'affinité au glutathion. Toutes les protéines de fusion font la taille attendue de 34KDa (a) et elles sont bien détectées par l'anticorps mabPF4 (b).

dans le même vecteur d'expression procaryote que précédemment pour produire des protéines fusionnées à la GST.

La purification par affinité au glutathion nous a permis d'obtenir des quantités importantes des différentes protéines recombinantes sauf pour le mutant GST-PF4 L67H. Nous n'avons jamais réussi à produire suffisamment de protéine GST-PF4 L67H pour pouvoir l'étudier. Par contre, l'intégrité et la pureté (> 95%) des autres protéines ont été vérifiées sur gel SDS-PAGE suivi soit d'une coloration au coomassie ou d'un western-blot utilisant un anticorps anti-PF4 (Figure 33). Les poids moléculaires (33KDa) ainsi que la pureté des protéines de fusion sont corrects même si on peut observer, comme précédemment, une contamination (< 5%) par de la GST seule (25KDa).

## **2) Rôle de l'histidine 67 dans l'interaction PF4v1/GAGs**

Pour étudier les interactions des différentes protéines mutantes de PF4 avec les GAGs nous avons utilisé la technologie SPR. Cette expérience de SPR met en évidence, de manière très surprenante, que c'est la substitution de la leucine 67 par une histidine qui modifie principalement l'affinité de PF4 avec l'héparine immobilisée (Figure 34). Nous avons ensuite réalisé une analyse des cinétiques des interactions en injectant différentes concentrations de protéines recombinantes. L'utilisation du logiciel BIAevaluation et le choix du modèle d'interaction Langmuir, nous ont permis de déterminer les différentes constantes d'association et de dissociation, et donc les constantes d'affinités, pour chacun des GAGs immobilisés (Table 9). Les protéines GST-PF4 P58L et GST-PF4 K66E ont des affinités pour l'héparine et les héparanes sulfates équivalentes à celles de GST-PF4. Les deux substitutions ne modifient pas, individuellement, les constantes d'association et de dissociation. La protéine double mutant GST-PF4 P58L K66E lie aussi les GAGs avec de très fortes affinités, de 3.34nM pour l'héparine et de 32.9nM pour les héparanes sulfates. Les complexes formés avec les différents GAGs sont légèrement moins stables que pour GST-PF4. En effet, les constantes d'association sont pratiquement identiques (de  $7.19 \times 10^4$  et  $6.35 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ), mais les constantes de dissociation sont plus faibles (de  $2.37 \times 10^{-3}$  et  $1.8 \times 10^{-4} \text{ S}^{-1}$ ).



**Figure 34 : Interaction des protéines mutantes avec les GAGs.** Sensogrammes résultant de l'injection des différentes protéines recombinantes, à la même concentration de 2μM, sur les GAGs immobilisés (140RU). Ces sensogrammes résultent du différentiel entre le canal d'intérêt et le canal de référence.

| KD (M)            | Heparin  | Heparan Sulfate |
|-------------------|----------|-----------------|
| GST-PF4           | 1.59E-09 | 8.60E-09        |
| GST-PF4v1         | 5.34E-06 | 9.06E-04        |
| GST-PF4 P58L      | 2.63E-09 | 5.25E-08        |
| GST-PF4 K66E      | 1.44E-09 | 1.02E-08        |
| GST-PF4 L67H      | ND       | ND              |
| GST-PF4 P58L K66E | 3.34E-09 | 3.29E-08        |
| GST-PF4 P58L L67H | 8.61E-06 | 1.15E-04        |
| GST-PF4 K66E L67H | 4.21E-08 | 3.89E-04        |

**Table 9 : Constantes d'affinité des mutants de PF4 pour les différents GAGs.** Ces constantes sont obtenues grâce aux sensogrammes résultant de l'injection de différentes concentrations (31.2nM à 1μM) des protéines recombinantes sur les GAGs immobilisés. Les cinétiques d'interaction sont analysés selon le modèle Langmuir et les constantes d'association et de dissociation sont obtenues par le logiciel BIAevaluation.

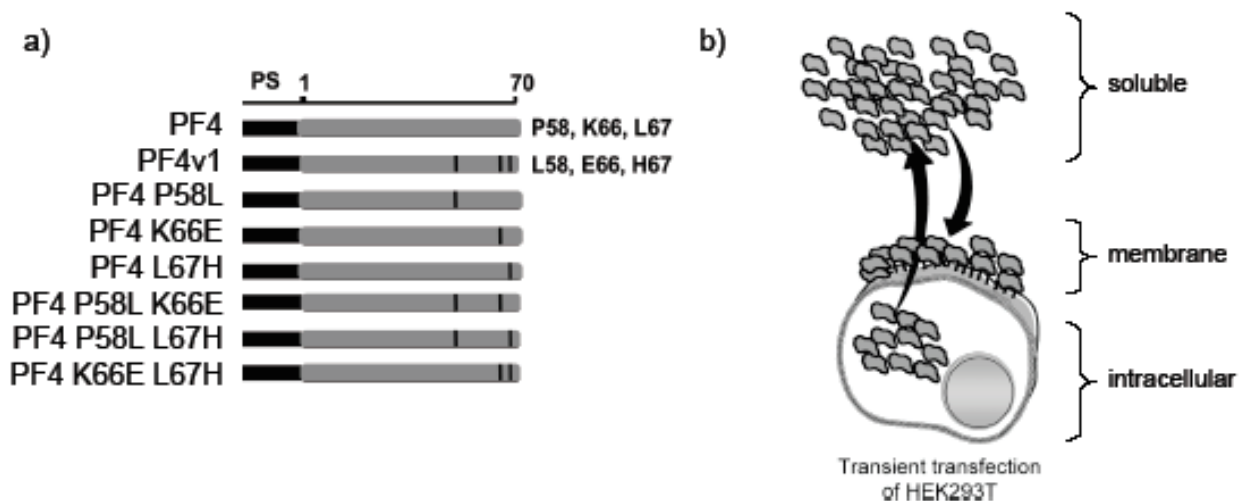
De façon tout à fait inattendue, la substitution de la leucine 67 par une histidine dans les doubles mutants GST-PF4 P58L L67H et GST-PF4 K66E L67H, modifie de manière très importante l'affinité des protéines pour les GAGs (Figure 34, Table 9). Les cinétiques d'affinité des protéines GST-PF4 P58L L67H et GST-PF4 K66E L67H pour les GAGs sont similaires à celles de GST-PF4v1. Ces protéines mutantes ont des constantes d'affinité, pour l'héparine, pratiquement identiques à celles de GST-PF4v1. De plus, la présence de l'histidine 67 inhibe totalement l'affinité des protéines GST-PF4 P58L L67H et GST-PF4 K66E L67H pour les chondroïtines sulfates, par rapport aux protéines GST-PF4 P58L et GST-PF4 K66E.

La protéine contrôle GST-PF4-241 lie les GAGs avec une affinité tellement faible qu'une analyse cinétique des interactions ne nous a pas permis de déterminer les constantes d'affinité. Ce résultat est en accord avec les travaux des équipes de J.T. Daly et R.J. Sharpe, qui ont démontré que le domaine C-terminal et plus particulièrement les quatre lysines de l'hélice alpha, est essentiel pour l'interaction entre la protéine PF4 et les GAGs (Maione et al., 1991; Mayo et al., 1995).

La substitution de la leucine 67 par une histidine dans la protéine PF4v1 est donc responsable de l'importante perte d'affinité de PF4v1 pour les GAGs membranaires. Cette analyse *in vitro* des affinités suggère qu'il doit exister d'importantes différences de diffusibilité et surtout de biodisponibilité *in vivo* entre les deux facteurs PF4 et PF4v1.

### **3) Rétention membranaire de PF4 et PF4v1 après leur sécrétion cellulaire**

Pour étudier la diffusibilité et la biodisponibilité des facteurs PF4 et PF4v1 dans un contexte plus physiologique, nous nous sommes intéressés à la rétention de ces protéines au niveau des membranes des cellules qui les synthétisent et les sécrètent. Cette étude préliminaire *ex vivo* nous permet d'analyser la diffusibilité et la biodisponibilité des facteurs PF4 et PF4v1 sur le site même de leur sécrétion. Une étude complémentaire *in vivo*, chez la souris, nous permettra d'étudier ces paramètres dans des conditions beaucoup plus complètes faisant intervenir aussi la demi-vie des protéines soumises aux contraintes de la circulation sanguine, etc.

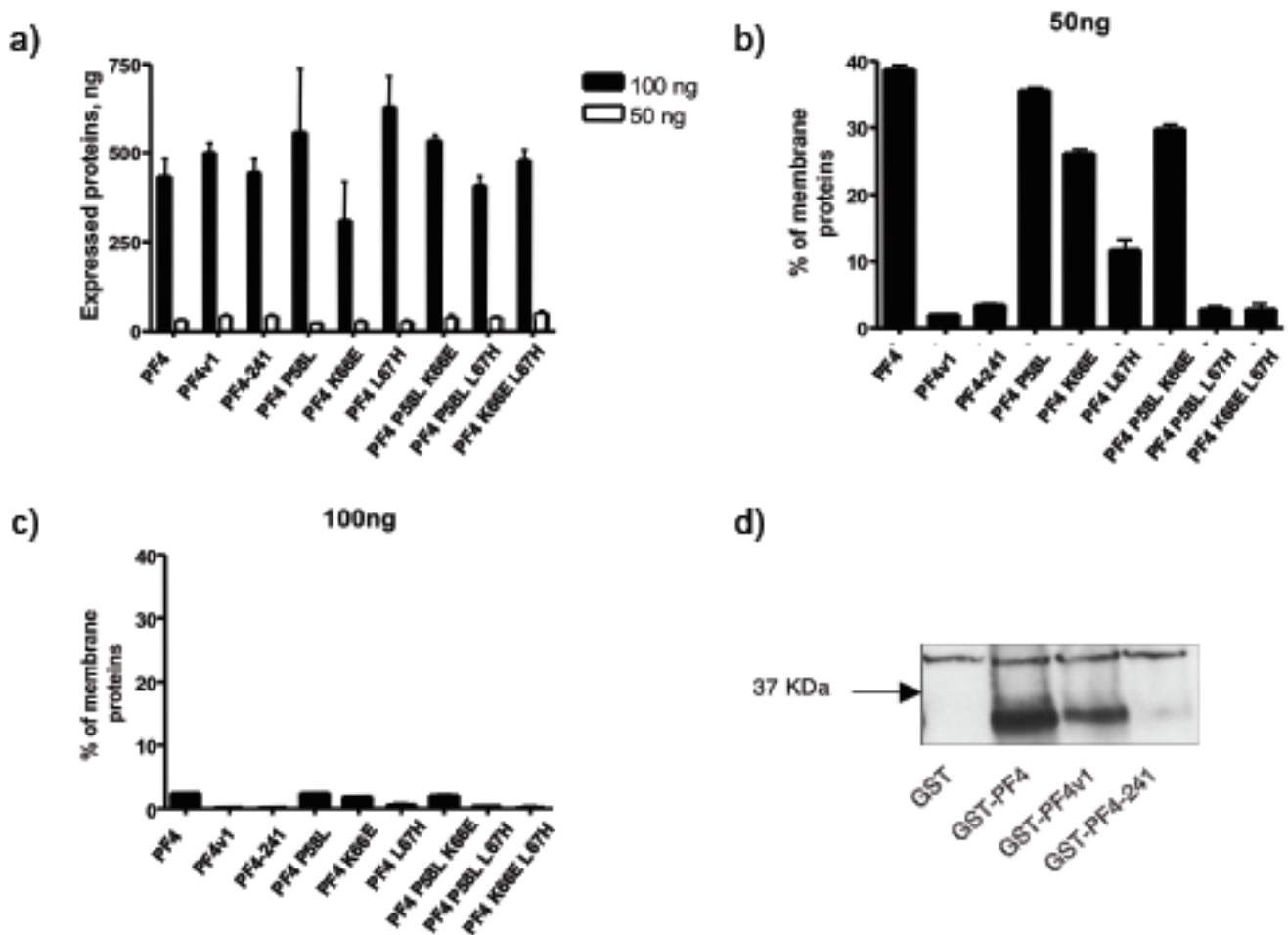


**Figure 35 : Modèle de sécrétion et de rétention membranaire de PF4, PF4v1 et des mutants.** a) représentation schématique des mutants de PF4. Les acides aminés communs entre les différentes protéines sont représentés par un rectangle gris et les acides aminés qui varient sont représentés par des traits noirs. Pour la sécrétion des protéines par les cellules eucaryotes, les ADNc sont en fusion avec la séquence codant pour le peptide signal de PF4v1 (rectangle noir). b) modèle de sécrétion et de rétention membranaire. Après 48h d'expression, les membranes des cellules sont lavées avec 2M NaCl et les protéines sont quantifiées par ELISA anti-PF4. Les protéines présentes dans le milieu et dans les cellules sont aussi quantifiées par ELISA anti-PF4. On peut ainsi déterminer le pourcentage de protéine membranaire.

Les ADNc des protéines PF4, PF4v1 et des différents mutants sont exprimés de manière transitoire et indépendante dans des cellules HEK293T (Human Embryonic Kidney). L'intérêt de ces cellules est qu'elles ne présentent aucune sensibilité biologique à ces facteurs. De plus, pour nous affranchir des différences de sécrétion observées entre PF4 et PF4v1 par l'équipe de P. Romagnani, toutes les protéines matures sont fusionnées au peptide signal de PF4v1 (Figure 35, a), plus efficace que celui de PF4 dans ce type cellulaire (Lasagni et al., 2007). Après 48h d'expression, les cellules sont lavées avec 2M NaCl. Cette fraction, appelée membrane, contient les protéines retenues au niveau des membranes cellulaires (Figure 35, b). Les protéines PF4, PF4v1 et les différents mutants sont quantifiés par ELISA. Pour comparer les différentes fractions membranaires, les expériences sont normalisées par la quantité totale de protéines exprimées dans chacune des expériences (fraction soluble + fraction membranaire + fraction intracellulaire) (Figure 36, a). Nous appellerons « fraction soluble » les protéines présentes dans le milieu, et fraction intracellulaire les protéines retrouvées à l'intérieur des cellules (Figure 35, a). Ainsi, nous avons déterminé le pourcentage de protéines retenues au niveau des membranes cellulaires pour chacun des facteurs.

Après sécrétion, la quantité de protéines PF4 liée aux membranes des cellules est beaucoup plus importante que celle de PF4v1, 40% et 2% respectivement (Figure 36, b). Le pourcentage de protéines PF4v1 liées aux membranes est identique à celui du contrôle PF4-241. On peut donc considérer la rétention membranaire de PF4v1 comme négligeable. La substitution P58L dans la protéine PF4 a des effets limités sur la fixation des protéines aux membranes (40% -> 36%). La substitution K66L diminue modérément l'affinité de PF4 pour les membranes (40% -> 26%). Par contre, la substitution L67H affecte de manière importante la rétention de la protéine PF4 au niveau des membranes cellulaires (40% -> 10%). Cet effet est amplifié par l'adjonction de chacune d'une des deux autres substitutions : seulement 3% des protéines PF4 P58L L67H et PF4 K66E L67H se lient aux membranes cellulaires, alors que 30% de la protéine PF4 P58L K66L est retenue par les membranes cellulaires.

Cette différence d'affinité pour les constituants des membranes cellulaires reste relative car elle dépend de la saturation des sites de fixation des membranes. Or il est possible de moduler le niveau de protéines exprimées en faisant varier la quantité d'ADN plasmidique transfecté. Ainsi, si on exprime une quantité plus importante de



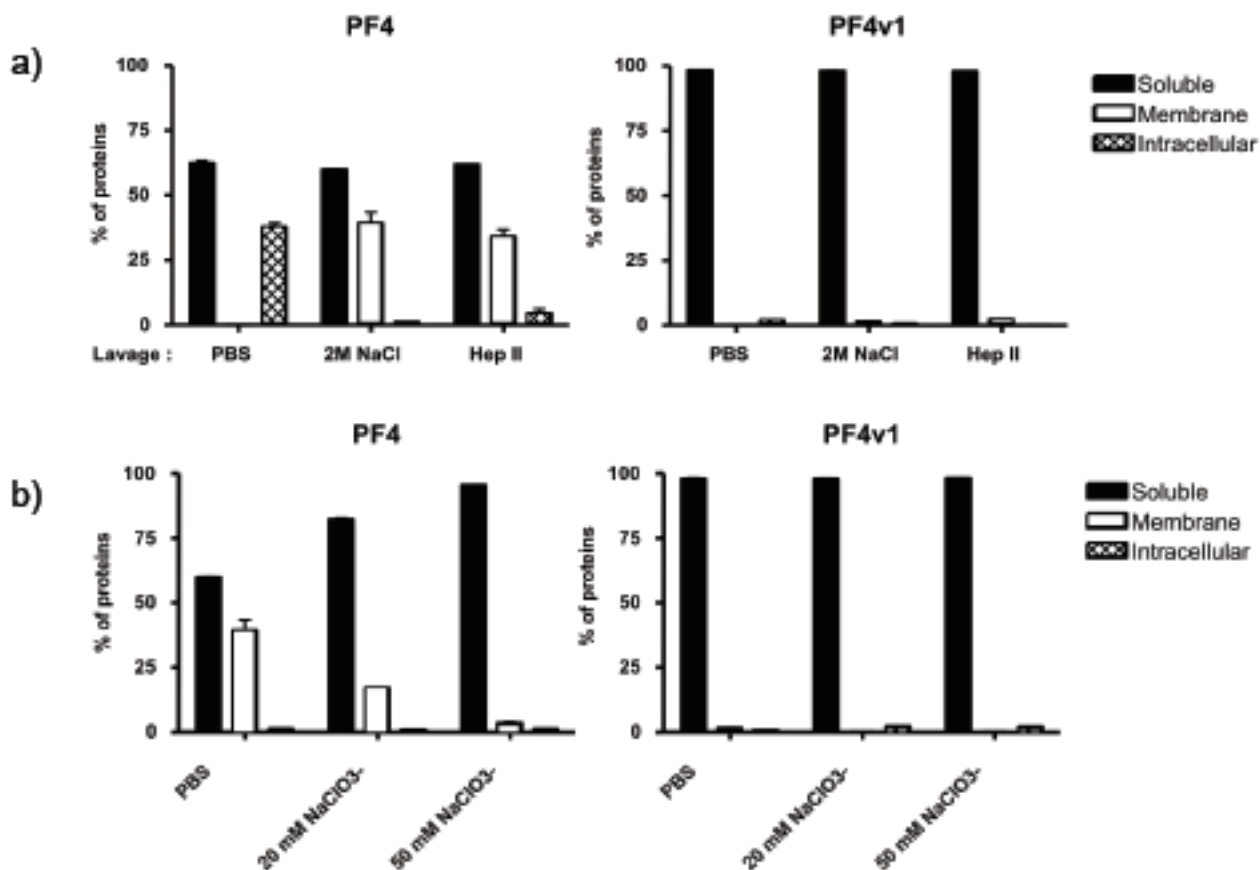
**Figure 36 : Rétention membranaire de PF4, PF4v1 et des mutants, exprimés par des HEK293T.**  
a) Expression totale des protéines recombinantes en fonction de la quantité de plasmide transfectée (50ng ou 100ng). Les quantités absolues de protéines sont obtenues par dosage ELISA anti-PF4 dans les trois fractions et additionnées. b) Pourcentage de protéine membranaire pour 50ng de plasmide transfecté. c) Pourcentage de protéine membranaire pour 100ng de plasmide transfecté. d) Western-blot anti-PF4 à partir des membranes de cellules HEK293T incubé ou non pendant 4h avec 1ng/ml de protéines recombinantes PF4, PF4v1 et PF4-241. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de plus de quatre expériences indépendantes réalisées en triplicates.

protéines (400 à 600ng de protéines contre 30 à 50ng de protéines précédemment), le pourcentage de protéines membranaires est affecté (Figure 36, c). On peut toujours observer des différences de rétention membranaire entre les différentes protéines mais on ne peut plus rendre compte de la significativité de ces résultats.

De plus, nous avons traité les cellules HEK293T avec 1ng/ml de protéines recombinantes PF4, PF4v1 et PF4-241. Lorsque l'on révèle par western-blot les protéines retenues par les membranes purifiées, on peut observer les différences de rétention entre PF4 et PF4v1, mais la quantité de PF4v1 est plus importante que précédemment (Figure 36, d). La différence de protéines PF4v1 et PF4-241 membranaires dans cette expérience montre que le pourcentage de protéines PF4v1 membranaires des expériences précédentes est probablement sous-estimé à cause de la saturation des membranes.

Cette différence de rétention membranaire entre les protéines PF4 et PF4v1 est certainement due à leur différence d'affinité pour les GAGs. En effet, pour déterminer la nature des sites de fixation sur les membranes des HEK293T, nous avons traité les cellules avec du sodium chlorate ( $\text{NaClO}_3^-$ ) ou de l'héparinase II (HepII). Le sodium chlorate est fréquemment utilisé pour étudier les interactions avec les GAGs car il inhibe la 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfate synthétase (PAPS), le principal donneur de sulfate des GAGs. L'utilisation de doses croissantes de  $\text{NaClO}_3^-$  augmente le pourcentage de protéines PF4 et PF4v1 solubles et diminue leur pourcentage membranaire (Figure 37). L'utilisation d'HepII pour laver les cellules démontre aussi une plus grande rétention membranaire de la protéine PF4 par les GAGs. En analysant la répartition des protéines PF4 et PF4v1 dans les différentes fractions nous constatons que cette répartition suit un profil comparable à celui qui est observé lors de l'expérience consistant à laver les membranes avec de hautes concentrations en sel. Après lavages par HepII ou par du  $\text{NaCl}$  2M, les protéines PF4 et PF4v1 sont désormais absentes des fractions membranaires.

A la vue des résultats obtenus lors de ces expériences, nous pouvons envisager que l'équipe de P. Romagnani a négligé, dans la mesure des différences de sécrétion entre les peptides signal de PF4 et PF4v1, le paramètre que constitue le phénomène de rétention membranaire des deux facteurs. En effet, deux seuls compartiments sont considérés dans cette étude : le milieu et les cellules. Or, la partie des cellules exposée au milieu, la membrane riche en GAGs, est un piège



**Figure 37 : La rétention des protéines PF4 et PF4v1 aux GAGs membranaires.** a) Le pourcentage de protéines recombinantes PF4 et PF4v1 dans les différentes fractions est déterminé à partir de différents lavages des membranes : PBS ou 2M NaCl ou 1u/ml d'Héparinase II. b) Le pourcentage de protéines recombinantes PF4 et PF4v1 dans les différentes fractions est déterminé après lavage des membranes avec un tampon à 2M NaCl. Dans cette expérience, les cellules ont été cultivées en présence ou non (PBS) de doses croissantes de sodium chlorate dans le milieu. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes réalisées en triplicates.

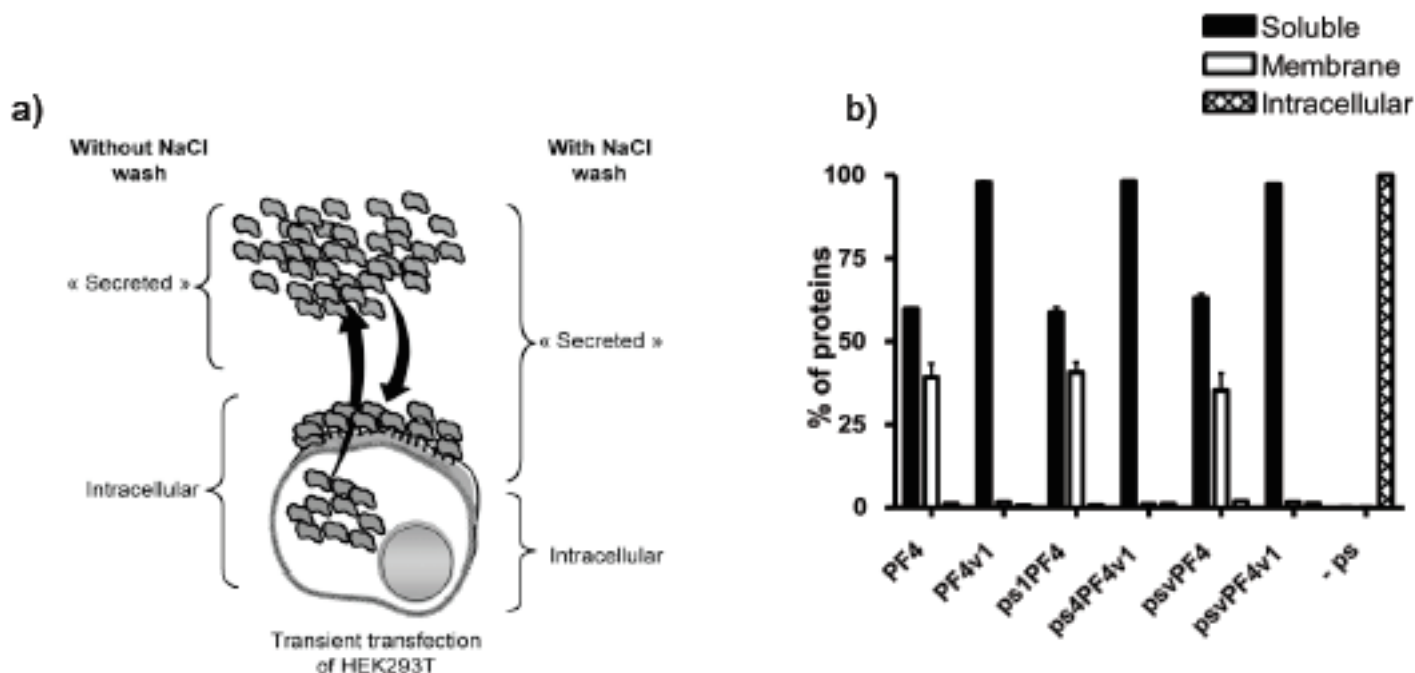
manifeste pour des protéines efficacement sécrétées qui seraient alors comptabilisées comme des protéines non-sécrétées. Cependant notre étude a été réalisée avec des constructions dans lesquelles seul le peptide signal de PF4v1 était présent. Or, ce peptide signal est décrit comme beaucoup plus efficace que celui de PF4. On peut donc se demander si deux mécanismes (sécrétion et rétention) ne seraient par superposés pour participer aux caractéristiques biologiques différentielles de PF4 et de son variant, PF4v1. La seule façon de répondre à cette question est d'échanger les peptides signal entre les deux gènes, voire d'utiliser une troisième séquence sans lien avec les chimiokines : le peptide signal de VEGF.

#### **4) Les peptides signaux de PF4 et PF4v1 sont-ils différentiellement efficaces pour la sécrétion ?**

Pour étudier des différences de sécrétion dues aux peptides signaux de PF4 et PF4v1, nous avons réalisé les mêmes expériences que précédemment. Dans cette expérience, le lavage à 2M NaCl nous sert à déterminer la quantité de protéines membranaires et donc la véritable quantité de protéines sécrétées. Les pourcentages des protéines dans les différentes fractions sont identiques à ceux déjà obtenus (Figure 38). De plus, l'inversion des peptides signaux ou l'utilisation d'un peptide signal de référence (VEGF) utilisé comme contrôle, ne modifie pas les quantités de protéines dans les différentes fractions. Enfin, l'expression de la protéine PF4 en absence de peptide signal (-ps) montre que cette protéine est uniquement présente dans la fraction intracellulaire. Ce contrôle nous a permis de vérifier que les lavages à 2M NaCl utilisés dans cette étude ne sont pas responsables de re-largages de protéines intracellulaires en favorisant, par exemple, une lyse même partielle des cellules.

Les peptides signaux de PF4 et PF4v1 ne présentent donc pas de différences d'efficacité de sécrétion, au moins lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules HEK293. De plus, ils sont très efficaces, autant que le peptide signal de la protéine VEGF, puisqu'ils permettent la sécrétion de plus de 98% des protéines exprimées.

Les protéines PF4 et PF4v1 ont donc une différence de diffusibilité importante qui doit leur conférer des caractéristiques physiologiques très différentes. Le facteur



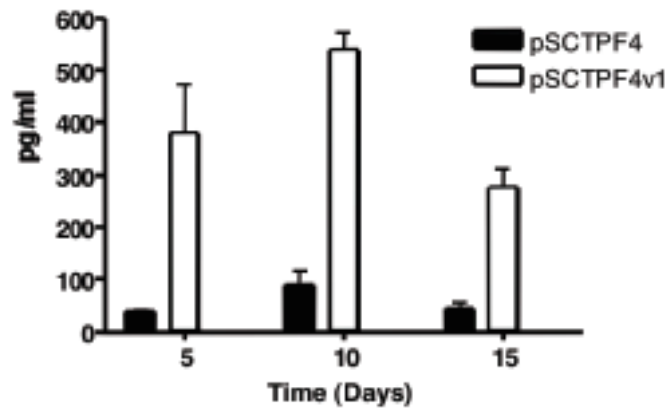
**Figure 38 : Efficacité de sécrétion des peptides signaux de PF4 et PF4v1.** a) Représentation schématique des fractions sécrétées et intracellulaires si on tient compte ou non de la fraction membranaire. b) Les protéines PF4 et PF4v1 sont exprimées de manière transitoire dans des HEK293T avec soit leurs peptides signaux respectifs, soit en inversant leurs peptides signaux, soit en présence du peptide signal de VEGF. Le pourcentage de protéines dans les différentes fractions est déterminé par ELISA anti-PF4. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de plus de quatre expériences indépendantes réalisées en triplicates.

PF4v1 doit avoir une biodisponibilité, des cibles cellulaires et des activités biologiques, différentes du facteur PF4.

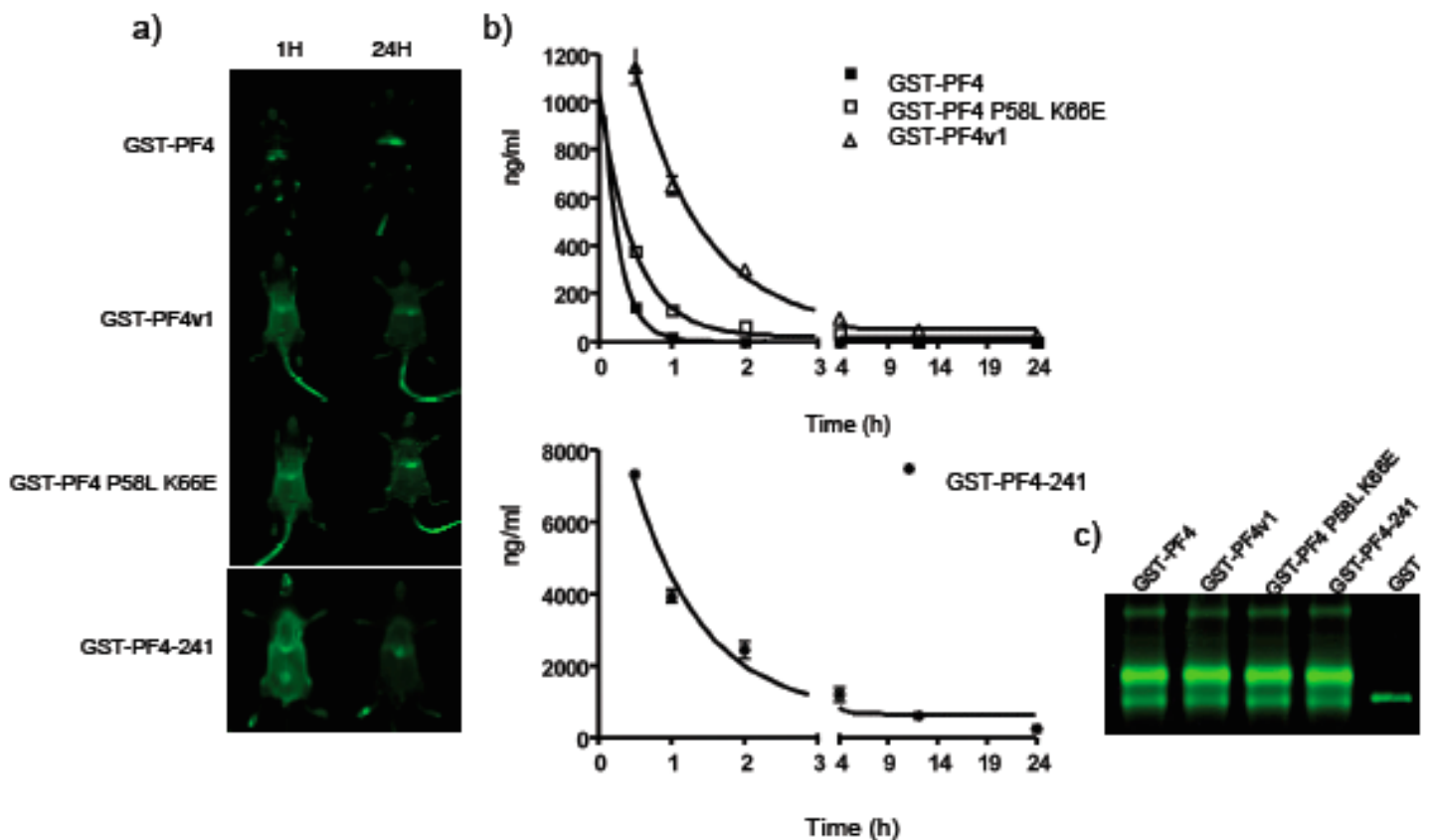
### **5) Biodisponibilité des facteurs PF4 et PF4v1**

*In vivo*, la biodisponibilité d'une protéine est définie par sa diffusibilité et sa clearance. La demie-vie d'une protéine *in vivo* peut être considérée comme un paramètre de sa clearance. Donc, pour étudier la diffusibilité *in vivo* des protéines PF4 et PF4v1, nous avons choisi de les faire s'exprimer dans un tissu particulier puis d'observer leur diffusion dans l'organisme. Pour cela, nous avons électrotransféré, dans la patte de souris Balb-C, l'ADNc codant l'un ou l'autre des deux facteurs. Puis nous avons quantifié, dans le plasma, la présence de PF4 ou de PF4v1, aidés pour cette expérience par les caractéristiques de l'anticorps utilisé en ELISA qui ne reconnaît pas le PF4 murin et qui ne discrimine pas entre PF4 et PF4v1 humains (Figure 39). Pour nous affranchir de potentielles régulations tissus-spécifiques liées à l'utilisation des peptides signaux, nous avons fusionné les protéines matures de PF4 et PF4v1 avec le peptide signal de VEGF. Les protéines sécrétées sont dosées dans le plasma par ELISA. Les deux protéines ont la même cinétique d'expression avec un maximum à 10 jours post-électrotransfection. Cette expérience, qui permet une expression constitutive des protéines, met en évidence que la protéine PF4v1 est plus diffusible *in vivo* que la protéine PF4. Au temps 10 jours, on quantifie en moyenne 90.5pg/ml de protéines PF4 et 537.9pg/ml de protéines PF4v1, circulantes dans le sang des souris. Les quantités de protéines circulantes ont été normalisées par la quantité de protéines exprimées au niveau du muscle.

Pour étudier la clearance des protéines PF4 et PF4v1, nous avons injecté 2nM (66ug) de protéines GST-PF4 et GST-PF4v1 en intraveineuse à des souris immunodéficientes RAG gamma. Les protéines ont été au préalable marquées par un fluorochrome IRDye 800 CW, qui émet dans l'infrarouge. Ce marquage permet de suivre la localisation de la protéine circulante au cours du temps, chez la souris sous anesthésie. Dès 1 heure post-injection, la protéine GST-PF4v1 est beaucoup plus diffuse que la protéine GST-PF4. La protéine GST-PF4 s'accumule très rapidement dans le foie (confirmé après dissection des souris et détection de la fluorescence



**Figure 39 : Diffusibilité des protéines PF4 et PF4v1 après transfert de gènes dans la patte de la souris.** Quantification par ELISA anti-PF4 des protéines circulantes dans le plasma des souris Balb-C électrotransférées avec 50ug de plasmide dans la patte. L'expression des protéines est suivie au cours du temps. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM d'une expérience réalisée sur quatre souris par point.



**Figure 40 : Diffusibilité des protéines GST-PF4, GST-PF4v1 et des mutants après injection intraveineuse dans la queue des souris.** 2nM de protéines marquées par un fluorochrome IRDye 800 CW qui émet dans l'infrarouge, sont injectées en intraveineuse dans des souris RAG-gamma. Les protéines circulantes sont ensuite visualisées au Licor-Odissey (a), et quantifiées par ELISA anti-PF4 (b), à différents temps. La quantité de chacune des protéines injectées est contrôlée par migration sur gel polyacrilamide et visualisées au Licor-Odissey (c). Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de deux expériences indépendantes réalisées en triplicates.

dans les différents organes) alors que la protéine GST-PF4v1 est présente dans tous les tissus. Au temps 24 heures, la localisation de la protéine GST-PF4v1 est maintenue dans tous les tissus alors que la protéine GST-PF4 n'est présente qu'au niveau du foie (Figure 40, a). La même expérience a été réalisée en injectant les protéines GST-PF4 P58L K66E et GST-PF4-241 marquées. Ces deux protéines ont la même diffusibilité que la protéine GST-PF4v1 puisque que l'on peut les observer dans tous les tissus dès 1 heure ainsi qu'à 24 heures.

La clearance des différentes protéines injectées a été déterminée par un dosage ELISA anti-PF4 des plasmas des souris injectées, de 30 minutes à 24 heures post-injection (Figure 40 b). Les résultats obtenus confirment les observations précédentes. Il semble donc que la clearance des protéines soit proportionnelle à leur affinité pour les GAGs et à leur diffusibilité. La protéine PF4v1 est donc nettement plus biodisponible que la protéine PF4. La protéine GST-PF4 est très rapidement éliminée de la circulation sanguine, on détecte 150 ng/ml à 30 minutes et on ne la détecte plus au bout d'1 heure. La clearance de la protéine GST-PF4 P58L K66E n'est que légèrement différente de celle de la protéine GST-PF4, alors que celle de la protéine GST-PF4v1 est beaucoup plus faible. On dose 1200 ng/ml de protéines circulantes à 30 minutes et 60 ng/ml à 12 heures. Enfin, l'élimination de la protéine GST-PF4-241 est encore plus lente puisqu'on détecte encore 300 ng/ml de protéine circulante à 24 heures.

### **3 - Discussion**

Récemment dans l'évolution, le gène pf4 a été dupliqué et plusieurs substitutions sont apparues pour donner le gène pf4v1. Il est raisonnable de penser que les différences en acides aminés ont permis un gain de fonction ou du moins une spécialisation fonctionnelle. En fait, l'essentiel des substitutions en acides aminés est localisé dans le peptide signal et c'est donc naturellement que l'équipe de P. Romagnani a tenté de comprendre si ces différences en acides aminés étaient susceptibles d'affecter l'efficacité de sécrétion (Lasagni et al., 2007). De notre côté, nous nous sommes intéressés à la partie maturée de la protéine car l'équipe de Strieter avait mis en évidence une activité antiangiogénique de la protéine PF4v1

beaucoup plus importante que celle de PF4 (Struyf et al., 2007; Struyf et al., 2004). La protéine PF4v1 inhibe davantage la migration des cellules endothéliales *in vitro* et la progression tumorale *in vivo* que la protéine PF4. Le facteur PF4v1 est surtout plus puissant pour inhiber la formation de métastases dans des expériences de xénogreffes de cellules LLC1 (adénocarcinome murin de poumon) chez la souris. Or les protéines matures ne divergent que par trois acides aminés.

Dans cette première partie, nous démontrons que la protéine PF4v1 inhibe plus efficacement la prolifération des cellules endothéliales *in vitro*, que la protéine PF4. Nous démontrons aussi que les trois acides aminés substitués dans la protéine PF4v1 modifient considérablement l'affinité de la protéine pour les GAGs. Alors que, naïvement, nous nous attendions à ce que la substitution de la lysine soit responsable de la perte d'affinité pour les GAGs, nous mettons en évidence, que, de manière très surprenante, la substitution de la leucine 67 par une histidine (acide aminé basique) dans l'hélice alpha C-terminale de la protéine PF4v1, est responsable : 1) de la perte d'affinité pour les GAGs et 2) des différences de diffusibilité entre les protéines PF4 et PF4v1. Cette substitution rend le facteur PF4v1 plus biodisponible. Il est moins retenu par les cellules qui le sécrètent et il est plus diffusible que le facteur PF4. Les résultats *in vivo* sont en accord avec les travaux des équipes de Gjesdal K., Pepper DS, et Rucinski B., qui ont démontré que la demi-vie de PF4 dans le plasma des singes injectés était de 30 min et l'héparine en était responsable (Gjesdal and Pepper, 1977; Rucinski et al., 1986). Ce gain de fonction permet à la chimiokine PF4v1 d'agir sur des partenaires cellulaires éloignés du site de sécrétion. Contrairement à la protéine PF4, la protéine PF4v1 pourrait ainsi inhiber efficacement la formation des métastases. Néanmoins, l'affinité de la protéine PF4v1 pour les GAGs n'est pas nulle, elle est identique à celle de l'endostatine (2.2 $\mu$ M, Ricard-Blum et al., 2004). Il a été clairement démontré que l'interaction avec les GAGs joue un rôle important pour l'activité biologique de l'endostatine. Il sera donc intéressant de déterminer le rôle des interactions avec les GAGs dans l'activité biologique de PF4v1. Les modifications importantes de la structure de la protéine PF4v1 pourraient permettre des interactions avec des protéoglycannes spécifiques des cellules endothéliales.

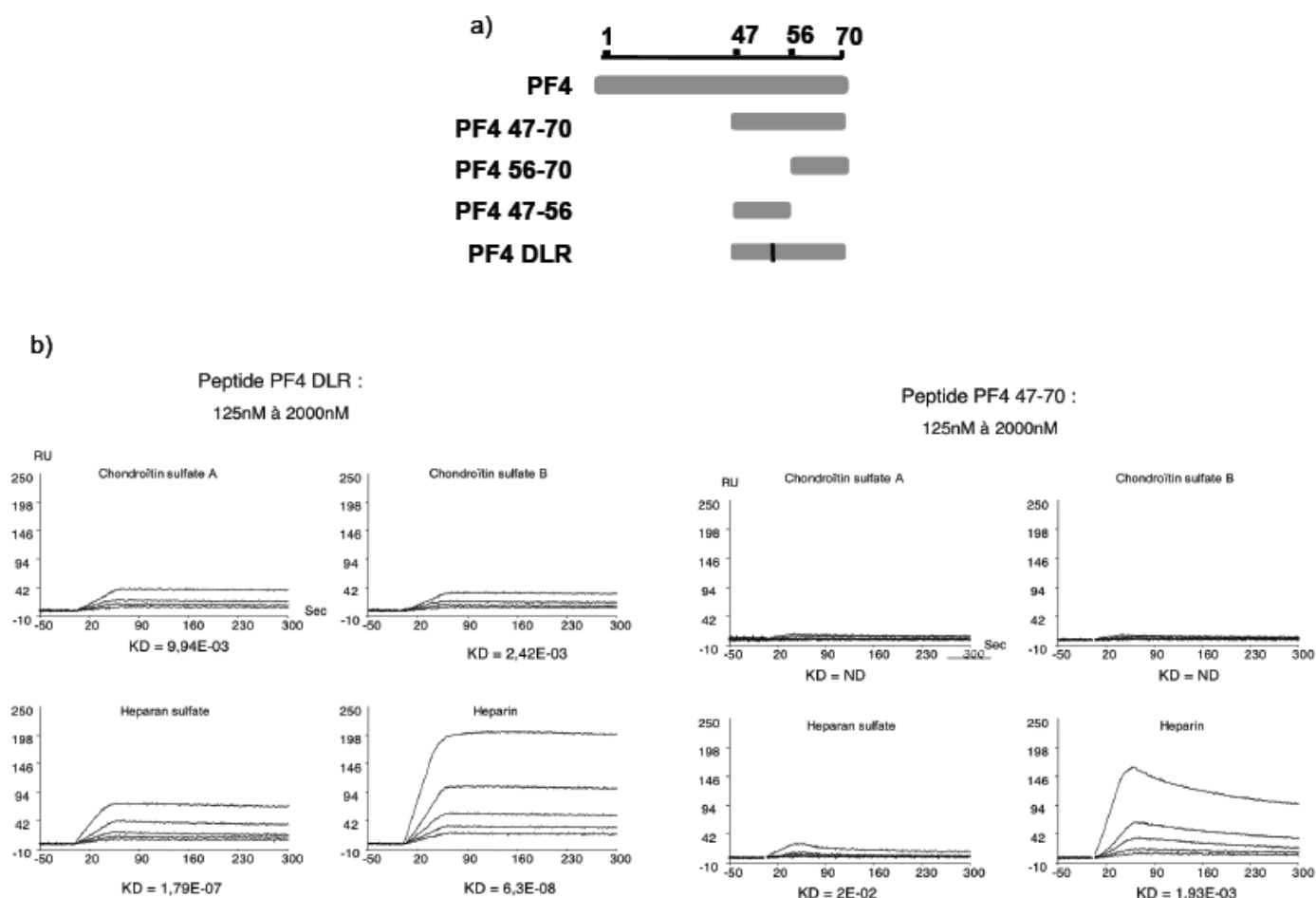
Enfin, nous démontrons que les peptides signaux de PF4 et PF4v1 n'ont pas de différences d'efficacité de sécrétion lorsqu'ils sont exprimés dans des cellules HEK293. A la vue des résultats obtenus lors de ces expériences, nous pouvons

envisager que l'équipe de P. Romagnani a surestimé les différences de sécrétion du fait des différences de rétention membranaire. Cependant il faut aussi noter que bien que les peptides signaux des deux facteurs soient divergents, leurs structures primaires sont comparables (même pourcentage en acides aminés hydrophobes, mêmes positions clés des acides aminés chargés et présence du motif d'adressage aux  $\alpha$ -granules des plaquettes (El Golli et al., 2005)) et sont cohérentes avec leur fonction. De plus, ces deux protéines sont des facteurs plaquettaires séquestrés dans les alpha-granules et relargués après activation des plaquettes. Néanmoins, la chimiokine PF4v1 peut être exprimée par d'autres types cellulaires, notamment les cellules musculaires lisses. Il faudrait tester l'efficacité de sécrétion des deux peptides signaux dans ces lignées cellulaires qui expriment naturellement ces facteurs pour déterminer s'il n'existe tout de même pas une régulation de leur sécrétion. Des travaux préliminaires, au laboratoire, montrent aussi un rôle des trois acides aminés substitués, dans l'induction de voies de sécrétion des différences (thèse Renaud Grepin). Ces mutations pourraient donc participer à des compartimentations différentes des deux protéines.

Il était ensuite intéressant, de déterminer s'il existe un lien direct entre la biodisponibilité et les activités antiangiogéniques des protéines PF4 et PF4v1. La question de l'importance de l'affinité aux GAGs pour les activités antiangiogéniques est un problème bien plus général que le cas de PF4 et PF4v1. Cependant, le modèle de ces deux chimiokines est probablement l'un des plus intéressants pour traiter la question car comprendre comment l'histidine 67 peut être responsable du gain d'activité antiangiogénique de la protéine PF4v1 circonscrit la problématique à un niveau moléculaire suffisamment fin pour espérer obtenir rapidement des réponses concluantes.



**Partie II.     Rôle de l'histidine 67 dans l'activité  
                         biologique de PF4v1**



**Figure 41 : Interaction des peptides issus de PF4 avec les GAGs.** a) Représentation schématique des peptides de PF4. La mutation du peptide PF4DLR est représentée par une barre noire (Q substitué en R). b) Sensogrammes résultant de l'injection de différentes concentrations de plusieurs peptides issus de PF4 (de 125nM à 2uM) sur les GAGs immobilisés (90RU). Les résultats des peptides PF4 47-56 et PF4 56-70 ne sont pas présentés car ils ne se fixent pas.

| KD (M)    | Heparin  | Heparan Sulfate | Chondroitin Sulfate A | Chondroitin Sulfate B |
|-----------|----------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| PF4 47-70 | 1.93E-03 | 2.00E-02        | 0                     | 0                     |
| PF4 47-57 | 0        | 0               | 0                     | 0                     |
| PF4 57-70 | 0        | 0               | 0                     | 0                     |
| PF4 DLR   | 6.30E-08 | 1.79E-07        | 9.94E-03              | 2.42E-03              |

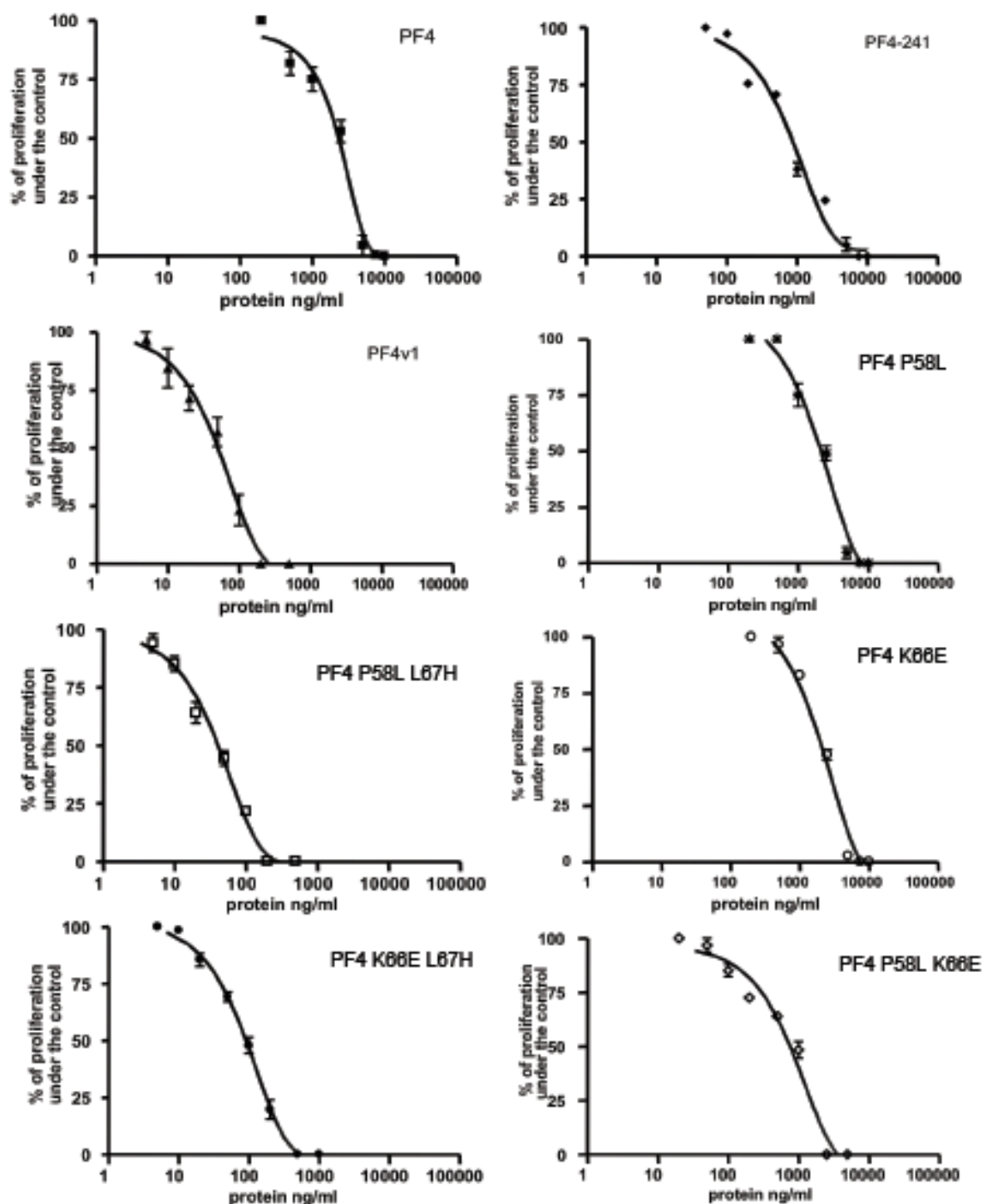
**Table 10 : Constantes d'affinité des peptides issus de PF4 pour les différents GAGs.** Ces constantes sont obtenues grâce aux sensogrammes résultant de l'injection de différentes concentrations (125nM à 2uM) des peptides sur les GAGs immobilisés. Les cinétiques d'interaction sont analysées selon le modèle Langmuir et les constantes d'association et de dissociation sont obtenues par le logiciel BIAevaluation.

## 1 - Affinité des différents peptides de PF4 pour les GAGs

La liaison aux GAGs est une caractéristique très importante des activités biologiques de la protéine PF4, notamment pour son activité antiangiogénique. Les quatre lysines du domaine C-terminale sont nécessaires mais non suffisantes pour ces interactions. En effet, les arginines de la partie N-terminale de la protéine sont importantes pour initier et renforcer les interactions avec les GAGs. De plus, le peptide 47-70 de la protéine PF4, conserve des activités antiangiogéniques (voir partie III, chapitre 6-4 de l'introduction) et la substitution d'une glutamine, du motif DLQ de ce peptide, en arginine (DLR), augmente son activité sur les cellules endothéliales.

Nous avons étudié les affinités des peptides PF4-47-70 et PF4-DLR pour les GAGs par la technologie SPR (Figure 41). Le peptide PF4-47-70 n'interagit pas avec les chondroïtines sulfates et les héparanes sulfates. Par contre, il possède une affinité modérée pour l'héparine de  $1.93\text{E-}03$  M. Les deux fragments 47-57 et 57-70 de ce peptide n'ont plus d'affinité pour l'héparine lorsqu'on les teste indépendamment. Le peptide PF4-DLR a des affinités modérées de  $9.94\text{E-}03$  M et  $2.42\text{E-}03$  M pour les chondroïtines sulfates A et B, respectivement, mais des affinités plus fortes pour les héparanes sulfates et l'héparine, de  $1.79\text{E-}07$  M et  $6.3\text{E-}08$  M respectivement (Table 10).

La conformation de la protéine PF4 est donc très importante pour son interaction avec les GAGs. Les quatre lysines sont nécessaires mais non suffisantes. Les arginines de la partie N-terminale de la protéine sont aussi essentielles. Ce travail confirme que l'interaction de PF4 avec les GAGs est une composante importante de son activité antiangiogénique. Néanmoins, ce n'est pas aussi simple car les travaux de l'équipe de R.J. Sharpe, sur la protéine recombinante PF4-241, ont montré que la liaison de PF4 aux GAGs n'est pas nécessaire pour son activité antiangiogénique *in vitro* et *in vivo*. L'étude du mécanisme d'action de la protéine PF4v1 nous permettra de mieux comprendre celui de PF4.



**Figure 42 : Test de prolifération de cellules endothéliales stimulées avec les protéines recombinantes des différents mutants.** Les BAEC sont cultivées en présence de FGF2 (10ng/ml) et de différentes quantités de protéines. Le pourcentage de prolifération est déterminé par rapport au témoin cultivé en présence de FGF2. Après 48h, la prolifération est quantifiée par dosage MTT. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes réalisées en triplicates.

| ng/ml | PF4  | PF4v1 | PF4 P58L | PF4 K66E | PF4 K66E L67H | PF4 P58L L67H | PF4 P58L K66E | PF4-241 |
|-------|------|-------|----------|----------|---------------|---------------|---------------|---------|
| IC50  | 2253 | 52,46 | 1985     | 2028     | 89,16         | 41,56         | 854           | 839,1   |
| Imax  | 5000 | 200   | 5000     | 5000     | 250           | 200           | 2500          | 5000    |

**Table 11 : Inhibition de la prolifération des cellules endothéliales BAEC par les protéines PF4 et PF4v1.** IC50 : concentration de protéines pour inhiber 50% de la prolifération. Imax : concentration maximale de protéines pour inhiber totalement la prolifération. Les concentration sont en ng/ml.

## **2 - Activité biologique des mutants de PF4**

Les protéines produites pour cette étude ont été testées dans des expériences d'inhibition de la prolifération de cellules BAEC, comme précédemment. Les protéines GST-PF4-241, GST-PF4 P58L, GST-PF4 K66E et GST-PF4 P58L K66E ont un profil d'inhibition semblable à celui de la protéine GST-PF4. Par contre, dès que l'histidine 67 est présente dans la protéine (GST-PF4 P58L L67H et GST-PF4 K66E L67H) l'inhibition de la prolifération se rapproche de celui obtenu avec la protéine GST-PF4v1 (Figure 42).

Les valeurs des I<sub>max</sub> et des IC<sub>50</sub> des différentes protéines mettent en évidence que l'histidine 67 est la mutation responsable des différences d'activité biologique (Table 11). La protéine GST-PF4-241 a un I<sub>max</sub> de 5  $\mu$ g/ml, ce qui confirme que l'affinité pour les GAGs n'est pas nécessaire pour son activité antiangiogénique. Elle pourrait même être inhibitrice car GST-PF4-241 a un IC<sub>50</sub> de 839.1 ng/ml contre 2.3  $\mu$ g/ml pour la protéine GST-PF4. De plus, ce résultat nous permet de dissocier les effets de l'histidine 67 sur l'affinité pour les GAGs, de son effet sur l'activité biologique de PF4v1.

## **3 - Discussion**

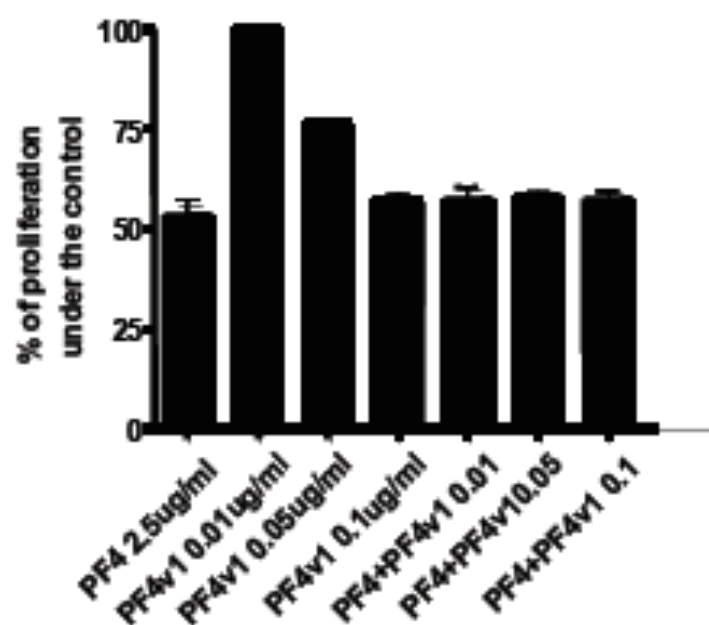
L'étude des affinités des peptides de PF4 pour les GAGs, dont on connaît les activités antiangiogéniques, confirme l'importance de la conformation de la protéine et de l'affinité pour les GAGs dans l'activité biologique de PF4. Les quatre lysines sont nécessaires mais pas suffisantes, comme le démontre l'absence d'interaction du peptide 57-70 avec les GAGs. Par contre, ces données sont en contradiction avec celles que nous obtenons avec la protéine PF4-241. Cette protéine conserve une activité antiangiogénique identique à celle de PF4 alors qu'elle n'interagit pas avec les GAGs. Il sera intéressant de comparer les activités antiangiogéniques des peptides de PF4 avec celles des protéines PF4 et PF4-241 pleine taille. L'absence d'interaction avec les GAGs (PF4-241), comme une trop forte affinité (PF4), pourrait limiter l'activité antiangiogénique de PF4. On peut donc supposer que l'affinité

modérée de la protéine PF4v1 pour les GAGs est optimum pour inhiber l'angiogenèse. Cette hypothèse est renforcée par l'analyse des activités biologiques des mutants de PF4. En effet, nous avons démontré que la mutation responsable des différences d'activités antiangiogéniques entre les protéines PF4 et PF4v1 est l'histidine 67. La même mutation est aussi responsable des différences d'affinités pour les GAGs. L'inhibition totale de l'affinité de la protéine PF4v1 pour les GAGs, par exemple en exprimant un PF4v1-241, permettra de confirmer cette hypothèse.

L'histidine 67 présente dans la protéine PF4v1 peut aussi augmenter l'activité antiangiogénique indépendamment de la modification d'affinité aux GAGs. La différence d'activité peut s'expliquer par une différence d'affinité pour un récepteur inhibiteur de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales. La conformation de la protéine PF4v1 peut rendre accessible un motif de liaison au récepteur, motif qui serait beaucoup moins exposé dans la conformation de la protéine PF4. L'histidine 67 pourrait aussi moduler directement l'affinité pour ce récepteur, la rendant nécessaire pour l'activité biologique de PF4v1.

L'histidine 67 dans la protéine PF4v1 est donc responsable de son importante biodisponibilité comme de son importante activité antiangiogénique. Il reste à déterminer plus précisément par quel mécanisme cette substitution module l'activité antiangiogénique de PF4v1.

**Partie III. PF4 et PF4v1 : des mécanismes d'action  
différents ?**



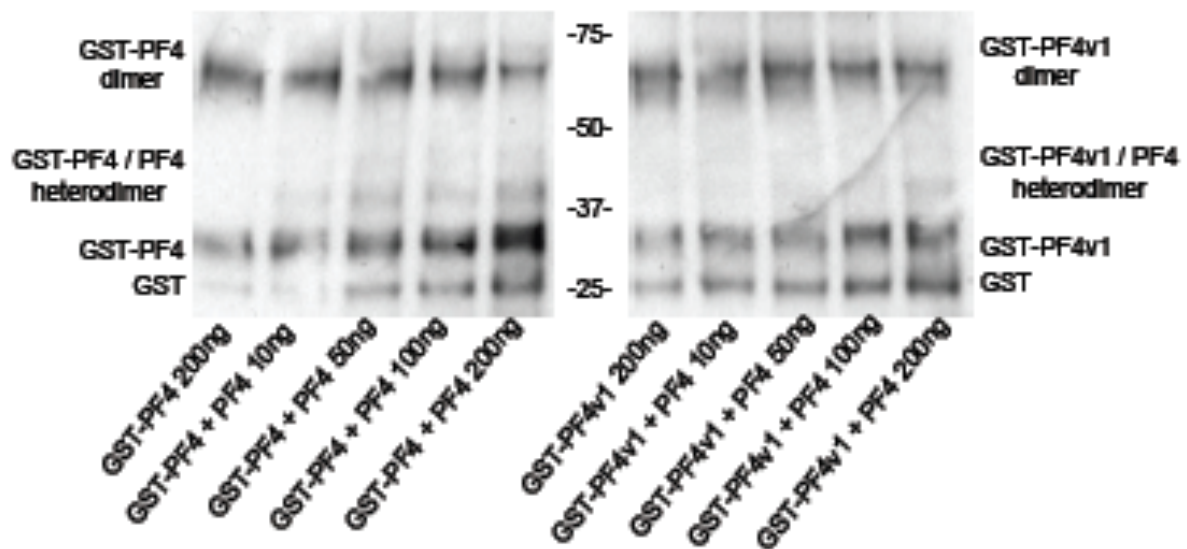
**Figure 43 : La protéine PF4 inhibe l'activité biologique de la protéine PF4v1.** Le test de prolifération de cellule BAEC est réalisé avec une quantité constante de GST-PF4 de 2.5ug/ml et différentes quantités de GST-PF4v1. En contrôle, les mêmes quantités de GST-PF4 et GST-PF4v1 sont testés indépendamment. Après 48h, la prolifération est quantifiée par dosage MTT. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de deux expériences indépendantes réalisées en triplicates.

Les protéines PF4 et PF4v1 sont toutes les deux sécrétées par les plaquettes activées et elles ont pour cible les cellules endothéliales. Par contre, elles semblent avoir des mécanismes d'action différents du fait de leurs différences d'affinité pour les GAGs mais aussi de leurs différences d'activité antiangiogénique. De plus, on peut envisager que les protéines PF4 et PF4v1 interagissent pour former des hétérodimères, comme la plupart des chimiokines. Nous avons donc recherché si l'une des protéines pouvait moduler l'activité de l'autre.

## **1 - Activité antagoniste de la protéine PF4 sur la protéine PF4v1**

Pour étudier la capacité de chacune des protéines PF4 et PF4v1 à moduler les activités de l'autre, nous avons quantifié la prolifération de cellules endothéliales BAEC traitées simultanément avec les deux protéines. Nous espérons ainsi avoir une réponse qui, selon l'intensité de l'inhibition observée, pourrait nous donner des indications sur les mécanismes mis en jeu : additivité, coopérativité, synergie, etc. Pour cela nous avons fixé une quantité de facteur telle que son activité était de l'ordre de 50% du maximum et de faire varier les quantités de l'autre facteur. Ainsi, pour une quantité fixe de protéine GST-PF4 de 2.5ug/ml qui inhibe 50% de la prolifération, nous avons ajouté des doses croissantes de protéines GST-PF4v1 (10ng/ml, 50ng/ml et 100ng/ml) qui inhibent la prolifération respectivement de 0, 25 et 50% (Figure 43). Les activités des deux protéines ne sont ni additives, ni synergiques. Il est même évident que la protéine GST-PF4 inhibe l'activité de la protéine GST-PF4v1. Cette inhibition n'est pas retrouvée lorsque l'on utilise des quantités de protéines GST-PF4 inférieures à 1ug/ml (dose n'ayant aucun effet sur la prolifération des cellules, données non montrées).

La modulation de l'activité d'une chimiokine par une autre est plutôt considérée comme une règle. La plupart du temps, cette modulation se fait par le biais d'interactions entre les deux protéines, formant ainsi des hétérodimères. Nous avons donc recherché la possibilité de formation de telles structures.

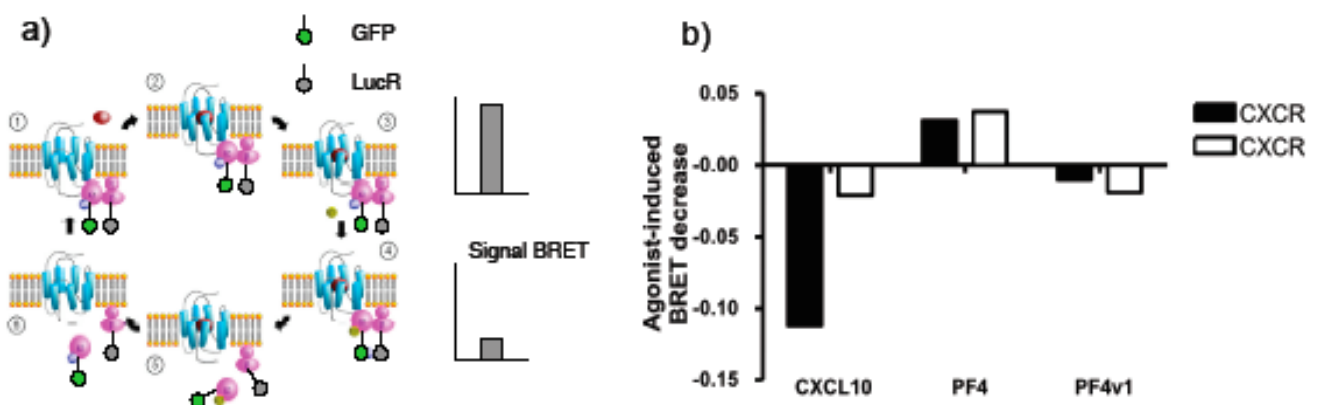


**Figure 44 : Hétérodimérisation des protéines PF4 et PF4v1.** Les protéines recombinantes GST-PF4 et GST-PF4v1 sont incubées toute la nuit avec différentes quantités de protéines PF4. Après liaison covalente (PFA 4%), les différents oligomères sont détectés par western-blot anti-GST.

## **2 - Hétérodimérisation des protéines PF4 et PF4v1**

Cette partie du travail a été la plus délicate. Les différentes approches choisies, comme les co-immunoprécipitations (co-IP) ou les interactions par SPR ainsi que les interactions par transfert d'énergie par bioluminescence (BRET) des deux protéines, ont été infructueuses. La seule méthode qui nous a donné des résultats exploitables est le couplage covalent des protéines. Les hétérodimères sont visualisés par western-blot. L'utilisation de protéines de poids moléculaires différents nous permet de distinguer les hétérodimères des homodimères. Ceci était possible car nous disposons de protéines fusionnées ou non à la GST. Des quantités fixes de protéines GST-PF4 et GST-PF4v1 sont incubées avec différentes concentrations de protéines PF4. Les protéines sont ensuite détectées avec un anticorps anti-GST (la GST ne multimérise pas, données non montrées) pour ne pas être gêné par les oligomères de protéines PF4 de haut poids moléculaires (24-34KDa). On peut observer que les protéines GST-PF4 et PF4 forment très facilement des hétérodimères (41KDa), alors qu'il n'y a pratiquement pas d'hétérodimères entre PF4 et GST-PF4v1 (Figure 44).

Quelles que soient les conditions testées, nous n'avons pas pu montrer une hétérodimérisation de PF4 et de PF4v1. Ce constat nous amène à penser que si l'inhibition de l'activité de PF4v1 par PF4 n'est pas le fruit d'une interaction directe, alors un troisième partenaire est probablement en cause. Naturellement nous pensons que la modulation de l'activité de la protéine PF4v1 par la protéine PF4 pourrait aussi être un effet antagoniste de la protéine sur un récepteur spécifique. L'hypothèse n'est pas simple car les deux protéines exercent des activités analogues, en l'occurrence une antiangiogenèse. De plus, aucun récepteur spécifique de PF4v1 n'a encore été caractérisé. Par contre il est connu que la chimiokine PF4 interagit spécifiquement avec les récepteurs CXCR3a et CXCR3b. Le récepteur CXCR3b, spécifique des cellules endothéliales, inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales. La protéine PF4 peut être l'antagoniste de la protéine PF4v1 si les deux protéines interagissent avec le même récepteur avec la même affinité mais en ayant des effets différents, sinon dans leurs conséquences



**Figure 45 : Etude de l'interaction de PF4 et PF4v1 avec les récepteurs CXCR3a et CXCR3b par BRET.** a) Représentation schématisée de l'étude de la liaison d'un ligand sur un RCPG par BRET. L'association de la protéine G avec le récepteur génère un signal BRET basal fort. L'activation de la protéine G par le ligand entraîne sa dissociation et donc une diminution du signal BRET. b) Les cellules HEK293T sont transfectées avec trois plasmides, un codant pour le récepteur CXCR3a ou CXCR3b, un autre codant pour la sous-unité  $\alpha$  de la protéine G couplée à la luciférase rénilla (LucR) et enfin le troisième plasmide code pour la sous-unité  $\gamma$  de la protéine G couplée à la GFP. Les cellules sont ensuite traitées avec les protéines recombinantes à la concentration de 1uM. Le signal BRET est mesuré après 1h de stimulation.

finales (inhibition de la prolifération des cellules endothéliales) du moins dans les affinités et cascades mises en œuvre.

### **3 - Interaction des protéines PF4 et PF4v1 avec les récepteurs CXCR3a et CXCR3b**

Pour étudier les interactions des protéines PF4 et PF4v1 avec les récepteurs CXCR3a et CXCR3b, nous avons utilisé la technologie du BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfer). Le donneur et l'accepteur d'énergie sont couplés aux sous-unités  $\alpha$  et  $\gamma$  de la protéine G associée aux récepteurs. Lorsque les trois partenaires sont exprimés dans la même cellule et qu'ils interagissent, nous avons un signal BRET important. L'association d'un ligand sur le récepteur génère une dissociation des sous-unités de la protéine G qui partent interagir avec leurs effecteurs, et donc il y a une diminution du signal BRET (Figure 45, a). Le BRET est couramment utilisé par les équipes qui travaillent sur les RCPG (Gales et al., 2006). Cette technique permet de démontrer la fixation d'un ligand sur le récepteur, les différents mécanismes induits en fonction du ligand, des protéines G impliquées et l'homo- ou hétéro-dimérisation des récepteurs.

Dans une première expérience préliminaire, nous avons co-exprimé les récepteurs CXCR3a ou CXCR3b avec les protéines LucR- $\alpha$ -Gi1 et GFP- $\gamma$ -2 dans des cellules HEK293T. Ces cellules sont ensuite traitées avec les protéines recombinantes CXCL10, GST-PF4 et GST-PF4v1 à 1ug/ml. L'interaction du ligand avec le récepteur est représentée par la différence de signal BRET entre la condition stimulée et la condition non stimulée (Figure 45, b). La protéine contrôle CXCL10, qui se fixe sur les deux récepteurs, active fortement la protéine Gi en présence du récepteur CXCR3a (diminution du signal BRET de -0.112), alors que le signal diminue plus modérément en présence du récepteur CXCR3b (diminution du signal BRET de -0.02). Néanmoins, les modifications du signal BRET sont significatives à partir de -0.01. La protéine GST-PF4 induit des résultats opposés puisque la différence de signal BRET est positive pour les deux récepteurs. Donc, la protéine GST-PF4 interagit bien avec les récepteurs, mais elle renforce la stabilité des interactions des sous-unités de la protéine G. La protéine GST-PF4v1, quant à elle,

n'active pas la protéine Gi par le récepteur CXCR3a (diminution du signal BRET de -0.01), par contre elle active la protéine Gi par le récepteur CXCR3b de la même façon que la protéine CXCL10 (diminution du signal BRET de -0.02). La protéine GST seule ne modifie pas le signal BRET (données non montrées). De même, en l'absence de récepteur, le signal BRET de base est plus faible et n'est pas modifié par les protéines recombinantes (données non montrées).

## 4 - Discussion

Les chimiokines constituent une grande famille de cytokines. La plupart sont sécrétées au site même d'inflammation et certaines sont exprimées par les mêmes cellules. De plus, plusieurs chimiokines peuvent se lier à un même récepteur alors que d'autres peuvent se lier à plusieurs récepteurs. Donc, il n'est pas étonnant de trouver beaucoup de données dans la littérature qui démontrent que les chimiokines peuvent réguler leurs activités entre elles. Pour cela, elles peuvent s'hétéro-oligomériser et/ou bloquer leur fixation sur un récepteur spécifique. La chimiokine PF4 ne fait pas exception, elle peut s'hétérodimériser avec la chimiokine IL8 qui a des activités biologiques très différentes. En s'associant, les activités des deux protéines sont modifiées, la migration des leucocytes induite par IL8 et l'activité anti-proliférative de PF4 sont augmentées (Nesmelova et al., 2005). Donc, on peut se demander si les chimiokines PF4 et PF4v1 pourraient réguler leurs activités biologiques entre elles et par quel mécanisme.

La protéine PF4 semble inhiber l'activité biologique de la protéine PF4v1. Les activités biologiques du facteur PF4 sont multiples et la plupart utilisent sa forte affinité pour les GAGs comme lors de l'agrégation plaquettaire, le recrutement des lymphocytes T ou des macrophages au niveau des cellules endothéliales. **On peut ainsi supposer que l'activité antiangiogénique n'est pas la principale fonction de PF4.**

Ainsi, de fortes concentrations de protéines PF4 pourraient favoriser la formation d'un hétérodimère inactif mais aussi saturer un récepteur membranaire commun aux deux protéines. Cela implique que l'activation du récepteur par la

protéine PF4 aurait des effets beaucoup moins importants qu'avec la protéine PF4v1. Il sera intéressant d'observer si cette inhibition s'applique aussi sur le recrutement des lymphocytes T.

La protéine PF4v1 semble s'homodimériser de la même façon que la protéine PF4. Par contre, les protéines ne semblent pas pouvoir s'hétérodimériser entre elles. Les deux chimiokines PF4 et PF4v1 pourraient avoir des cibles cellulaires différentes du fait de leur diffusibilité. En s'associant, la protéine PF4 limiterait la diffusibilité de PF4v1. De plus, la protéine PF4 inhibe l'activité biologique de la protéine PF4v1 lorsqu'elles agissent sur les mêmes cellules. L'impossibilité de s'hétérodimériser doit être un mécanisme de sécurité pour limiter l'inhibition de l'activité de PF4v1 d'autant que les deux protéines sont synthétisées par un même type cellulaire : les plaquettes. Cependant, il serait intéressant de vérifier si l'héparine ne pourrait pas favoriser la formation d'hétérodimères PF4/PF4v1 de faible stabilité. Du fait de la différence d'affinité des deux chimiokines pour l'héparine on pourrait alors avoir formation d'un gradient de diffusion de la protéine PF4v1.

Nous pensons toutefois que la différence d'activité antiangiogénique entre les deux chimiokines est tellement importante que d'autres éléments que ceux développés ci-dessus sont insuffisants pour en rendre compte. Nous nous sommes alors orientés vers une étude sur la spécificité de reconnaissance et de transduction des récepteurs présumptifs (Gales et al., 2006). L'expérience préliminaire de BRET nous apporte des éléments de réponse intéressants et, bien que des mises au point restent à faire, j'ai tenu à faire figurer, dans cette thèse, des ébauches de résultats ayant le mérite de susciter des discussions.

La différence d'activation de la protéine Gi par la protéine contrôle CXCL10 (voir Figure 45) peut s'expliquer de deux façons.

- L'affinité : l'équipe de P. Romagnani, qui a caractérisé le récepteur CXCR3b, a démontré que la protéine CXCL10 a une meilleure affinité pour le récepteur CXCR3a.
- La signalisation : la même équipe a mis en évidence que les deux récepteurs induisaient des voies de signalisation différentes, le récepteur CXCR3b étant insensible à un traitement à la toxine pertussique (PTX), alors que le récepteur CXCR3a y est sensible. La PTX est un inhibiteur

des sous-unités  $\alpha_i$  des protéines G. Donc, le récepteur CXCR3b n'interagit pas préférentiellement avec la sous-unité  $\alpha_i$  des protéines G.

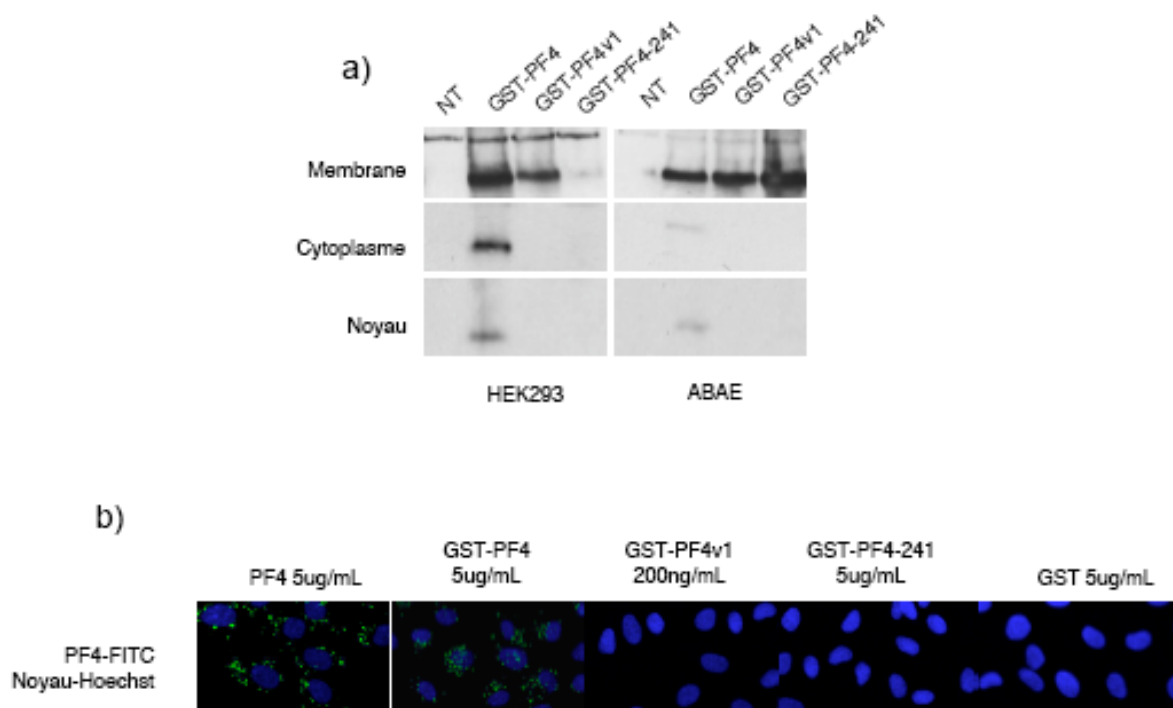
Nos résultats obtenus avec le récepteur CXCR3a sont donc validés. Par contre, les résultats à partir du récepteur CXCR3b devront être confirmés en utilisant la bonne protéine G. Pour cela, nous disposons déjà les ADNc, dans les vecteurs d'expression BRET, pour toutes les sous-unités  $\alpha$  caractérisées. Nous pourrions donc les tester afin de caractériser la sous-unité  $\alpha$  spécifique du récepteur CXCR3b. Néanmoins, les signaux BRET obtenus avec le récepteur CXCR3b sont tout de même significatifs qualitativement même s'ils ne sont pas encore quantitatifs. De plus, les résultats obtenus à partir de la protéine GST-PF4 confirment ceux obtenus par l'équipe de P. Romagnani c'est-à-dire une faible affinité pour le récepteur CXCR3a et une affinité identique à celle de CXCL10 pour le récepteur CXCR3b. L'absence d'activation de la protéine  $G_i$  par ce ligand, et donc l'absence d'activation d'effecteurs classiques, explique que nous ne connaissions pas encore le rôle de ces récepteurs dans les activités biologiques de PF4. La protéine PF4 peut être internalisée avec le récepteur, comme c'est le cas pour les chimiokines CCL21 et CXCL11 avec le récepteur CXCR3b (Colvin et al., 2004). Par contre, nous pouvons observer que la protéine GST-PF4v1 interagit principalement avec le récepteur CXCR3b et que les voies de signalisation activées sont différentes de celle induite par la protéine GST-PF4. L'affinité des deux chimiokines pour un même récepteur expliquerait que la protéine PF4 puisse inhiber l'activité biologique de la protéine PF4v1.

À l'instar de ce que nous pouvons supposer pour les activités de PF4 et PF4v1, des activités antagonistes ont été démontrées pour les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11. Ces ligands du récepteur CXCR3 peuvent aussi se lier avec le récepteur CCR3 bloquant ainsi l'activité des ligands du récepteur CCR3 (Loetscher et al., 2001). De plus, l'internalisation de certains récepteurs aux chimiokines peut être modifiée par des antagonistes (Mueller, 2007). Le récepteur CXCR3 peut être d'autant plus régulé qu'après son internalisation il est dégradé et non pas recyclé comme la plupart des récepteurs RCPG (Meiser et al., 2008). L'ensemble de ces données souligne l'importance que doit prendre l'étude comparative des voies de signalisation de nos deux chimiokines mais aussi avec d'autres chimiokines

inhibitrices ou activatrices afin de mieux percevoir le réseau de régulations susceptible d'être mis en place.



#### **Partie IV.    Rôle de l'internalisation du facteur PF4 dans                          son activité biologique**



**Figure 46 : Internalisation des facteurs PF4 et PF4v1 dans les cellules endothéliales.** Les cellules HEK293 et BAEC, stimulées 4h avec 1ug/ml des différentes protéines recombinantes, sont fractionnées. La présence des différentes protéines dans chaque extrait est ensuite révélée par western-blot avec l'anticorps mabPF4 (a). L'internalisation des protéines dans les BAEC est aussi visualisée par immunocytochimie en utilisant le même anticorps (b). La protéine PF4 est détectée grâce à un anticorps secondaire anti-mouse couplé FITC et les noyaux sont marqués par du Hoechst.

La protéine PF4 a été utilisée comme sonde pour la détection des GAGs membranaires des cellules endothéliales par imagerie (Silbert et al., 1990). Depuis, il a été observé que la protéine PF4 pouvait être internalisée dans les cellules endothéliales, et présentait alors une localisation péri-nucléaire. Cette internalisation peut être passive ou dépendre de l'interaction de la protéine avec un récepteur spécifique, comme par exemple les GAGs ou un RCPG. Le rôle de l'internalisation dans l'activité biologique de la protéine PF4 n'est pas caractérisé.

## **1 - Internalisation des facteurs PF4 et PF4v1 dans les cellules endothéliales**

Nous avons observé l'internalisation des protéines GST-PF4, GST-PF4v1 et GST-PF4-241 par fractionnement de cellules HEK293 (insensibles à PF4 et PF4v1), et de cellules BAEC (sensibles à PF4 et PF4v1). Les cellules sont traitées avec une quantité identique de protéines recombinantes : 1 µg/ml. La différence de rétention de protéines aux membranes des HEK293 est cohérente avec les résultats obtenus dans la partie 2.3. De plus, seule la protéine GST-PF4 est internalisée et nucléarisée dans les HEK293. Une interprétation est que, en l'absence de récepteur CXCR3, l'internalisation de PF4 dans ce type cellulaire est dépendante de la liaison aux GAGs (Figure 46, a).

L'internalisation des différentes protéines recombinantes dans les cellules endothéliales BAEC est identique à celle observée précédemment dans les cellules HEK293. Seule la protéine GST-PF4 est internalisée. Par contre, la fixation des protéines aux membranes est différente. On observe la même quantité de protéines GST-PF4, GST-PF4v1 et GST-PF4-241 fixées aux membranes purifiées. Cette différence peut être due :

- à une composition en GAGs différente de celle des HEK293
- à la présence d'un récepteur spécifique pour lequel ces trois protéines auraient une affinité identique. L'internalisation des protéines GST-PF4, GST-PF4v1 et GST-PF4-241 est aussi vérifiée par immunocytochimie (Figure 46, b).

### Extrait nucléaire :

|    |        |             |                                                                     |       |         |     |    |   |   |
|----|--------|-------------|---------------------------------------------------------------------|-------|---------|-----|----|---|---|
| 5  | P60712 | ACTB_BOVIN  | Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)                                   | 372,8 | 41769,7 | 5,3 | 26 | 9 | 9 |
| 6  | P00761 | TRYP_PIG    | Trypsin precursor (EC 3.4.21.4)                                     | 207,2 | 24393,8 | 7   | 25 | 6 | 6 |
| 9  | P19483 | ATPA1_BOVIN | ATP synthase alpha chain heart isoform, mitochondrial precursor     | 152,7 | 59682,7 | 9,2 | 5  | 2 | 2 |
| 11 | P81605 | DCD_HUMAN   | Dermcidin precursor (Preprodercidin)                                | 116,9 | 11276,8 | 6,1 | 20 | 2 | 2 |
| 18 | P00829 | ATPB_BOVIN  | ATP synthase beta chain, mitochondrial precursor (EC 3.6.3.14)      | 85,43 | 56248,6 | 5,2 | 5  | 2 | 2 |
| 25 | P02722 | ADT1_BOVIN  | ADP/ATP translocase 1 (Adenosine nucleotide translocator 1) (ANT 1) | 57,8  | 32815,2 | 9,8 | 5  | 2 | 2 |
| 27 | P10720 | PF4V_HUMAN  | Platelet factor 4 variant precursor (PF4var1) (PF4a10) (CXCL4L1)    | 57,59 | 11545,3 | 9,3 | 16 | 2 | 2 |

### Extrait cytoplasmique :

|    |        |              |                                                                                         |        |          |      |    |    |   |
|----|--------|--------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|--------|----------|------|----|----|---|
| 1  | Q258K2 | Q258K2_CANFA | Myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle                                                 | 4606,1 | 226328,4 | 5,5  | 42 | 91 | 8 |
| 2  | P35579 | MYH9_HUMAN   | Myosin-9 (Myosin heavy chain, nonmuscle 9a) (Nonmuscle myosin heavy chain 9a)           | 4601,9 | 226260,5 | 5,5  | 41 | 91 | 8 |
| 3  | Q27991 | MYH10_BOVIN  | Myosin-10 (Myosin heavy chain, nonmuscle 10b) (Nonmuscle myosin heavy chain 10b)        | 3493,7 | 228958,1 | 5,44 | 42 | 80 | 5 |
| 7  | Q62717 | Q62717_BOVIN | Non-muscle myosin heavy chain (fragment)                                                | 1905,3 | 72326,97 | 5,18 | 58 | 40 | 3 |
| 8  | P84136 | ACTB_CAMD    | Actin, cytoplasmic 1 (Beta-actin)                                                       | 1689,5 | 41774,76 | 5,3  | 56 | 38 | 3 |
| 17 | Q46546 | Q46546_MUSPF | Beta-actin (fragment)                                                                   | 726,43 | 35814,01 | 5,65 | 50 | 26 | 1 |
| 19 | P60661 | MYL6_BOVIN   | Myosin light polypeptide 6 (Myosin light chain alkali 3) (Myosin light chain 3) (MLC-3) | 575,58 | 16788,09 | 4,56 | 63 | 13 | 1 |
| 23 | Q380A2 | Q380A2_CANFA | Actin (fragment)                                                                        | 414,45 | 12195,97 | 4,94 | 62 | 11 | 1 |
| 24 | Q5E9E2 | Q5E9E2_BOVIN | Myosin regulatory light chain MRCL2                                                     | 463,65 | 19852,53 | 4,67 | 51 | 7  | 1 |
| 25 | Q5V059 | Q5V059_HUMAN | Tropomyosin 3                                                                           | 396,77 | 27157,84 | 4,77 | 43 | 11 | 1 |
| 31 | Q27966 | MYO1C_BOVIN  | Myosin 1c (Myosin 1 beta) (MM1 beta) (MM1b)                                             | 276,39 | 118873,3 | 9,33 | 7  | 7  | 1 |
| 32 | P02561 | TPM1_HORSE   | Tropomyosin alpha-4 chain (Tropomyosin-4) (Platelet beta tropomyosin)                   | 270,81 | 28374,43 | 4,65 | 21 | 6  | 1 |
| 38 | P15864 | H12_MOUSE    | Histone H1.2 (H1 VAR.1) (H1c)                                                           | 191,05 | 21122,68 | 11   | 19 | 4  | 1 |
| 39 | P52987 | CAZAT_HUMAN  | F-actin capping protein alpha-1 subunit (CapZ alpha-1)                                  | 163,9  | 32771,29 | 5,45 | 24 | 4  | 1 |
| 40 | P62157 | CALM_BOVIN   | Calmodulin (CaM)                                                                        | 163,4  | 16695,79 | 4,09 | 42 | 4  | 1 |
| 41 | P68183 | EF1A1_BOVIN  | Elongation factor 1.alpha.1 (EF-1.alpha.1) (Elongation factor 1 A.1) (eEF1A.1)          | 159,98 | 50189,11 | 9,1  | 10 | 5  | 1 |
| 44 | Q3MRM5 | TBB2C_BOVIN  | Tubulin beta-2C chain                                                                   | 137,97 | 49799    | 4,79 | 7  | 3  | 1 |
| 45 | P00761 | TRYP_PIG     | Trypsin precursor (EC 3.4.21.4)                                                         | 124,62 | 24393,8  | 7    | 16 | 3  | 1 |
| 47 | P02768 | ALBU_HUMAN   | Serum albumin precursor                                                                 | 85,43  | 69321,49 | 5,92 | 4  | 2  | 1 |
| 48 | Q32CJ7 | Q32CJ7_BOVIN | Tubulin, alpha 1 (Testis specific)                                                      | 81,86  | 49825,35 | 4,96 | 12 | 4  | 1 |
| 49 | P79136 | CAPZB_BOVIN  | F-actin capping protein subunit beta (CapZ beta)                                        | 71,75  | 33719,91 | 6,02 | 8  | 2  | 1 |
| 51 | Q3MHR5 | Q3MHR5_BOVIN | Splicing factor, arginine/serine-rich 2                                                 | 68,08  | 25461,88 | 11,9 | 4  | 1  | 1 |
| 54 | P62863 | H4_BOVIN     | Histone H4 (H4.1)                                                                       | 57,37  | 11229,34 | 11,4 | 10 | 1  | 1 |
| 61 | Q5E973 | RL18_BOVIN   | 60S ribosomal protein L18                                                               | 50,6   | 21390,98 | 11,7 | 7  | 1  | 1 |

**Table 12 : Partenaires intracellulaires de PF4 purifiés par SPR.** Après immobilisation de la protéine PF4 (purifiée de plaquette, HYPHEN Biomed), des extraits membranaires, cytoplasmiques et nucléaires sont injectés. Les protéines qui interagissent avec PF4 sont récupérées et séquencées par Qstar-MS/MS. Les protéines en vert ont un score suffisant pour une bonne identification, les protéines en rouge ont un score trop faible pour permettre une bonne identification et les protéines surlignées en jaune sont non-spécifiques.

## **2 - Partenaires intracellulaires de PF4**

Par analogie avec ce qui est décrit pour FGF1 et FGF2, deux facteurs de croissance présentant une forte affinité aux GAGs, ainsi que pour étudier la signification biologique de l'internalisation de la protéine PF4, nous avons recherché des partenaires intracellulaires de la protéine. La technologie SPR nous permet de visualiser des interactions entre la protéine PF4 immobilisée et des protéines d'extraits nucléaires et cytoplasmiques de BAEC. Ensuite, les protéines fixées à PF4 peuvent être récupérées et séquencées par spectrométrie de masse (Qstar-MS/MS). Les résultats ainsi obtenus sont décevants. Toutes les protéines que nous avons séquencées sont principalement des protéines du cytosquelette, des histones et des ATP synthases (Table 12).

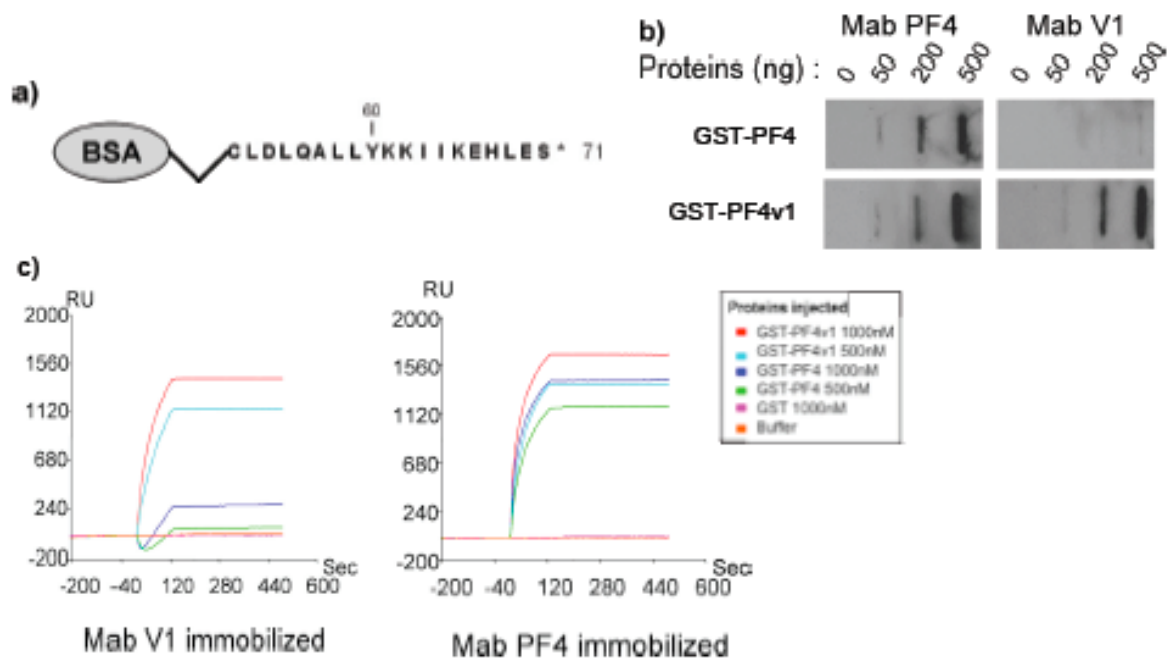
Par ailleurs, l'utilisation d'extraits membranaires de cellules BAEC ne nous a pas permis de caractériser un récepteur spécifique pour la protéine PF4.

## **3 - Discussion**

L'analyse des fixations des protéines PF4, PF4v1 et PF4-241 aux membranes des cellules endothéliales met en évidence un récepteur spécifique de ces facteurs. Il n'a pu être caractérisé par SPR-QstarMS/MS, malgré son abondance aux membranes des cellules BAEC. Ce récepteur peut être un protéoglycane spécifique des cellules endothéliales, qui interagirait tout de même avec la protéine PF4-241, ou un récepteur de type RCPG, pour lequel les trois ligands ont la même affinité. Par contre, l'internalisation de la protéine PF4 semble dépendre de sa fixation aux GAGs car il est aussi bien internalisé dans les cellules HEK293 que dans les cellules BAEC. Néanmoins, il faudrait déterminer la quantité réelle de PF4 internalisée par les GAGs car un récepteur de type RCPG, comme CXCR3b, peut être internalisé avec son ligand (Colvin et al., 2004). La localisation du CXCR3b internalisé dans les cellules endothéliales est périnucléaire comme la protéine PF4. Donc, les protéines PF4 et PF4v1 ont des mécanismes d'action différents. Il faudra déterminer si les cellules HUVEC expriment le récepteur CXCR3b et si l'activité de la protéine PF4v1

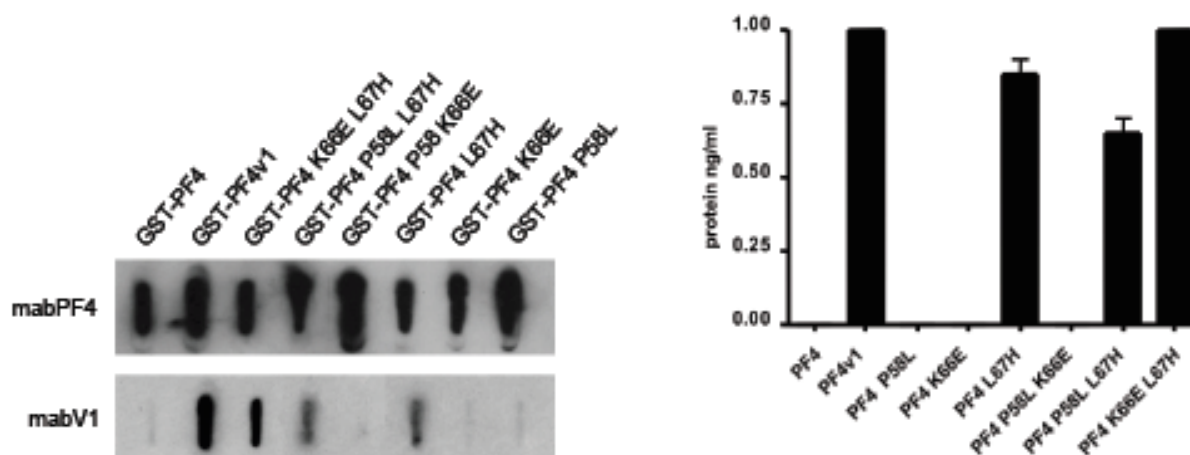
peut être inhibée par un antagoniste du récepteur. Il sera aussi intéressant de vérifier si la protéine PF4 peut être colocalisée avec le récepteur CXCR3b dans des cellules HUVEC stimulées. De plus, le rôle de l'internalisation dans l'activité antiangiogénique de la protéine PF4 avec ou non le récepteur CXCR3b, pourra être étudié en bloquant l'internalisation avec de la cyclodextrine.

**Partie V. Développement d'un nouvel outil : un anticorps monoclonal spécifique de PF4v1**



**Figure 47 : Caractérisation d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de PF4v1 : mabV1.**

a) Représentation schématique du peptide de fusion utilisé pour l'immunisation des souris. b) L'anticorps purifié mabV1 est testé en Dot-blot sur les protéines recombinantes PF4 et PF4v1. L'anticorps anti-PF4 (R&D System), qui reconnaît les deux protéines, est utilisé en contrôle. c) Sensogrammes résultant de l'injection de différentes concentrations de protéines recombinantes PF4 et PF4v1 (500nM et 1uM) sur les anticorps mabV1 et mabPF4 immobilisés (3000 RU).



**Figure 48 : Caractérisation de l'épitope du mabV1.** a) L'anticorps purifié mabV1 est testé en Dot-blot sur les protéines recombinantes PF4, PF4v1 et les différents variants. L'anticorps anti-PF4 (R&D System), qui reconnaît toutes les protéines, est utilisé en contrôle. b) Dosage ELISA, avec l'anticorps mabV1, des protéines recombinantes PF4, PF4v1 et des différents variants. Le mabV1 est immobilisé et l'anticorps polyclonal anti-PF4 (R&D System), qui détecte tous les variants de PF4, est utilisé pour la détection. Toutes les protéines sont testées à la même concentration de 1ng/ml. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de deux expériences indépendantes réalisées en triplicates.

Pour étudier l'expression de la protéine PF4v1 endogène, il manquait un outil important : un anticorps spécifique capable de distinguer les protéines PF4v1 et PF4. Nous avons développé cet outil, caractérisé l'épitope de l'anticorps et les applications pour lesquelles il peut être utilisé.

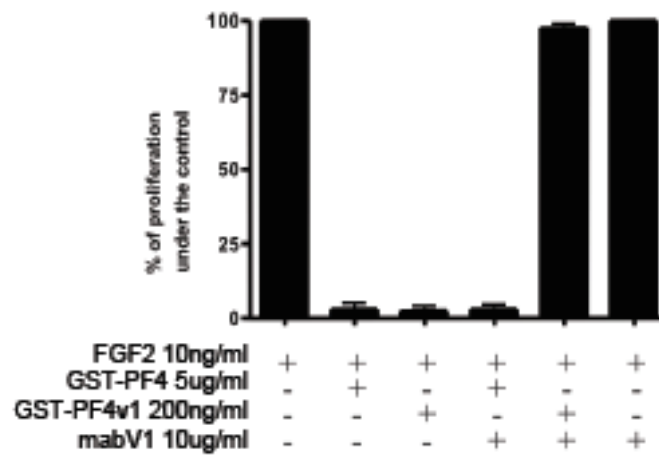
Cette partie a fait l'objet d'une déclaration d'invention (déposé le 7 octobre 2008). Brevet Européen n° EP08305648.1, intitulé : NEUTRALIZING MONOCLONAL ANTIBODIES AND FRAGMENTS THEREOF DIRECTED AGAINST THE HUMAN PLATELET FACTOR-4 VARIANT 1 (PF4v1). Dubrac A., Prats H. et Bikfalvi A.

## **1 - Développement d'un anticorps monoclonal de souris spécifique de PF4v1 : mabV1**

Les souris ont été immunisées avec un peptide contenant les 19 derniers acides aminés de PF4v1 (de l'acide aminé 52 à l'acide aminé 70). Tous les sérums obtenus, ont été testés par SPR pour leur capacité à se fixer aux protéines GST-PF4 et GST-PF4v1 immobilisées (Annexe). Ainsi, nous avons sélectionné le sérum 9E11 spécifique de la protéine PF4v1. Après purification de l'anticorps, sa spécificité a été validée par Dot-blot et par SPR. Dans les deux cas, l'anticorps détecte seulement la protéine PF4v1. L'analyse comparative par SPR des avidités des anticorps mabV1 et mabPF4, démontre que le mabV1 a deux fois moins d'affinité pour PF4v1 que l'anticorps commercial qui détecte les deux protéines PF4 et PF4v1 (Figure 47).

## **2 - Caractérisation de l'épitope du mabV1**

Pour caractériser l'épitope du mabV1, nous avons réalisé un Dot-blot en condition dénaturante à partir d'extraits de bactéries exprimant les différents mutants de PF4. Seules les protéines possédant l'histidine 67 sont détectées par l'anticorps mabV1. Ce résultat est confirmé par dosage ELISA des milieux conditionnés des HEK293 exprimant les différents mutants de PF4. Le mabV1 est immobilisé et l'anticorps polyclonal anti-PF4, qui détecte tous les mutants de PF4, est utilisé pour la détection. Tous les extraits sont dosés au préalable par ELISA anti-PF4 pour les



**Figure 49 : Activité bloquante du mabV1 sur l'activité biologique de PF4v1.** Test de prolifération de cellules endothéliales BAEC stimulées avec les protéines recombinantes GST-PF4 et GST-V1. L'expérience est réalisée en présence ou en absence de 10ug/ml de mabV1. Les résultats sont les moyennes  $\pm$  SEM de trois expériences indépendantes réalisées en triplicates.

tester ensuite à la même concentration de 1ng/ml de protéines recombinantes (Figure 48).

### **3 - Activité bloquante du mabv1**

L'histidine 67 est impliquée dans l'activité antiangiogénique de la protéine PF4v1. L'ajout de 10ug/ml d'anticorps mabV1 au test d'inhibition de la prolifération de cellules BAEC, en même temps que la protéine GST-PF4v1, abolit totalement l'activité biologique de la protéine. Par contre, l'anticorps n'a aucun effet sur l'activité de la protéine GST-PF4, ni sur l'activité de la protéine FGF2 (Figure 49).

### **4 - Discussion**

L'anticorps mabV1 est spécifique de PF4v1. Il distingue la protéine PF4v1 de la protéine PF4 en se liant à l'histidine 67. La détection de la protéine native PF4v1 par le mabV1 nous donne aussi des informations sur la structure de la protéine. La chaîne latérale hydrophobe de la leucine 67 de la protéine PF4 est orientée vers le noyau hydrophobe. Ce noyau est formé par les résidus des leucines et isoleucines, de la protéine. Le résidu imidazole hydrophile de l'histidine 67 doit être repoussé de ce noyau, modifiant ainsi de manière très importante la structure C-terminale de la protéine. Une différence importante de structure entre les protéines PF4 et PF4v1 peut expliquer les différences d'affinités aux GAGs, d'activités biologiques et de liaison aux récepteurs CXCR3a et CXCR3b. Cette hypothèse devra être validée par l'obtention de la structure tridimensionnelle de la protéine PF4v1 par cristallographie.

De plus, l'inhibition de l'activité antiangiogénique de la protéine PF4v1 par l'anticorps mabV1 confirme les résultats obtenus précédemment : l'histidine 67 est importante pour l'activité antiangiogénique de PF4v1. Cette expérience nous apporte des informations supplémentaires sur le mécanisme d'action du facteur PF4v1 :

- L'activité antiangiogénique de PF4v1 est indépendante de sa biodisponibilité.

- L'histidine 67 (ou du moins son environnement immédiat) participe directement à la liaison de la protéine avec un récepteur spécifique.

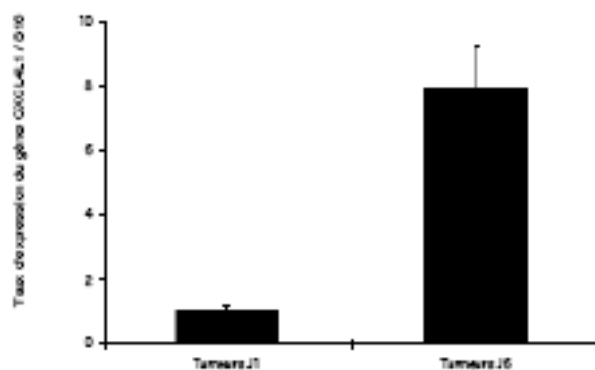
En tenant compte des résultats obtenus dans les expériences préliminaires de la Partie III, on peut supposer que l'histidine 67 ne modifie pas l'affinité de la protéine PF4v1, par rapport à la protéine PF4, pour un récepteur. Au contraire, la protéine PF4v1 doit avoir une affinité identique à celle de PF4. Une compétition des deux ligands pour un même récepteur expliquerait l'inhibition de l'activité de la protéine PF4v1 par la protéine PF4. Ainsi, les 2.5ug de protéines PF4 (par rapport aux 100ng de PF4v1) doivent saturer les sites de liaison. Il est probable que l'histidine modifie l'interaction avec le récepteur. Les récepteurs aux chimiokines ont plusieurs ligands avec des affinités différentes, comme les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 qui interagissent toutes avec le même récepteur, CXCR3a. Le domaine de liaison sur le récepteur est identique, mais la liaison de chacune de ces chimiokines génère des modifications conformationnelles différentes du récepteur. Ainsi, les voies de signalisation et les effecteurs sont différents (Clark-Lewis et al., 2003; Colvin et al., 2006; Colvin et al., 2004). Il est possible qu'il en soit de même pour les chimiokines PF4 et PF4v1 avec le récepteur CXCR3b. La protéine PF4, en liant le récepteur, activerait des voies de signalisation inhibitrices de la prolifération et de la migration indépendantes de la protéine G. Par contre, la protéine PF4v1 induirait ses effets par les effecteurs de la protéine G. Le rôle important de l'histidine dans cette interaction est renforcé par des travaux récents de l'équipe de Medina qui démontrent qu'un groupement imidazole augmente l'efficacité des antagonistes du CXCR3 (Du et al., 2008; Hayes et al., 2008).

Ce nouvel outil va nous permettre d'étudier l'expression de la protéine PF4v1 endogène dans les différents tissus mais aussi dans différentes pathologies. En premier lieu nous nous sommes intéressés à l'expression de la protéine PF4v1 dans les adénocarcinomes pancréatiques.

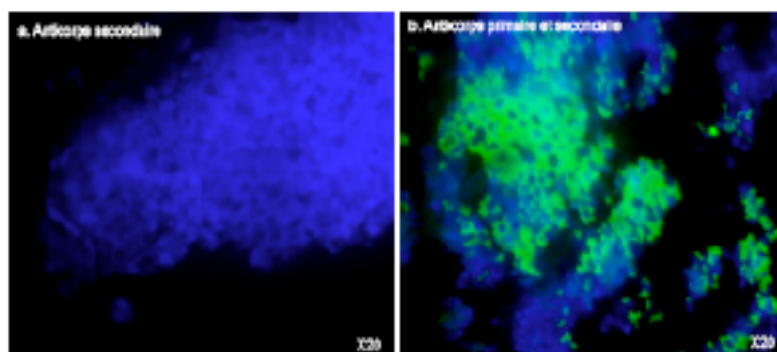
## **Partie VI. Surexpression de PF4v1 dans l'adénocarcinome de pancréas**

| ATyID              | Gène         | Description                                               | Rapport<br>jour6/jour1 |
|--------------------|--------------|-----------------------------------------------------------|------------------------|
| 241379_s at        | HHH1H8       | Basic helix-loop-helix domain-containing, class E, 5      | 41,78                  |
| 220889_s at        | CA14         | Carbonic anhydrase X                                      | 6,22                   |
| 223897_s at        | CA12         | Carbonic anhydrase XII                                    | 3,62                   |
| 224628_s at        | CDC47        | Cell division cycle associated 7                          | 2,26                   |
| 203757_s at        | CEACAM6      | Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 | 2,60                   |
| 204574_s at        | CLEHAP1      | Clustering associated protein 1                           | 6,25                   |
| 203400_s at        | COL1A1       | Collagen, type1, alpha 1                                  | 3,65                   |
| 211550_s at        | EGFR         | Epidermal growth factor receptor                          | 3,78                   |
| 211638_s at        | ERBB3        | V-erb-B1 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 | 4,26                   |
| 201410_s at        | CLSP1B       | Glycogen-like peptide 1 receptor                          | 8,64                   |
| 62_s at            | GSK3A        | Glycogen synthase kinase 3 alpha                          | 2,17                   |
| 1860009_s at       | HS22886      | Histidine H2 receptor, beta 2                             | 2,18                   |
| 201049_s at        | MMF2         | Matrix metalloproteinase (gelatinase A)                   | 6,36                   |
| 214180_s at        | MUC3AC       | Mucin 3AC, oligomeric mucin-like-forming                  | 9,28                   |
| 214359_s at        | MUC7         | Mucin 7, secreted                                         | 4,62                   |
| 203019_s at        | NTN1         | Netrin 1                                                  | 4,60                   |
| 201400_s at        | PCDH18       | Protocadherin 18                                          | 26,17                  |
| <b>207815_s at</b> | <b>PF4V1</b> | <b>Platelet factor 4 variant 1</b>                        | <b>14,64</b>           |
| 229124_s at        | PRKG1        | Protein kinase 1 (G12-VGDF)                               | 3,16                   |
| 211006_s at        | PTGER2       | Prostaglandin E receptor 2                                | 18,80                  |
| 247814_s at        | SERPINE1     | Serpin peptidase inhibitor, clade B, member 9             | 12,65                  |
| 1506010_s at       | STMN3        | Stathmin-like 3                                           | 2,84                   |
| 211612_s at        | TP53NP1      | Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1             | 16,49                  |
| 211400_s at        | TSPY4N1      | Tetraspanin 4                                             | 2,16                   |
| 211576_s at        | ULN1         | Unc-51 like kinase 4 (Calaguna)                           | 4,36                   |
| 201410_s at        | VEGFR3       | Vascular endothelial growth factor receptor 3             | 7,24                   |

**Table 13 : Gènes surexprimés dans les tumeurs BxPC3, 6 jours après implantation des cellules sur la CAM de poulet.** Puce Affimétix humaine (U133PLUS\_2), comparaison des gènes humains surexprimés 6 jours après xénogreffe sur CAM, par rapport à 1 jour post implantation. Le gène CXCL4L1 (PF4V1) est alors 14,64 fois plus exprimé. (L. Dumartin)



**Figure 50 : Surexpression de l'ARNm PF4v1 des tumeurs BxPC3 entre le 1er et le 6ème jour après implantation sur CAM.** Les résultats obtenus par qPCR sont normalisés par rapport au gène humain de référence S16. (L. Dumartin)



**Figure 51 : Immunomarquage de xénogreffes sur CAM, 6 jours après implantation de cellules de cancer pancréatique BxPC3.** a. anticorps secondaire seul. L'anticorps secondaire anti-goat FITC est spécifique. b. Les cellules exprimant PF4v1 sont détectées à l'aide de l'anticorps anti-PF4 (FITC, marquage vert), alors que les noyaux des cellules BxPC3 (bleu) sont marqués à l'aide du cell tracker blue. (L. Dumartin)

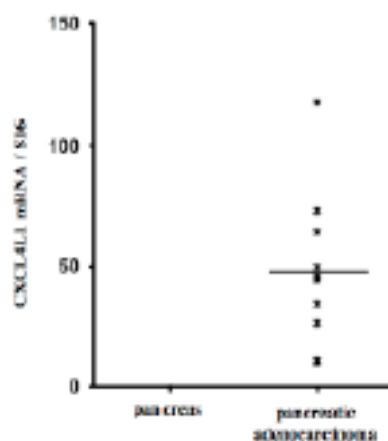
Cette première partie du travail a été réalisée par Laurent Dumartin. L'analyse du transcriptome, par puces Affymetrix (U133PLUS\_2), de xénogreffes de cellules d'adénocarcinomes pancréatiques (BxPC3) sur la membrane chorioallantoïdienne de poulet (CAM), montre une surexpression de plusieurs gènes dont PF4v1, 6 jours après implantation (Table 13). Le facteur plaquettaire 4 quant à lui ne semble pas être régulé. L'expression du transcrit PF4v1 est confirmée par qPCR (Figure 50). L'expression de la protéine PF4v1 a ensuite été validée par immunocytochimie (Figure 51). Puisque l'expression de PF4v1 n'est jamais retrouvée dans les cellules BxPC3 cultivées isolément, il semble évident que l'expression de l'ARNm PF4v1 par les cellules xénogreffées dépende de la présence d'un microenvironnement.

Dans un second temps, une étude est menée sur des biopsies de patients. L'expression du gène pf4v1 est quantifiée par qPCR (Figure 52). L'expression est fortement induite chez les 12 patients porteurs d'un adénocarcinome pancréatique (Figure 53) aussi bien au niveau ARN que protéine. Le marquage est absent des tissus sains, mais est très intense au sein de la tumeur primaire pancréatique et au niveau des métastases. Cependant, comme la distribution est hétérogène, nous pouvons supposer que cette expression soit sous-tendue par certaines caractéristiques des différents groupes de patients comme le stade tumoral, le pouvoir métastasant, etc.

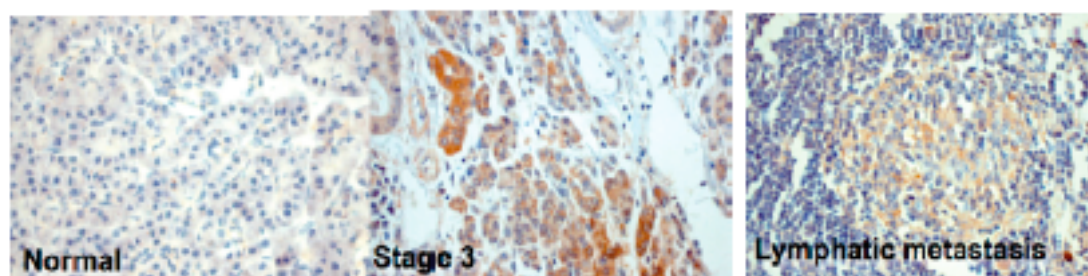
En l'absence d'anticorps spécifique de PF4v1, les marquages précédents avaient été réalisés avec l'anticorps commercial anti-PF4. Donc, pour valider ce travail, nous avons utilisé l'anticorps spécifique de la protéine PF4v1 sur des xénogreffes de BxPC3 chez des souris immunodéficientes RAG gamma et sur la CAM (Figure 54). Le marquage est aussi intense au niveau des tumeurs primaires que des métastases pulmonaires chez la souris. Nous obtenons également un marquage intense et spécifique au niveau des nodules de BxPC3 de la CAM.

La chimiokine PF4v1 est surexprimée dans les adénocarcinomes pancréatiques. De plus, cette expression est activée par le microenvironnement tumoral. L'expression de cette chimiokine pourrait donc constituer un nouveau biomarqueur du cancer du pancréas mais il reste encore de nombreuses questions en suspens :

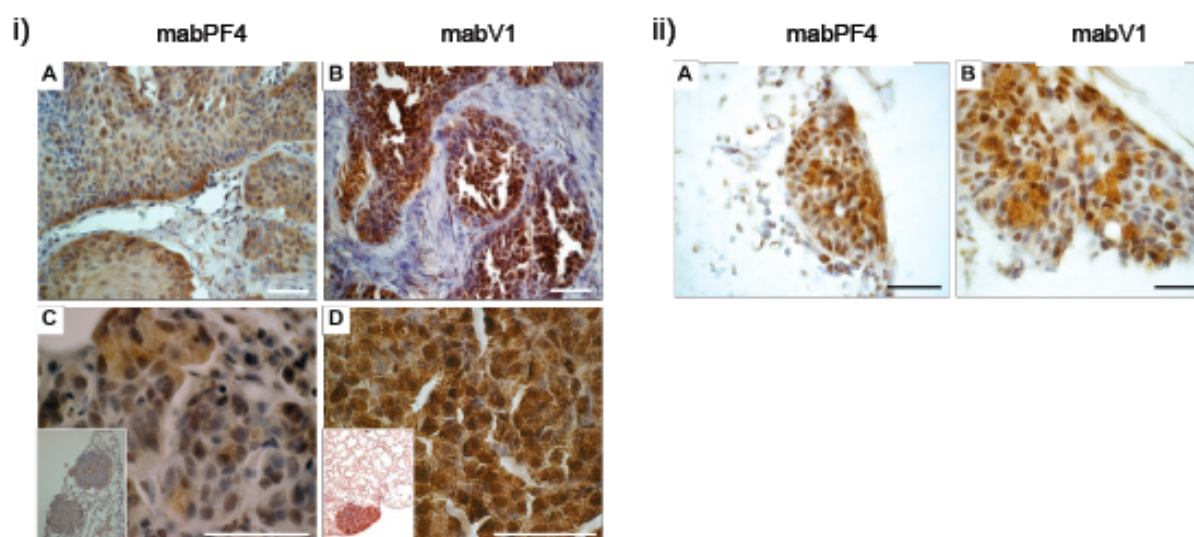
- Peut-on observer des différences d'expression de la protéine PF4v1 par des



**Figure 52 : Surexpression de l'ARNm PF4v1 dans des biopsies de pancréas de 12 patients atteints d'un cancer du pancréas.** Les résultats obtenus par qPCR sont normalisés par rapport au gène humain de référence S16. (L. Dumartin)



**Figure 53 : Marquage PF4v1 de cellules de pancréas humains sains ou cancéreux.** L'anticorps ne détecte rien dans les tissus sains. Par contre, nous avons un marquage intense au niveau de la tumeur primaire et des métastases. (L. Dumartin)



**Figure 54 : Immunomarquage de xénogreffes de cellules pancréatiques BxPC3 implantées chez la souris et sur la CAM.** (L. Dumartin). i) Immunomarquage de la protéine PF4v1 dans un modèle de xénogreffe de BxPc3 chez la souris. A et B : tumeurs primaires implantées en sous cutanée. C et D : micrométastases pulmonaires. ii) Immunomarquage de la protéine PF4v1 exprimée par les BxPc3 implantées dans un modèle de CAM à j6. Barres d'échelles : 50μm.

techniques classiques de biochimie tel que le western-blot ?

- Peut-on envisager un dosage par ELISA de la protéine PF4v1 dans les sérums des patients ?

- Quel est l'intérêt pour une cellule tumorale d'exprimer une chimiokine antiangiogénique ?

- Quelle est l'activité biologique de la protéine PF4v1 sur les cellules BxPC3 ?

Les chimiokines peuvent attirer, pour certaines, différents leucocytes comme les neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes au niveau des tumeurs (Coelho et al., 2005; Moser et al., 2004). Les macrophages recrutés au sein des tumeurs, en particulier les TAMs (tumor associated macrophages) peuvent participer à la progression tumorale. Par exemple, IL8 est connue pour attirer les neutrophiles. Cette chimiokine est produite par des cellules tumorales (SUIT-2) et les adénocarcinomes pancréatiques (Le et al., 2000). Cette chimiokine joue un rôle dans la progression du cancer du pancréas (Kamohara et al., 2007). Le facteur plaquettaire 4 agit lui aussi sur le recrutement des neutrophiles (Brandt et al., 2000) et des monocytes (Deuel et al., 1981) et induit la différenciation de ces derniers en macrophages (Scheuerer et al., 2000). Une étude récente montre que la protéine PF4v1 n'agit pas sur le recrutement des neutrophiles et des monocytes (Vandercappellen et al., 2007) mais pourrait, à l'image d'une autre chimiokine (CXCL9), attirer les lymphocytes T (Struyf et al., 2007). De plus, la chimiokine PF4v1 possède un fort pouvoir antiangiogénique. Donc, PF4v1 ne semble pas favoriser un environnement pro-tumoral.

Néanmoins, la chimiokine CXCL10 (IP10), de la même famille que PF4v1 et possédant une activité antiangiogénique identique, est surexprimée dans plusieurs cancers. La protéine CXCL10 peut favoriser la progression des tumeurs colorectales en agissant sur le microenvironnement tumoral, par exemple en recrutant les TAMs (Zipin-Roitman et al., 2007). L'expression de cette chimiokine peut être activée dans les cellules des tumeurs du sein, au cours de leur développement. La protéine CXCL10 stimule la prolifération des cellules MCF7 et MDA-MB-435 (Datta et al., 2006). Les deux équipes démontrent que l'activité de la protéine est régulée par deux récepteurs RCPG, le CXCR3a et le CXCR3b. En effet, les cellules cancéreuses mammaires expriment les deux récepteurs. En présence du récepteur CXCR3b, la protéine CXCL10 inhibe la prolifération des cellules, alors qu'en son absence la protéine CXCL10 active leur prolifération par l'intermédiaire du CXCRa. Il a aussi été

mis en évidence que le récepteur CXCR3a peut être exprimé dans des cellules pancréatiques lors de pancréatites chroniques (Singh et al., 2007). Cette pathologie peut engendrer des cancers du pancréas et elle rend le diagnostic, des cancers pancréatiques, difficile. L'équipe de J.D. Wig, démontre aussi que la surexpression du récepteur CXCR3a (7 fois) est corrélée avec la surexpression de la protéine CXCL10 (14 fois) dans les cellules des acini. Le rôle des deux protéines dans la pancréatite chronique n'a pas été déterminé par les auteurs. Par rapport aux résultats que nous avons obtenus, il est peu probable que la protéine PF4v1 participe à la progression des tumeurs pancréatiques en interagissant avec le récepteur CXCR3a. Mais, il sera donc intéressant de rechercher l'expression du récepteur CXCR3b. La protéine PF4v1 pourrait alors ralentir la croissance tumorale pour limiter les zones nécrotiques au sein des tumeurs. Ainsi, on peut supposer que la régulation de l'expression de deux récepteurs CXCR3a et CXCR3b, au sein des tumeurs, permet de réguler la progression tumorale en influant sur la balance angiogénique.

Ainsi, la protéine PF4v1 exprimée par les cellules cancéreuses pourrait plus simplement participer à la maturation des vaisseaux tumoraux. L'angiogenèse tumorale est anarchique, anormale et peu fonctionnelle. Les inhibiteurs de l'angiogenèse permettent, avec des doses modérées, la normalisation des vaisseaux. La protéine PF4v1 cible plus spécifiquement les cellules endothéliales que les protéines PF4 et CXCL10. Ces deux chimiokines participent aussi au recrutement des leucocytes et des monocytes, par l'intermédiaire du CXCR3a. Donc, l'activité antiangiogénique de la protéine PF4v1 endogène pourrait favoriser la progression des tumeurs pancréatiques en normalisant les vaisseaux tumoraux. D'autres données favorisent un effet paracrine de la protéine PF4v1 :

- On peut observer une absence de vascularisation au centre des nodules, peut être à cause d'un excès d'antiangiogène.
- Des expériences préliminaires montrent aussi une absence d'activité biologique de la protéine recombinante PF4v1 sur la prolifération ou la survie des cellules BxPc3 en culture.

La médiane de survie des patients atteints d'un cancer pancréatique est très faible (<10 mois) et la survie à 5 ans est inférieure à 5%. Ce pronostic est catastrophique du fait d'une chirurgie rarement envisageable et d'un diagnostic tardif

(on ne peut toujours pas distinguer les pancréatites chroniques de l'apparition d'un cancer). La découverte de nouveaux biomarqueurs sécrétés et diffusibles permettra le développement de nouveaux outils de détection qui aideront le diagnostic clinique et amélioreront le suivi thérapeutique. De plus, comprendre les mécanismes moléculaires qui induisent l'expression d'une chimiokine angiostatique comme PF4v1 peut servir à la mise en place de traitements de ce type de cancer.



## **Chapitre III : CONCLUSION ET PERSPECTIVES**



L'angiogenèse tumorale est un phénomène général des tumeurs solides. Les cellules endothéliales formant les néovaisseaux des tumeurs sont homogènes et génétiquement stables contrairement aux cellules cancéreuses. Dès 1971, Folkman considère l'angiogenèse comme une cible primordiale dans les traitements contre le cancer. Depuis quelques années de nouveaux types de molécules antiangiogéniques et anti-tumorales ont vu le jour comme les anticorps dirigés contre le VEGF mais aussi des molécules ciblant les récepteurs au VEGF. Néanmoins, l'efficacité des traitements antiangiogéniques varie d'un cancer à l'autre car il dépend de la combinaison des antiangiogènes et de la chimiothérapie. Il est donc important de développer de nouvelles molécules mais aussi de découvrir de nouveaux biomarqueurs thérapeutiques.

Les chimiokines sont impliquées dans la progression tumorale en agissant sur le microenvironnement tumoral, et notamment sur l'angiogenèse tumorale. Les mécanismes d'action de la plupart de ces facteurs sont bien caractérisés. Ces mécanismes sont complexes car ils dépendent de plusieurs facteurs : l'affinité pour les GAGs, l'oligomérisation, les hétérodimérisations et le récepteur. Ce dernier paramètre est le plus complexe car les chimiokines peuvent interagir avec plusieurs récepteurs et ont des activités agonistes ou antagonistes en fonction du récepteur. Cette complexité rend difficile l'appréhension de toutes les fonctions biologiques de ces facteurs et donc de déterminer, *in vivo*, la réelle fonction de chacun.

La protéine PF4 est la première chimiokine pour laquelle il a été caractérisé une activité antiangiogénique. Depuis, ses mécanismes d'action antiangiogéniques ont été caractérisés. Mais, il reste des interrogations quant à son récepteur. Récemment, un variant naturel de PF4 a été caractérisé, PF4v1. Ces deux chimiokines ont des différences d'activité antiangiogénique importantes alors qu'elles n'ont que trois acides aminés de différence.

Durant ce travail de thèse, nous nous sommes donc intéressés à caractériser les mécanismes d'action du facteur PF4v1 et à comprendre l'évolution des activités biologiques. Il est intéressant de déterminer pourquoi, au cours de l'évolution, une nouvelle chimiokine antiangiogénique est apparue. **Quelle est la signification de l'émergence d'une nouvelle et redondante activité antiangiogénique : la régulation de son expression ? les modalités de son activité ? sa biodisponibilité ?**

Au cours cette analyse fonctionnelle et structurale de la chimiokine PF4v1, nous démontrons que la protéine PF4v1 est beaucoup plus diffusible et biodisponible que la protéine PF4. Nous avons déterminé les affinités de PF4 et PF4v1 pour les GAGs. Ainsi, nous avons démontré que cette nouvelle caractéristique est apparue avec la substitution de la leucine 67 par une histidine dont la conséquence pourrait être l'émergence d'importantes modifications conformationnelles.

De plus, nous mettons en évidence que l'apparition de cet acide aminé est aussi causale de l'augmentation de l'activité antiangiogénique du variant. En effet, l'utilisation d'un anticorps ciblant spécifiquement cette histidine bloque l'activité de la protéine PF4v1.

Dans ce travail, nous abordons aussi les mécanismes moléculaires de l'activité antiangiogénique de la protéine PF4v1. Ses mécanismes semblent différents de ceux de la protéine PF4, puisque ses activités antiangiogéniques ne sont ni additives, ni synergiques mais étonnamment compétitives. Des résultats préliminaires nous indiquent aussi que la chimiokine PF4v1 peut s'homodimériser, comme les autres chimiokines, mais elle ne semble pas pouvoir s'hétérodimériser avec la chimiokine PF4. Cette caractéristique pourrait ainsi limiter l'inhibition de l'activité antiangiogénique de PF4v1 par la protéine PF4.

Nous commençons aussi l'étude des interactions des facteurs PF4 et PF4v1 avec les récepteurs CXCR3a et CXCR3b. Le récepteur CXCR3a est exprimé par les cellules hématopoïétiques, certaines cellules cancéreuses (cellules issues de tumeurs du sein) et par les cellules endothéliales. L'activation de ce récepteur participe à la prolifération des cellules. Par contre, le récepteur CXCR3b est impliqué dans des activités antiprolifératives et est exprimé plus spécifiquement par les cellules endothéliales. La chimiokine PF4v1 activerait spécifiquement le récepteur CXCR3b alors que la protéine PF4 peut se fixer sur les deux récepteurs. De plus, l'activité de la protéine PF4v1 passe par l'activation de la protéine Gi, contrairement à celle de la protéine PF4. L'étude préliminaire mérite donc d'être poursuivie pour mieux comprendre les bases moléculaires.

Enfin, nous avons développé un anticorps monoclonal spécifique de PF4v1. Il nous a aussi permis de démontrer que la protéine PF4v1 est un nouveau biomarqueur potentiel du cancer du pancréas. Dans cette étude, nous montrons que l'ARN messager et la protéine PF4v1 sont fortement exprimés au niveau d'adénocarcinomes pancréatiques humains. L'utilisation de l'anticorps spécifique

mabV1 nous permet de valider cette expression dans les biopsies des patients. La chimiokine PF4v1 pourrait alors servir de marqueur des cancers pancréatiques. Pour cela, il est nécessaire de développer un outil de détection de la protéine PF4v1 dans le sérum. En effet, nous montrons par ailleurs que la diffusibilité de PF4v1 en fait un candidat intéressant pour une détection sérique. Un test ELISA de dosage de la protéine PF4v1 circulante est en cours d'élaboration. Il nous reste à améliorer la sensibilité du dosage. Cependant, il serait nécessaire d'accumuler des données pour valider cette approche :

- L'expression de PF4v1 est-elle observée spécifiquement pour le cancer du pancréas ou bien est-elle plus générale ?
- Certains paramètres comme l'inflammation, les hémorragies ou les thromboses influent-ils sur l'expression de PF4v1 ?

Connaître plus en détail la régulation moléculaire et les mécanismes d'actions de cette chimiokine angiostatique permettra d'approfondir son rôle au niveau tumoral.

Ce travail nous permet de proposer deux modèles d'action de la chimiokine PF4v1.

- Les chimiokines PF4 et PF4v1, après leur sécrétion, auraient des cibles cellulaires différentes. PF4v1 agirait sur les cellules endothéliales les plus distales, alors que PF4 agirait sur les cellules endothéliales les plus proximales. De plus, si les deux chimiokines peuvent former des hétérodimères instable à l'aide de l'héparine circulante, on verrait apparaître des modifications de leur gradient (Figure 55).
- Le mécanisme d'action de PF4v1 au niveau de la cellule endothéliale est différent de celui de PF4. Interagissant faiblement avec les GAGs, on peut supposer qu'il se fixera principalement sur un récepteur spécifique inhibiteur de la prolifération et de la migration, peut-être le CXCR3b (Figure 56).

Pour répondre définitivement à la problématique principale de cette étude qui est de définir la caractéristique principale de la chimiokine PF4v1, nous devons confirmer les expériences préliminaires présentées. L'étude de l'interaction PF4v1/CXCR3b nous permettra de distinguer les activités de la chimiokine PF4v1 de celles des autres chimiokines antiangiogéniques PF4, CXCL9, CXCL10 et CXCL11. En se liant spécifiquement au récepteur CXCR3b des cellules endothéliales, la

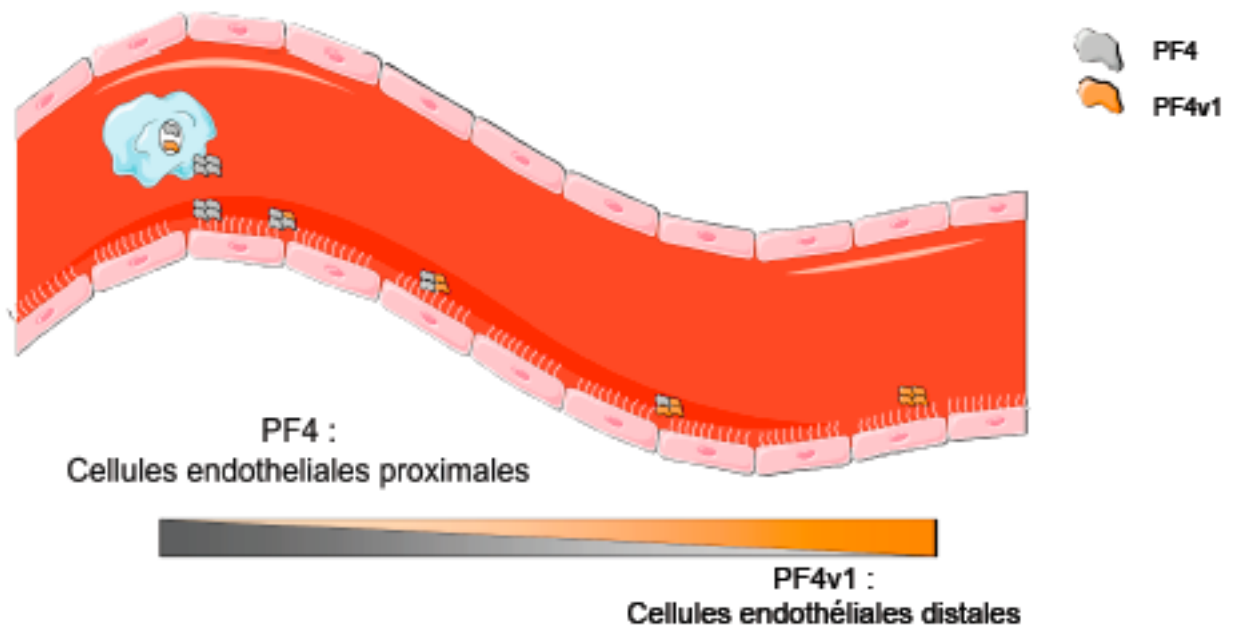


Figure 55 : Représentation schématique du modèle de biodisponibilité des chimiokines PF4 et PF4v1.

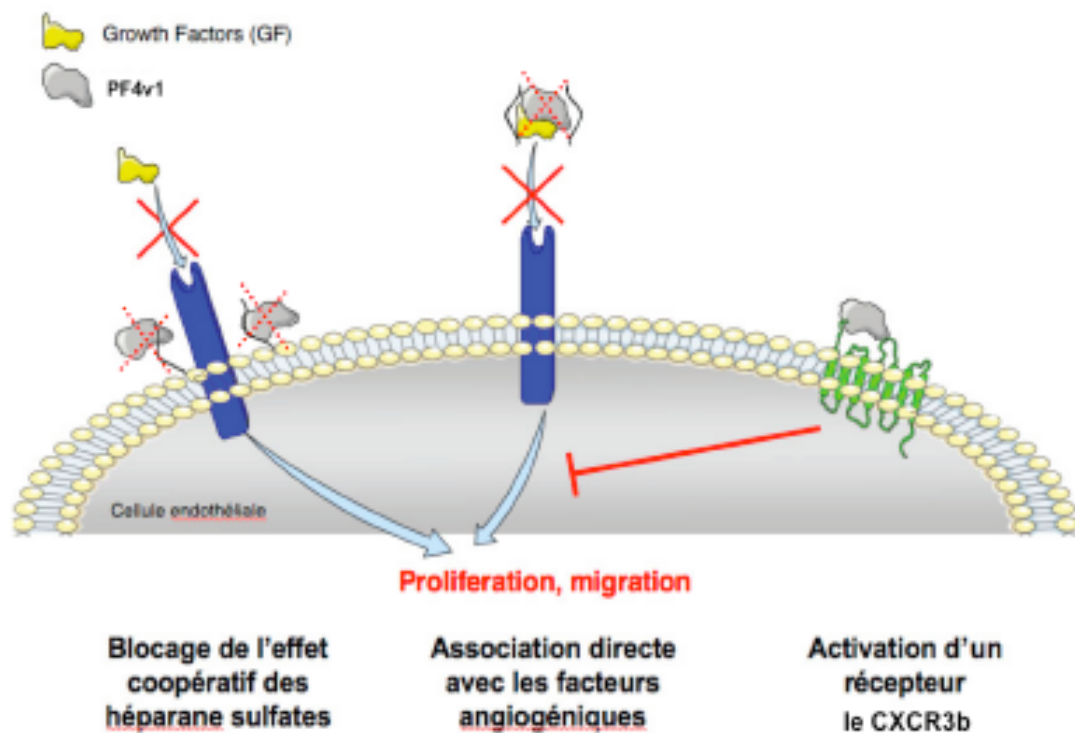


Figure 56 : Représentation schématique du mécanisme d'action de la chimiokine antiangiogénique PF4v1 sur les cellules endothéliales.

protéine PF4v1 se distinguerait des autres. Nous confirmerons que l'activité de la protéine PF4v1 est médiée par le récepteur CXCR3b en réalisant des tests de prolifération à partir de cellules transfectées avec un siRNA anti CXCR3.

Nous avons aussi débuté l'étude des activités antiangiogéniques *in vivo* des chimiokines PF4 et PF4v1. L'équipe de Strieter a déjà démontré que la protéine PF4v1 inhibe plus la formation de métastases que la protéine PF4 lors de xénogreffes de cellules LLC1 chez la souris. Nous voulons déterminer si cette propriété dépend de l'activité antiangiogénique ou uniquement de la diffusibilité de PF4v1. Pour cela, nous avons produit des lentivirus contenant les ADNc codant pour les protéines PF4, PF4v1, PF4 L67H, PF4P58L K66E et PF4-241. Ces ADNc sont sous le contrôle d'un promoteur inductible. Ainsi, nous avons produit des lignées LLC1 exprimant l'une de ces protéines sous le contrôle d'un répresseur. L'expression des différentes chimiokines pourra être déclenchée au stade choisi de la progression tumorale. Nous pourrions donc déterminer le rôle de l'histidine 67 dans l'activité antiangiogénique *in vivo*. L'analyse du mutant PF4v1-241 (PF4v1 dont les lysines sont substituées par des glutamates comme pour la protéine PF4-241) dans les mêmes expériences complètera cette étude.

Il sera aussi intéressant d'étudier le rôle des GAGs dans les interactions des chimiokines PF4v1, PF4, CXCL9, CXCL10 et CXCL11 avec leur récepteur. Pour cela, les expériences de BRET seront réalisées à partir de cellules traitées avec du NaClO<sub>3</sub>-. Les constantes d'affinités des chimiokines seront aussi déterminées par la technologie SPR. Enfin, nous étudierons leur diffusibilité *in vivo* comme nous l'avons fait pour les protéines PF4 et PF4v1. Nous avons produit la protéine PF4v1-241 et nous la testerons dans les différentes expériences citées précédemment mais aussi dans des tests d'activité biologique. Nous verrons si l'affinité modérée pour les GAGs de la protéine PF4v1 est nécessaire pour son activité biologique.

Il reste aussi à déterminer le rôle des deux autres acides aminés spécifiques de PF4, la leucine 58 et le glutamate 66. Ces mutations peuvent être impliquées dans des interactions avec d'autres chimiokines, notamment avec la protéine PF4. On envisage l'utilisation des protéines mutantes PF4 P58L et PF4 K66E dans des expériences de cross-link. Ces expériences seront complétées et validées par la

technologie alpha-screen. Cette technologie est basée sur les mêmes principes que le BRET mais on étudie les interactions de protéines en solution.

Les résultats obtenus durant ma thèse suggèrent tous que les différences d'activités biologiques observées entre les protéines PF4 et PF4v1 sont dues à d'importantes différences de structures tridimensionnelles. Nous collaborons avec l'équipe du Dr WU à Taiwan, pour l'obtention de la structure tridimensionnelle par cristallographie.

Enfin, il serait particulièrement intéressant de générer une souris transgénique exprimant PF4v1. En effet, le gène de PF4v1 est absent chez la souris mais celui codant son récepteur est présent puisque la protéine est active dans les expériences de xénogreffe. L'expression de PF4v1, sous contrôle de son propre promoteur, correspondrait alors à une « humanisation » du potentiel antiangiogénique murin et apporterait probablement beaucoup de données quant au rôle de cette chimiokine dans différents processus physiologiques comme pathologiques. De plus, comme nous disposons de grandes quantités de l'anticorps neutralisant spécifique de PF4v1, il serait assez simple d'élaborer des protocoles permettant d'étudier le rôle biologique de cette chimiokine dans le développement tumoral.

Finalement, à l'image de PF4, nous envisageons de développer des molécules anti-angiogéniques à partir de PF4v1. Nous étudierons l'activité biologique et la biodisponibilité de la protéine PF4v1-241, qui pourrait avoir les caractéristiques combinées des protéines PF4v1 et PF4-241. Cependant, la mise en place de nouvelles molécules thérapeutiques dans les traitements contre le cancer passe par une meilleure connaissance de ces molécules antiangiogéniques qui sont exprimées au sein de certaines tumeurs, comme PF4v1. Ces molécules pourraient aussi favoriser le microenvironnement tumoral, comme la chimiokine CXCL10. L'absence d'activité chimioattractive sur les leucocytes et les monocytes fait de la protéine PF4v1 un candidat particulièrement intéressant. Il faudra cependant élucider plus avant les mécanismes d'action de la protéine PF4v1 si l'on veut un jour utiliser cette chimiokine comme agent thérapeutique antiangiogénique.

Les travaux présentés dans ce manuscrit apportent plusieurs éléments de réponse aux questions souvent abordées dans le domaine de la biologie des chimiokines. Les différentes approches que nous avons choisies ont permis de distinguer les différentes caractéristiques biochimiques et biologiques qui distinguent deux chimiokines dont la divergence est récente dans l'évolution. Il est tout à fait remarquable de constater qu'un nombre très restreint de mutations engendre de telles différences de comportement entre ces deux chimiokines. Notre travail, bien que très incomplet, permet de poser l'hypothèse selon laquelle PF4 posséderait deux activités majeures : une faible action antiangiogénique et une forte action dans l'agrégation plaquettaire due à son extraordinaire affinité pour les GAGs. Les « mutations » de PF4v1 supprimeraient l'activité d'agrégation et spécialiseraient cette chimiokine dans l'action antiangiogénique. L'aspect le plus surprenant lié à cette spécialisation est probablement le fait que si peu de changements en acides aminés conduisent à (i) une modification d'intrication (et un mode de transduction) avec un récepteur inhibiteur de la prolifération et (ii) l'acquisition d'une diffusibilité et d'une stabilité in vivo en adéquation avec les fonctions d'un antiangiogène. Donc notre étude suggère, que le passage de la conformation classique d'une chimiokine à une conformation structuralement différente et fonctionnellement très distincte, ne tient qu'à un nombre très restreint de mutations et reflète l'extraordinaire potentiel évolutif de cette famille de gènes.



## **Chapitre IV :     MATERIEL ET METHODE**



## **Matériel & Methode**

### **Culture cellulaire :**

Les cellules BAEC sont cultivées dans un milieu DMEM 4.5g/l de glucose (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) contenant des antibiotiques, 1% de glutamine, et 10% de sérum de veau foetal et sont maintenues sous 10% de CO<sub>2</sub> à 37 ° C. Les cellules HUVEC sont cultivées dans des boîtes préalablement incubées avec de la fibronectine et dans un milieu M199 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) contenant des antibiotiques, 1% de glutamine, et 10% de sérum et sont maintenues sous 5% de CO<sub>2</sub> à 37 ° C. Les cellules HEK293T sont cultivées dans un milieu DMEM 1g/l de glucose contenant des antibiotiques, 1% de glutamine, et 10% de sérum et sont maintenues sous 5% de CO<sub>2</sub> à 37 ° C. Les cellules HEK293 sont transfectées avec du Jet-PEI (Invitrogen) en suivant les instructions du fournisseur.

### **Produits :**

La protéine purifiée de plaquette PF4 a été fournie par HYPHEN BioMed, la protéine recombinante CXCL10 a été fournie par R&D system et les différents GAGs, Heparin sodium salt de muqueuse intestinale de porc (H9399), chondroitin sulfate A sodium salt (C6737), chondroitin sulfate B sodium salt de muqueuse intestinale de porc (C3788), par Sigma. L'heparinase II de *Flavobacterium* (H6512) est fourni par Sigma. Les heparan sulfates sodium salt de porc (H1890-56) sont fournis par US Biological.

### **Plasmides codant les protéines PF4 et PF4v1 :**

Les régions codantes des ADNc humains PF4/CXCL4 et PF4v1/CXCL4L1 ont été clonées à partir des vecteurs pCDNA-PF4 et pCDNA-PF4v1 (vecteurs fabriqués par Renaud Grepin au laboratoire) en deux étapes successives. Tout d'abord, des fragments longs d'ADNc de PF4 et PF4v1, contenant les séquences des peptides signaux, ont été amplifiés par des amorces spécifiques de PF4 et de PF4v1 (Full-PF4s et full-PF4v1s pour les amorces sens ; full-PF4as et full-PF4v1as pour les amorces antisens, Tableau 2). Les amplicons (306 et 315 pb) ont été sous-clonés dans le vecteur PSC-A (Stratagene). Les constructions plasmidiques obtenues ont été vérifiées par séquençage de l'ADN. Ces constructions ont été utilisées comme matrice pour amplifier les régions maturées, sans peptide signal, des protéines PF4 et PF4v1 (PF4s et PF4v1s pour les amorces sens; PF4as et PF4v1as pour les amorces antisens, Tableau 2). Enfin, la séquence nucléotidique des clones sélectionnés a été vérifiée par le séquençage automatisé de l'ADN. Les produits de PCR purifiés ont ensuite été digérés par les enzymes de restriction BamH1 et Xho1 et insérés dans les plasmides pET15 (Novagen), pGEX-6P-2 (Amersham Biosciences) et par les enzymes de restriction Kpn1 et Not1 pour le plasmide pSCT (fabriqué au laboratoire, l'ADNc est sous le contrôle du promoteur CMV) pour générer les vecteurs d'expression pETPF4, PETPF4v1, pGEX-PF4, pGEX-PF4v1 et pSCTPF4, pSCTPF4v1.

### **Construction des vecteurs d'expression recombinants codant les mutants de PF4 :**

Les vecteurs d'expression pSCTPF4 et pGEX-PF4 ont été utilisés comme matrice d'ADN pour la mutagenèse dirigée en utilisant la procédure QuikChange II kit

XL (Stratagen) (Annexe, Tableau 1). Enfin, le criblage des clones mutants a été effectué par séquençage de l'ADN comme décrit précédemment.

### **Plasmides codant les protéines CXCR3a et CXCR3b :**

Les ADNc des récepteurs ont été fournis par l'équipe de J.P. Girard, et ils ont été insérés dans le vecteur pSCT en deux étapes successives. Tout d'abord, dans le vecteur PSC-A (Stratagene) et les constructions plasmidiques obtenues ont été vérifiées par séquençage de l'ADN. Puis, les fragments digérés par Kpn1 et Not1 ont été insérés dans le vecteur pSCT.

### **Production des protéines recombinantes PF4v1 et ses variants dans *E. coli* :**

Les *E. Coli* BL21 (DE3), transformées avec les plasmides pGEX-6P-2 ou pET15, (Amersham) contenant les différents ADNc décrits précédemment en fusion avec la GST, ont été cultivées dans 100 ml de LB avec 100 mg / ml d'ampicilline. Lorsque la DO des cultures, à la longueur d'onde 600nm, atteint 0,3-0,5 DO, l'expression des protéines de fusion est induite par l'ajout sous agitation de 0,5 mmol / L isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) (Euromedex). Les cultures sont cultivées pendant une nuit à 220 t / min et 25 ° C. Les cultures induites à l'IPTG, ainsi qu'une culture contrôle contenant le vecteur vide pGEX-6P-2, sont ensuite recueillies par centrifugation à 5000 tr / min pendant 15 minutes à 4 ° C. Les culots bactériens sont alors resuspendus dans 10 volumes de tampon de lyse contenant du PBS 1X (10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7.3, Lonza), 1 mg / ml lysozyme (Sigma) et un cocktail inhibiteur de protéases (Roche). Les cellules sont lysées par plusieurs cycles de congélation/décongélation dans de l'azote liquide, suivis par sonication (6 cycles de 30 secondes) dans un bain de glace. 5 g / ml DNase I (Sigma) sont ajoutés aux lysats et ces derniers sont incubés sur de la glace pendant 15 min pour compléter la fragmentation de l'ADN. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés par centrifugation à 12 000 tr/min pendant 30 minutes à 4 ° C et les surnageants recueillis.

### **Purification des protéines recombinantes GST-PF4v1 par chromatographie d'affinité :**

Les surnageants contenant les protéines recombinantes solubles GST-PF4v1 ou GST-PF4 (ou un autre mutant) sont chargés sur une colonne d'affinité HP GSTrap (5 ml; Amersham Biosciences) préalablement équilibrée avec du PBS IX, à un débit de 1 ml / min et à température ambiante. Les protéines fixées à la colonne sont ensuite lavées avec du PBS IX jusqu'à ce que l'absorbance à 280 nm soit redescendue à la valeur de référence. Une fois la ligne de base stable, les protéines recombinantes GST-PF4v1 fixées sont éluées par dix volumes de colonne de tampon d'élution (PBS IX, 20 mM de glutathion réduit, pH 8,0) à un débit de 1 ml / min. Les fractions éluées contenant les protéines recombinantes GST-PF4v1 sont regroupées. Les différentes étapes de la purification et les profils protéiques obtenus sont analysés par gels SDS-PAGE suivis d'une coloration au bleu de Coomassie (Biorad) ou d'une analyse par western blot.

### **Test de viabilité cellulaire :**

Les cellules BAE sontensemencées dans des plaques de 96 puits à fond plat à la densité de 5 x 10<sup>3</sup> cellules / puits et laissées croître pendant 24 h. Les cellules sont ensuite déprivées en sérum une nuit avant d'être traités pour 48h avec 10 ng / ml de FGF2 en présence ou non de différentes concentrations de protéines recombinantes.

Chaque condition est réalisée en trois exemplaires. La viabilité des cellules est mesurée à 490 nm par un test de prolifération cellulaire (CellTiter 96 Aqueous One Solution, Promega Corp) en suivant les instructions du fabricant.

#### **Test de migration cellulaire :**

$3 \times 10^5$  cellules BAEC sont ensemencées dans des boîtes de diamètre 35mm dans leur milieu de culture supplémenté en FGF2 (1ng/ml). Après 48h, les cellules sont déprivées en sérum et en FGF2 durant 48h. Une « blessure » est ensuite réalisée à l'aide d'un cône, les cellules sont lavées et incubées dans un milieu sans sérum supplémenté en FGF2 (10ng/ml) en présence ou non de différentes concentrations de protéines recombinantes produites chez E.Coli. La surface de la plaie réendothélialisée est quantifiée 18h plus tard grâce au logiciel ImageJ 1.4.

#### **Biotinilation des GAGs :**

Les différents GAGs ont été biotinilés à partir du kit EZ-link NHS-LC-biotinylation (Pierce), en suivant les instructions du fabricant.

#### **SPR (résonance plasmonique de surface) :**

Les expériences de fixation en temps réel ont été réalisées avec les biocapteurs Biacore 3000 (Biacore AB) ou ProteOn (Bio-Rad) et quantifiées en unités de résonance (RU) ( $1000 \text{ RU} = 1 \text{ ng de protéines lié/mm}^2$  de surface de cellule de flux) (Ferjoux et al, 2003). Les anticorps sont immobilisés sur une puce de dextran carboxyméthylé (puce CM5, Biacore AB) et les GAGs biotinilés sont immobilisés sur une puce de streptavidine (puce SA, Bio-Rad). Les anticorps (10000 RU) sont crosslinkés sur les cellules de flux 2 et 3 tandis que la cellule de flux 1 représente la référence d'interaction non spécifique. Les GAGs (90 RU) sont immobilisés sur les canaux 2, 3, 4, 5. Les ligands solubles sont injectés à un débit de  $30 \mu\text{l} / \text{min}$  et exposés à la surface durant 600sec (phase d'association). Cette étape est suivie par un flux de 300sec au cours duquel la dissociation se produit. Les sensorgrammes sont représentatifs des interactions spécifiques (réponse différentielle) quand la mesure de la fixation non-spécifique qui se produit dans le canal 1 est déduite des mesures des autres canaux. Les résultats sont exprimés en unités de résonance (RU) en fonction du temps (en secondes) (Linkins and Warkentin, 2008; Piccin et al., 2007).

#### **ELISA :**

Les concentrations en protéines recombinantes PF4, PF4v1 et des mutants ont été mesurées à l'aide d'un kit de dosage ELISA commercial (R & D Systems) en suivant les instructions du fabricant. Du PBS ou du milieu de culture ont servi de blanc.

Ce kit a servi à l'élaboration d'un premier test de dosage spécifique PF4v1. Après dosage des protéines, la concentration en protéines recombinantes est de nouveau mesurée en utilisant l'ELISA commercial sauf que cette fois le premier anticorps monoclonal de souris anti-PF4 a été remplacé par l'anticorps monoclonal de souris anti-PF4v1 (clone 9E11-2D5-2G1).

Les mesures sont effectuées en trois exemplaires et les résultats analysés à l'aide du logiciel Softmax Pro4.0 (Molecular Devices).

#### **Imagerie infra rouge in vivo :**

Le système d'imagerie infra-rouge Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) permet de détecter *in vivo* chez la souris et de quantifier un signal au sein des tissus en profondeur. Ce processus, plus sensible que la fluorescence dans le visible, est basé sur l'utilisation de fluorophores absorbant et émettant dans le proche infrarouge. Les protéines recombinantes PF4, PF4v1 et les mutants ont été couplés de manière covalente au marqueur infra-rouge IRDye 800 NHS selon la procédure expérimentale suivante : les protéines, reprises dans un tampon PBS 1X pH 8,5 à la concentration de 1mg / mL, sont rajoutées au marqueur IRDye 800 (20μmol/μL). Le volume de marqueur à ajouter est obtenu d'après la formule :

$$\text{Volume (en } \mu\text{L)} = \frac{233,2}{\text{Masse Molaire (kDa)}}$$

Le mélange protéine/marqueur infra-rouge est ensuite incubé 2h à l'abri de la lumière sous agitation douce et à température ambiante permettant d'établir une liaison entre les amines libres des protéines PF4 et PF4v1 et le groupement N-Hydroxy-Succimidylester du marqueur IRDye 800. L'IRDye 800 n'ayant pas réagi avec les protéines est éliminée par dialyse. Les protéines sont ensuite concentrées, dosées et les ratios marqueur infra-rouge/protéine sont déterminés par un gel SDS-PAGE scanné sur l'Odyssey. La localisation et la clairance *in vivo* des protéines PF4, PF4v1 et des variants couplés à l'IRDye 800 sont alors déterminées. 2nmole de protéine marquée sont injectées en intra veineuse à des souris immunodéficientes RaG gamma. Les souris sont ensuite scannées à différents temps post-injection sur le système d'imagerie infra-rouge Odyssey ( $\lambda_{\text{excit}} = 774\text{nm}$  et  $\lambda_{\text{émis}} = 805\text{nm}$ ) et les images obtenues sont analysées avec le logiciel de traitement d'image Odyssey.

#### **Mesure BRET (Bioluminescence resonance energy transfer) :**

Les plasmides, codants pour les récepteurs, les protéines G alpha étiquetés LucR (Luciférase Rénilla ; 460–500 nm) et les protéines G gamma étiquetés GFP2 (510–550 nm), sont transfectés de manière transitoire dans des cellules HEK293T. 48h après la transfection, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS 1X. Les cellules sont ensuite décollées avec du PBS 1X et redistribuées dans une plaque 96 puits (50ug de protéine par puit ; Optiplate, PerkinElmer, Lifescience). Pour l'étude des interactions les cellules sont incubées en présence ou non des différents ligands (1μM final) 1 minute avant l'ajout du substrat de la LucR DeepBlueC coelenterazine (5μM final ; PerkinElmer, Lifescience). La bioluminescence de la LucR est détectée entre 370–450 nm alors que celle de la fluorescence de la GFP2 est détectée entre 500–530 nm. Le signal BRET est calculé en faisant le ratio de la GFP2 sur la LucR (Gales et al., 2006).

#### **Western-blot Analyse :**

Les différents extraits protéiques ont d'abord été dosés par BCA (acide bicinchoninique). 30 à 60ug de protéines totales sont séparées sur un gel SDS-PAGES (gradient 4-20%, Pierce). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est ensuite incubée 30min dans un tampon de blocage TBST+3% lait, avant d'être incubée avec l'anticorps primaire anti-PF4 (mAb AF795, la R & D Systems, Minneapolis, MN, clone 170106, 7 mg / mL) pendant 1h à température ambiante. Après 3 lavages de 10 min au TBST, la membrane est incubée 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-mouse couplé à l'HRP (enzyme horseradish peroxidase). Ensuite, la membrane

est lavée 3 fois avec du TBST pendant 15min et les protéines sont révélées par bioluminescence avec de l'ECL (Enhanced Chemiluminescence Substrate).

#### **Dot Blot Analyse :**

L'anticorps monoclonal de souris dirigé contre PF4v1 (MabV1, clone 9E11-2D5-2G1) a été testé et son épitope déterminé par une expérience de dot blot en utilisant les protéines recombinantes PF4 et PF4v1. 0,5 mg de protéines ont été déposés sur une membrane de nitrocellulose en utilisant un appareil de microfiltration buvard. Après deux lavages de 5 minutes avec du TBS-Tween, la membrane est incubée avec 3% de lait dans du TBS-Tween pendant 30 min. Après trois nouveaux lavages de 5 minutes avec du TBS-Tween, la membrane est incubée avec les anticorps spécifiques à la dilution de 1:1000. Les anticorps suivants ont été utilisés: l'anticorps monoclonal anti-PF4 (mAb AF795, la R & D Systems, Minneapolis, MN, clone 170106, 7 mg / mL) et l'anticorps monoclonal anti-PF4v1 (MabV1, clone 9E11-2D5-2G1). La révélation de l'anticorps secondaire marqué HRP est réalisée avec le système ECL.

#### **Couplage covalent des protéines :**

Différentes quantités de protéines recombinantes, dans un volume final de 20ul, sont incubées sur la nuit à 4°C. On rajoute ensuite 5ul de PFA (ParaFormaldéhyde) à 4% et pH7 pendant 10min à température ambiante. Enfin, on ajoute 5ul de glycine 1M.

#### **Immunocytochimie :**

Les cellules BAEC sont fixées 15min à l'aide de PFA à 3% et pH7. Elles sont ensuite rincées deux fois au PBS et incubées avec une solution de PBS+50mM NH<sub>4</sub>Cl deux fois 20min à 4°C. Les cellules sont perméabilisées par un traitement de 5min à température ambiante avec une solution PBS+Triton X100 0.25%. Après deux lavages au PBS, les cellules sont incubées avec du méthanol absolu pendant 10min à -20°C. Ensuite, les cellules sont rincées avec du PBS+BSA0.5% et incubées avec l'anticorps primaire anti-PF4 (mAb AF795, la R & D Systems, Minneapolis, MN, clone 170106, 7 mg / mL) dilué au 1/250. Après 1h à température ambiante, les cellules sont rincées et incubées avec une solution contenant l'anticorps secondaire anti-mouse couplé FITC dilué au 1/500 (Sigma) et du Hoechst dilué au 1/1000 (Invitrogen). Les cellules sont ensuite motées entre lame et lamelle avec du milieu Glycérol gélatiné selon Kaiser (Merck).

#### **Analyses Statistiques :**

Les expériences sont répétées au moins deux fois. Les analyses statistiques sont effectuées par test t non appariés. Toutes les données sont sous la forme moyenne±s.e.m.



## **Chapitre V : ANNEXE**



**Partie I. Publication :** Dubrac A., Quemener C., Lacazette E., Lopez F., Zanibellato C., Wu W.G., Prats H. and Bikfalvi A. (2010). Functional divergence between 2 chemokines is conferred by single amino acid change. *Blood* 116, 4703-4711.



# Functional divergence between 2 chemokines is conferred by single amino acid change

Alexandre Dubrac,<sup>1,3</sup> Cathy Quemener,<sup>1,2</sup> Eric Lacazette,<sup>3</sup> Frédéric Lopez,<sup>3</sup> Catherine Zanibellato,<sup>3</sup> Wen-Guey Wu,<sup>4</sup>

\*András Bikfalvi,<sup>1,2</sup> and \*Hervé Prats<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U920, Talence, France; <sup>2</sup>Université Bordeaux, Talence, France; <sup>3</sup>Inserm, U858 and Université Paul Sabatier Toulouse, Toulouse, France; and

<sup>4</sup>Department of Life Sciences, Tsing Hua University, Hsinchu, Taiwan

**CXCL4 and CXCL4L1 are 2 closely related CXC chemokines that exhibit potent anti-angiogenic activity. Because interactions with glycosaminoglycans play a crucial role in chemokines activity, we determined the binding parameters of CXCL4 and CXCL4L1 for heparin, heparan sulfate, and chondroitin sulfate B. We further demonstrated that the Leu67/His67 substitution is critical for the decrease in glycan binding of CXCL4L1 but also for the increase of its angiostatic activities. Using**

**a set of mutants, we show that glycan affinity and angiostatic properties are not completely related. These data are reinforced using a monoclonal antibody that specifically recognizes structural modifications in CXCL4L1 due to the presence of His67 and that blocks its biologic activity. In vivo, half-life and diffusibility of CXCL4L1 compared with CXCL4 is strongly increased. As opposed to CXCL4L1, CXCL4 is preferentially retained at its site of expression. These**

**findings establish that, despite small differences in the primary structure, CXCL4L1 is highly distinct from CXCL4. These observations are not only of great significance for the antiangiogenic activity of CXCL4L1 and for its potential use in clinical development but also for other biologic processes such as inflammation, thrombosis or tissue repair. (Blood. 2010;116(22):4703-4711)**

## Introduction

The formation of new blood vessels (angiogenesis) is essential for embryonic development, postnatal growth, and wound healing. Angiogenesis also significantly contributes to pathologic conditions. Insufficient angiogenesis leads to tissue ischemia, whereas excessive vascular growth promotes cancer, chronic inflammatory disorders, or ocular neovascular disease.<sup>1</sup> Many positive and negative angiogenesis regulators have been identified including growth factors (such as vascular endothelial growth factors and fibroblast growth factors), guidance molecules (such as netrins), thrombospondins, or chemokines.<sup>1</sup>

Chemokines are broad-range regulators that play important roles in development, inflammation, HIV pathophysiology, and cancer.<sup>2</sup> Chemokines are divided into 4 subfamilies, based on structural properties and primary amino acid sequence, as CXC, CC, C, or CX3C.<sup>2</sup> Cell responses to chemokines involve interactions with glycosaminoglycans (GAGs), integrins, and receptors (GPCRs).<sup>3</sup> Concentration gradients of chemokines may be formed due to their interaction with GAGs. In vivo, these gradients are needed for cell migration and leukocyte arrest at inflammatory sites.<sup>3</sup> GAGs have a carbohydrate structure and are found on the cell surface and in the matrix. Heparan sulfate, chondroitin sulfate, and keratan sulfate, the most common GAGs identified on cell surfaces, vary by their lengths, repeating disaccharide units, and sulfation pattern.<sup>4</sup> Heparin is more often a circulating GAG.<sup>5</sup> The difference in GAG structure has consequences for their interaction with chemokines. This may lead to differences in localization, local or systemic concentration, and availability in vivo.

CXC chemokines represent a large family of homologous peptides exhibiting positive or negative activities on the control of angiogenesis.<sup>6</sup> Angiostatic CXC chemokines could play an important role in tumor development and dissemination. For example, overexpression of CXCL4 or CXCL10 has been shown to block tumor progression and to induce regression of metastasis.<sup>7,8</sup> We have extensively contributed in the study of CXCL4 (Platelet Factor 4 [PF4]).<sup>9-13</sup> We have demonstrated antiangiogenic, anti-invasive and antitumor properties of a C-terminal fragment of CXCL4.<sup>13</sup> Furthermore, we have partially elucidated its interaction with angiogenic growth factors and integrins.<sup>12,14</sup> In addition, it has also been shown that CXCL4 interacts with an alternatively spliced variant of the CXCR3 receptor.<sup>15</sup>

*CXCL4L1* (*pf4v1* or *pf4alt*) has arisen by recent duplication of the *CXCL4* gene and is only present in humans, chimpanzees, and monkeys. Both *CXCL4* and *CXCL4L1* genes are localized on chromosome 4, albeit in inversed orientation. Mature CXCL4L1 is highly homologous to CXCL4 and only differs in 3 amino acids. These 2 chemokines share several properties such as antiangiogenic activity and antitumor effects in vivo when administered as protein.<sup>16</sup> Despite the apparent similarity of both chemokines, crucial differences may exist such as in binding to GAGs, export, diffusibility, and interaction with receptors or oligomerization. It has been already reported that CXCL4L1 is very different to CXCL4 with regard to the mechanism of export from cells since CXCL4, but not CXCL4L1, is released from cells through dense core granules (DCCs) by a protein kinase C (PKC)-dependent mechanism.<sup>17</sup>

Submitted March 15, 2010; accepted July 27, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, August 5, 2010; DOI 10.1182/blood-2010-03-274852.

\*A.B. and H.P. are co-senior authors.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

In this study, we aimed to elucidate more precisely the functional differences between CXCL4L1 and CXCL4 especially with relation to their interaction with GAGs. We clearly demonstrated that CXCL4L1 and CXCL4 are very different in terms of in vitro glycan binding, in vivo diffusion, and biologic activity. These differences are conferred by single amino acid substitutions at the C-terminus of the molecule. These observations are not only of great significance for the antiangiogenic activity of CXCL4L1 and its potential use in clinical development, but also for other biologic processes such as inflammation, thrombosis, or tissue repair.

## Methods

### Cell lines, culture, and transfection

Bovine aortic endothelial cells (BAECs) were grown in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) 1 g/L glucose (Invitrogen) containing antibiotics (gentamicin), 1% L-glutamine, and 10% new born calf serum (NbCS). Human embryonic kidney (HEK)293T cells (GenHunter, Q401) were grown in DMEM containing 4.5 g/L glucose (Gibco), supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% glutamine, and antibiotics (penicillin/streptomycin). BAEC and HEK293T cells were cultured at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs; Lonza) were maintained in endothelial basal medium-2 (Lonza) supplemented with endothelial growth medium-2 SingleQuots (Lonza), which contains 2% FCS and were incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. For transient transfection experiments, cells were seeded onto 6-well dishes (5 × 10<sup>5</sup> cells/well) 24 hours before transfection. HEK293T cells were transfected with 50 ng of vectors using the JetPEI transfection reagent (Polyplus Transfection) according to the manufacturer's instructions.

### Cell proliferation assays

BAECs and HUVECs were seeded in 96-well plates at 5 × 10<sup>3</sup> and 1 × 10<sup>4</sup> cells/well, respectively and allowed to adhere overnight. Complete medium was replaced by serum-free medium and cells were treated in triplicate with 10 ng/mL recombinant basic fibroblast growth factor (FGF2) in the presence or absence of different concentrations of recombinants chemokines during 48 hours. As control, we carried out the tests in absence of FGF2 or recombinants proteins. Cell proliferation was measured at 490 nm using the CellTiter 96 AQueous One Solution cell proliferation assay (Promega) following the manufacturer's instructions.

### Migration assays

HUVEC migration assays were carried out using a transwell assay (membrane filter with 8-μm pore size; BD Biosciences). Cells (1 × 10<sup>5</sup>) in serum-free medium were seeded per insert and allowed to migrate for 6 hours at 37°C with serum-free medium 0.5% FBS in the lower chamber as a chemoattractant. Migrated cells were fixed, stained with Coomassie blue and counted. BAEC migration was tested by the scratch assay as described previously.<sup>18</sup> Surface recovery after migration was determined using National Institutes of Health ImageJ Version 1.44 software.

### HUVEC tube formation assays

Twenty-four-well culture plates (Nunc) were coated with 250 μL of Matrigel (BD Biosciences), and incubated at 37°C for 30 minutes. HUVECs (40 000 cells per well) were suspended in a culture medium (150 μL) containing 0.5% FCS, FGF2 (20 ng/mL) with or without the different conditioned media (350 μL) harvested from HEK 293 cells that were transfected with the different plasmids encoding the various chemokines or mutants. Before the assay, the concentration of the chemokines or mutant proteins was determined using the commercial CXCL4-enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (R&D Systems). Equal amounts of protein concentrations (1 μg/mL) were used for the assay. Untransfected conditioned medium was used as control. Finally, the cells were added to the Matrigel-coated wells (40 000 cells per well). HUVECs were incubated

for 10 hours at 37°C, and 4 digitized pictures were made per well to determine the number of branching points.

### Secretion and membrane retention assays

Twenty-four hours after transient transfection, media (soluble fraction) were collected, HEK 293T were washed and then treated or not with Heparinase II (1 U/mL, 1 hour, 37°C), or 2M NaCl in phosphate-buffered saline (1 minute, 37°C). Treatment solutions were collected and analyzed (membrane-associated fraction). In addition, cell were harvested and lysed with phosphate-buffered saline containing 1% nonyl phenoxypolyethoxyethanol (NP40) and the extracts were analyzed (intracellular fraction). In another set of experiments, cells were treated with 20 to 50mM NaClO<sub>3</sub> 24 hours after transient transfection for 24 additional hours. The different fractions were then collected as described above and analyzed.

### CXCL4/CXCL4L1-ELISA assays

The concentrations of CXCL4, CXCL4L1, and mutant proteins were determined according to the manufacturer's indications with the commercial CXCL4-ELISA kit (R&D Systems), which does not distinguish between CXCL4 and CXCL4L1. We also developed a specific CXCL4L1 (and derived mutants) test using part of the commercial CXCL4-ELISA kits where the first mouse monoclonal CXCL4 antibody was substituted by a mouse monoclonal CXCL4L1 antibody (Mab-L1). Assays were performed in triplicate and results analyzed using the Softmax Pro4.0 software (Molecular Devices).

### Animal studies

RAG-γ/c and BALB/c mice were housed and treated in the animal facility of Bordeaux University (Animalerie Mutualisée Bordeaux I). All animal procedures were done according to institutional guidelines and were approved by the Inserm institutional animal care committee. Then, 500 μL of blood were collected into each tube containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), mixed, and immediately placed in an ice bath for 30 minutes. Plasma was obtained by spinning the tubes in a refrigerated centrifuge for 30 minutes. Plasma samples were stored at -70°C until analysis with the commercially available CXCL4-ELISA kit that recognizes human but not mouse chemokines CXCL4 (R&D Systems).

### CXCL4 and CXCL4L1 labeling with IRDye800W and mice imaging

Eight-week-old RAG-γ/c mice (male, n = 6 per group) were injected intravenously with 2nM rCXCL4 and rCXCL4L1 proteins labeled with IRDye800CW (Protein Labeling Kit-HighMW#928-38040; LI-COR Biosciences). Infrared (IR) fluorescence imaging of live animals was done at each time point using Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) equipped with the MousePOD. Furthermore, blood was collected intracardially and organs were removed and scanned with the Odyssey Imaging System at baseline and at 1/2, 1, 2, 4, 12, 24, and 48 hours after administration of labeled chemokines.

### Electrotransfer of plasmids encoding CXCL4 or CXCL4L1 in the tibialis anterior of mice

Fifteen micrograms of control pSCT DNA plasmid or pSCT DNA plasmids encoding CXCL4 (pSCT-CXCL4) or CXCL4L1 (pSCT-CXCL4L1) were injected into the tibialis anterior of 6-week-old BALB/c mice (female, n = 6 per group). Electroporation was performed as described using an ECM 830 electroporator (BTX Division of Genetronics Inc).<sup>19</sup> For determination of CXCL4 or CXCL4L1 expression in the muscle, the electroporated tibialis anterior was excised and protein extracts, obtained after homogenization in a tissue extraction reagent (Invitrogen), were analyzed by Western blotting and densitometry.

### SPR

Real-time binding experiments were performed with a BIAcore 3000 biosensor instrument (BIAcore AB) or Proteon XPR36 (Bio-Rad)

biosensor instrument. Heparin (Hep), heparan sulfate (HS), or chondroitin sulfate B (CSB) were biotinylated (with the EZ-Link Biotin-LC-Hydrazide kit; Pierce) and were immobilized (140, 120, and 120 resonance units [RU], respectively) on a streptavidin-coated sensorchip (chip SA, BIAcore AB; NLC Sensorchip, Bio-Rad). Mab-L4 (mAb7952; R&D Systems) and Mab-L1 antibodies were immobilized (10 000 RU) on a CM5 sensorchip (BIAcore AB). Sensorgrams are representative of specific interactions (differential response) and results are expressed as RU as a function of time in seconds. A kinetic analysis to determine association, dissociation, and affinity constants ( $k_a$ ,  $k_d$ , and  $K_D$ , respectively) was carried out by injecting different protein concentrations over immobilized GAGs (16–2000 nM; 30  $\mu$ L/min; 600 second-association phase; 300-second dissociation phase) or over immobilized antibodies (31.25–500 nM; 30  $\mu$ L/min; 150-second association phase; 300-second dissociation phase). The dissociation rate of the complexes of recombinant proteins with GAGs or with antibodies were not influenced by the contact time (4–8 minutes, data not shown). Binding parameters were obtained by fitting the overlaid sensorgrams with the 1:1 Langmuir binding model of the BIAevaluation 3.1 software.

### Statistic analysis

Data are presented as mean  $\pm$  SD. Statistical analyses were performed using the Student *t* test. \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$ . Half inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) values were determinate with equation log (inhibitor) versus response variable slope (4 parameters), and half-lives were determined with equation 2 phases exponential decay (Graphpad Prism Software Version 1.0).

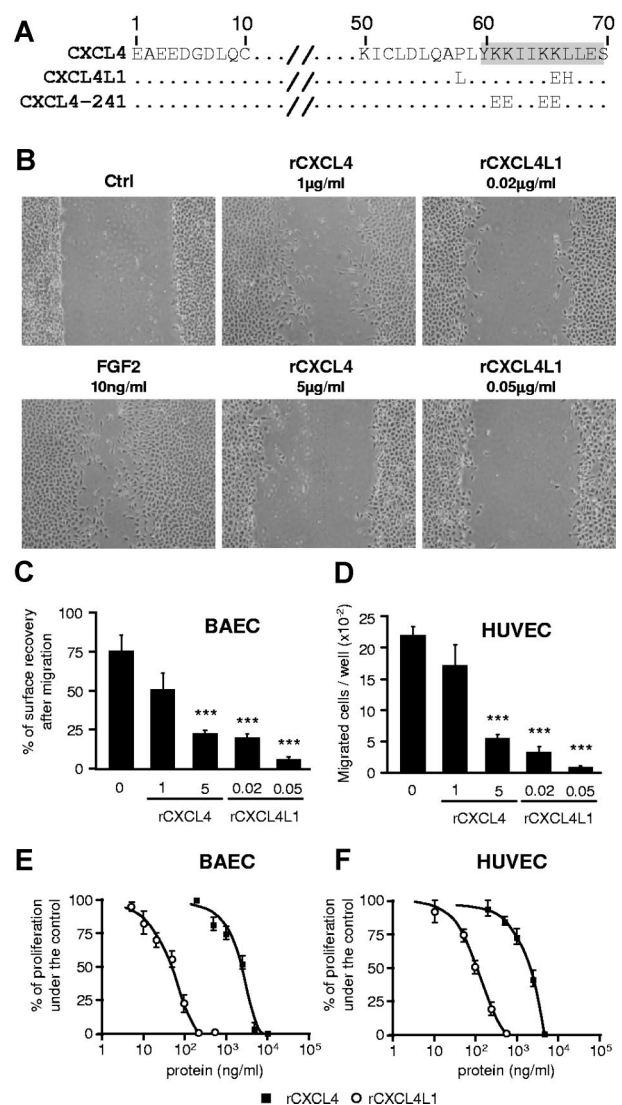
### Reagents, construction of expression plasmids, protein expression, purification, Western blot analysis, CXCL4L1-specific monoclonal antibody, and cell death assays

These items are described in detail in supplemental Methods and supplemental Table 1 (available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article).

## Results

### In vitro functional characterization of recombinant CXCL4 and CXCL4L1

Mature CXCL4 and CXCL4L1 only differs by 3 amino acids (Figure 1A) located in the C-terminal  $\alpha$ -helix (Figure 1A, gray shade). CXCL4 (rCXCL4) and -CXCL4L1 (rCXCL4L1) fused to glutathione S-transferase (GST) were expressed in *Escherichia coli*, purified by glutathione sepharose affinity chromatography and verified by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, Coomassie staining, and Western blot (supplemental Figure 1A). The biologic activity of rCXCL4 and rCXCL4L1 was evaluated through their ability to inhibit migration and/or the proliferation of endothelial cells in vitro.<sup>16</sup> Using the scratch wound assay we first confirmed that rCXCL4L1 is at least a 250-fold more potent inhibitor of cell migration than rCXCL4 for bovine aortic endothelial cells (BAECs; Figure 1B–C). The chemotactic activity of FGF2, tested on HUVECs by Boyden chamber assays, was drastically inhibited after 16 hours exposure to 20 ng/mL (2.5 nM) of rCXCL4L1, whereas rCXCL4 only did so for much higher concentrations ( $\geq 1000$  ng/mL, 125 nM; Figure 1D). Moreover, we evaluated the effect of rCXCL4 and rCXCL4L1 on FGF2-dependent proliferation of HUVECs and BAECs. As previously described, rCXCL4 inhibited proliferation of HUVECs<sup>20</sup> and BAECs with an  $IC_{50}$  of 2.3  $\mu$ g/mL. We determined an  $IC_{50}$  value of 0.053  $\mu$ g/mL for rCXCL4L1 indicating that the antiproliferative effect of CXCL4L1 is 43 $\times$  greater than that of CXCL4 (Figure 1C). In addition, no difference in activity was observed between

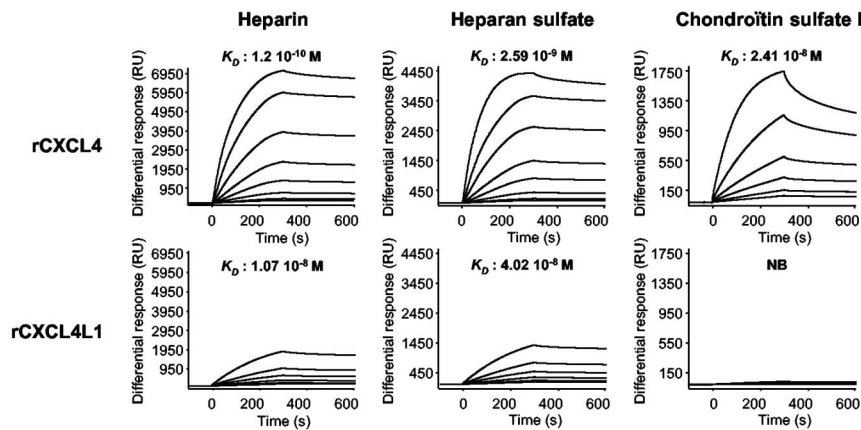


**Figure 1. Functional characterization of recombinant rCXCL4 and rCXCL4L1 in vitro.** (A) Alignment of CXCL4, CXCL4L1 and CXCL4-241 amino acid sequences. The fully conserved (.) and substituted residues were indicated.  $\alpha$ -helix (gray shade) of CXCL4 is represented. The alignment was constructed using ClustalW. (B) In vitro endothelial cell migration assay using the scratch assay. BAECs were stimulated with FGF2 (10 ng/mL) in the presence or absence of rCXCL4L1 (0.02 and 0.05  $\mu$ g/mL) or rCXCL4 (1 and 5  $\mu$ g/mL). (C) Quantification of the scratch assay results ( $n = 6$ ). (D) In vitro endothelial cell migration assay using Boyden chambers. In comparison, the effect of CXCL4L1 or CXCL4 on endothelial cell migration was also tested on HUVECs ( $n = 6$ ). (E–F) In vitro endothelial cell proliferation using MTT assay. BAECs and HUVECs were stimulated with FGF2 (10 ng/mL) in presence or absence of various concentrations of rCXCL4 or rCXCL4L1 and cell proliferation was determined.

rCXCL4 (CXCL4 fused to GST), CXCL4 purified after removal of GST (CXCL4c) or commercially available CXCL4 (supplemental Figure 1B). Similarly, GST fusion had no effect on CXCL4L1 activity (supplemental Figure 1B). In addition, rCXCL4L1 or rCXCL4 had no effect on nonendothelial cells such as HEK 293 (supplemental Figure 1C) and did not induce toxicity nor apoptosis of endothelial cells (supplemental Figure 1D–E). Taken together, this indicates that CXCL4L1 and, to a lesser extent CXCL4, act both on endothelial cell proliferation and migration without induction of cell death.

### rCXCL4 and rCXCL4L1 GAG affinities

GAG binding is of great importance for the biologic activity of a large number of chemokines and growth factors. It has previously



**Figure 2.** Overlaid sensorgrams for the binding of rCXCL4 and rCXCL4L1 to purified GAGs. Sensorgrams and representative  $K_D$  from the injection of different concentrations (15.6–2000 nM) of rCXCL4 and rCXCL4L1 over immobilized GAGs are depicted. NB indicates no binding.

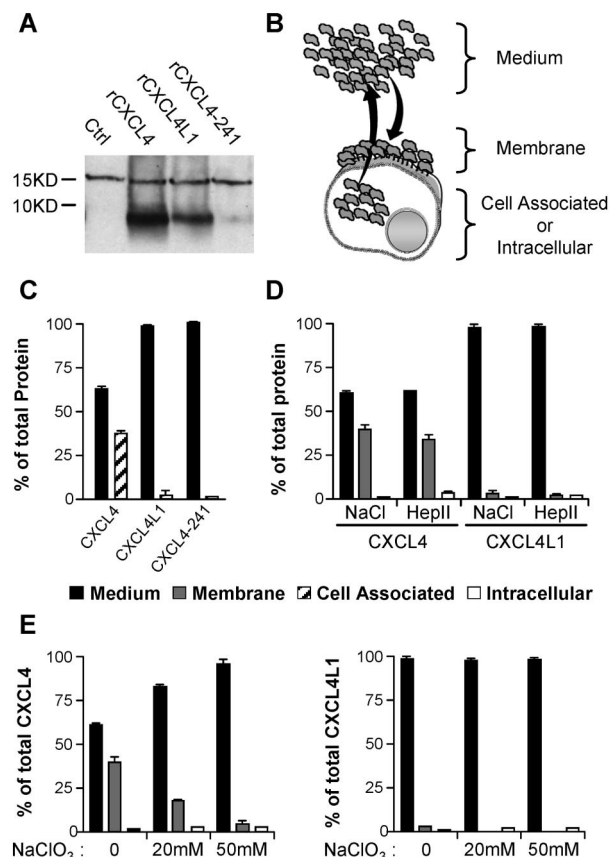
been shown CXCL4 can interact in vitro and in vivo with sulfated GAGs<sup>21–24</sup> and that the C-terminal region (in which lies the differences between CXCL4 and CXCL4L1) is required for these interactions.<sup>20</sup> Using surface plasmon resonance (SPR) experiments, we determined the affinity constants of the 2 chemokines for GAGs. To this aim, Hep, HS, and CSB were biotinylated and immobilized onto a streptavidin-coated sensor chip. As shown in Figure 2, rCXCL4 strongly bound to the immobilized GAGs with affinity constants of  $1.2 \times 10^{-10}$  M for Hep,  $2.59 \times 10^{-9}$  M for HS and  $2.41 \times 10^{-9}$  M for CSB. On the other hand, rCXCL4L1 bound to Hep and HS with moderate affinity of  $1.07 \times 10^{-8}$  M and  $4.02 \times 10^{-8}$  M, respectively. More surprisingly, no significant binding of rCXCL4L1 to CSB was observed ( $K_D > 10^{-2}$ ). These results clearly indicate that a difference of 3 amino acids between rCXCL4 and rCXCL4L1 has dramatic consequences for their interactions with GAGs. We next set out to examine the biologic consequences of these differences in cellulo and in vivo.

#### In cellulo diffusion of CXCL4 and CXCL4L1

First, HEK293 cells were treated with recombinant chemokines. We also included CXCL4-241 (initially named PF4-241) as a control. In the latter, the 4 lysines located at C-terminus of CXCL4 are mutated (Figure 1A) leading to a complete loss of heparin binding.<sup>20</sup> After 4 hours incubation, cell membrane fractions were analyzed by Western blotting using an anti-CXCL4 antibody that recognizes equally well the 3 proteins.<sup>16,25</sup> CXCL4 and CXCL4L1 were differentially bound to the cell membranes whereas CXCL4-241 was never found membrane-associated (Figure 3A). These results are in good agreement with the binding experiments (Figure 2).

We next determined whether the differences in GAGs affinities have consequences for the release when chemokines are expressed by the cells. To this goal, HEK293 were transiently transfected and a comparable level of CXCL4, CXCL4L1, or CXCL4-241 was obtained (supplemental Figure 2C). The protein content of different fractions (cell-associated, intracellular and membrane-bound fractions, and the culture medium) was determined (Figure 3B–C). The majority of CXCL4L1 was found in the medium, whereas a significant part of CXCL4 remained associated to the cells (Figure 3C). As expected, CXCL4-241 was only detected in the medium (Figure 3C). To identify whether cell-associated chemokines were bound to the cell surface or remained intracellular, various treatments that dissociate molecules from GAGs were used. High salt treatment completely removed CXCL4 and CXCL4L1 indicating that chemokines were associated with the cell surface in a

noncovalent manner (Figure 3C). Heparanase II treatment indicated that HS-GAGs are the major cell surface binding sites for both, CXCL4 and CXCL4L1 (Figure 3D). After 48 hours pretreatment of HEK293 cells by sodium chlorate (inhibition of GAGs sulfation), a drastic reduction in protein content in the membrane



**Figure 3.** In vitro association properties of CXCL4 and CXCL4L1 to GAGs sulfated membranes. (A) Western blot with Mab-L4 antibody, which neither discriminates between CXCL4, CXCL4L1, or CXCL4-241, of membrane fractions of cells treated with 1  $\mu$ g/mL recombinant proteins. (B) Schematic representation of membrane retention or diffusion of secreted protein after transfection. (C) CXCL4-ELISA assay on the different fractions of transfected HEK293T cells. CXCL4, CXCL4L1, and CXCL4-241 released in the medium (1) or remaining cell-associated (2), were quantified. (D) Distribution of CXCL4 and CXCL4L1 in medium and the membrane bound or intracellular fraction. Membrane-bound chemokines were collected with high salt (NaCl) or heparinase II (Hep II) treatment. (E) Membrane binding of CXCL4 and CXCL4L1 in cells treated or not with sodium chlorate ( $\text{NaClO}_3$ ). Results are represented as percent of total proteins expressed.

fraction was observed for CXCL4. In addition, CXCL4L1 which was initially already low, was further decreased by sodium chlorate pretreatment (Figure 3E). This indicates that sulfate groups are required for binding. Furthermore, our results clearly indicate that CXCL4 was much better recovered from the membrane than CXCL4L1 (39% for CXCL4 versus 2% for CXCL4L1 in the membrane fraction). Significantly more CXCL4L1 than CXCL4 was found in the medium (98% for CXCL4L1 versus 60% for CXCL4). Thus, CXCL4L1 is less tightly associated to the cell surface than CXCL4 and diffuses much more efficiently after secretion.

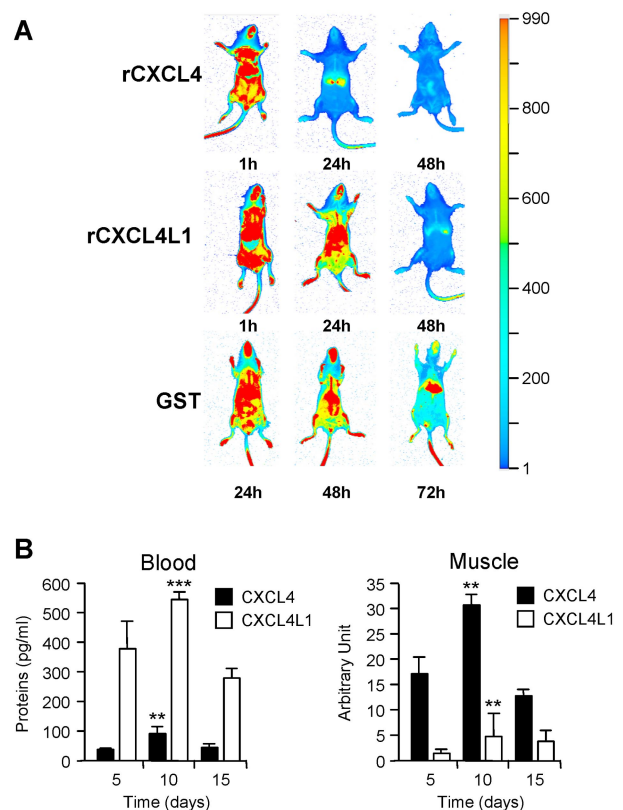
It has been recently published that the secretion of CXCL4 is much lesser efficient than that of CXCL4L1 due to their respective signal peptides that are much more divergent than the mature protein.<sup>17</sup> Because the differences in the signal sequence could greatly influence our analysis, we design expression vectors in which the signal peptides were exchanged or replaced by the vascular endothelial growth factor signal sequence (supplemental Figure 2A). Whatever the signal peptide used, secretion efficiency was very high, and no effect on the distribution of CXCL4 or CXCL4L1 within the different fractions (membrane, intracellular, medium) was observed (supplemental Figure 2B). In the absence of signal peptide, there was no release of CXCL4, even if transfected cells were washed with a high-salt solution to remove membrane-bound chemokines (supplemental Figure 2). Thus, although the signal peptides exhibit 38% amino acid divergence, both chemokines are released with similar efficiency.

Consequently, the differences in the distribution of both chemokines in the different cell compartments are due to the 3 amino acids divergence of the C-terminus.

### In vivo behavior of CXCL4 and CXCL4L1

Because the in cellulo diffusibility of CXCL4L1 was greatly enhanced compared with CXCL4, we examined the bioavailability and the clearance of these 2 molecules in vivo. To this aim, rCXCL4 and rCXCL4L1 were labeled with IR dye (supplemental Figure 3A). Biologic activities were verified before injection (supplemental Figure 3B). A single intravenous injection of  $2 \times 10^{-9}$  moles (17  $\mu$ g) of labeled chemokine was given to mice. After 24 hours, fluorescence imaging revealed a much more rapid clearance for rCXCL4 than rCXCL4L1 (Figure 4A) and a greater accumulation of rCXCL4 in the liver (Figure 4A and supplemental Figure 3C). Serum levels of rCXCL4 and rCXCL4L1 were determined at different times after injection into mice using a specific ELISA test that does not recognize mouse CXCL4. In agreement with previous studies,<sup>22,26</sup> our results indicated that rCXCL4 was very rapidly cleared from the circulation in a biphasic pattern with half-lives of 2.1 minute and 30–40 minutes. rCXCL4L1 showed also a biphasic pattern of disappearance from the circulation with half-life of 5.33 minutes and 58 minutes (supplemental Figure 3D).

We next investigated the in vivo bioavailability of CXCL4 and CXCL4L1 when expressed continuously by a mouse tissue. To this aim, plasmids expressing human CXCL4 or CXCL4L1 cDNAs were electrotransferred into the tibialis anterior muscle of Balb/c mice. At specified time points after electrotransfer, chemokine levels were measured both in the plasma and muscle using ELISA test that only recognizes human CXCL4L1 or CXCL4. As shown in Figure 4B, the amount of circulating CXCL4L1 was much greater than that of CXCL4 (left panel). This was inverted in the muscle, where much more CXCL4 than CXCL4L1 was recovered (right panel). These data clearly show that CXCL4L1 is highly diffusible,

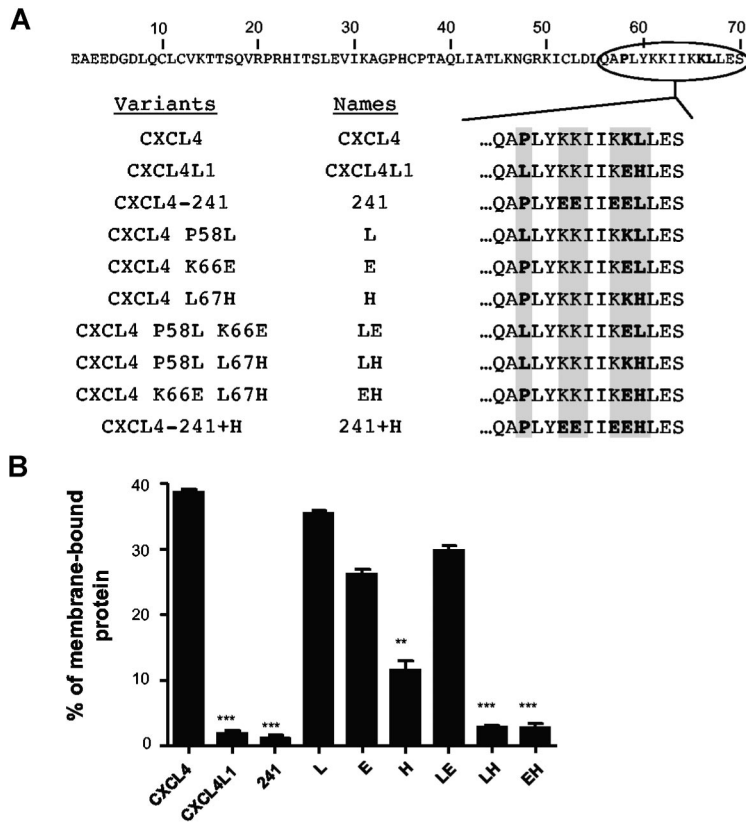


**Figure 4. In vivo diffusion of CXCL4 and CXCL4L1.** (A) Injection of rCXCL4, rCXCL4L1, or GST labeled with IRDye800CW in RAG- $\gamma$ /c mice ( $n = 6$ ). Biodistribution was monitored with IR signal at 1, 24, and 48 hours after injection. GST was still detected at 72 hours, whereas CXCL4 and CXCL4L1 were completely cleared from the mice. (B) In vivo diffusion of human CXCL4 and CXCL4L1 expressed in mice using electrotransfer in the tibialis anterior muscle ( $n = 6$ ). Plasma levels were determined using a human CXCL4-ELISA (left panel) specific for human chemokines. No signal was detected in controls (mouse tissue). Expression of human CXCL4 and CXCL4L1 in the tibialis anterior muscle was also detected by Western blot using Mab-L4 (right panel). The graphs represent the densitometric analysis. No signal was observed for control mice electrotransferred with the empty vector.

in contrast to CXCL4, which remains sequestered in the muscle, the site where it is produced.

### Leucine versus Histidine at position 67 is critical for GAGs affinities

Because mature CXCL4L1 only differs from CXCL4 by 3 amino acids, we determined which substitution is responsible for the variations in GAG affinity. We produced a series of CXCL4 mutants (Figure 5A and supplemental Figure 1A). It is of note that the variant CXCL4 L67H could not be produced, probably because of a defect in the stability of the recombinant protein in *Escherichia coli*. Using SPR analysis, all the purified proteins were tested and their affinity constants for immobilized GAGs were determined (Table 1). Each individual substitution had more or less an effect on GAGs binding. Remarkably, all molecules with His67 (including CXCL4L1) had very reduced affinities for Hep and HS and did not bind CSB. On the other hand, proteins with Leu67 (including CXCL4) showed high affinities to Hep ( $K_D$  values at the picomolar to nanomolar range) and HS. Within this last class of proteins, the Pro58 substitution (L and LE proteins) abolished the binding to CSB. This indicates that, together with Leu67, Pro58 is required for CSB binding of CXCL4. The Lys/Glu66 substitution had only a moderate effect.



**Figure 5. Histidine 67 is critical for the membrane binding of CXCL4L1.** (A) Schematic representation of the amino acid sequences of CXCL4, CXCL4L1, or mutants. (B) In cellulo binding properties of CXCL4, CXCL4L1 and mutants to cell membranes. HEK293T cells were transfected with plasmids expressing CXCL4, CXCL4L1, or mutants. The amount of proteins associated with the membrane was determined using the human CXCL4-ELISA, which detects CXCL4, CXCL4L1, and all variants.

To validate these observations in the living cell, we performed in cellulo diffusion assays. As shown in Figure 5, the different chemokines, when transfected in HEK 293 cells, were efficiently produced and secreted (supplemental Figure 2C-D). The results clearly show that the presence of His67 inhibited chemokine retention at the cell membrane. These results are in agreement with affinities for GAGs observed by SPR (Table 1) confirming that GAGs are essential for cell surface retention. Interestingly, the Lys/Glu66 substitution (Table 1) showed a greater effect on membrane retention than on GAG affinity (Figure 5B). This indicates that other membrane constituents (eg, lipids) may also contribute to surface retention.

**Histidine 67 is critical for inhibition of cell proliferation and in vitro angiogenesis**

We then assessed the ability of rCXCL4 mutants to inhibit the proliferation of BAECs. IC<sub>50</sub> and I<sub>max</sub> presented in Table

2 (complete data are presented in supplemental Figure 4) clearly show that 2 groups could be distinguished: proteins with Leu67 and proteins with His67. Proteins with Leu67 (including CXCL4) showed an IC<sub>50</sub> ranged between 0.8 and 2.3 μg/mL whereas those with the His67 (including CXCL4L1) have an IC<sub>50</sub> ranged between 0.04 and 0.15 μg/mL. In accordance with previous results, we showed that CXCL4-241 present a biologic activity similar to CXCL4 indicating that the inhibitory effect is not dependent on GAG affinity. More importantly, when Leu67 is replaced by His67, at least a 5.5-fold increase in inhibitory activity was observed (Table 2). This indicates that the 2 different effects of His67 substitution (ie, modification of GAG binding and biologic activity) are not necessary connected.

Mutants with single mutation were tested in a tube-formation assay. Once again, replacement of Leu67 by His67 induced an increased inhibitory effect (Figure 6) indicating that in vitro angiogenesis was also sensitive to the single amino acid substitution.

**Table 1. Binding constants of CXCL4, CXCL4L1 and related mutants for heparin, heparan sulfate and chondroitin sulfate B**

|                       | Heparin                               |                         |                     | Heparan sulfate                       |                         |                     | Chondroitin sulfate B                 |                         |                     |
|-----------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------|---------------------------------------|-------------------------|---------------------|
|                       | ka, M <sup>-1</sup> × s <sup>-1</sup> | kd, s <sup>-1</sup>     | K <sub>D</sub> , nM | ka, M <sup>-1</sup> × s <sup>-1</sup> | kd, s <sup>-1</sup>     | K <sub>D</sub> , nM | ka, M <sup>-1</sup> × s <sup>-1</sup> | kd, s <sup>-1</sup>     | K <sub>D</sub> , nM |
| rCXCL4                | 2.00 × 10 <sup>5</sup>                | 2.39 × 10 <sup>-5</sup> | 0.12                | 1.54 × 10 <sup>5</sup>                | 3.98 × 10 <sup>-4</sup> | 2.59                | 4.00 × 10 <sup>4</sup>                | 9.64 × 10 <sup>-5</sup> | 2.41                |
| rCXCL4 P58L (L)       | 6.47 × 10 <sup>4</sup>                | 1.28 × 10 <sup>-4</sup> | 1.98                | 4.91 × 10 <sup>4</sup>                | 9.63 × 10 <sup>-4</sup> | 19.6                | NB                                    | NB                      | NB                  |
| rCXCL4 K66E (E)       | 8.22 × 10 <sup>4</sup>                | 1.19 × 10 <sup>-4</sup> | 1.44                | 4.90 × 10 <sup>4</sup>                | 4.99 × 10 <sup>-4</sup> | 10.2                | 1.26 × 10 <sup>4</sup>                | 2.89 × 10 <sup>-5</sup> | 2.28                |
| rCXCL4 P58L K66E (LE) | 7.17 × 10 <sup>4</sup>                | 1.81 × 10 <sup>-4</sup> | 2.53                | 1.16 × 10 <sup>5</sup>                | 2.02 × 10 <sup>-3</sup> | 17.4                | NB                                    | NB                      | NB                  |
| rCXCL4 P58L L67H (LH) | 1.32 × 10 <sup>3</sup>                | 4.98 × 10 <sup>-4</sup> | 37.8                | 2.16 × 10 <sup>3</sup>                | 5.01 × 10 <sup>-4</sup> | 23.2                | NB                                    | NB                      | NB                  |
| rCXCL4 K66E L67H(EH)  | 6.01 × 10 <sup>3</sup>                | 8.58 × 10 <sup>-4</sup> | 14.3                | 7.86 × 10 <sup>3</sup>                | 3.62 × 10 <sup>-4</sup> | 46.1                | NB                                    | NB                      | NB                  |
| rCXCL4L1              | 5.34 × 10 <sup>3</sup>                | 5.74 × 10 <sup>-5</sup> | 10.7                | 7.76 × 10 <sup>3</sup>                | 3.12 × 10 <sup>-4</sup> | 40.2                | NB                                    | NB                      | NB                  |

Representative measurements binding constants for the binding of CXCL4, CXCL4L1 and mutants to heparin, heparan sulfate or chondroitin sulfate B as determined by SPR binding studies.

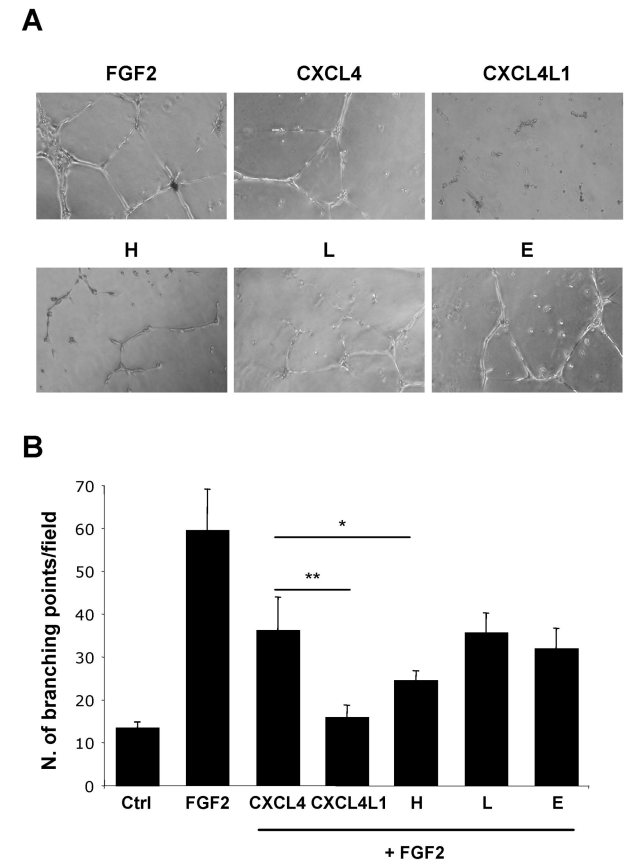
NB indicates no binding.

**Table 2. Half-maximum (IC<sub>50</sub>) and maximum inhibitory (I<sub>max</sub>) concentration values for the inhibition of endothelial cells proliferation by CXCL4, CXCL4L1, and related mutants**

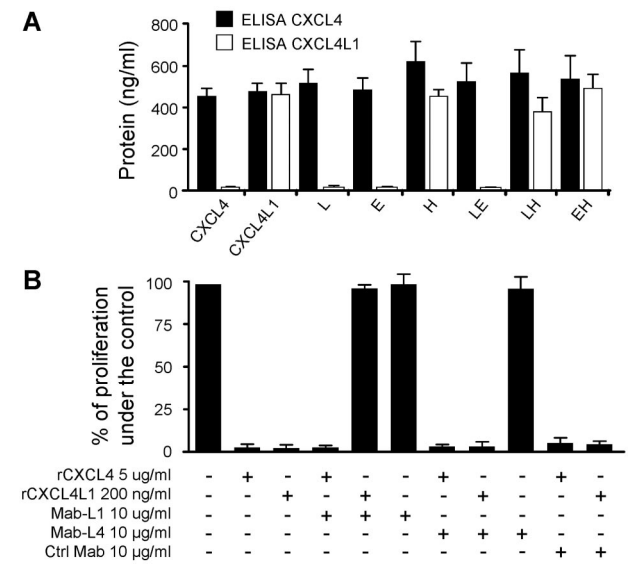
|                         | IC <sub>50</sub> , mg/mL | I <sub>max</sub> , mg/mL |
|-------------------------|--------------------------|--------------------------|
| rCXCL4                  | 2.3                      | 5.0                      |
| rCXCL4L1 (v1)           | 5.3 × 10 <sup>-2</sup>   | 0.2                      |
| rCXCL4 P58L(L)          | 2.0                      | 5.0                      |
| rCXCL4 K66E (E)         | 2.0                      | 5.0                      |
| rCXCL4 P58L K66E (LE)   | 0.85                     | 2.5                      |
| rCXCL4 P58L L67H (LH)   | 4.2 × 10 <sup>-2</sup>   | 0.2                      |
| rCXCL4 K66E L67H (EH)   | 8.9 × 10 <sup>-2</sup>   | 0.25                     |
| rCXCL4 241 (241)        | 0.84                     | 5.0                      |
| rCXCL4 241 L67H (241+H) | 15 × 10 <sup>-2</sup>    | 0.4                      |

The half maximum (IC<sub>50</sub>) and maximum inhibitory (I<sub>max</sub>) concentration for each protein was deduced from the dose-response curves (supplemental Figure 3) of the inhibition of endothelial cell proliferation.

To better characterize the CXCL4L1 activity, we developed mouse monoclonal antibodies (Mab-L1) directed against a peptide that corresponds to the 20 amino acids of the C-terminal part of CXCL4L1. Mab-L1 tightly bound rCXCL4L1 but not rCXCL4 as determined by BIAcore analysis and slot-blot assay (supplemental Figure 5A-B). Mab-L1 was used to perform ELISA to detect the different proteins expressed by transfected cells (supplemental Figure 5C). Our results clearly show that Mab-L1 only recognized CXCL4L1 or mutants that contain His67 (Figure 7A). This indicates that His67 was crucial for the epitope recognized by Mab-L1.



**Figure 6. Histidine 67 is critical for inhibiting the FGF2-induced capillary tube formation of HUVECs by CXCL4L1.** (A) Representative images of HUVECs on Matrigel stimulated with FGF2 and in the presence or not of the indicated chemokine. (B) Quantitative analysis of the experiments shown in panel A obtained by counting the number of branching points from 4 fields.



**Figure 7. Specific anti-CXCL4L1 monoclonal antibody blocks CXCL4L1's biologic activity.** (A) The specific anti-CXCL4L1 monoclonal antibody (Mab-L1) detects specifically proteins possessing His67. Conditioned media of HEK293T expressing CXCL4, CXCL4L1, or mutants were tested with CXCL4-ELISA (Mab-L4) or with a specific CXCL4L1-ELISA (Mab-L1). (B) Effect of Mab-L1 (10  $\mu$ g/mL) on the proliferation of BAEC treated or not with rCXCL4 (5  $\mu$ g/mL) or rCXCL4L1 (0.2  $\mu$ g/mL). Mab-L4 and unrelated Immunoglobulin G were used as controls.

His67 may contribute to the epitope by itself, or induce a conformational change within the C-terminal region.

Mab-L1 was then used in proliferation assays on BAECs and HUVECs. As shown in Figure 6 B, Mab-L1 completely blocked the inhibitory effect of CXCL4L1 but had no effect on CXCL4 activity. In opposite, Mab-L4, that recognized both chemokines, had no influence on their inhibitory activity (Figure 7B). Taken together, these results indicate that the motif involved in the inhibitory effect of CXCL4L1 lies in its carboxyl terminal part. This is in accordance with previous results, which demonstrate that peptides derived from the C-terminal part of CXCL4 have angiostatic properties.<sup>10,11</sup>

## Discussion

CXCL4 is a CXC chemokine that has pleiotropic effects and plays a role in blood coagulation,<sup>27</sup> angiogenesis,<sup>6,8</sup> modulation of the immune system<sup>28</sup> and tumor growth.<sup>8</sup> CXCL4 has also been proposed to play critical role in other human diseases including heparin-induced thrombocytopenia (HIT) and progression of multiple myeloma.<sup>29,30</sup> During evolution, recent gene duplication gave rise to a second CXCL4 form, named PF4alt/PF4V1 or CXCL4L1.<sup>31</sup> CXCL4L1 is only found in some primates. Except for the parts of the genes that encode the mature polypeptides (95% identity), the genetic conservation between the 2 genes is poor (promoters, introns, 5' untranslated region, and 3' untranslated region). This indicates that the regulation of expression has drastically diverged between the CXCL4 and CXCL4L1 genes. As for the signal sequence, the situation is particular, because, despite significant genetic divergence (difference in 13 of 33 amino acids), the efficiency of secretion is similar as demonstrated in this work. Among the 3 diverging amino acids, leucine 67 (for CXCL4) is replaced by histidine (for CXCL4L1) in rhesus monkey, chimpanzee, and orangutan or by arginine in marmoset. Proline 58 is replaced by leucine only in chimpanzee and orangutan whereas glutamate 66 is only found in human. This underlines the fact that

the leucine 67 mutation is the first event that evolutionary distinguishes CXCL4L1 from CXCL4. This is in line with our results showing that this event is also the most significant in terms of biologic activity and glycan binding. This highlights the fact that a single amino acid substitution has significant consequences on the biologic properties of regulatory molecules.

We have clearly shown that these 2 chemokines mainly differ by their cell surface retention and that the 3 amino acid substitutions within the carboxyl terminus are responsible for this effect. It is well known that chemokines exert their biologic activity through high-affinity interactions with cell-surface receptors, but their interactions with proteoglycans remain crucial because they may facilitate high local concentrations required for cell activation.<sup>3</sup> We have determined striking differences in the affinity constants for GAGs between CXCL4, CXCL4L1 and the different mutants and fusion proteins. First, GAG affinity was directly correlated with membrane retention as shown by transfection experiments. Second, affinities for heparin and heparan sulfate were significantly reduced for CXCL4L1 and, most interestingly, binding to chondroitin sulfate B was abolished. Because chemokines/GAGs interactions are highly dependent on positively charged amino acids, it was surprising that the Lys/Glu substitution had only a limited impact. On the other hand, the Leu/His substitution had dramatic consequences for all GAG affinities. In between was the Pro/Leu substitution that mainly affected CSB affinity.

The interaction of CXCL4 with chondroitin sulfate B is of great biologic significance and includes leukocyte activation,<sup>32</sup> binding of monocytes to the endothelium,<sup>33</sup> adhesion of progenitors<sup>34</sup> and interaction with the LDL receptor.<sup>35</sup> We show herein that the substitutions of 2 amino acid is involved in the inability of CXCL4L1 to bind CSB. This could explain the loss in its inhibitory activity of monocytes or neutrophils,<sup>36</sup> a property that seems to be restricted to CXCL4.

CXCL4L1 has a much more potent angiostatic activity than CXCL4. We initially sought that this increase is related to the decreased affinity in proteoglycan binding, making CXCL4L1 more available for interaction with a potential receptor. However, when the Leu/His67 mutation was introduced into CXCL4-241 (PF4-241) which does not bind proteoglycans and which has similar activity than CXCL4,<sup>20</sup> a significant increase in biologic activity was also observed. This strongly suggests that the Leu/His mutation has 2 potentially unrelated effects ie decrease of GAG binding and increase in biologic activity. The role of His67 in the biologic activity of CXCL4L1 is reinforced by inhibition experiments using a monoclonal antibody. This antibody, Mab-L1, recognized specifically His67 of CXCL4L1 or a conformational change of the C-terminus induced by substitution of the amino acid. Nevertheless, Mab-L1 was able to completely block CXCL4L1 activity whereas an antibody directed against the amino-terminal half of the molecule had no effect. These findings mostly argue for a structural re-organization of the carboxyl terminal domain of CXCL4L1, which is responsible for the specific effects of the molecule. It is also not to exclude that difference in biologic activity may be related to different oligomeric state of CXCL4L1

in comparison to CXCL4. Structure biology experiments are underway to address this issue.

Finally, we show that CXCL4L1 and CXCL4 are nonredundant chemokines because they differ in many aspects from each other. In particular, binding to GAGs and diffusibility are strikingly different. The high local concentration of CXCL4 at the surface of producing cells, could explain a juxtacrine effect that involves vicinity with target endothelial cells. Conversely, we have shown in vivo that CXCL4L1 has a high diffusibility, an enhanced half-life and, in vitro, a low IC<sub>50</sub> value for endothelial cell inhibition. These parameters clearly indicate that CXCL4L1 is a paracrine regulator acting over longer distances than CXCL4 does. Consequently, when CXCL4 and CXCL4L1 are produced by the same cells such as megakaryocytes or platelets, their juxtacrine and paracrine modes of actions are complementary rather than redundant. Nevertheless, little is known about the spatial and temporal expression of these 2 chemokines and it will be of great importance to better characterize their respective regulation of gene expression in normal and pathologic tissues.

Existing data point out to a role of CXCL4 chemokines as a biomarker for disease. It has been proposed that circulating platelet-derived CXCL4 could represent a suitable biomarker for solid tumors,<sup>37</sup> cardiovascular disease or trauma.<sup>38</sup> However, the lack of specific antibodies could be responsible for misinterpretations because the reagents available do not discriminate between CXCL4 and CXCL4L1. It has not escaped our notice that the better diffusibility and stability makes CXCL4L1 a potential better biomarker than CXCL4. Antibodies that discriminate between the 2 chemokines may thus be of importance not only for research but also as diagnostic tools for monitoring patients and the response to therapy.

## Acknowledgments

We thank A. Rayssac for technical assistance with the electrotransfer experiments in mice.

This work was supported by grants from the ACI Cancéropoles 2007 (Institut National du Cancer) to H.P. and A.B., Agence Nationale de la Recherche (ANR, ANR Blanc Angio\_ANR\_NSC) to A.B. and W.-G.W., The Institut National du Cancer (INCA, ChemoRencan project) to A.B. and H.P., Association de la Recherche sur le Cancer (ARC) to A.B., and Ligue contre le Cancer to A.B.

## Authorship

Contribution: A.D., A.B., and H.P. designed research; A.D., C.Q., C.Z., and E.L. performed research; A.D. and F.L. performed SPR experiments and analysis; A.D., C.Q., F.L., W.-G.W., A.B., and H.P. analyzed data; and A.D., W.-G.W., A.B., and H.P. drafted the paper.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Andreas Bikfalvi, Insem U920, University Bordeaux I, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France; e-mail: a.bikfalvi@angio.u-bordeaux1.fr.

## References

1. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005;438(7070):932-936.
2. Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, Corsi MM, Locati M, Mantovani A. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front Biosci*. 2009;14:540-551.
3. Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:787-820.
4. Hacker U, Nybakken K, Perrimon N. Heparan sulfate proteoglycans: the sweet side of development. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(7):530-541.
5. Sasisekharan R, Venkataraman G. Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr Opin Chem Biol*. 2000;4(6):626-631.
6. Keeley EC, Mehrad B, Strieter RM. Chemokines as mediators of neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28(11):1928-1936.

7. Yamaguchi K, Ogawa K, Katsube T, et al. Platelet factor 4 gene transfection into tumor cells inhibits angiogenesis, tumor growth and metastasis. *Anticancer Res.* 2005;25(2A):847-851.
8. Strieter RM, Burdick MD, Mestas J, Gomperts B, Keane MP, Belperio JA. Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. *Eur J Cancer.* 2006;42(6):768-778.
9. Perollet C, Han ZC, Savona C, Caen JP, Bikfalvi A. Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood.* 1998;91(9):3289-3299.
10. Jouan V, Canron X, Alemany M, et al. Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action. *Blood.* 1999; 94(3):984-993.
11. Hagedorn M, Zilberberg L, Lozano RM, et al. A short peptide domain of platelet factor 4 blocks angiogenic key events induced by FGF-2. *FASEB J.* 2001;15(3):550-552.
12. Ragona L, Tomaselli S, Quemener C, Zetta L, Bikfalvi A. New insights into the molecular interaction of the C-terminal sequence of CXCL4 with fibroblast growth factor-2. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;382(1):26-29.
13. Bello L, Lucini V, Costa F, et al. Combinatorial administration of molecules that simultaneously inhibit angiogenesis and invasion leads to increased therapeutic efficacy in mouse models of malignant glioma. *Clin Cancer Res.* 2004;10(13): 4527-4537.
14. Aidoudi S, Bujakowska K, Kieffer N, Bikfalvi A. The CXC-chemokine CXCL4 interacts with integrins implicated in angiogenesis. *PLoS ONE.* 2008;3(7):e2657.
15. Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, et al. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med.* 2003; 197(11):1537-1549.
16. Struyf S, Burdick MD, Peeters E, et al. Platelet factor-4 variant chemokine CXCL4L1 inhibits melanoma and lung carcinoma growth and metastasis by preventing angiogenesis. *Cancer Res.* 2007;67(12):5940-5948.
17. Lasagni L, Grepin R, Mazzinghi B, et al. PF-4/ CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. *Blood.* 2007;109(10): 4127-4134.
18. Bossard C, Van den Berghe L, Laurell H, et al. Antiangiogenic properties of fibroblast, an extracellular FGF-2-binding polypeptide. *Cancer Res.* 2004;64(20):7507-7512.
19. Bornes S, Prado-Lourenco L, Bastide A, et al. Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ Res.* 2007; 100(3):305-308.
20. Maione TE, Gray GS, Hunt AJ, Sharpe RJ. Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor 4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity. *Cancer Res.* 1991;51(8):2077-2083.
21. Rao AK, Niewiarowski S, James P, et al. Effect of heparin on the in vivo release and clearance of human platelet factor 4. *Blood.* 1983;61(6): 1208-1214.
22. Rucinski B, Niewiarowski S, Strzyzewski M, Holt JC, Mayo KH. Human platelet factor 4 and its C-terminal peptides: heparin binding and clearance from the circulation. *Thromb Haemost.* 1990;63(3):493-498.
23. Mixon TA, Dehmer GJ. Recombinant platelet factor 4 for heparin neutralization. *Semin Thromb Hemost.* 2004;30(3):369-377.
24. Cochran S, Li CP, Ferro V. A surface plasmon resonance-based solution affinity assay for heparin sulfate-binding proteins. *Glycoconj J.* 2009; 26(5):577-587.
25. Struyf S, Burdick MD, Proost P, Van Damme J, Strieter RM. Platelets release CXCL4L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet factor-4/ CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis. *Circ Res.* 2004;95(9):855-857.
26. Dehmer GJ, Fisher M, Tate DA, Teo S, Bonnem EM. Reversal of heparin anticoagulation by recombinant platelet factor 4 in humans. *Circulation.* 1995;91(8):2188-2194.
27. Kaiser P, Harenberg J, Walenga JM, et al. Effects of a heparin-binding protein on blood coagulation and platelet function. *Semin Thromb Hemost.* 2001;27(5):495-502.
28. Romagnani P, Maggi L, Mazzinghi B, et al. CXCR3-mediated opposite effects of CXCL10 and CXCL4 on TH1 or TH2 cytokine production. *J Allergy Clin Immunol.* 2005;116(6):1372-1379.
29. Cheng SH, Ng MH, Lau KM, et al. 4q loss is potentially an important genetic event in MM tumorigenesis: identification of a tumor suppressor gene regulated by promoter methylation at 4q13.3, platelet factor 4. *Blood.* 2007;109(5): 2089-2099.
30. Dager WE, White RH. Pharmacotherapy of heparin-induced thrombocytopenia. *Expert Opin Pharmacother.* 2003;4(6):919-940.
31. Eisman R, Surrey S, Ramachandran B, Schwartz E, Poncz M. Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt. *Blood.* 1990;76(2):336-344.
32. Xiao Z, Visentin GP, Dayananda KM, Neelamegham S. Immune complexes formed following the binding of anti-platelet factor 4 (CXCL4) antibodies to CXCL4 stimulate human neutrophil activation and cell adhesion. *Blood.* 2008;112(4):1091-1100.
33. Baltus T, von Hundelshausen P, Mause SF, Buhre W, Rossaint R, Weber C. Differential and additive effects of platelet-derived chemokines on monocyte arrest on inflamed endothelium under flow conditions. *J Leukoc Biol.* 2005;78(2): 435-441.
34. Dudek AZ, Nesmelova I, Mayo K, Verfaillie CM, Pitchford S, Slungaard A. Platelet factor 4 promotes adhesion of hematopoietic progenitor cells and binds IL-8: novel mechanisms for modulation of hematopoiesis. *Blood.* 2003;101(12):4687-4694.
35. Nassar T, Sachais BS, Akkawi S, et al. Platelet factor 4 enhances the binding of oxidized low-density lipoprotein to vascular wall cells. *J Biol Chem.* 2003;278(8):6187-6193.
36. Vandercappellen J, Noppen S, Verbeke H, et al. Stimulation of angiostatic platelet factor-4 variant (CXCL4L1/PF-4var) versus inhibition of angiogenic granulocyte chemotactic protein-2 (CXCL6/ GCP-2) in normal and tumoral mesenchymal cells. *J Leukoc Biol.* 2007;82(6):1519-1530.
37. Cervi D, Yip TT, Bhattacharya N, et al. Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth. *Blood.* 2008;111(3):1201-1207.
38. Maier M, Geiger EV, Henrich D, et al. Platelet factor 4 is highly upregulated in dendritic cells after severe trauma. *Mol Med.* 2009;15(11-12): 384-391.

## Reagents

Sodium chlorate ( $\text{NaClO}_3^-$ ), Heparin sodium salt from bovine intestinal mucosa, Chondroitin sulfate A sodium salt, Chondroitin sulfate B sodium salt and Heparinase 2 from *flavobacterium heparinum* were all purchased from Sigma. Heparan Sulfate-Na Salt-Porcine was purchased from United States Biological.

## Construction of expression plasmids

The coding regions of human CXCL4/PF4 and CXCL4L1/PF4v1 cDNA were cloned from pCDNA-CXCL4 and pCDNA-CXCL4L1 in two consecutive steps. First, a rather long CXCL4 or CXCL4L1 cDNA fragments was amplified by PCR (Full-CXCL4s and Full-CXCL4L1s as forward primers; Full-CXCL4as and Full-CXCL4L1as as reverse primers, Table 1). The amplicons (306 and 315 bp) were cloned into the pSC-A vector (Stratagene) (pSC-CXCL4 and pSC-CXCL4L1). The sequences were confirmed by DNA sequencing. Constructs were used as templates to amplify the coding region of mature CXCL4 or CXCL4L1 (CXCL4s and CXCL4L1s as forward primers; CXCL4as and CXCL4L1as as backward primers, SI Table 3). Purified PCR products were digested with BamHI and XhoI restriction enzymes and inserted into the pGEX-6P-2 plasmid (Amersham Biosciences) to generate pGEX-CXCL4 and pGEX-CXCL4L1 expression vectors. Moreover, pSC-CXCL4 and pSC-CXCL4L1 were digested with KpnI and XhoI restriction enzymes and full lengths CXCL4 or CXCL4L1 cDNAs were inserted into the pSCT plasmid. CXCL4 and CXCL4L1 signal peptides were permuted using AlwNI and XhoI restriction enzymes. The VEGF signal peptide was inserted by PCR (psVEGFs as forward primers; psVEGFas as backward primers, SI Table 3). pGEX-CXCL4L1 and pSCT-CXCL4L1 expression vectors were used as templates for site-directed mutagenesis using QuikChange II XL kit (Stratagen). Sequences of the recombinant plasmids were confirmed by DNA sequencing.

## Production of recombinants CXCL4L1 and variants

*E. coli* BL21 (DE3) transformed with the pGEX-6P-2 (GST-fusion expression vector, Amersham) containing the different cDNAs, were grown in 100 ml LB with 100  $\mu\text{g/ml}$  ampicillin. After the  $\text{OD}_{600\text{nm}}$  reached 0.3–0.5, expression of fusion proteins was induced by 0.5 mmol/L isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) (Euromedex). Cultures were grown overnight at 220 rpm and 25°C. IPTG-induced test and control (empty pGEX-6P-2 vector) cultures were collected by centrifugation at 5,000 rpm for 15 minutes at 4°C. Pellets were resuspended in 10 volumes of lysis buffer containing PBS 1 $\times$  (10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, pH 7.3, Lonza), 1mg/ml lysozyme (Sigma) and a protease inhibitor cocktail (Roche). Cells were lysed by repeated cycles of freezing and thawing, followed by sonication (six 30 s sonication steps) in an ice bath. For complete fragmentation of DNA, DNase I (Sigma) was added and stirred on ice for 15 min. The cell debris were removed by centrifugation at 12,000 r/min for 30 minutes at 4°C and supernatants were collected.

## Affinity chromatography for purification of recombinant proteins

Supernatants containing soluble GST-CXCL4L1, GST-CXCL4 or mutants were loaded on a GStrap HP affinity column (5 ml; Amersham Biosciences) pre-equilibrated with PBS (pH 7.4) at a flow rate of 5 ml/min at room temperature. The bound material was washed with PBS until the absorbance at OD 280 nm returned to baseline. Once the baseline was stable, elution of bound recombinant proteins was carried out using ten column volumes of elution buffer (PBS, 20

mM reduced glutathion, pH 8.0) at a 5 ml/min flow rate. The eluted fractions containing the recombinant proteins were pooled, dialyzed (against reduced glutathion) and concentrated by ultrafiltration with vivaspin (Sartorius). The GST tag was cleaved or not with the PreScission Protease (Amersham Biosciences). Removal of free GST was done by an additional glutathion purification step. The collected fractions were analyzed by SDS-PAGE gel electrophoresis and stained with Coomassie blue (Biorad) or by Western blot.

### **Western-blot analysis**

Samples were boiled at 95°C for 5 min after addition of reducing agents and 30 µg of total proteins were separated on a NuPAGE 4–12% Bis-Tris gel (Invitrogen). After transfer, nitrocellulose membranes (Schleicher & Schüll) were blocked with 3% skimmed milk. CXCL4L1, CXCL4 or mutant chemokines were immunodetected using mouse anti-human CXCL4 monoclonal antibody (mAb7952; R&D Systems, Minneapolis, MN 55413 USA, clone 170138, 0,5 µg/mL, dilution 1 : 500) as primary antibody and peroxidase-conjugated sheep anti-mouse (dilution 1 : 10000) (Amersham) as secondary antibody and the ECL detection kit (Amersham). Densitometric analysis was carried out using ImageJ software (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD). Membrane fractionation was performed with the Mem-PER<sup>®</sup> Eukaryotic Membrane Protein Extraction Reagent Kit (PIERCE, Rockford).

### **CXCL4L1 specific monoclonal antibody**

Mice were immunized with a CXCL4L1 fusion peptide (BSA-CLDLQALLYKKIIEHLES). Hybridoma supernatants were then tested for reactivity against CXCL4 or CXCL4L1 by slot blot. Monoclonal antibodies from clone 9E11-2D5-2G1 (Mab-L1), which only recognized CXCL4L1 but not CXCL4, were then selected. We next performed Biacore analysis (Figs. S4A and B).

### **Cell death assays**

Apoptosis was evaluated by measuring caspase 3/7 activities with the Apo-one homogeneous assay kit, according to manufacturer instructions (Promega France). BAE cells were seeded in 96-wells plates at a concentration of  $1 \times 10^4$  cells/well and allowed to adhere overnight. Complete medium was replaced by serum-free medium and/or recombinant proteins for 24 hours.

**Table S1. Oligonucleotides used for plasmid constructions**

|                       | 5' → 3'                                   |
|-----------------------|-------------------------------------------|
| <b>Full-CXCL4s</b>    | AAAAAACTCAAGATCTGGTACCATGAGCTCCGCAGC      |
| <b>Full-CXCL4as</b>   | AAAAAACCGCGGCCGCGGATCCCCCTAACTCTCCAAAAGTT |
| <b>Full-CXCL4L1s</b>  | AAAAAACTCAAGATCTGGTACCATGAGCTCCGCAGC      |
| <b>Full-CXCL4L1as</b> | AAAAAACCGCGGCCGCGGATCCCCCTAACTCTCCAAATGTT |
| <b>CXCL4s</b>         | AAACAATTGGTCATATGGAAGCTGAAGAAGATGGGGA     |
| <b>CXCL4as</b>        | AAAAAACCGCGGCCGCGGATCCCCCTAACTCTCCAAAAGTT |
| <b>CXCL4L1s</b>       | AAACAATTGGTCATATGGAAGCTGAAGAAGATGGGGA     |
| <b>CXCL4L1as</b>      | AAAAAACCGCGGCCGCGGATCCCCCTAACTCTCCAAATGTT |
| <b>M1s</b>            | GCTTGGATCTGCAAGCCCCGCTGTACAAGAAAATCATTA   |
| <b>M1as</b>           | TTAATGATTTTCTTGTACAGCGGGGCTTGCAGATCCAAGC  |
| <b>M2s</b>            | GCTGTACAAGAAAATCATTAAGAAACATTTGGAGAGTTAG  |
| <b>M2as</b>           | CTAACTCTCCAAATGTTTCTTAATGATTTTCTTGTACAGC  |
| <b>M3s</b>            | GCTGTACAAGAAAATCATTAAGGAACTTTTGGAGAGTTAG  |
| <b>M3as</b>           | CTAACTCTCCAAAAGTTCCTTAATGATTTTCTTGTACAGC  |
| <b>M23s</b>           | GCTGTACAAGAAAATCATTAAGAACTTTTGGAGAGTTAG   |
| <b>M23as</b>          | CTAACTCTCCAAAAGTTCCTTAATGATTTTCTTGTACAGC  |
| <b>psVEGFs</b>        | GGCAGATCGGTACCATGAACTTTCTGCTGTCTTG        |
| <b>psVEGFas</b>       | TCCCCATCTTCTTCAGCTTCGGGTGCAGCCTGGGACCACT  |

**Figure S1. Purification of rCXCL4, rCXCL4L1 and related mutants**

(A) Recombinant proteins (*E. Coli*) were purified by glutathion sepharose chromatography and analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions. Proteins were visualized by Coomassie staining (upper panel) or by Western blotting with anti-CXCL4 antibody that recognizes both CXCL4 and CXCL4L1 (lower panel). Immunoreactivity is depicted for GST-fusion proteins with an apparent MW of 33KDa (GST, 25KDa). (B) Inhibition of bovine aortic endothelial cell (BAEC) proliferation by rCXCL4, rCXCL4L1, commercial platelet purified CXCL4 (CXCL4) and proteins where GST has been cleaved-off (rCXCL4c and rCXCL4L1c). Data are expressed as percentages of proliferation of FGF2-stimulated control cells. (C) & (D) MTT assay on cells treated or not with different concentrations of recombinant chemokines. After 48h, cell death was not observed with BAEC or HEK293. (E) Effect of CXCL4 and CXCL4L1 on apoptosis of BAECs. Serum starvation and increasing concentration of chemokines were assayed for apoptosis induction by quantifying the activation of caspase-3/7. Results are expressed as the means  $\pm$  SD of three independent experiments done in triplicate.

**Figure S2. CXCL4, CXCL4L1 secretion and membrane retention**

(A) Schematic representation of the cDNA sequences used for transfection of HEK293. CXCL4 and CXCL4L1 signal peptides were permuted or replaced by the VEGF signal peptide. CXCL4 without signal peptide was used as control. (B) Quantification of CXCL4 and CXCL4L1 in the medium and in the membrane or intracellular fraction of transfected HEK293 cells. Quantification was done using a CXCL4-ELISA kit (Mab-L4, Roche). (C) & (D) Total or membrane CXCL4, CXCL4L1 and mutants quantification of transfected HEK293 cells. The proteins quantification in the different fractions allowed us to determinate the amount of total expressed proteins for each transfection. Results are expressed as the means  $\pm$  SD of three independent experiments done in triplicate.

**Figure S3. In vivo bioavailability and clearance of CXCL4 and CXCL4L1**

(A) Recombinant CXCL4 or rCXCL4L1 (\*) labeled with IRDye800CW (right panel) or not labeled (left panel) were analyzed by SDS-PAGE under reducing conditions. The IR signal was visualized using Odyssey Infrared Imaging System and the unlabeled proteins were visualized by western-blot using Mab-L4. Dimers and free GST are indicated by (\*\*) and (\*\*\*) respectively. (B) Inhibition of BAECs proliferation by rCXCL4 and rCXCL4L1 labeled with IRDye800CW. Data are expressed as percentages of proliferation of FGF2-stimulated control cells. (C) rCXCL4, rCXCL4L1 or GST, labeled with IRDye800CW, were injected in RAG- $\gamma/c$  (n=6) mice and mice were imaged at 1, 24, 48, 72h. Twenty-four hours after injection, proteins were found mostly accumulated in the liver. (D) Circulating rCXCL4 and rCXCL4L1 was also quantified in the blood at different time points after injection using the human CXCL4-ELISA.

**Figure S4. Histidine 67 is critical for inhibition of endothelial cells proliferation**

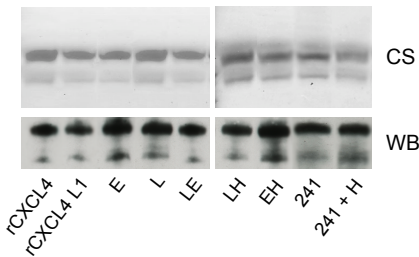
Inhibition of BAEC proliferation by recombinant CXCL4, CXCL4L1 or related mutants. Different concentrations of recombinant proteins were applied to cells stimulated with 10 ng/ml of FGF2. After 48h, cells were counted using the MTT assay. Data are expressed as percentage of proliferation of FGF2-stimulated control cells. No significant inhibition was observed with GST alone. Results are expressed the means  $\pm$  SD of at least three independent experiments done in triplicates. Deduced IC<sub>50</sub> and I<sub>max</sub> values are presented Table 2.

**Figure S5. Characterization of Mab-L1, a specific monoclonal antibody for CXCL4L1**

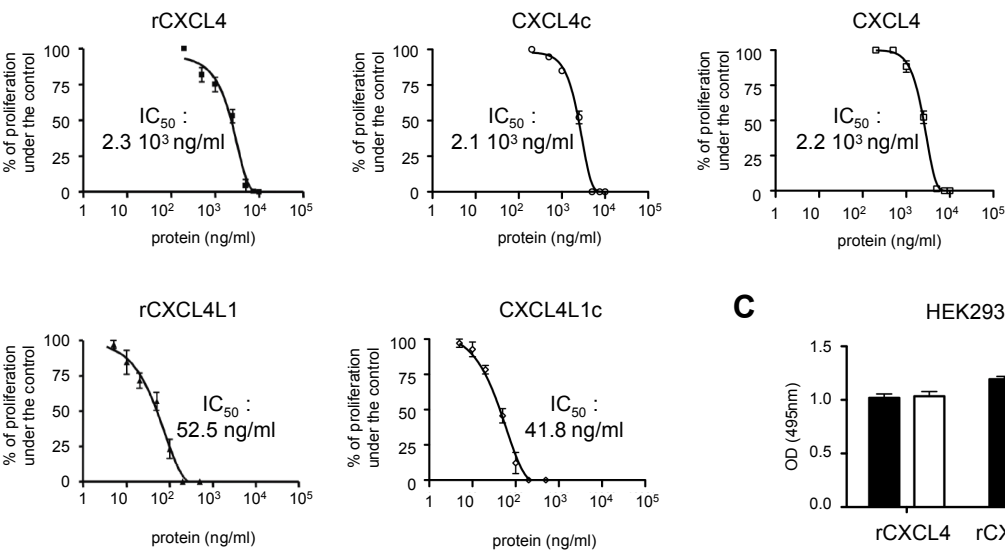
(A) SPR analysis of Mab-L1 specificity. The figure depicts the overlay of sensorgrams derived from the injection of different amounts of rCXCL4 and rCXCL4L1 (15.6–1000 nM) over immobilized Mab-L4 (mAb7952; R&D Systems) and Mab-L1 antibodies (10000 RU) and deduced  $K_D$  values. (B) Slot-blot of CXCL4 and CXCL4L1 using Mab-L1. Mab-L4, which recognizes both proteins, was used as control antibody. (C) Quantification of rCXCL4L1 (15.6 pg/ml to 100 ng/ml) by ELISA using Mab-L4 or Mab-L1. The experiment was repeated two times in triplicate.

Figure S1

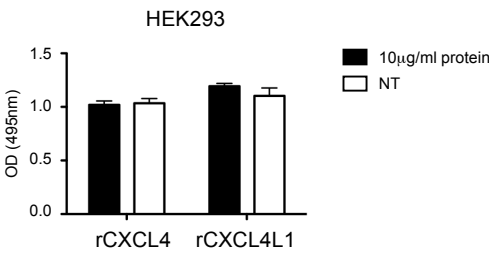
A



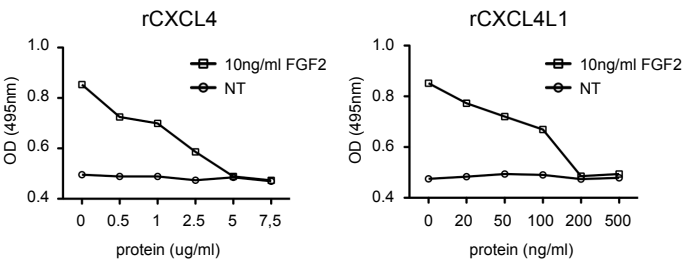
B



C



D



E

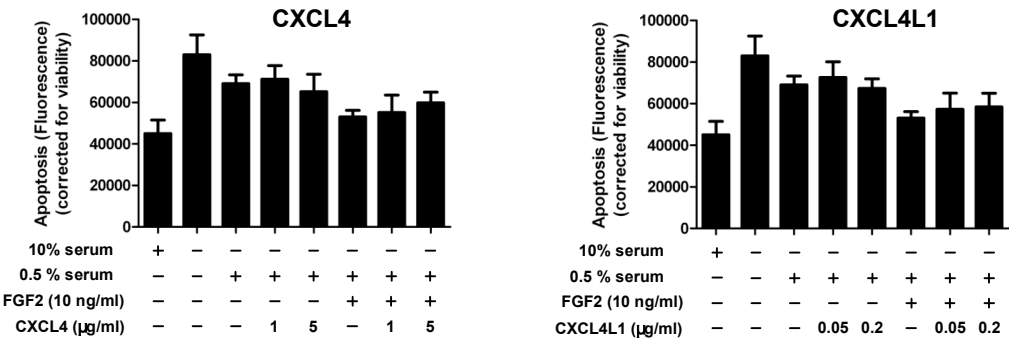
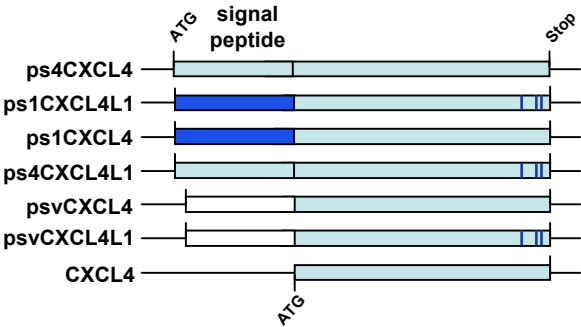
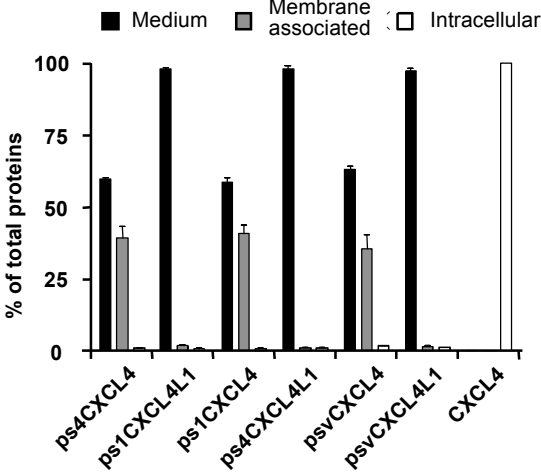


Figure S2

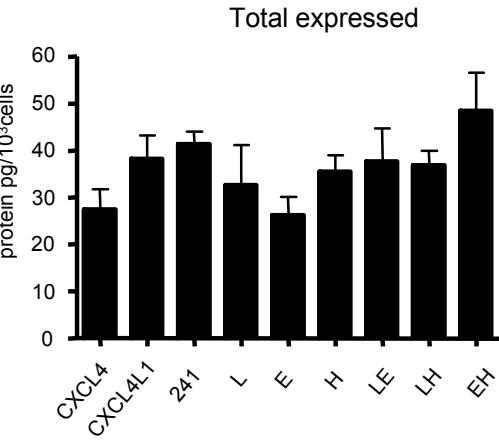
A



B



C



D

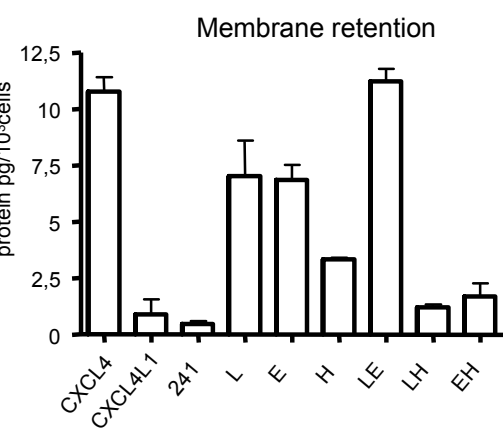


Figure S3

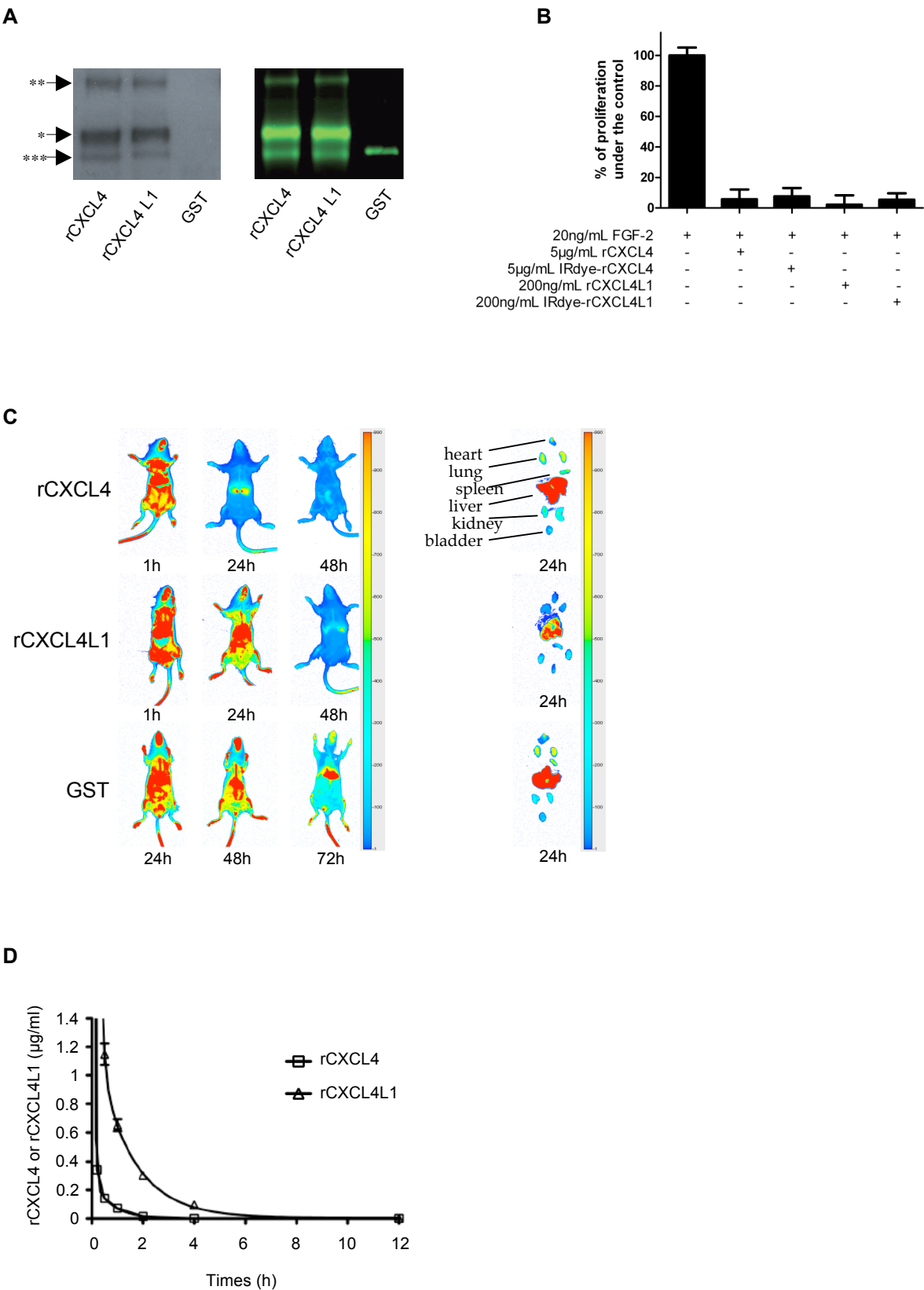


Figure S4

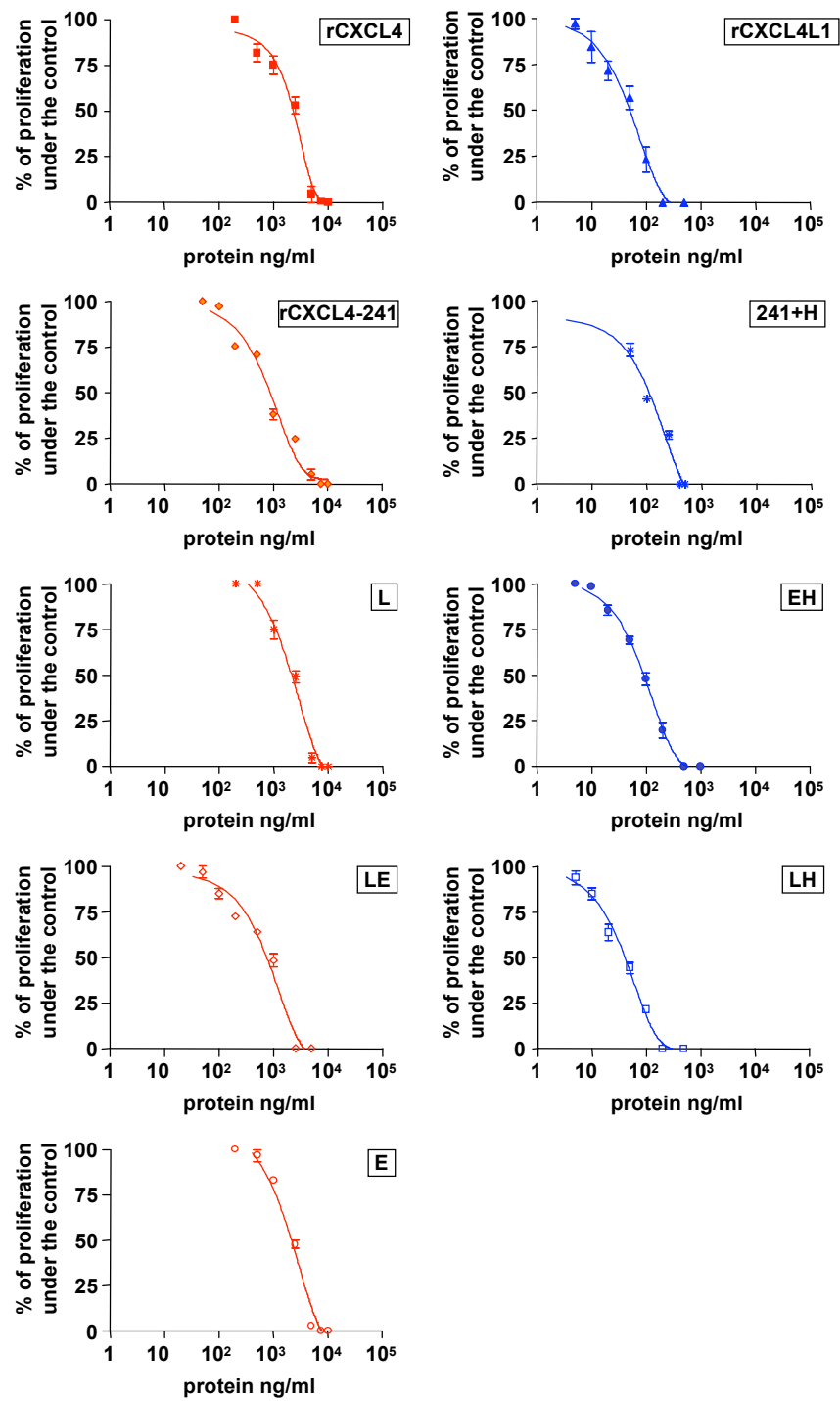
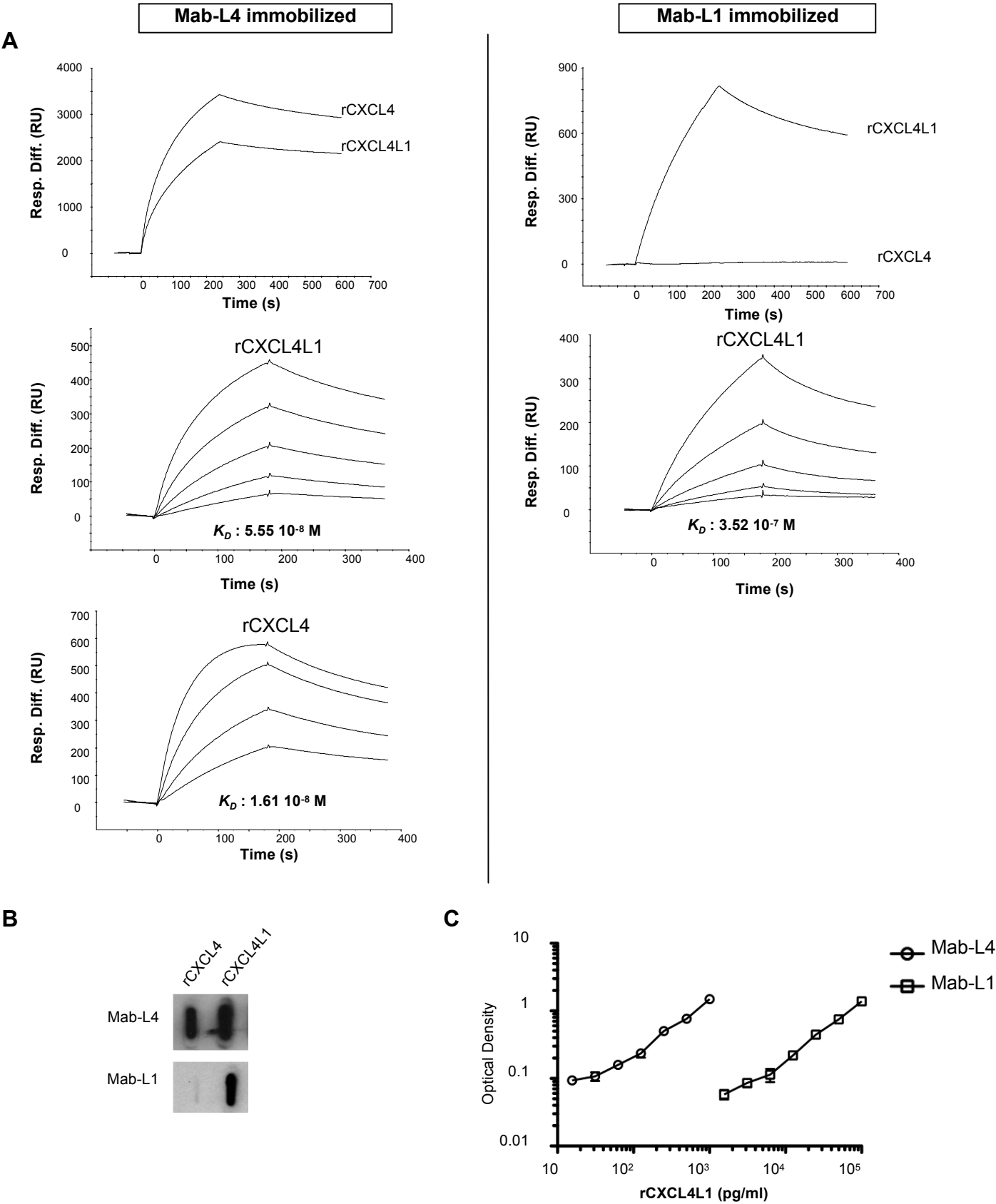


Figure S5



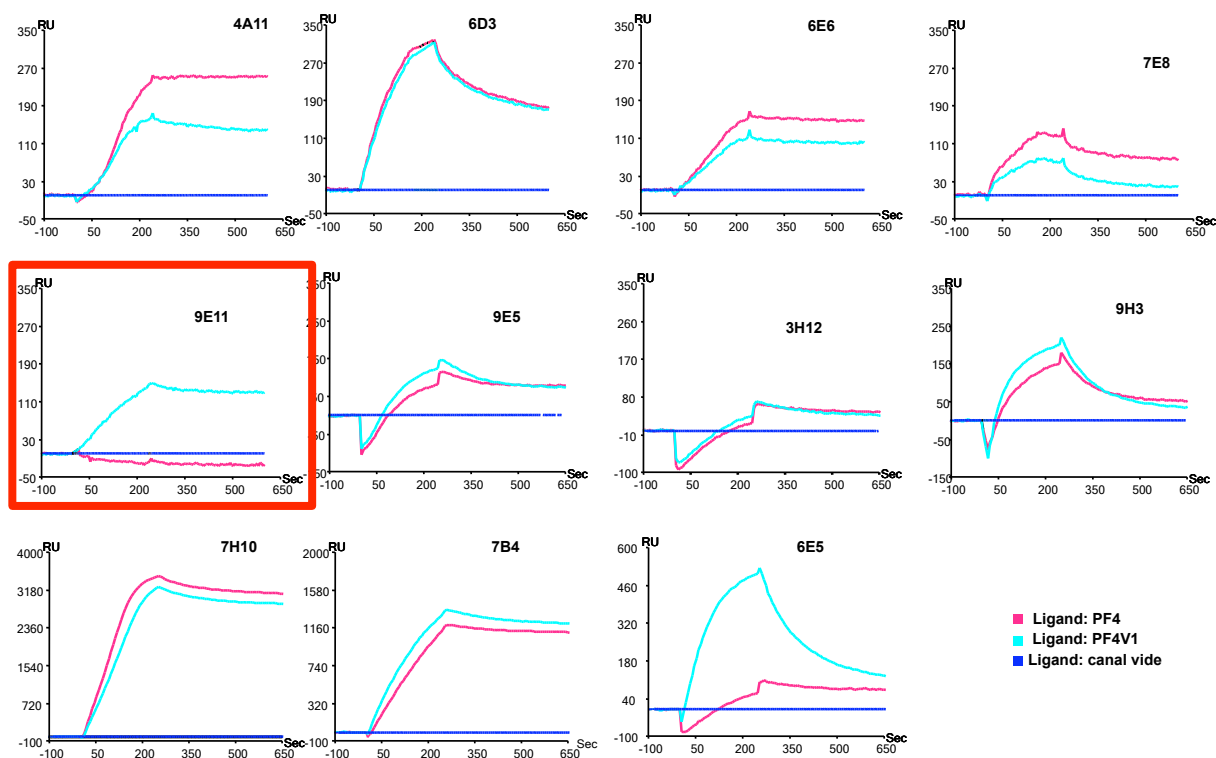


## **Partie II. Oligos PCR et SPR**



|                     | 5' -> 3'                                   |
|---------------------|--------------------------------------------|
| <b>Full-PF4s</b>    | AAAAAACTCAAGATCTGGTACCATGAGCTCCGCAGC       |
| <b>Full-PF4as</b>   | AAAAAACC GCGGCCGCGGATCCCCCTAACTCTCCAAAAGTT |
| <b>Full-PF4v1s</b>  | AAAAAACTCAAGATCTGGTACCATGAGCTCCGCAGC       |
| <b>Full-PF4v1as</b> | AAAAAACC GCGGCCGCGGATCCCCCTAACTCTCCAAATGTT |
| <b>PF4s</b>         | AAACAATTGGTCATATGGAAGCTGAAGAAGATGGGGA      |
| <b>PF4as</b>        | AAAAAACC GCGGCCGCGGATCCCCCTAACTCTCCAAAAGTT |
| <b>PF4v1s</b>       | AAACAATTGGTCATATGGAAGCTGAAGAAGATGGGGA      |
| <b>PF4v1as</b>      | AAAAAACC GCGGCCGCGGATCCCCCTAACTCTCCAAATGTT |
| <b>M1s</b>          | GCTTGGATCTGCAAGCCCCGCTGTACAAGAAAATCATTAA   |
| <b>M1as</b>         | TTAATGATTTTCTTGTACAGCGGGGCTTGCAGATCCAAGC   |
| <b>M2s</b>          | GCTGTACAAGAAAATCATTAAAGAAACATTTGGAGAGTTAG  |
| <b>M2as</b>         | CTAACTCTCCAAATGTTTCTTAATGATTTTCTTGTACAGC   |
| <b>M3s</b>          | GCTGTACAAGAAAATCATTAAAGGAACTTTGGAGAGTTAG   |
| <b>M3as</b>         | CTAACTCTCCAAAAGTTCCTTAATGATTTTCTTGTACAGC   |
| <b>M23s</b>         | GCTGTACAAGAAAATCATTAAAGAACTTTTGGAGAGTTAG   |
| <b>M23as</b>        | CTAACTCTCCAAAAGTTCCTTAATGATTTTCTTGTACAGC   |

**Table 1: Oligonucléotides utilisés pour les expériences de PCR et de QuikChange II XL.**



**Figure 1: Interaction des différents sérums des souris immunisées PF4v1 avec les ligands GST-PF4 et GST-PF4v1.** Sensogrammes résultant de l'injection des sérums dilués au 1/200 sur les ligands GST-PF4 et GST-PF4v1 immobilisés (2000RU). Ces sensogrammes résultent du différentiel entre le canal d'intérêt et le cal de référence.





## **Chapitre VI : BIBLIOGRAPHIE**



- Abdollahi, A., Hlatky, L., and Huber, P.E. (2005). Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resist Updat* 8, 59-74.
- Adams, R.H., and Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 464-478.
- 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. (2000). The CXC chemokine receptor 2, CXCR2, is the putative receptor for ELR+ CXC chemokine-induced angiogenic activity. *J Immunol* 165, 5269-5277.
- Alexopoulou, A.N., Multhaupt, H.A., and Couchman, J.R. (2007). Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 505-528.
- Ali, S., Malik, G., Burns, A., Robertson, H., and Kirby, J.A. (2005). Renal transplantation: examination of the regulation of chemokine binding during acute rejection. *Transplantation* 79, 672-679.
- Almog, N., Henke, V., Flores, L., Hlatky, L., Kung, A.L., Wright, R.D., Berger, R., Hutchinson, L., Naumov, G.N., Bender, E., *et al.* (2006). Prolonged dormancy of human liposarcoma is associated with impaired tumor angiogenesis. *Faseb J* 20, 947-949.
- 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. (1996). 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.
- Baggiolini, M. (1998). Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 392, 565-568.
- Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1997). Human chemokines: an update. *Annu Rev Immunol* 15, 675-705.
- Baldwin, J.M., Schertler, G.F., and Unger, V.M. (1997). An alpha-carbon template for the transmembrane helices in the rhodopsin family of G-protein-coupled receptors. *J Mol Biol* 272, 144-164.
- Balkwill, F. (2004). The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol* 14, 171-179.
- Bame, K.J. (2001). Heparanases: endoglycosidases that degrade heparan sulfate proteoglycans. *Glycobiology* 11, 91R-98R.
- Bastide, A., Karaa, Z., Bornes, S., Hieblot, C., Lacazette, E., Prats, H., and Touriol, C. (2008). An upstream open reading frame within an IRES controls expression of a specific VEGF-A isoform. *Nucleic Acids Res* 36, 2434-2445.
- Beattie, J., Phillips, K., Shand, J.H., Szymanowska, M., Flint, D.J., and Allan, G.J. (2008). Molecular interactions in the insulin-like growth factor (IGF) axis: a surface plasmon resonance (SPR) based biosensor study. *Mol Cell Biochem* 307, 221-236.
- Belperio, J.A., Keane, M.P., Arenberg, D.A., Addison, C.L., Ehlert, J.E., Burdick, M.D., and Strieter, R.M. (2000). CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol* 68, 1-8.
- Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-410.
- Bernfield, M., Gotte, M., Park, P.W., Reizes, O., Fitzgerald, M.L., Lincecum, J., and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Biochem* 68, 729-777.

- Bertolini, F., Mancuso, P., Shaked, Y., and Kerbel, R.S. (2007). Molecular and cellular biomarkers for angiogenesis in clinical oncology. *Drug Discov Today* **12**, 806-812.
- Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* **432**, 332-337.
- Bikfalvi, A. (2003). [Tumor angiogenesis]. *Bull Cancer* **90**, 449-458.
- Bikfalvi, A. (2004). Platelet factor 4: an inhibitor of angiogenesis. *Semin Thromb Hemost* **30**, 379-385.
- Bleuel, K., Popp, S., Fusenig, N.E., Stanbridge, E.J., and Boukamp, P. (1999). Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2065-2070.
- Borgstrom, P., Discipio, R., and Maione, T.E. (1998). Recombinant platelet factor 4, an angiogenic marker for human breast carcinoma. *Anticancer Res* **18**, 4035-4041.
- Bossard, C., Van den Berghe, L., Laurell, H., Castano, C., Cerutti, M., Prats, A.C., and Prats, H. (2004). Antiangiogenic properties of fibstatin, an extracellular FGF-2-binding polypeptide. *Cancer Res* **64**, 7507-7512.
- Brandt, E., Ludwig, A., Petersen, F., and Flad, H.D. (2000). Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunol Rev* **177**, 204-216.
- Browder, T., Butterfield, C.E., Kraling, B.M., Shi, B., Marshall, B., O'Reilly, M.S., and Folkman, J. (2000). Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res* **60**, 1878-1886.
- Byrne, A.M., Bouchier-Hayes, D.J., and Harmey, J.H. (2005). Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* **9**, 777-794.
- Cadene, M., Boudier, C., de Marcillac, G.D., and Bieth, J.G. (1995). Influence of low molecular mass heparin on the kinetics of neutrophil elastase inhibition by mucus proteinase inhibitor. *J Biol Chem* **270**, 13204-13209.
- Cao, Y. (2001). Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol* **33**, 357-369.
- Cao, Y. (2004). Antiangiogenic cancer therapy. *Semin Cancer Biol* **14**, 139-145.
- Capila, I., Wu, Y., Rethwisch, D.W., Matte, A., Cygler, M., and Linhardt, R.J. (2002). Role of arginine 292 in the catalytic activity of chondroitin AC lyase from *Flavobacterium heparinum*. *Biochim Biophys Acta* **1597**, 260-270.
- Cardin, A.D., and Weintraub, H.J. (1989). Molecular modeling of protein-glycosaminoglycan interactions. *Arteriosclerosis* **9**, 21-32.
- Carmeliet, P. (2000). Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* **6**, 389-395.
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* **9**, 653-660.
- Carmeliet, P. (2004). Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med* **255**, 538-561.
- Carmeliet, P. (2005). Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**, 932-936.
- Clark-Lewis, I., Mattioli, I., Gong, J.H., and Loetscher, P. (2003). Structure-function relationship between the human chemokine receptor CXCR3 and its ligands. *J Biol Chem* **278**, 289-295.

- Coelho, A.L., Hogaboam, C.M., and Kunkel, S.L. (2005). Chemokines provide the sustained inflammatory bridge between innate and acquired immunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 553-560.
- Cohen, I., Pappo, O., Elkin, M., San, T., Bar-Shavit, R., Hazan, R., Peretz, T., Vlodavsky, I., and Abramovitch, R. (2006). Heparanase promotes growth, angiogenesis and survival of primary breast tumors. *Int J Cancer* 118, 1609-1617.
- Colin, S., Jeanny, J.C., Mascarelli, F., Vienet, R., Al-Mahmood, S., Courtois, Y., and Labarre, J. (1999). In vivo involvement of heparan sulfate proteoglycan in the bioavailability, internalization, and catabolism of exogenous basic fibroblast growth factor. *Mol Pharmacol* 55, 74-82.
- Colvin, R.A., Campanella, G.S., Manice, L.A., and Luster, A.D. (2006). CXCR3 requires tyrosine sulfation for ligand binding and a second extracellular loop arginine residue for ligand-induced chemotaxis. *Mol Cell Biol* 26, 5838-5849.
- Colvin, R.A., Campanella, G.S., Sun, J., and Luster, A.D. (2004). Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *J Biol Chem* 279, 30219-30227.
- Conti, I., and Rollins, B.J. (2004). CCL2 (monocyte chemoattractant protein-1) and cancer. *Semin Cancer Biol* 14, 149-154.
- Conway, E.M., Collen, D., and Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 49, 507-521.
- Couchman, J.R., Chen, L., and Woods, A. (2001). Syndecans and cell adhesion. *Int Rev Cytol* 207, 113-150.
- Cui, Z., Reilly, M.P., Surrey, S., Schwartz, E., and McKenzie, S.E. (1998). -245 bp of 5'-flanking region from the human platelet factor 4 gene is sufficient to drive megakaryocyte-specific expression in vivo. *Blood* 91, 2326-2333.
- Datta, D., Flaxenburg, J.A., Laxmanan, S., Geehan, C., Grimm, M., Waaga-Gasser, A.M., Briscoe, D.M., and Pal, S. (2006). Ras-induced modulation of CXCL10 and its receptor splice variant CXCR3-B in MDA-MB-435 and MCF-7 cells: relevance for the development of human breast cancer. *Cancer Res* 66, 9509-9518.
- Dawson, D.W., Pearce, S.F., Zhong, R., Silverstein, R.L., Frazier, W.A., and Bouck, N.P. (1997). CD36 mediates the In vitro inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 138, 707-717.
- de Fraipont, F., Nicholson, A.C., Feige, J.J., and Van Meir, E.G. (2001). Thrombospondins and tumor angiogenesis. *Trends Mol Med* 7, 401-407.
- Delehedde, M., Lyon, M., Gallagher, J.T., Rudland, P.S., and Fernig, D.G. (2002a). Fibroblast growth factor-2 binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates a sustained phosphorylation of p42/44 mitogen-activated protein kinase and proliferation of rat mammary fibroblasts. *Biochem J* 366, 235-244.
- Delehedde, M., Lyon, M., Vidyasagar, R., McDonnell, T.J., and Fernig, D.G. (2002b). Hepatocyte growth factor/scatter factor binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates the proliferation of human HaCaT keratinocytes. *J Biol Chem* 277, 12456-12462.
- Deuel, T.F., Senior, R.M., Chang, D., Griffin, G.L., Heinrichson, R.L., and Kaiser, E.T. (1981). Platelet factor 4 is chemotactic for neutrophils and monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 4584-4587.

- Deutsch, V., Bitan, M., Friedmann, Y., Eldor, A., and Vlodavsky, I. (2000). Megakaryocyte maturation is associated with expression of the CXC chemokine connective tissue-activating peptide CTAP III. *Br J Haematol* **111**, 1180-1189.
- Devalaraja, R.M., Nanney, L.B., Du, J., Qian, Q., Yu, Y., Devalaraja, M.N., and Richmond, A. (2000). Delayed wound healing in CXCR2 knockout mice. *J Invest Dermatol* **115**, 234-244.
- Dhanabal, M., Ramchandran, R., Waterman, M.J., Lu, H., Knebelmann, B., Segal, M., and Sukhatme, V.P. (1999). Endostatin induces endothelial cell apoptosis. *J Biol Chem* **274**, 11721-11726.
- Dreys, J., Siegert, P., Medinger, M., Mross, K., Strecker, R., Zirrgiebel, U., Harder, J., Blum, H., Robertson, J., Jurgensmeier, J.M., *et al.* (2007). Phase I clinical study of AZD2171, an oral vascular endothelial growth factor signaling inhibitor, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* **25**, 3045-3054.
- Du, X., Chen, X., Mihalic, J.T., Deignan, J., Duquette, J., Li, A.R., Lemon, B., Ma, J., Miao, S., Ebsworth, K., *et al.* (2008). Design and optimization of imidazole derivatives as potent CXCR3 antagonists. *Bioorg Med Chem Lett* **18**, 608-613.
- Duda, D.G., Jain, R.K., and Willett, C.G. (2007). Antiangiogenics: the potential role of integrating this novel treatment modality with chemoradiation for solid cancers. *J Clin Oncol* **25**, 4033-4042.
- Eisman, R., Surrey, S., Ramachandran, B., Schwartz, E., and Poncz, M. (1990). Structural and functional comparison of the genes for human platelet factor 4 and PF4alt. *Blood* **76**, 336-344.
- Eitzman, D.T., Chi, L., Saggin, L., Schwartz, R.S., Lucchesi, B.R., and Fay, W.P. (1994). Heparin neutralization by platelet-rich thrombi. Role of platelet factor 4. *Circulation* **89**, 1523-1529.
- El Golli, N., Issertial, O., Rosa, J.P., and Briquet-Laugier, V. (2005). Evidence for a granule targeting sequence within platelet factor 4. *J Biol Chem* **280**, 30329-30335.
- Eliceiri, B.P., Paul, R., Schwartzberg, P.L., Hood, J.D., Leng, J., and Cheresh, D.A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* **4**, 915-924.
- Ellis, L.M. (2005). Bevacizumab. *Nat Rev Drug Discov Suppl*, S8-9.
- Ellis, L.M., and Hicklin, D.J. (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat Rev Cancer* **8**, 579-591.
- Escudier, B., Eisen, T., Stadler, W.M., Szczyluk, C., Oudard, S., Siebels, M., Negrier, S., Chevreau, C., Solska, E., Desai, A.A., *et al.* (2007). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* **356**, 125-134.
- Esko, J.D., and Lindahl, U. (2001). Molecular diversity of heparan sulfate. *J Clin Invest* **108**, 169-173.
- Eslin, D.E., Zhang, C., Samuels, K.J., Rauova, L., Zhai, L., Niewiarowski, S., Cines, D.B., Poncz, M., and Kowalska, M.A. (2004). Transgenic mice studies demonstrate a role for platelet factor 4 in thrombosis: dissociation between anticoagulant and antithrombotic effect of heparin. *Blood* **104**, 3173-3180.
- Farber, J.M. (1997). Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* **61**, 246-257.

- Feraud, O., Cao, Y., and Vittet, D. (2001). Embryonic stem cell-derived embryoid bodies development in collagen gels recapitulates sprouting angiogenesis. *Lab Invest* **81**, 1669-1681.
- Feron, O. (2004). Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* **25**, 536-542.
- Ferrara, N., and Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* **438**, 967-974.
- Filmus, J. (2001). Glypicans in growth control and cancer. *Glycobiology* **11**, 19R-23R.
- Flaumenhaft, R., Moscatelli, D., and Rifkin, D.B. (1990). Heparin and heparan sulfate increase the radius of diffusion and action of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* **111**, 1651-1659.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* **285**, 1182-1186.
- Folkman, J. (2004). Endogenous angiogenesis inhibitors. *Apmis* **112**, 496-507.
- Folkman, J. (2006). Angiogenesis. *Annu Rev Med* **57**, 1-18.
- Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* **6**, 273-286.
- Francis, D.J., Parish, C.R., McGarry, M., Santiago, F.S., Lowe, H.C., Brown, K.J., Bingley, J.A., Hayward, I.P., Cowden, W.B., Campbell, J.H., *et al.* (2003). Blockade of vascular smooth muscle cell proliferation and intimal thickening after balloon injury by the sulfated oligosaccharide PI-88: phosphomannopentaose sulfate directly binds FGF-2, blocks cellular signaling, and inhibits proliferation. *Circ Res* **92**, e70-77.
- Fraser, J.R., Laurent, T.C., and Laurent, U.B. (1997). Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *J Intern Med* **242**, 27-33.
- Frederick, M.J., and Clayman, G.L. (2001). Chemokines in cancer. *Expert Rev Mol Med* **3**, 1-18.
- Fuster, M.M., and Esko, J.D. (2005). The sweet and sour of cancer: glycans as novel therapeutic targets. *Nat Rev Cancer* **5**, 526-542.
- Gales, C., Van Durm, J.J., Schaak, S., Pontier, S., Percherancier, Y., Audet, M., Paris, H., and Bouvier, M. (2006). Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nat Struct Mol Biol* **13**, 778-786.
- Gallagher, J.T. (2001). Heparan sulfate: growth control with a restricted sequence menu. *J Clin Invest* **108**, 357-361.
- Gallagher, J.T., and Turnbull, J.E. (1992). Heparan sulphate in the binding and activation of basic fibroblast growth factor. *Glycobiology* **2**, 523-528.
- Gengrinovitch, S., Greenberg, S.M., Cohen, T., Gitay-Goren, H., Rockwell, P., Maione, T.E., Levi, B.Z., and Neufeld, G. (1995). Platelet factor-4 inhibits the mitogenic activity of VEGF121 and VEGF165 using several concurrent mechanisms. *J Biol Chem* **270**, 15059-15065.
- Gentilini, G., Kirschbaum, N.E., Augustine, J.A., Aster, R.H., and Visentin, G.P. (1999). Inhibition of human umbilical vein endothelial cell proliferation by the CXC chemokine, platelet factor 4 (PF4), is associated with impaired downregulation of p21(Cip1/WAF1). *Blood* **93**, 25-33.
- Gilat, D., Herschkoviz, R., Mekori, Y.A., Vlodavsky, I., and Lider, O. (1994). Regulation of adhesion of CD4+ T lymphocytes to intact or heparinase-treated subendothelial extracellular matrix by diffusible or anchored RANTES and MIP-1 beta. *J Immunol* **153**, 4899-4906.

- Gjesdal, K., and Pepper, D.S. (1977). Half-life of platelet factor 4 (PF-4) in plasma and platelets from macaca mulatta. *Thromb Haemost* 37, 73-80.
- Gospodarowicz, D., and Cheng, J. (1986). Heparin protects basic and acidic FGF from inactivation. *J Cell Physiol* 128, 475-484.
- Gotte, M., Joussen, A.M., Klein, C., Andre, P., Wagner, D.D., Hinkes, M.T., Kirchhof, B., Adamis, A.P., and Bernfield, M. (2002). Role of syndecan-1 in leukocyte-endothelial interactions in the ocular vasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43, 1135-1141.
- Green, C.J., Charles, R.S., Edwards, B.F., and Johnson, P.H. (1989). Identification and characterization of PF4var1, a human gene variant of platelet factor 4. *Mol Cell Biol* 9, 1445-1451.
- Griffin, C.A., Emanuel, B.S., LaRocco, P., Schwartz, E., and Poncz, M. (1987). Human platelet factor 4 gene is mapped to 4q12----q21. *Cytogenet Cell Genet* 45, 67-69.
- Gudermann, T., Kalkbrenner, F., Dippel, E., Laugwitz, K.L., and Schultz, G. (1997). Specificity and complexity of receptor-G-protein interaction. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 31, 253-262.
- Gupta, S.K., Hassel, T., and Singh, J.P. (1995). A potent inhibitor of endothelial cell proliferation is generated by proteolytic cleavage of the chemokine platelet factor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7799-7803.
- Gupta, S.K., and Singh, J.P. (1994). Inhibition of endothelial cell proliferation by platelet factor-4 involves a unique action on S phase progression. *J Cell Biol* 127, 1121-1127.
- Habuchi, O. (2000). Diversity and functions of glycosaminoglycan sulfotransferases. *Biochim Biophys Acta* 1474, 115-127.
- Hagedorn, M., Zilberberg, L., Lozano, R.M., Cuevas, P., Canron, X., Redondo-Horcajo, M., Gimenez-Gallego, G., and Bikfalvi, A. (2001). A short peptide domain of platelet factor 4 blocks angiogenic key events induced by FGF-2. *Faseb J* 15, 550-552.
- Hagedorn, M., Zilberberg, L., Wilting, J., Canron, X., Carrabba, G., Giussani, C., Pluderi, M., Bello, L., and Bikfalvi, A. (2002). Domain swapping in a COOH-terminal fragment of platelet factor 4 generates potent angiogenesis inhibitors. *Cancer Res* 62, 6884-6890.
- Han, Z.C., Lu, M., Li, J., Defard, M., Boval, B., Schlegel, N., and Caen, J.P. (1997). Platelet factor 4 and other CXC chemokines support the survival of normal hematopoietic cells and reduce the chemosensitivity of cells to cytotoxic agents. *Blood* 89, 2328-2335.
- Han, Z.C., Sensebe, L., Abgrall, J.F., and Briere, J. (1990). Platelet factor 4 inhibits human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood* 75, 1234-1239.
- 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. (2008). Retrospective: Judah Folkman (1933-2008). *Science* 319, 1055.
- Hansell, P., Olofsson, M., Maione, T.E., Arfors, K.E., and Borgstrom, P. (1995). Differences in binding of platelet factor 4 to vascular endothelium in vivo and endothelial cells in vitro. *Acta Physiol Scand* 154, 449-459.
- Hayes, M.E., Wallace, G.A., Grongsaard, P., Bischoff, A., George, D.M., Miao, W., McPherson, M.J., Stoffel, R.H., Green, D.W., and Roth, G.P. (2008). Discovery of small molecule benzimidazole antagonists of the chemokine receptor CXCR3. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 1573-1576.

- Hermans, E. (2003). Biochemical and pharmacological control of the multiplicity of coupling at G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther* 99, 25-44.
- Holash, J., Wiegand, S.J., and Yancopoulos, G.D. (1999). New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene* 18, 5356-5362.
- Hoogewerf, A.J., Kuschert, G.S., Proudfoot, A.E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C.A., and Wells, T.N. (1997). Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* 36, 13570-13578.
- 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.
- Huang, S.S., Huang, J.S., and Deuel, T.F. (1982). Proteoglycan carrier of human platelet factor 4. Isolation and characterization. *J Biol Chem* 257, 11546-11550.
- Iozzo, P., Pratipanawatr, T., Pijl, H., Vogt, C., Kumar, V., Pipek, R., Matsuda, M., Mandarino, L.J., Cusi, K.J., and DeFronzo, R.A. (2001). Physiological hyperinsulinemia impairs insulin-stimulated glycogen synthase activity and glycogen synthesis. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280, E712-719.
- Iozzo, R.V. (2005). Basement membrane proteoglycans: from cellar to ceiling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 646-656.
- Iozzo, R.V., and Cohen, I. (1993). Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma. *Experientia* 49, 447-455.
- 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., Duda, D.G., Clark, J.W., and Loeffler, J.S. (2006). Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 3, 24-40.
- Jimenez, B., Volpert, O.V., Crawford, S.E., Febbraio, M., Silverstein, R.L., and Bouck, N. (2000). Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med* 6, 41-48.
- Johnson, Z., Kosco-Vilbois, M.H., Herren, S., Cirillo, R., Muzio, V., Zaratin, P., Carbonatto, M., Mack, M., Smailbegovic, A., Rose, M., *et al.* (2004). Interference with heparin binding and oligomerization creates a novel anti-inflammatory strategy targeting the chemokine system. *J Immunol* 173, 5776-5785.
- Johnson, Z., Proudfoot, A.E., and Handel, T.M. (2005). Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 625-636.
- Jouan, V., Canon, X., Alemany, M., Caen, J.P., Quentin, G., Plouet, J., and Bikfalvi, A. (1999). Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action. *Blood* 94, 984-993.
- Kamohara, H., Takahashi, M., Ishiko, T., Ogawa, M., and Baba, H. (2007). Induction of interleukin-8 (CXCL-8) by tumor necrosis factor-alpha and leukemia inhibitory factor in pancreatic carcinoma cells: Impact of CXCL-8 as an autocrine growth factor. *Int J Oncol* 31, 627-632.

- Kantarci, A., Black, S.A., Xydas, C.E., Murawel, P., Uchida, Y., Yucekal-Tuncer, B., Atilla, G., Emingil, G., Uzel, M.I., Lee, A., *et al.* (2006). Epithelial and connective tissue cell CTGF/CCN2 expression in gingival fibrosis. *J Pathol* 210, 59-66.
- Kerbel, R., and Folkman, J. (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2, 727-739.
- Kerbel, R.S., and Kamen, B.A. (2004). The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer* 4, 423-436.
- Khachigian, L.M., and Parish, C.R. (2004). Phosphomannopentaose sulfate (PI-88): heparan sulfate mimetic with clinical potential in multiple vascular pathologies. *Cardiovasc Drug Rev* 22, 1-6.
- Kolber, D.L., Knisely, T.L., and Maione, T.E. (1995). Inhibition of development of murine melanoma lung metastases by systemic administration of recombinant platelet factor 4. *J Natl Cancer Inst* 87, 304-309.
- Kunkel, S.L., and Godessart, N. (2002). Chemokines in autoimmunity: from pathology to therapeutics. *Autoimmun Rev* 1, 313-320.
- Kuschert, G.S., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., and Wells, T.N. (1999). Glycosaminoglycans interact selectively with chemokines and modulate receptor binding and cellular responses. *Biochemistry* 38, 12959-12968.
- Laing, K.J., and Secombes, C.J. (2004). Chemokines. *Dev Comp Immunol* 28, 443-460.
- Lane, D.A., Denton, J., Flynn, A.M., Thunberg, L., and Lindahl, U. (1984). Anticoagulant activities of heparin oligosaccharides and their neutralization by platelet factor 4. *Biochem J* 218, 725-732.
- Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Orlando, C., Maggi, E., *et al.* (2003). An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med* 197, 1537-1549.
- Lasagni, L., Grepin, R., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Meini, C., Sagrinati, C., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Alain-Courtois, N., *et al.* (2007). PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. *Blood* 109, 4127-4134.
- Lau, E.K., Paavola, C.D., Johnson, Z., Gaudry, J.P., Geretti, E., Borlat, F., Kungl, A.J., Proudfoot, A.E., and Handel, T.M. (2004). Identification of the glycosaminoglycan binding site of the CC chemokine, MCP-1: implications for structure and function in vivo. *J Biol Chem* 279, 22294-22305.
- Le, X., Shi, Q., Wang, B., Xiong, Q., Qian, C., Peng, Z., Li, X.C., Tang, H., Abbruzzese, J.L., and Xie, K. (2000). Molecular regulation of constitutive expression of interleukin-8 in human pancreatic adenocarcinoma. *J Interferon Cytokine Res* 20, 935-946.
- Liekens, S., De Clercq, E., and Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol* 61, 253-270.
- Lin, E.Y., and Pollard, J.W. (2004). Role of infiltrated leucocytes in tumour growth and spread. *Br J Cancer* 90, 2053-2058.
- Lindahl, U., Kusche-Gullberg, M., and Kjellen, L. (1998). Regulated diversity of heparan sulfate. *J Biol Chem* 273, 24979-24982.

- Linker, A., Hoffman, P., Sampson, P., and Meyer, K. (1958). Heparitin sulfate. *Biochim Biophys Acta* 29, 443-444.
- Linkins, L.A., and Warkentin, T.E. (2008). The approach to heparin-induced thrombocytopenia. *Semin Respir Crit Care Med* 29, 66-74.
- Liu, L., Cara, D.C., Kaur, J., Raharjo, E., Mullaly, S.C., Jongstra-Bilen, J., Jongstra, J., and Kubes, P. (2005). LSP1 is an endothelial gatekeeper of leukocyte transendothelial migration. *J Exp Med* 201, 409-418.
- Loetscher, P., Pellegrino, A., Gong, J.H., Mattioli, I., Loetscher, M., Bardi, G., Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (2001). The ligands of CXC chemokine receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, are natural antagonists for CCR3. *J Biol Chem* 276, 2986-2991.
- Ludwig, R.J., Boehme, B., Podda, M., Henschler, R., Jager, E., Tandi, C., Boehncke, W.H., Zollner, T.M., Kaufmann, R., and Gille, J. (2004). Endothelial P-selectin as a target of heparin action in experimental melanoma lung metastasis. *Cancer Res* 64, 2743-2750.
- Luster, A.D., Greenberg, S.M., and Leder, P. (1995). The IP-10 chemokine binds to a specific cell surface heparan sulfate site shared with platelet factor 4 and inhibits endothelial cell proliferation. *J Exp Med* 182, 219-231.
- Lyon, M., Deakin, J.A., Rahmoune, H., Fernig, D.G., Nakamura, T., and Gallagher, J.T. (1998). Hepatocyte growth factor/scatter factor binds with high affinity to dermatan sulfate. *J Biol Chem* 273, 271-278.
- Lyon, M., Rushton, G., Askari, J.A., Humphries, M.J., and Gallagher, J.T. (2000). Elucidation of the structural features of heparan sulfate important for interaction with the Hep-2 domain of fibronectin. *J Biol Chem* 275, 4599-4606.
- Lyon, M., Rushton, G., and Gallagher, J.T. (1997). The interaction of the transforming growth factor-betas with heparin/heparan sulfate is isoform-specific. *J Biol Chem* 272, 18000-18006.
- Ma, Y., Lin, D., Sun, W., Xiao, T., Yuan, J., Han, N., Guo, S., Feng, X., Su, K., Mao, Y., *et al.* (2006). Expression of targeting protein for xkfp2 associated with both malignant transformation of respiratory epithelium and progression of squamous cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 12, 1121-1127.
- Mackay, C.R. (2001). Chemokines: immunology's high impact factors. *Nat Immunol* 2, 95-101.
- Maione, T.E., Gray, G.S., Hunt, A.J., and Sharpe, R.J. (1991). Inhibition of tumor growth in mice by an analogue of platelet factor 4 that lacks affinity for heparin and retains potent angiostatic activity. *Cancer Res* 51, 2077-2083.
- Maione, T.E., Gray, G.S., Petro, J., Hunt, A.J., Donner, A.L., Bauer, S.I., Carson, H.F., and Sharpe, R.J. (1990). Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. *Science* 247, 77-79.
- Maniotis, A.J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E.A., Gardner, L.M., Pe'er, J., Trent, J.M., Meltzer, P.S., and Hendrix, M.J. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol* 155, 739-752.
- Marchetti, D., and Nicolson, G.L. (2001). Human heparanase: a molecular determinant of brain metastasis. *Adv Enzyme Regul* 41, 343-359.
- Mascellani, G., Liverani, L., Bianchini, P., Parma, B., Torri, G., Bisio, A., Guerrini, M., and Casu, B. (1993). Structure and contribution to the heparin cofactor II-mediated inhibition of thrombin of naturally

- oversulphated sequences of dermatan sulphate. *Biochem J* 296 ( Pt 3), 639-648.
- Maxhimer, J.B., Quiros, R.M., Stewart, R., Dowlathshahi, K., Gattuso, P., Fan, M., Prinz, R.A., and Xu, X. (2002). Heparanase-1 expression is associated with the metastatic potential of breast cancer. *Surgery* 132, 326-333.
- Mayo, K.H., Barker, S., Kuranda, M.J., Hunt, A.J., Myers, J.A., and Maione, T.E. (1992). Molten globule monomer to condensed dimer: role of disulfide bonds in platelet factor-4 folding and subunit association. *Biochemistry* 31, 12255-12265.
- Mayo, K.H., and Chen, M.J. (1989). Human platelet factor 4 monomer-dimer-tetramer equilibria investigated by <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. *Biochemistry* 28, 9469-9478.
- Mayo, K.H., Ilyina, E., Roongta, V., Dundas, M., Joseph, J., Lai, C.K., Maione, T., and Daly, T.J. (1995). Heparin binding to platelet factor-4. An NMR and site-directed mutagenesis study: arginine residues are crucial for binding. *Biochem J* 312 ( Pt 2), 357-365.
- Mc, L.J. (1959). The discovery of heparin. *Circulation* 19, 75-78.
- McLaren, K.M., Holloway, L., and Pepper, D.S. (1980). Human platelet factor 4 and tissue mast cells. *Thromb Res* 19, 293-297.
- Meiser, A., Mueller, A., Wise, E.L., McDonagh, E.M., Petit, S.J., Saran, N., Clark, P.C., Williams, T.J., and Pease, J.E. (2008). The chemokine receptor CXCR3 is degraded following internalization and is replenished at the cell surface by de novo synthesis of receptor. *J Immunol* 180, 6713-6724.
- Meyer, K., Linker, A., Davidson, E.A., and Weissmann, B. (1953). The mucopolysaccharides of bovine cornea. *J Biol Chem* 205, 611-616.
- Middleton, J., Neil, S., Wintle, J., Clark-Lewis, I., Moore, H., Lam, C., Auer, M., Hub, E., and Rot, A. (1997). Transcytosis and surface presentation of IL-8 by venular endothelial cells. *Cell* 91, 385-395.
- Milkiewicz, M., Ispanovic, E., Doyle, J.L., and Haas, T.L. (2006). Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol* 38, 333-357.
- Mills, C.D., Kincaid, K., Alt, J.M., Heilman, M.J., and Hill, A.M. (2000). M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 164, 6166-6173.
- Modi, W.S., and Chen, Z.Q. (1998). Localization of the human CXC chemokine subfamily on the long arm of chromosome 4 using radiation hybrids. *Genomics* 47, 136-139.
- Modi, W.S., Dean, M., Seuanez, H.N., Mukaida, N., Matsushima, K., and O'Brien, S.J. (1990). Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor (MDNCF/IL-8) resides in a gene cluster along with several other members of the platelet factor 4 gene superfamily. *Hum Genet* 84, 185-187.
- Moser, B., Wolf, M., Walz, A., and Loetscher, P. (2004). Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol* 25, 75-84.
- Motzer, R.J., Hoosen, S., Bello, C.L., and Christensen, J.G. (2006). Sunitinib malate for the treatment of solid tumours: a review of current clinical data. *Expert Opin Investig Drugs* 15, 553-561.
- Mueller, A. (2007). Internalization: what does it tell us about pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of an antagonist? *Br J Pharmacol* 152, 1145-1146.

- Mulloy, B., Forster, M.J., Jones, C., and Davies, D.B. (1993). N.m.r. and molecular-modelling studies of the solution conformation of heparin. *Biochem J* 293 ( Pt 3), 849-858.
- Murakami, M., Elfenbein, A., and Simons, M. (2008). Non-canonical fibroblast growth factor signalling in angiogenesis. *Cardiovasc Res* 78, 223-231.
- Murdoch, C., Monk, P.N., and Finn, A. (1999). Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells. *Immunology* 98, 36-41.
- Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hebert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev* 52, 145-176.
- Murry, B.P., Blust, B.E., Singh, A., Foster, T.P., and Marchetti, D. (2006). Heparanase mechanisms of melanoma metastasis to the brain: Development and use of a brain slice model. *J Cell Biochem* 97, 217-225.
- Najjam, S., Gibbs, R.V., Gordon, M.Y., and Rider, C.C. (1997). Characterization of human recombinant interleukin 2 binding to heparin and heparan sulfate using an ELISA approach. *Cytokine* 9, 1013-1022.
- Narita, K., Staub, J., Chien, J., Meyer, K., Bauer, M., Friedl, A., Ramakrishnan, S., and Shridhar, V. (2006). HSulf-1 inhibits angiogenesis and tumorigenesis in vivo. *Cancer Res* 66, 6025-6032.
- Neri, D., and Bicknell, R. (2005). Tumour vascular targeting. *Nat Rev Cancer* 5, 436-446.
- Nesmelova, I.V., Sham, Y., Dudek, A.Z., van Eijk, L.I., Wu, G., Slungaard, A., Mortari, F., Griffioen, A.W., and Mayo, K.H. (2005). Platelet factor 4 and interleukin-8 CXC chemokine heterodimer formation modulates function at the quaternary structural level. *J Biol Chem* 280, 4948-4958.
- Netelenbos, T., Drager, A.M., van het Hof, B., Kessler, F.L., Delouis, C., Huijgens, P.C., van den Born, J., and van Dijk, W. (2001). Differences in sulfation patterns of heparan sulfate derived from human bone marrow and umbilical vein endothelial cells. *Exp Hematol* 29, 884-893.
- Netelenbos, T., Zuijderduijn, S., Van Den Born, J., Kessler, F.L., Zweegman, S., Huijgens, P.C., and Drager, A.M. (2002). Proteoglycans guide SDF-1-induced migration of hematopoietic progenitor cells. *J Leukoc Biol* 72, 353-362.
- Nor, J.E., Mitra, R.S., Sutorik, M.M., Mooney, D.J., Castle, V.P., and Polverini, P.J. (2000). Thrombospondin-1 induces endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis by activating the caspase death pathway. *J Vasc Res* 37, 209-218.
- O'Donovan, N., Galvin, M., and Morgan, J.G. (1999). Physical mapping of the CXC chemokine locus on human chromosome 4. *Cytogenet Cell Genet* 84, 39-42.
- 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., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R.A., Moses, M., Lane, W.S., Cao, Y., Sage, E.H., and Folkman, J. (1994). Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* 79, 315-328.

- Oliver, G. (2004). Lymphatic vasculature development. *Nat Rev Immunol* 4, 35-45.
- Orimo, A., Gupta, P.B., Sgroi, D.C., Arenzana-Seisdedos, F., Delaunay, T., Naeem, R., Carey, V.J., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-348.
- Orimo, A., and Weinberg, R.A. (2006). Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle* 5, 1597-1601.
- Ortega, N., Sordello, S., and Plouet, J. (1997). [Tumoral vascularization: physiopathology and therapeutic prospects]. *Bull Cancer* 84, 391-395.
- Papetti, M., and Herman, I.M. (2002). Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 282, C947-970.
- Parish, C.R. (2006). The role of heparan sulphate in inflammation. *Nat Rev Immunol* 6, 633-643.
- Parish, C.R., Freeman, C., Brown, K.J., Francis, D.J., and Cowden, W.B. (1999). Identification of sulfated oligosaccharide-based inhibitors of tumor growth and metastasis using novel in vitro assays for angiogenesis and heparanase activity. *Cancer Res* 59, 3433-3441.
- Pellegrini, L., Burke, D.F., von Delft, F., Mulloy, B., and Blundell, T.L. (2000). Crystal structure of fibroblast growth factor receptor ectodomain bound to ligand and heparin. *Nature* 407, 1029-1034.
- Penc, S.F., Pomahac, B., Eriksson, E., Detmar, M., and Gallo, R.L. (1999). Dermatan sulfate activates nuclear factor-kappaB and induces endothelial and circulating intercellular adhesion molecule-1. *J Clin Invest* 103, 1329-1335.
- Pepper, M.S. (1997). Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 605-619.
- Pepper, M.S. (2000). Lymphangiogenesis and tumor metastasis: more questions than answers. *Lymphology* 33, 144-147.
- Perollet, C., Han, Z.C., Savona, C., Caen, J.P., and Bikfalvi, A. (1998). Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood* 91, 3289-3299.
- Petersen, F., Brandt, E., Lindahl, U., and Spillmann, D. (1999). Characterization of a neutrophil cell surface glycosaminoglycan that mediates binding of platelet factor 4. *J Biol Chem* 274, 12376-12382.
- Piccin, A., Murphy, W.G., and Smith, O.P. (2007). Circulating microparticles: pathophysiology and clinical implications. *Blood Rev* 21, 157-171.
- Pikas, D.S., Eriksson, I., and Kjellen, L. (2000). Overexpression of different isoforms of glucosaminyl N-deacetylase/N-sulfotransferase results in distinct heparan sulfate N-sulfation patterns. *Biochemistry* 39, 4552-4558.
- Poncz, M., Surrey, S., LaRocco, P., Weiss, M.J., Rappaport, E.F., Conway, T.M., and Schwartz, E. (1987). Cloning and characterization of platelet factor 4 cDNA derived from a human erythroleukemic cell line. *Blood* 69, 219-223.
- Proudfoot, A.E., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N., and Kosco-Vilbois, M.H. (2003). Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1885-1890.

- Rabenstein, D.L. (2002). Heparin and heparan sulfate: structure and function. *Nat Prod Rep* 19, 312-331.
- Rajagopalan, H., Nowak, M.A., Vogelstein, B., and Lengauer, C. (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 3, 695-701.
- Rapraeger, A.C. (2000). Syndecan-regulated receptor signaling. *J Cell Biol* 149, 995-998.
- Rege, T.A., Fears, C.Y., and Gladson, C.L. (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis in malignant gliomas: nature's antiangiogenic therapy. *Neuro Oncol* 7, 106-121.
- Ricard-Blum, S., Feraud, O., Lortat-Jacob, H., Rencurosi, A., Fukai, N., Dkhisli, F., Vittet, D., Imberty, A., Olsen, B.R., and van der Rest, M. (2004). Characterization of endostatin binding to heparin and heparan sulfate by surface plasmon resonance and molecular modeling: role of divalent cations. *J Biol Chem* 279, 2927-2936.
- Richmond, A., Balentien, E., Thomas, H.G., Flaggs, G., Barton, D.E., Spiess, J., Bordoni, R., Francke, U., and Derynck, R. (1988). Molecular characterization and chromosomal mapping of melanoma growth stimulatory activity, a growth factor structurally related to beta-thromboglobulin. *Embo J* 7, 2025-2033.
- Ringvall, M., Ledin, J., Holmborn, K., van Kuppevelt, T., Ellin, F., Eriksson, I., Olofsson, A.M., Kjellen, L., and Forsberg, E. (2000). Defective heparan sulfate biosynthesis and neonatal lethality in mice lacking N-deacetylase/N-sulfotransferase-1. *J Biol Chem* 275, 25926-25930.
- Robishaw, J.D., and Berlot, C.H. (2004). Translating G protein subunit diversity into functional specificity. *Curr Opin Cell Biol* 16, 206-209.
- Roboz, G.J., Giles, F.J., List, A.F., Cortes, J.E., Carlin, R., Kowalski, M., Bilic, S., Masson, E., Rosamilia, M., Schuster, M.W., *et al.* (2006). Phase 1 study of PTK787/ZK 222584, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, for the treatment of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia* 20, 952-957.
- Romagnani, P., Annunziato, F., Lasagni, L., Lazzeri, E., Beltrame, C., Francalanci, M., Uguccioni, M., Galli, G., Cosmi, L., Maurenzig, L., *et al.* (2001). Cell cycle-dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. *J Clin Invest* 107, 53-63.
- Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 18, 217-242.
- Rot, A. (1992). Endothelial cell binding of NAP-1/IL-8: role in neutrophil emigration. *Immunol Today* 13, 291-294.
- Rucinski, B., Knight, L.C., and Niewiarowski, S. (1986). Clearance of human platelet factor 4 by liver and kidney: its alteration by heparin. *Am J Physiol* 251, H800-807.
- Rucinski, B., Niewiarowski, S., James, P., Walz, D.A., and Budzynski, A.Z. (1979). Antiheparin proteins secreted by human platelets. purification, characterization, and radioimmunoassay. *Blood* 53, 47-62.
- Rucinski, B., Niewiarowski, S., Strzyzewski, M., Holt, J.C., and Mayo, K.H. (1990). Human platelet factor 4 and its C-terminal peptides: heparin binding and clearance from the circulation. *Thromb Haemost* 63, 493-498.

- Rucinski, B., Stewart, G.J., De Feo, P.A., Boden, G., and Niewiarowski, S. (1987). Uptake and processing of human platelet factor 4 by hepatocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 186, 361-367.
- Sadir, R., Imberty, A., Baleux, F., and Lortat-Jacob, H. (2004). Heparan sulfate/heparin oligosaccharides protect stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against proteolysis induced by CD26/dipeptidyl peptidase IV. *J Biol Chem* 279, 43854-43860.
- Saksela, E. (1998). A guinea pig's view on prostate cancer screening trials. *Acta Oncol* 37, 533-537.
- 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.
- Salcedo, R., Resau, J.H., Halverson, D., Hudson, E.A., Dambach, M., Powell, D., Wasserman, K., and Oppenheim, J.J. (2000). Differential expression and responsiveness of chemokine receptors (CXCR1-3) by human microvascular endothelial cells and umbilical vein endothelial cells. *Faseb J* 14, 2055-2064.
- Sanderson, R.D., Yang, Y., Kelly, T., MacLeod, V., Dai, Y., and Theus, A. (2005). Enzymatic remodeling of heparan sulfate proteoglycans within the tumor microenvironment: growth regulation and the prospect of new cancer therapies. *J Cell Biochem* 96, 897-905.
- Sanderson, R.D., Yang, Y., Suva, L.J., and Kelly, T. (2004). Heparan sulfate proteoglycans and heparanase--partners in osteolytic tumor growth and metastasis. *Matrix Biol* 23, 341-352.
- Santiard-Baron, D., Langui, D., Delehedde, M., Delatour, B., Schombert, B., Touchet, N., Tremp, G., Paul, M.F., Blanchard, V., Sergeant, N., *et al.* (2005). Expression of human FE65 in amyloid precursor protein transgenic mice is associated with a reduction in beta-amyloid load. *J Neurochem* 93, 330-338.
- Sarrazin, S., Adam, E., Lyon, M., Depontieu, F., Motte, V., Landolfi, C., Lortat-Jacob, H., Bechard, D., Lassalle, P., and Delehedde, M. (2006). Endocan or endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy. *Biochim Biophys Acta* 1765, 25-37.
- Sasisekharan, R., Shriver, Z., Venkataraman, G., and Narayanasami, U. (2002). Roles of heparan-sulphate glycosaminoglycans in cancer. *Nat Rev Cancer* 2, 521-528.
- Sasisekharan, R., and Venkataraman, G. (2000). Heparin and heparan sulfate: biosynthesis, structure and function. *Curr Opin Chem Biol* 4, 626-631.
- Sathornsumetee, S., and Rich, J.N. (2006). Vandetanib, a novel multitargeted kinase inhibitor, in cancer therapy. *Drugs Today (Barc)* 42, 657-670.
- Schaffner, A., Rhyn, P., Schoedon, G., and Schaer, D.J. (2005). Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes--role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway. *J Leukoc Biol* 78, 202-209.
- Scheuerer, B., Ernst, M., Durrbaum-Landmann, I., Fleischer, J., Grage-Griebenow, E., Brandt, E., Flad, H.D., and Petersen, F. (2000). The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood* 95, 1158-1166.

- Scotton, C.J., Wilson, J.L., Milliken, D., Stamp, G., and Balkwill, F.R. (2001). Epithelial cancer cell migration: a role for chemokine receptors? *Cancer Res* 61, 4961-4965.
- Sessa, C., Guibal, A., Del Conte, G., and Ruegg, C. (2008). Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? *Nat Clin Pract Oncol* 5, 378-391.
- Sgadari, C., Angiolillo, A.L., and Tosato, G. (1996). Inhibition of angiogenesis by interleukin-12 is mediated by the interferon-inducible protein 10. *Blood* 87, 3877-3882.
- Sgadari, C., Farber, J.M., Angiolillo, A.L., Liao, F., Teruya-Feldstein, J., Burd, P.R., Yao, L., Gupta, G., Kanegane, C., and Tosato, G. (1997). Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo. *Blood* 89, 2635-2643.
- Sharma, B., Handler, M., Eichstetter, I., Whitelock, J.M., Nugent, M.A., and Iozzo, R.V. (1998). Antisense targeting of perlecan blocks tumor growth and angiogenesis in vivo. *J Clin Invest* 102, 1599-1608.
- Sharpe, R.J., Byers, H.R., Scott, C.F., Bauer, S.I., and Maione, T.E. (1990). Growth inhibition of murine melanoma and human colon carcinoma by recombinant human platelet factor 4. *J Natl Cancer Inst* 82, 848-853.
- Silbert, D.I., Gill, P.J., Humphries, D.E., Silbert, J.E., Culp, L.A., and Silbert, C.K. (1990). Glycosaminoglycans of bovine aorta endothelial cells: identification and localization by use of a platelet factor 4-fluorescein probe. *J Histochem Cytochem* 38, 589-593.
- Silbert, J.E., and Freilich, L.S. (1980). Biosynthesis of chondroitin sulphate by a Golgi-apparatus-enriched preparation from cultures of mouse mastocytoma cells. *Biochem J* 190, 307-313.
- Silbert, S., Rosa, D.D., Matte, U., Goldim, J.R., Barcellos, S.H., and Procianny, R.S. (1997). [Coagulase-negative Staphylococcus sp. in blood cultures from infants less than 60 days old: infection versus contamination]. *J Pediatr (Rio J)* 73, 161-165.
- Silvestre, J.S., and Levy, B.I. (2002). Angiogenesis therapy in ischemic disease. *Arch Mal Coeur Vaiss* 95, 189-196.
- Singh, L., Bakshi, D.K., Majumdar, S., Vasishta, R.K., Arora, S.K., and Wig, J.D. (2007). Expression of interferon-gamma-inducible protein-10 and its receptor CXCR3 in chronic pancreatitis. *Pancreatology* 7, 479-490.
- Slungaard, A. (2005). Platelet factor 4: a chemokine enigma. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1162-1167.
- Smith, D.R., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Orringer, M.B., Whyte, R.I., Burdick, M.D., Wilke, C.A., and Strieter, R.M. (1994). Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J Exp Med* 179, 1409-1415.
- Soto, H., Wang, W., Strieter, R.M., Copeland, N.G., Gilbert, D.J., Jenkins, N.A., Hedrick, J., and Zlotnik, A. (1998). The CC chemokine 6Ckine binds the CXC chemokine receptor CXCR3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8205-8210.
- St Charles, R., Walz, D.A., and Edwards, B.F. (1989). The three-dimensional structure of bovine platelet factor 4 at 3.0-A resolution. *J Biol Chem* 264, 2092-2099.
- Strieter, R.M., Burdick, M.D., Gomperts, B.N., Belperio, J.A., and Keane, M.P. (2005). CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 16, 593-609.

- Strieter, R.M., Poverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., *et al.* (1995). The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. *J Biol Chem* **270**, 27348-27357.
- Stringer, S.E., and Gallagher, J.T. (1997). Specific binding of the chemokine platelet factor 4 to heparan sulfate. *J Biol Chem* **272**, 20508-20514.
- Struyf, S., Burdick, M.D., Peeters, E., Van den Broeck, K., Dillen, C., Proost, P., Van Damme, J., and Strieter, R.M. (2007). Platelet factor-4 variant chemokine CXCL4L1 inhibits melanoma and lung carcinoma growth and metastasis by preventing angiogenesis. *Cancer Res* **67**, 5940-5948.
- Struyf, S., Burdick, M.D., Proost, P., Van Damme, J., and Strieter, R.M. (2004). Platelets release CXCL4L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet factor-4/CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis. *Circ Res* **95**, 855-857.
- Stuckey, J.A., St Charles, R., and Edwards, B.F. (1992). A model of the platelet factor 4 complex with heparin. *Proteins* **14**, 277-287.
- Sugahara, K., and Kitagawa, H. (2000). Recent advances in the study of the biosynthesis and functions of sulfated glycosaminoglycans. *Curr Opin Struct Biol* **10**, 518-527.
- Sugumaran, G., and Silbert, J.E. (1991). Subfractionation of chick embryo epiphyseal cartilage Golgi. Localization of enzymes involved in the synthesis of the polysaccharide portion of proteochondroitin sulfate. *J Biol Chem* **266**, 9565-9569.
- Sulpice, E., Bryckaert, M., Lacour, J., Contreres, J.O., and Tobelem, G. (2002). Platelet factor 4 inhibits FGF2-induced endothelial cell proliferation via the extracellular signal-regulated kinase pathway but not by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Blood* **100**, 3087-3094.
- Sulpice, E., Contreres, J.O., Lacour, J., Bryckaert, M., and Tobelem, G. (2004). Platelet factor 4 disrupts the intracellular signalling cascade induced by vascular endothelial growth factor by both KDR dependent and independent mechanisms. *Eur J Biochem* **271**, 3310-3318.
- Suzuki, K. (1968). Cerebral GM1-gangliosidosis: chemical pathology of visceral organs. *Science* **159**, 1471-1472.
- Tabruyn, S.P., and Griffioen, A.W. (2007). Molecular pathways of angiogenesis inhibition. *Biochem Biophys Res Commun* **355**, 1-5.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., Hubscher, S., Hirano, H., Siebenlist, U., and Shaw, S. (1993a). T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature* **361**, 79-82.
- Tanaka, Y., Adams, D.H., and Shaw, S. (1993b). Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunol Today* **14**, 111-115.
- Tanaka, Y., Fujii, K., Hubscher, S., Aso, M., Takazawa, A., Saito, K., Ota, T., and Eto, S. (1998). Heparan sulfate proteoglycan on endothelium efficiently induces integrin-mediated T cell adhesion by immobilizing chemokines in patients with rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum* **41**, 1365-1377.
- Taraboletti, G. (2001). Thrombospondin-1: an inhibitor of angiogenesis. *Haemostasis* **31 Suppl 1**, 23-24.
- Teruya-Feldstein, J., Jaffe, E.S., Burd, P.R., Kanegane, H., Kingma, D.W., Wilson, W.H., Longo, D.L., and Tosato, G. (1997). The role of Mig, the monokine induced by interferon-gamma, and IP-10, the interferon-gamma-inducible protein-10, in tissue necrosis and vascular damage associated

- with Epstein-Barr virus-positive lymphoproliferative disease. *Blood* **90**, 4099-4105.
- Toole, B.P. (2004). Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat Rev Cancer* **4**, 528-539.
- Touriol, C., Bornes, S., Bonnal, S., Audigier, S., Prats, H., Prats, A.C., and Vagner, S. (2003). Generation of protein isoform diversity by alternative initiation of translation at non-AUG codons. *Biol Cell* **95**, 169-178.
- Tozer, G.M., Kanthou, C., and Baguley, B.C. (2005). Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer* **5**, 423-435.
- Tumova, S., Woods, A., and Couchman, J.R. (2000). Heparan sulfate proteoglycans on the cell surface: versatile coordinators of cellular functions. *Int J Biochem Cell Biol* **32**, 269-288.
- Turnbull, J., Powell, A., and Guimond, S. (2001). Heparan sulfate: decoding a dynamic multifunctional cell regulator. *Trends Cell Biol* **11**, 75-82.
- Vandercappellen, J., Noppen, S., Verbeke, H., Put, W., Conings, R., Gouwy, M., Schutyser, E., Proost, P., Scot, R., Geboes, K., *et al.* (2007). Stimulation of angiostatic platelet factor-4 variant (CXCL4L1/PF-4var) versus inhibition of angiogenic granulocyte chemotactic protein-2 (CXCL6/GCP-2) in normal and tumoral mesenchymal cells. *J Leukoc Biol* **82**, 1519-1530.
- Vassilatis, D.K., Hohmann, J.G., Zeng, H., Li, F., Ranchalis, J.E., Mortrud, M.T., Brown, A., Rodriguez, S.S., Weller, J.R., Wright, A.C., *et al.* (2003). The G protein-coupled receptor repertoires of human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 4903-4908.
- Veltri, R.W., Miller, M.C., Zhao, G., Ng, A., Marley, G.M., Wright, G.L., Jr., Vessella, R.L., and Ralph, D. (1999). Interleukin-8 serum levels in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Urology* **53**, 139-147.
- Vlodavsky, I., Abboud-Jarrous, G., Elkin, M., Naggi, A., Casu, B., Sasisekharan, R., and Ilan, N. (2006). The impact of heparanase and heparin on cancer metastasis and angiogenesis. *Pathophysiol Haemost Thromb* **35**, 116-127.
- Vlodavsky, I., and Friedmann, Y. (2001). Molecular properties and involvement of heparanase in cancer metastasis and angiogenesis. *J Clin Invest* **108**, 341-347.
- Vlodavsky, I., Korner, G., Ishai-Michaeli, R., Bashkin, P., Bar-Shavit, R., and Fuks, Z. (1990). Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* **9**, 203-226.
- Wahl, M.L., Kenan, D.J., Gonzalez-Gronow, M., and Pizzo, S.V. (2005). Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated. *J Cell Biochem* **96**, 242-261.
- Webb, L.M., Ehrenguber, M.U., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Rot, A. (1993). Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 7158-7162.
- Wedge, S.R., Kendrew, J., Hennequin, L.F., Valentine, P.J., Barry, S.T., Brave, S.R., Smith, N.R., James, N.H., Dukes, M., Curwen, J.O., *et al.* (2005). AZD2171: a highly potent, orally bioavailable, vascular endothelial growth factor receptor-2 tyrosine kinase inhibitor for the treatment of cancer. *Cancer Res* **65**, 4389-4400.
- 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.
- Woods, A., and Couchman, J.R. (2000). Integrin modulation by lateral association. *J Biol Chem* **275**, 24233-24236.
- Yamaguchi, K., Ogawa, K., Katsube, T., Shimao, K., Konno, S., Shimakawa, T., Yoshimatsu, K., Naritaka, Y., Yagawa, H., and Hirose, K. (2005). Platelet factor 4 gene transfection into tumor cells inhibits angiogenesis, tumor growth and metastasis. *Anticancer Res* **25**, 847-851.
- Yancopoulos, G.D., Davis, S., Gale, N.W., Rudge, J.S., Wiegand, S.J., and Holash, J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* **407**, 242-248.
- Yip, G.W., Smollich, M., and Gotte, M. (2006). Therapeutic value of glycosaminoglycans in cancer. *Mol Cancer Ther* **5**, 2139-2148.
- Yu, H., Munoz, E.M., Edens, R.E., and Linhardt, R.J. (2005). Kinetic studies on the interactions of heparin and complement proteins using surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta* **1726**, 168-176.
- Zetser, A., Bashenko, Y., Edovitsky, E., Levy-Adam, F., Vlodaysky, I., and Ilan, N. (2006). Heparanase induces vascular endothelial growth factor expression: correlation with p38 phosphorylation levels and Src activation. *Cancer Res* **66**, 1455-1463.
- Zetter, B.R. (2008). The scientific contributions of M. Judah Folkman to cancer research. *Nat Rev Cancer* **8**, 647-654.
- Zhang, X., Chen, L., Bancroft, D.P., Lai, C.K., and Maione, T.E. (1994). Crystal structure of recombinant human platelet factor 4. *Biochemistry* **33**, 8361-8366.
- Zhou, Z., Wang, J., Cao, R., Morita, H., Soininen, R., Chan, K.M., Liu, B., Cao, Y., and Tryggvason, K. (2004). Impaired angiogenesis, delayed wound healing and retarded tumor growth in perlecan heparan sulfate-deficient mice. *Cancer Res* **64**, 4699-4702.
- Zipin-Roitman, A., Meshel, T., Sagi-Assif, O., Shalmon, B., Avivi, C., Pfeffer, R.M., Witz, I.P., and Ben-Baruch, A. (2007). CXCL10 promotes invasion-related properties in human colorectal carcinoma cells. *Cancer Res* **67**, 3396-3405.
- Zucker, M.B., and Katz, I.R. (1991). Platelet factor 4: production, structure, and physiologic and immunologic action. *Proc Soc Exp Biol Med* **198**, 693-702.