



**HAL**  
open science

# Caractérisation d'endocan murin : dualité fonctionnelle pro- ou anti-tumorale de l'endocan selon son statut de glycosylation. Etude des mécanismes d'action anti-tumorale

Hanane Yassine

► **To cite this version:**

Hanane Yassine. Caractérisation d'endocan murin : dualité fonctionnelle pro- ou anti-tumorale de l'endocan selon son statut de glycosylation. Etude des mécanismes d'action anti-tumorale. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S029 . tel-01205156

**HAL Id: tel-01205156**

**<https://theses.hal.science/tel-01205156>**

Submitted on 25 Sep 2015

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

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

# THESE

Pour obtenir le titre de

## DOCTEUR EN SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Ecole doctorale Biologie-Santé

---

### Caractérisation de l'endocan murin : dualité fonctionnelle pro- ou anti-tumorale de l'endocan selon son statut de glycosylation. Etude des mécanismes d'action anti-tumorale

---

Présentée et soutenue publiquement le 24 septembre 2014

Par

**Hanane Yassine**

Devant le jury composé de :

**Professeur Arnaud Scherpereel**

Service de Pneumologie et d'Oncologie thoracique  
Pôle des Maladies Respiratoires-Hôpital Albert Calmette CHRU de Lille

**Président**

**Professeur Jean Francois Mornex**

Université Claude Bernard Lyon 1  
Service de pneumologie - Centre maladies orphelines pulmonaires

**Rapporteur**

**Professeur Andreas Bikfalvi**

Université Bordeaux I  
Inserm U1029, Laboratoire de l'Angiogenèse et du Microenvironnement des cancers (LAMC)

**Rapporteur**

**Docteur Raquel del Toro**

Inserm U833, Angiogenèse Embryonnaire et Pathologique, Collège de France

**Examineur**

**Docteur Philippe Lassalle**

Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, U1019, Equipe 11, Lille

**Directeur de Thèse**

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier vivement l'ensemble des membres du jury qui ont accepté la tâche d'évaluer mon travail de thèse :

- **Monsieur le professeur Arnaud scherpereel**
- **Monsieur le professeur Andreas Bikfalvi**
- **Monsieur le professeur Jean Francois Mornex**
- **Madame le docteur Raquel del Toro**

### **A Madame le docteur Anne Tsicopoulos**

Je tiens tout d'abord à vous remercier pour m'avoir accueillie dans votre laboratoire et m'avoir permis de réaliser la thèse dans les meilleures conditions. Je vous en serai toujours reconnaissante.

### **A Monsieur le docteur Philippe Lassalle**

Je vous remercie de m'avoir accepté dans votre équipe de recherche et de m'avoir encadré pendant ces courtes années. Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée pendant la thèse, vous avez su m'encourager pour la mener à bien. J'ai beaucoup appris et je suis très honorée de vous avoir eu comme encadrant.

### **A Nathalie de Freitas Caires**

Petite chef et future maman, merci d'avoir été toujours disponible pour m'aiguiller quand j'avais besoin d'aide. Je te remercie pour tous tes précieux conseils scientifiques (mais aussi tout le nouveau vocabulaire !!), et pour tout ce qu'on a partagé en dehors de la science !

### **A Han Vorng et Philippe Hauw**

Je vous remercie tous les deux pour les bons moments passés ensemble. Des moments inoubliables. Han, merci pour ta gentillesse et ton soutien infini.

### **A Lucie, Aurélie et Maud**

Je suis ravie de vous avoir rencontrés, merci pour les bons moments et les fous rires qu'on a partagés ensemble.

### **A Manale**

Merci d'avoir peaufiné ma thèse en si peu de temps, je te serai toujours reconnaissante.

### **Aux Lunginnoviens**

Merci à Omar et Jean **edward** (oui c'est comme ça que je l'écris !!!) pour les bons moments qu'on a passés ensemble. Au final, les libanais ne sont pas si méchants que ça non !?

### **Aux membres de l'unité U1019**

A Patricia, Catherine, Laetitia, Saliha, Aurélie, Benjamin, Joanne, Julie, Julien, Philippe, merci pour la bonne ambiance et pour vos sourires.

Je tiens à remercier mes amis, pour leur présence et leur soutien. Je pense en particulier à Safaa, Rabab, Ali, Hassan et les deux petits poussins Ali et Hussein.

Un immense merci à ma famille sans qui rien n'aurait été possible.

A mes parents, pour m'avoir permis d'atteindre ce niveau, être toujours présents à mes côtés, pour votre soutien, vos encouragements, votre écoute et vos conseils.

A mes sœurs Malak, Lama et Rim, mon frère Ali et à nos bouts de choux Eva, Malak, Sara, Vera et Yara. Votre présence à mes côtés m'a toujours été indispensable et réconfortante.

Enfin, je tiens à dédier ce travail à mon mari Ali qui m'a aidé sans relâche pendant toutes ces années, avec tout amour. Merci d'avoir toujours été à mes cotés, sans toi je n'aurais jamais pu accomplir cette aventure ! Milles mercis.

## SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	1
<b>ABBREVIATIONS</b> .....	3
<b>RESUME</b> .....	6
<b>PARTIE I : INTRODUCTION</b> .....	7
CHAPITRE I : L'ANGIOGENESE PHYSIOLOGIQUE ET TUMORALE.....	8
1. Définition de l'angiogenèse .....	8
2. La place de l'angiogenèse au cours du développement et chez l'adulte .....	8
2.1 La vasculogenèse.....	8
2.2. L'angiogenèse et l'expansion du réseau primaire.....	8
3. Les mécanismes de l'angiogenèse .....	9
3.1. Angiogenèse par intussusception .....	9
3.2 Angiogenèse par bourgeonnement.....	11
4. L'angiogenèse tumorale .....	14
4.1 Le switch angiogénique .....	14
4.2 Mécanisme de vascularisation tumorale.....	16
4.3 Structure des vaisseaux tumoraux .....	19
CHAPITRE II : LES TIP CELLS .....	21
1. Méthodes d'analyses.....	21
2. Marqueurs moléculaires des Tip cells .....	24
2.1 Delta-like ligand 4 (DLL4) .....	24
2.2 CXCR4.....	25
2.3 Apelin.....	26
2.4 Le récepteur 2 pour le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR2) .....	27
2.5 Le récepteur 3 pour le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR3) .....	28
2.6 Neuropilin-1 (NRP1).....	29
2.7 Platelet Derived Growth Factor BB (PDGF-BB) .....	31
2.8 Uncoordinated-5B (UNC5B).....	32
2.9 Angiopoeitine 2 (Ang-2).....	33
2.10 Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor (uPAR).....	35
2.11 Nidogen-1 .....	37
2.12 Sox 17.....	38
2.13 PlexinD1 .....	40
2.14 Endocan .....	42

CHAPITRE III : ENDOCAN .....	43
1. Organisation génomique .....	43
1.1 Gène et ADNc.....	43
1.2 Structure du protéoglycane .....	46
2. Expression et régulation .....	48
2.1 Au niveau de l'ARNm.....	48
2.2 Au niveau de la protéine.....	50
3. Endocan et tumeurs épithéliales/endocrines.....	52
4. Endocan marqueur de l'angiogenèse tumorale.....	56
5. Endocan et Tip cells.....	58
6. Fonctions d'endocan .....	58
CHAPITRE IV : OBJECTIFS DE LA THESE .....	61
<b>PARTIE II : RESULTATS</b> .....	61
CHAPITRE I : Effet de la perte de la chaîne glycanique d'endocan sur sa propriété tumorale.....	62
CHAPITRE II : Comprendre le déficit de glycosylation observé chez l'endocan murin.....	81
<b>PARTIE III : DISCUSSION ET PERSPECTIVES</b> .....	95
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	102

## **ABREVIATIONS**

**A549** : human lung adenocarcinoma

**ALI** : Acute Lung Injury

**Ang-1** : Angiopoietin-1

**Ang-2** : Angiopoietin-2

**B16F10** : mouse melanoma

**CS** : Chondroitin Sulfate

**CRC** : Colorectal Cancer

**CHO-DG44** : Chinese Hamster Ovarian

**cIMT** : carotid intima-media thickness

**DLL4** : Delta-Like Ligand 4

**DSL** : Delta-Serrate-LAG 2

**DLL1** : Delta Like Ligand-1

**EPC** : Endothelial Progenitor Cells

**ECRF24** : Immortalized CD31+ high human endothelial cell line

**EGF** : Epidermal Growth Factor

**EBV** : Epstein-Barr Virus

**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor

**EL-4** : mouse lymphoma cell line

**Enos** : Endothelial Nitric Oxide Synthase

**FGF** : Fibroblast Growth Factor

**Foxc 1** : Forkhead box c1

**Foxc 2** : Forkhead box c2

**FAK** : Focal Adhesion Kinase

**HIF-1** : Hypoxia Inducible transcription Factor 1

**HMG** : High mobility group

**HGF** : Hepatocyte Growth Factor

**HGF/SF** : Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor

**HUVEC** : Human Umbilical Endothelial Cells

**HMEC** : Human Microvascular Endothelial Cell lines

**HEK-293** : Human Embryonic Kidney 293

**HT-29** : Human colon adenocarcinoma

**HCC** : Hepatocellular Carcinoma

**IgG1** : Immunoglobulin G1  
**IA** : Intussusception Angiogenesis  
**ICAM-1** : Intercellular Adhesion Molecule-1  
**ICAM-2** : Intercellular adhesion molecule 2  
**IGF** : Insulin Growth Factor  
**IGFBP** : Insulin-like Growth Factor Binding Protein  
**IL-1 $\beta$**  : Interleukin-1 $\beta$   
**IL-4** : Interleukin-4  
**INF- $\gamma$**  : Interferon- $\gamma$   
**GPCR** : G-Protein Coupled Receptor  
**GPI** : Glycosyl phosphatidylinositol  
**GAG** : Glycosaminoglycan  
**K1000** : human FGF-2-transfected NIH3T3  
**LFA-1** : Lymphocyte Function associated Antigen-1  
**LPR-1** : Lipophorin Receptor 1  
**LPS** : Lipopolysaccharide  
**LEC** : Lymphatic Endothelial Cells  
**LPL** : Lipoprotein Lipase  
**LLC** : Lewis Lung Carcinoma  
**mTOR** : mammalian Target Of Rapamycin  
**MVD** : Microvascular Density  
**MMP-19** : Matrix Metalloproteinase 19  
**NK** : Natural Killer  
**NPC** : Nasopharynx Carcinoma  
**NRP1** : Neuropilin-1  
**NRP2** : Neuropilin-2  
**NICD** : Notch Intracellular Domain  
**NIH3T3** : mouse embryonic fibroblast cell line  
**PECAM** : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule  
**Phalanx cells** : Cellules de phalange  
**PH3** : Phosphohistone H3  
**PI3k/AKT** : Phosphoinositide 3-kinase /protein kinase B  
**PAE** : Porcine Aortic Endothelial cells  
**PASI** : Psoriasis Area and Severity Index



**PDGFR** : Platelet Derived Growth Factor Receptor  
**SCID** : Severe Combined Immuno Deficiency  
**SHP1** : Src-homology phosphatase-1  
**SHP2** : Src-homology phosphatase-2  
**SDF-1** : Stromal-cell derived factor-1  
**SEMA3A** : Semaphorin class 3  
**SA** : Sprouting Angiogenesis  
**Stalk cells** : Cellules organisées en tige  
**TNF $\alpha$**  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$   
**Tie-2** : Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains  
**Tip cells** : Cellules de la pointe  
**TGF $\beta$**  : Transforming Growth Factor  $\beta$   
**UNC5** : Uncoordinated-5  
**uPAR** : urokinase-type Plasminogen Activator Receptor  
**VE-cadherin** : Vascular Endothelial cadherin  
**VEGF** : Vascular Endothelial Growth Factor  
**VEGFR1** : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1  
**VEGFR2** : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2  
**VEGFR3** : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3  
**VCAM-1** : Vascular Cell Adhesion Molecule-1  
**VLDL** : Very low density lipoprotein  
**ZO-1** : Zonula Occludens

## RESUME

Une tumeur nécessite un approvisionnement en oxygène et en nutriments pour sa croissance mais aussi pour la dissémination à distance vers d'autres organes. L'angiogenèse tumorale est le phénomène exploité par la tumeur pour accomplir ses besoins. Les « Tip cells » situées à l'extrémité des capillaires en bourgeonnement initient et guident la croissance des néovaisseaux. Ces cellules sont considérées actuellement comme une cible thérapeutique pertinente pour les médicaments anti-angiogéniques. De nombreuses études ont permis d'identifier un cluster de marqueurs moléculaires exprimés de manière privilégiée au niveau des « Tip cells ». Un de ces marqueurs appelé endocan, a été identifié au laboratoire, et a fait objet du travail réalisé pendant la thèse.

Endocan est un protéoglycane circulant surexprimé dans de nombreux cancers humains dont l'expression est fréquemment associée à un mauvais pronostic. Par son glycanes, endocan intervient dans la croissance tumorale en augmentant l'effet des facteurs de croissance, mais aussi la migration des cellules endothéliales.

Mon travail de thèse s'est orienté sur la caractérisation biochimique et fonctionnelle d'endocan murin afin d'avoir un modèle animal utile pour une meilleure compréhension de l'activité pro-tumorale d'endocan humain.

Les travaux présentés dans ce manuscrit montrent qu'endocan murin est un protéoglycane de type chondroïtine sulfate, mais partiellement glycosylé. Ce déficit de glycosylation est gouverné par des domaines peptiques distants codés par l'exon 1 et l'exon 2 et qui distinguent l'endocan murin de son homologue humain. Dans un modèle de xénogreffe tumorale chez la souris SCID, nous avons démontré qu'endocan murin ne présente aucun pouvoir pro-tumoral. Contrairement à l'endocan humain, il ralentit la vitesse de croissance tumorale. Cette propriété anti-tumorale est liée à la présence d'une forme non glycosylée. Nous avons pu montrer à travers plusieurs modèles de xénogreffes tumorales que cette propriété de freinage de la croissance tumorale s'étend aussi au core protéique d'endocan humain. De plus, nous avons pu démontrer qu'une administration systémique d'endocan non glycosylé est significativement associée à un ralentissement de la croissance tumorale. Ceci établit la relation de causalité entre le polypeptide d'endocan et la propriété anti-tumorale observée dans les différents modèles animaux.

Le polypeptide d'endocan ne modifie pas *in vitro* la prolifération ni la viabilité des cellules HT-29 ce qui laisse penser à un mécanisme d'action indirect. Sur le plan pathologique, nous avons montré que les formes non glycosylées d'endocan humain et murin sont associées à une réaction inflammatoire stromale constituée d'une infiltration pan-leucocytaire. La déplétion des leucocytes CD122+ (essentiellement les cellules NK murines) abolit partiellement l'effet anti-tumoral induit par l'endocan non glycosylé.

Nos résultats ajoutent endocan au concert des molécules endothéliales tumorales qui participent au contrôle de la réaction inflammatoire stromale.

---

# **PARTIE I : INTRODUCTION**

---

# CHAPITRE I : L'ANGIOGENESE PHYSIOLOGIQUE ET TUMORALE

---

## 1. Définition de l'angiogenèse

L'**angiogenèse** est le phénomène qui permet la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de l'endothélium vasculaire préexistant. Ce phénomène est indispensable dans la vie pré- et post-natale pour la croissance et l'homéostasie. L'angiogenèse est également impliquée dans de nombreux processus pathologiques tels que la croissance tumorale.

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

### 2.1 La vasculogenèse

Lors des premières étapes du développement embryonnaire, le plexus capillaire primitif est construit à partir de cellules progénitrices endothéliales (EPC) ou angioblastes issues de la différenciation des hémangioblastes dérivant du mésoderme. Ce processus est appelé **la vasculogenèse**. Cette dernière, essentiellement décrite durant les étapes précoces de l'embryogenèse, ne leur serait cependant pas exclusive (Risau 1997; Swift et Weinstein 2009). En effet, la présence des EPC circulantes chez l'adulte suggère l'existence d'une vasculogenèse post-natale participant à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins chez l'adulte, mais également dans le cadre pathologique à l'angiogenèse tumorale (Ribatti et al. 2007b).

### 2.2. L'angiogenèse et l'expansion du réseau primaire

Une fois le plexus capillaire primitif établi, l'évolution en réseau mature organisé en artères et en veines se développe par le processus d'angiogenèse.

Chez l'adulte, les vaisseaux sanguins sont quiescents et ne nécessitent que très rarement la formation de nouvelles ramifications. Cependant, ils conservent la capacité de répondre à des signaux angiogéniques. Les cellules endothéliales sont, après les cellules nerveuses les cellules dont la demi-vie est la plus longue. Seulement 0.01% des cellules endothéliales résidentes sont engagées dans le cycle de division cellulaire (Hanahan et Folkman 1996).

L'angiogenèse est réactivée physiologiquement lors du remodelage tissulaire cyclique dans le système génital féminin (Pendant les cycles menstruels ; dans le placenta et la glande mammaire pendant la gestation) et la réparation tissulaire lors de lésion traumatique (cicatrisation) (Pepper et al. 2000). Elle est également associée à divers conditions

pathologiques où elle peut présenter un impact néfaste ou bénéfique (Griffioen et Molema 2000; Andres et Djonov 2010). Ainsi l'angiogenèse permet de réparer les dommages causés par l'ischémie ou l'insuffisance cardiaque (Ferrara et Alitalo 1999). Cependant, dans certaines situations pathologiques telles que les maladies inflammatoires (arthrites rhumatoïdes, psoriasis), les maladies cardiovasculaires (athérosclérose), les maladies de la rétine (rétinopathie liée au diabète) et la progression tumorale, l'activation de l'angiogenèse aggrave la pathologie (Folkman 1995; Carmeliet et Jain 2000a; Carmeliet 2005; Paleolog 2009).

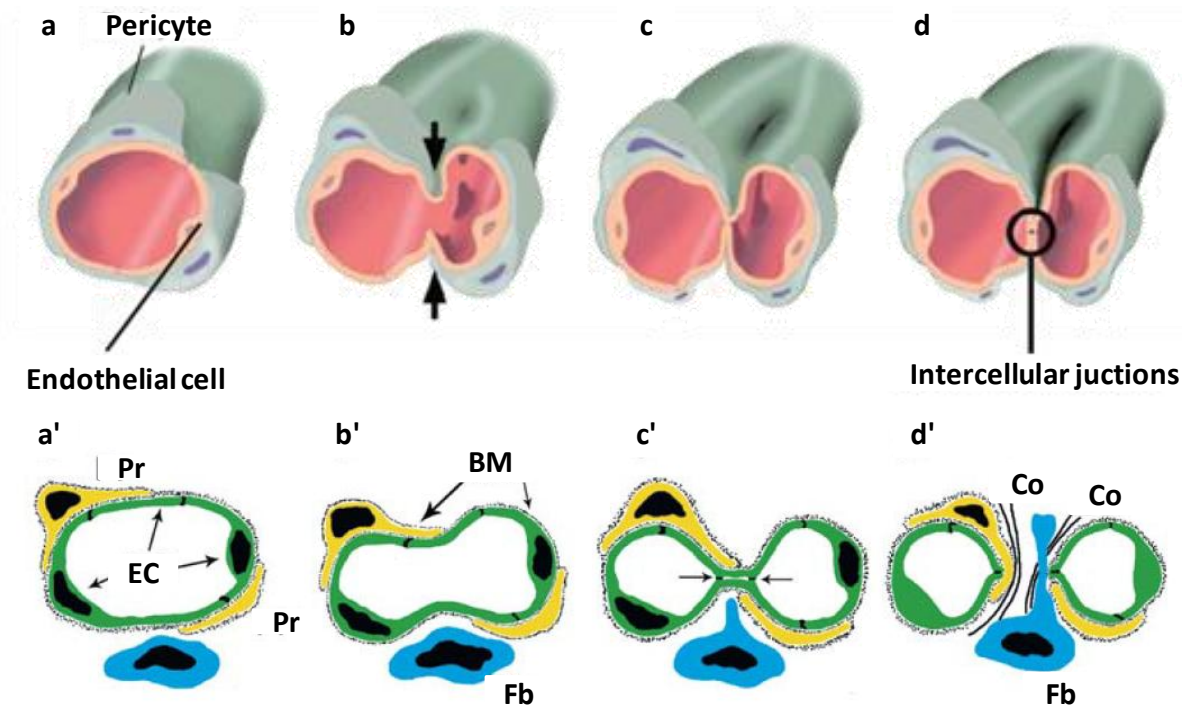
Dans les conditions physiologiques normales, deux grands mécanismes d'angiogenèse ont été décrits : l'angiogenèse par bourgeonnement (SA : Sprouting Angiogenesis) et l'angiogenèse par intussusception (IA) (Carmeliet et Jain 2000a; Ribatti et al. 2012). De plus, trois autres mécanismes d'angiogenèse ont été décrits et sont particulièrement associés au développement tumoral, à savoir la vasculogenèse post-natale tumorale, la cooption vasculaire et le mimétisme vasculaire (Auguste et al. 2005; Hillen et Griffioen 2007; Carmeliet et Jain 2011). Ces trois derniers mécanismes d'angiogenèse seront abordés dans la partie angiogenèse tumorale.

### **3. Les mécanismes de l'angiogenèse**

#### **3.1. Angiogenèse par intussusception**

L'angiogenèse par intussusception (IA) a été découverte à la fin des années quatre-vingt du 20<sup>ème</sup> siècle et reste mal étudiée. L'IA permet un remodelage vasculaire très rapide et économique car elle n'implique pas la prolifération des cellules endothéliales. En effet, l'IA induit la formation de néovaisseaux par subdivision d'un vaisseau préexistant via l'établissement des piliers intraluminaux (Fig.1). Ces derniers sont formés suite à une invagination des parois endothéliales opposées d'un vaisseau à l'intérieur de la lumière vasculaire. Par la suite les jonctions inter-endothéliales sont réorganisées, et une perforation centrale est formée dans le corps du pilier. Ultérieurement, le pilier est envahi par les péricytes et les fibroblastes qui vont alors synthétiser une matrice extracellulaire permettant d'augmenter la séparation entre les deux vaisseaux fils (Caduff et al. 1986; Djonov et al. 2000; De Spiegelaere et al. 2012). Néanmoins, l'IA semble jouer un rôle majeur dans la

croissance et le remodelage des lits vasculaires y compris les lits vasculaires tumoraux (Patan et al. 1996; Nico et al. 2010).



**Figure 1 : Représentation schématique du processus d'angiogenèse par intussusception (IA).** (a-d) Schéma tridimensionnel représentant la génération de nouveaux vaisseaux par IA. (a-b) Le processus commence par la migration de parois opposées du capillaire l'une vers l'autre dans la lumière du vaisseau. Lorsque le contact entre les deux parois est établi, (c-d) un pilier intraluminal sera formé et les jonctions endothéliales seront réorganisées. (d) Les cellules endothéliales se rétractent et les deux néovaisseaux se séparent et seront rapidement envahies par des fibroblastes (Fb) et des péricytes (Pr) qui fixent des fibrilles de collagène (Co). (a-d') Représentation bidimensionnelle des événements décrits dans (a-d). (BM) : membrane basale. D'après (Djonov et al. 2000; De Spiegelaere et al. 2012).

### 3.2 Angiogenèse par bourgeonnement

L'angiogenèse par bourgeonnement est le premier mécanisme d'angiogenèse à avoir été décrit et le mieux caractérisé (Fig.2). Ce mécanisme est essentiellement régulé d'une manière paracrine par des facteurs angiogéniques qui sont exprimés par les tissus hypoxiques (Carmeliet 2005).

Il nécessite deux grandes étapes complémentaires aussi indispensables l'une que l'autre : une phase d'activation et une phase de maturation.

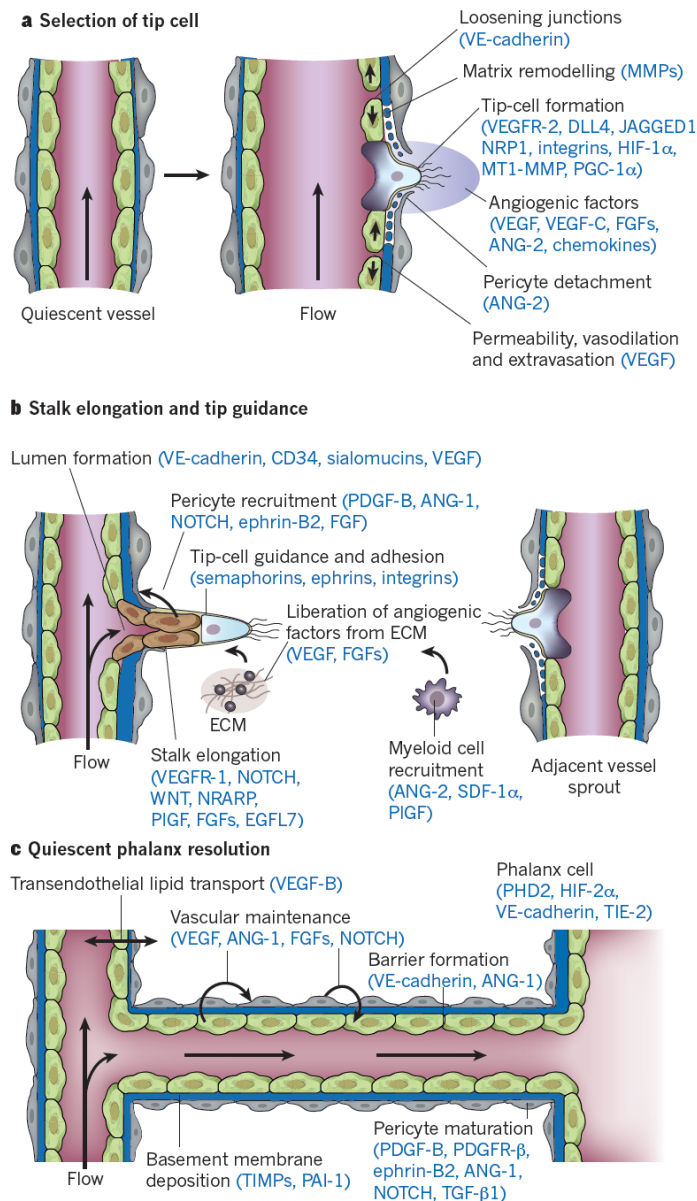
Le processus est initié par une étape d'activation au cours de laquelle des facteurs angiogènes tels que les membres de la famille du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) se lient à leurs récepteurs et induisent une dilatation et une augmentation de la perméabilité vasculaire. L'Ang-1 (Angiopoïétin-1) et les molécules de jonction, telles que les VE-cadhérine (Vascular Endothelial cadherine) et PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1), maintiennent une interaction entre les cellules. Durant cette étape, ces interactions sont inhibées pour permettre une déstabilisation du vaisseau. L'Ang-2 (Angiopoïétine-2) et l'extravasation de protéases spécifiques induisent une dégradation locale de la matrice extracellulaire et de la membrane basale. Cela va permettre aux cellules endothéliales, aux péricytes et aux cellules musculaires lisses vasculaires de se détacher et de migrer vers les stimuli angiogéniques (Fig.2a) (Carmeliet et Jain 2000a). Très rapidement, une hiérarchie s'établit au sein des cellules endothéliales activées. Trois phénotypes de cellules endothéliales sont reconnus dans le développement du bourgeon vasculaire : les Tip cells (cellules de la pointe), les Stalk cells (cellules organisées en tige) et les Phalanx cells (cellules de phalange). Durant le bourgeonnement vasculaire, une seule cellule s'engage vers un phénotype « Tip cell ». Elle émet des filopodes et migre dans la matrice dégradée tout en palpant son environnement. Les cellules endothéliales qui sont au contact de la « Tip-cell » adoptent alors un phénotype différent, et sont appelées « Stalk cell ». Ces cellules n'ayant pas de filopodes, restent alignées et jointives derrière la Tip-cell et allongent progressivement le bourgeon vasculaire par le biais de divisions mitotiques à rythme élevé. Elles créent la lumière du nouveau vaisseau et contribuent à la formation de la membrane basale (Fig.2b). Lorsque deux bourgeons vasculaires se rencontrent, ils établissent une jonction qui conduit à la formation d'une nouvelle anastomose microvasculaire (Fig.2c) (Carmeliet et al. 2009; Smet et al. 2009).

La seconde phase de l'angiogenèse par bourgeonnement est l'étape de maturation. Cette phase a pour but de reconstituer une membrane basale autour des nouveaux capillaires et de leur assurer une couverture péricytaire qui permettra aux cellules endothéliales de survivre plusieurs mois dans un état de quiescence. Le PDGFB, le TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor  $\beta$ ), l'Ang- 1 sont considérés comme acteurs majeurs de cette phase de maturation. Les cellules endothéliales adoptent un troisième phénotype durant cette phase correspondant aux « Phalanx cells » (Fig.2c). Elles sont ainsi appelées puisqu'elles forment une monocouche ordonnée de cellules endothéliales. Ces cellules prolifèrent à un rythme plus lent par rapport aux « Stalk cell ». Elles possèdent les caractéristiques morphologiques des cellules endothéliales quiescentes mais continuent à former la membrane basale et d'améliorer les jonctions serrées. Elles forment une barrière étanche entre le sang et les tissus environnants (Smet et al. 2009; De Spiegelaere et al. 2012).

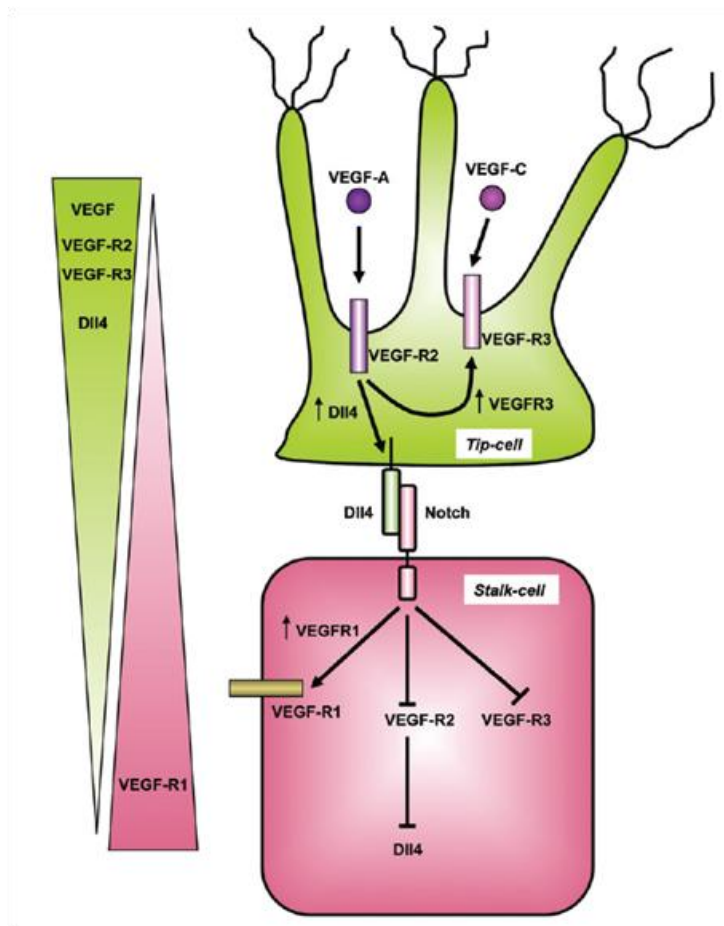
### **3.2.1 Induction du phénotype « Tip Cell » : Dialogue entre DLL4 et Notch**

La spécification cellulaire entre Tip et Stalk cells est contrôlée par le système Notch/DLL4 (Delta-Like Ligand 4). Lors de l'activation avec le VEGF, les cellules endothéliales se mettent en concurrence les unes avec les autres pour devenir les Tip cells. Cette compétition est médiée par l'expression du ligand DLL4 à la surface de la cellule endothéliale en réponse au VEGF (Fig.3). La cellule pionnière surexprimant DLL4 se lie aux récepteurs Notch exprimé à la surface des Stalk Cell. En se liant, DLL4 induit l'expression du VEGFR1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-1) qui piège le VEGF et réprime l'expression du VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2), VEGFR3 ((Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3), NRP1 (Neuropilin-1) à la surface des « Stalk cell » inhibant ainsi leur devenir en « Tip cell ». Cette interaction aboutit à une diminution de la réponse de type migratoire, empêche l'extension des filopodes, inhibe les ramifications des vaisseaux et engage les « Stalk cell » dans une réponse mitogène. Le système Notch/DLL4 agit ainsi comme un régulateur très fin de la ramification vasculaire (Smet et al. 2009).





**Figure 2 :** Représentation schématique des principales étapes d'angiogenèse par bourgeonnement (SA). (a) Suite à une stimulation par des facteurs angiogéniques (VEGF), le vaisseau quiescent va se dilater et une seule cellule endothéliale s'engage en phénotype du tip cell (DLL4). La migration du Tip cell nécessite la dégradation de la membrane basale, la perte des jonctions endothéliales, le détachement des péricytes et la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMPs. VEGF augmente la perméabilité vasculaire et induit l'extravasation des protéines plasmatiques qui vont créer une couche de matrice provisoire. (b) les Tip cells adhèrent à la matrice extracellulaire via les intégrines, et migrent en réponse à des molécules angiogéniques. Les Stalk cells se prolifèrent pour permettre l'élongation et la formation de la lumière du vaisseau. Afin de stabiliser les vaisseaux néoformés, les Stalk cells recrutent les péricytes et induisent la formation de la membrane basale. (c) Les deux Tip cells se rencontrent et se fusionnent et induisent la formation d'une anastomose. Les vaisseaux rentrent dans un état de quiescence et les cellules endothéliales s'engagent en phénotypes de « phalanx cell ». D'après (Carmeliet et Jain 2011).



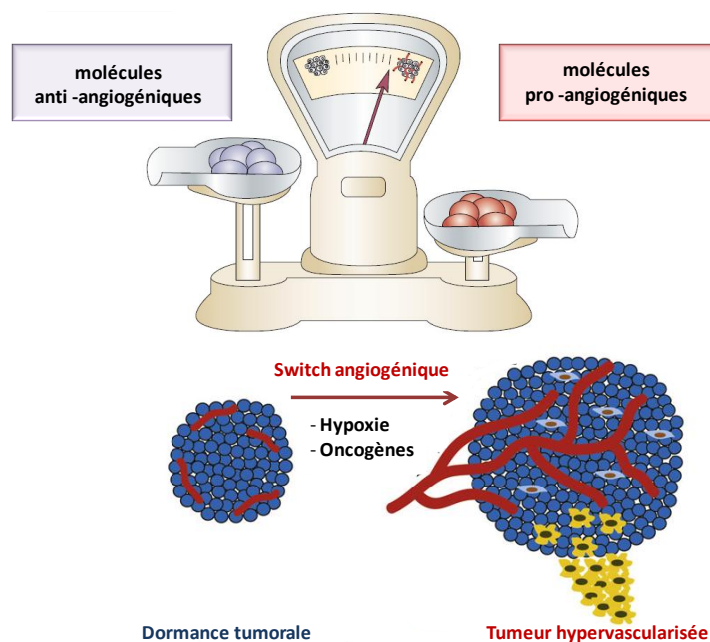
**Figure 3 :** Schéma représentant la signalisation DLL4/Notch dans la spécification des tip cells. (D'après Feige et al, 2010).

## 4. L'angiogenèse tumorale

### 4.1 Le switch angiogénique

Les premières étapes de la formation de tumeurs sont basées sur une combinaison d'altérations génétiques et épigénétiques qui activent les oncogènes et / ou inhibent les gènes suppresseurs de tumeurs (Baeriswyl et Christofori 2009). Dans la phase prévasculaire, les cellules tumorales prolifèrent parfois aussi rapidement que dans une tumeur vascularisée. Cependant, la mort des cellules tumorales par apoptose, contrebalance cette prolifération et maintient la masse tumorale dans un état d'équilibre (Ribatti et al. 2007b). La tumeur est dans un état de dormance. Dès que la masse tumorale atteint une taille critique de quelques millimètres de diamètre, les cellules tumorales situées au centre de la tumeur commencent à manquer d'approvisionnement suffisant en oxygène et en nutriments. Elles peuvent subir ainsi une apoptose ou une nécrose. Malheureusement, les

cellules tumorales peuvent surmonter cette inhibition de croissance en induisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux sanguins préexistants via l'angiogenèse tumorale (Bergers et Benjamin 2003; Baeriswyl et Christofori 2009). En 1971, Folkman a proposé l'angiogenèse comme un processus clé pour la croissance tumorale et l'invasion métastatique et, par conséquent, le blocage de l'angiogenèse est une stratégie pour interrompre la croissance d'une tumeur. La transition d'une hyperplasie prévasculaire vers une tumeur hautement vascularisée est désignée par le terme du « Switch angiogénique » (Carmeliet et Jain 2000a) (Fig.4). La régulation moléculaire de l'angiogenèse tumorale est à l'image d'une balance comportant sur chacun de ses plateaux les facteurs pro ou anti angiogéniques. En effet, dans les tissus normaux, la quiescence vasculaire est maintenue par un déséquilibre de cette balance en faveur des molécules anti-angiogéniques. Inversement, le « Switch angiogénique » est activé quand l'effet des molécules anti-angiogéniques est contre balancé par les molécules pro-angiogéniques (Fig.4).



**Figure 4 : Activation du Switch angiogénique.** Divers signaux tels que l'hypoxie et l'activation des oncogènes stimulent l'expression des facteurs pro-angiogéniques. Le Switch angiogénique est induit suite à un déséquilibre de la balance en faveur des facteurs pro-angiogéniques. Ce Switch permet la transition d'une phase de dormance tumorale à une phase de croissance exponentielle hypervascularisée. D'après (Bergers et Benjamin 2003).

Divers signaux sont capables d'induire le switch angiogénique tel que le stress métabolique (hypoxie, pH acide ou hypoglycémie), le stress mécanique (forces d'étirement, pression générée par la prolifération des cellules), la réponse immunitaire / inflammatoire (cellules immunitaires / inflammatoires qui se sont infiltrées dans le tissu), et des mutations génétiques (activation des oncogènes ou délétion de gènes suppresseurs de tumeur qui contrôlent la production de molécules régulatrices de l'angiogenèse) (Carmeliet 1999; Kerbel 2000). En particulier, l'hypoxie est un facteur prépondérant du switch angiogénique et du maintien du déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogènes. Notamment, elle a un rôle dans la stabilisation de la sous unité  $\alpha$  du facteur de transcription HIF-1 (hypoxia-inducible transcription factor). Cette stabilisation aboutit à l'induction de divers facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF, le FGF, la NOS (nitric oxide synthase), le PDGF (platelet-derived growth factor) et l'Ang2 (Carmeliet et Jain 2000a).

#### **4.2 Mécanisme de vascularisation tumorale**

L'angiogenèse tumorale implique des interactions cellulaires et moléculaires complexes entre les cellules cancéreuses, les cellules endothéliales, les cellules du stroma tumoral et peritumoral, et les constituants de la matrice extracellulaire. L'activation des cellules endothéliales peut se faire par sécrétion de facteurs angiogéniques soit de façon directe par les cellules cancéreuses, elles-mêmes, soit de façon indirecte par d'autres types cellulaires présents dans le stroma tumoral et par certains composants de la matrice extracellulaire (Carmeliet et Jain 2000a). Parmi celles-ci, le VEGF et la famille des angiopoïétines ont un rôle prépondérant.

L'angiogenèse tumorale est un processus qui peut se rapprocher de l'angiogenèse physiologique, avec néanmoins quelques particularités. Les vaisseaux tumoraux sont, pour la plupart, issus du réseau vasculaire pré-existant et peuvent être induits par bourgeonnement ou par intussusception (décrits en amont) (Carmeliet et Jain 2000b). Cependant, trois autres mécanismes de vascularisation tumorale sont cités dans la littérature. La vasculogenèse post-natale tumorale, la cooption vasculaire et le mimétisme vasculaire (Ribatti et al. 2007b; De Spiegelaere et al. 2012).

#### **4.2.1 La vasculogénèse post-natale tumorale**

Des cellules endothéliales progénitrices peuvent être mobilisées à partir de la moelle osseuse et transportées par la circulation sanguine puis être incorporées dans la paroi des vaisseaux tumoraux en formation (Asahara et al. 1999) (Fig. 5).

#### **4.2.2 La cooption vasculaire**

Dans les tissus hautement vascularisés tels que le cerveau, les tumeurs peuvent se développer dans une certaine mesure sans induire une réponse angiogénique spécifique. La tumeur subvient alors à ses besoins en oxygène et nutriments en parasitant le système vasculaire pré-existant du tissu envahi (Hillen et Griffioen 2007). On parle du phénomène de « cooption vasculaire ».

Au fur et à mesure que la tumeur augmente en taille, les vaisseaux sanguins deviennent complètement noyés dans la tumeur (Fig. 5). Cependant, après une certaine période, les vaisseaux cooptés par la tumeur commencent à régresser en raison d'une surexpression d'Ang-2. Cette surexpression est une résultante d'un mécanisme de défense engendré par l'hôte (Holash et al. 1999; Hillen et Griffioen 2007).

Par conséquent, la cooptation vasculaire est principalement observée au cours de la phase initiale de la croissance tumorale. La régression des vaisseaux cooptés induit une réponse angiogénique robuste et stimule la formation des néovaisseaux via l'angiogénèse par bourgeonnement, l'IA ou par le mimétisme vasculaire (Hillen et Griffioen 2007).

#### **4.2.3 Le mimétisme vasculaire**

Dans certaines tumeurs, les cellules tumorales possèdent une plasticité pour acquérir un phénotype endothélial et par la suite former des structures tubulaires propres (Paulis et al. 2010).

Ce processus a été décrit pour la première fois dans le mélanome agressif par Maniotis et collaborateurs, et connu par le phénomène du « mimétisme vasculaire » (Maniotis et al. 1999). Il se traduit par la construction d'un réseau capillaire entièrement composé de cellules tumorales plutôt que des cellules endothéliales. Le mimétisme vasculaire peut aussi conduire à la construction des vaisseaux mosaïques caractérisés par une alternance de cellules tumorales et endothéliales (Chang et al. 2000) (Fig. 5).

Le mimétisme vasculaire est principalement détecté dans les tumeurs agressives, y compris le mélanome, le cancer du rein, le cancer du sein, le cancer de l'ovaire, le cancer de la prostate et le cancer du poumon (Maniotis et al. 1999; Seftor et al. 2002; Hendrix et al. 2003; Paulis et al. 2010).

Dans le mélanome agressif, il a été démontré que les cellules tumorales ont subi une réversion génétique en cellule pluripotente. L'analyse transcriptionnelle de ces lignées tumorales montre que ces cellules étaient capables d'exprimer des gènes associés à de multiples phénotypes cellulaires notamment une surexpression des gènes spécifiques des cellules endothéliales, épithéliales, hématopoïétique, fibroblastique (*une surexpression d'endocan est remarquable et sera évoqué ultérieurement*) (Seftor et al. 2002; Hendrix et al. 2003) (Tableau 1). Ceci suggère que le mimétisme vasculaire ressemble à la vasculogénèse observée principalement durant le développement. Le mimétisme vasculaire se développe à partir de cellules tumorales dédifférenciées pluripotentes tandis que la vasculogénèse se développe à partir des cellules progénitrices endothéliales (De Spiegelaere et al. 2012).

Angiogenesis/vasculogenesis-related genes in melanoma

Gene name	Unigene	Function	Ratio
TIE-1 (TIE)	Hs.78824	Endothelial tyrosine kinase	25
Epithelial cell kinase (EphA2)	Hs.171596	Receptor tyrosine kinase, ECK	13
Ephrin receptor B2 (EphB2)	Hs.125124	Receptor tyrosine kinase, ERK/HEK5	3.7
Ephrin A1 (EFNA1)	Hs.1624	Eph receptor ligand B61	0.34 (3.0)
Ephrin B1 (EFNB1)	Hs.144700	Eph receptor ligand	3.9
VEGF-B <sub>165</sub> (VEGFB)	Hs.78781	Growth factor	0.40 (2.5)
VEGF-C (VEGFC)	Hs.79141	flt-4 Ligand	6.5
Neuropilin (NRP1)	Hs.69285	VEGF receptor	5.3
Connective tissue growth factor (CTGF)	Hs.75511	Growth factor	26
VE-Cadherin, cadherin-5 (CDH5)	Hs.76206	Cell-cell adhesion molecule	11
Selectin E (SELE)	Hs.89546	Adhesion molecule	6.6
Paired box 8 (PAX8)	Hs.73149	Transcriptional regulator	10.4
Thrombospondin 2 (THBS2)	Hs.108623	ECM-binding protein	0.03 (33)
CD36	Hs.75613	Thrombospondin/collagen receptor	0.10 (9.6)
Hypoxia inducible factor 1z (HIF1A)	Hs.197540	BHLH transcription factor	3.1
Leukemia inhibitory factor (LIF)	Hs.2250	IL-6 Superfamily member	8.3
Leukemia inhibitory factor receptor (LIFR)	Hs.2798	LIF receptor	9.9
Tissue factor pathway inhibitor (TFPI)	Hs.170279	Coagulation inhibitor	4.0
Tissue factor pathway inhibitor-2 (TFPI2)	Hs.78045	Coagulation inhibitor	8.5
Placental bikunin (SPINT2)	Hs.31439	Serine protease/coagulation inhibitor	11.5
Laminin 5γ2 (LAMC2)	Hs.54451	Extracellular matrix	50
Fibronectin (FN1)	Hs.118162	Extracellular matrix	27
Collagen IV, α2 (COL4A2)	Hs.75617	Extracellular matrix	3.6
Collagen IV, α4 (COL4A4)	Hs.180828	Extracellular matrix	0.32 (3.1)
Fibrillin-1 (FBN1)	Hs.750	Extracellular matrix	5.0
Podocalyxin-like protein (PODXL)	Hs.16426	Sialoglycoprotein foot process	15.0
Endothelial differentiation receptor (EDG1)	Hs.154210	G-coupled receptor	3.7
Endothelial cell specific molecule (ESM1)	Hs.41716	Endothelial specific signaling molecule	41
TNFz-induced protein 2 (TNFAIP2)	Hs.101382	Pro-inflammatory cytokine, B94	4.3
Endothelial differentiation-related factor-1 (EDF1)	Hs.174050	Endothelial cell differentiation regulator	4.8
Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI1)	Hs.82085	Serine protease inhibitor	31

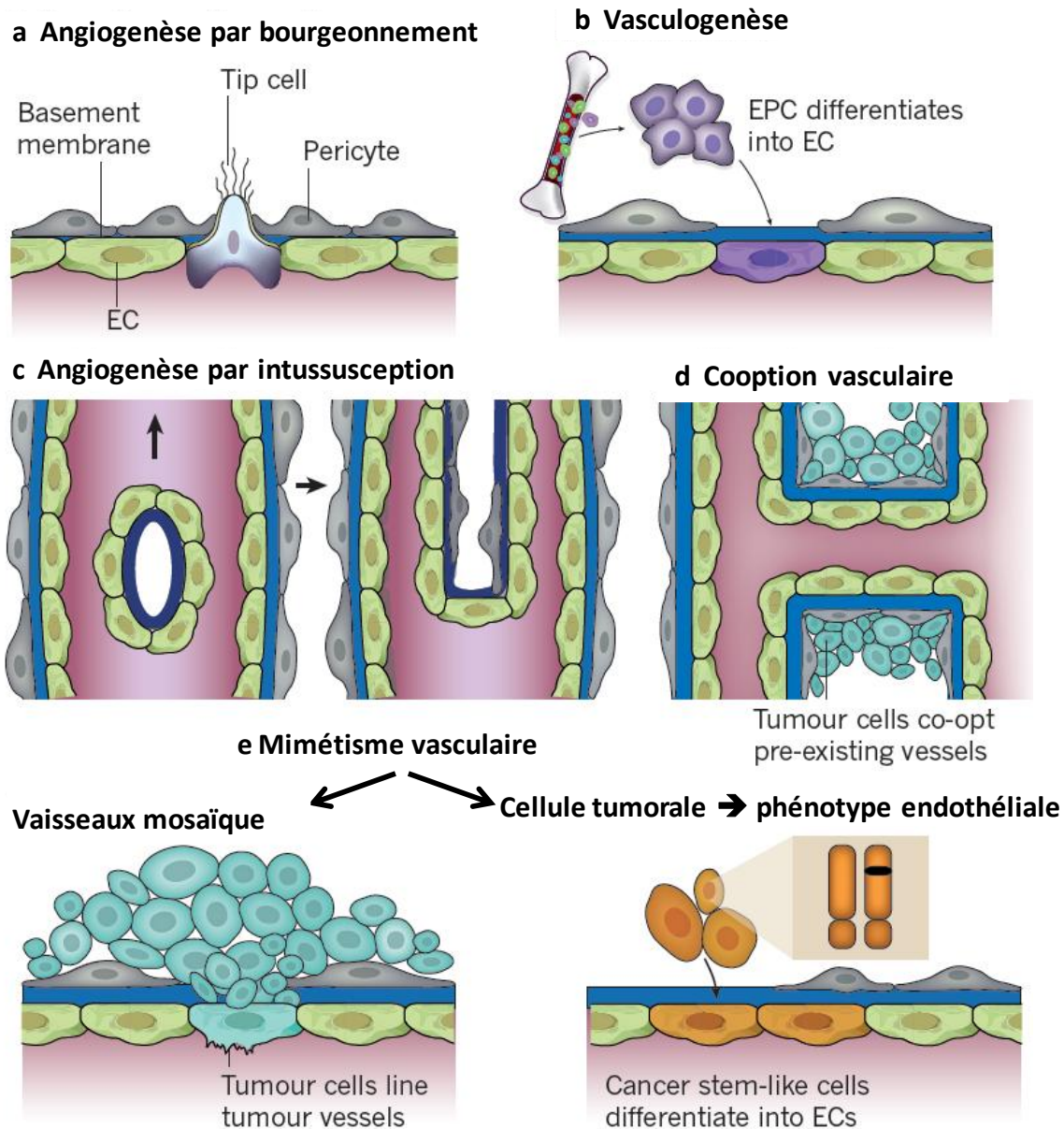
**Tableau 1** : Analyse de transcriptome des gènes liés à l'angiogénèse dans les lignées humaines de mélanome peu et très agressif. Le ratio correspond à l'expression du gène dans le mélanome très agressif/l'expression du gène dans le mélanome peu agressif. D'après (Seftor et al. 2002).

### 4.3 Structure des vaisseaux tumoraux

Une des caractéristiques particulières des vaisseaux tumoraux, c'est qu'elles ne parviennent pas à retourner à l'état de quiescence, contrairement aux néovaisseaux physiologiques. Cette caractéristique va permettre la croissance continue des néovaisseaux (Bergers et Benjamin 2003). Une cellule endothéliale tumorale prolifère 50 à 200 fois plus qu'une cellule endothéliale normale (Ribatti et al. 2007a). Par conséquent, le système vasculaire tumoral développe des caractéristiques uniques et devient tout à fait distinct des vaisseaux normaux.

Les vaisseaux tumoraux ont une architecture chaotique. La vascularisation est très désorganisée, les vaisseaux sont tortueux et dilatés, avec un diamètre irrégulier et très hémorragique (Carmeliet et Jain 2000b). Ceci est en partie lié à la surexpression du VEGF. De plus les vaisseaux sont caractérisés par des branchements et des dérivations excessifs. Le flux sanguin est chaotique et variable ce qui conduit à l'apparition des régions hypoxiques et acides (Helmlinger et al. 1997). Ces conditions réduisent l'efficacité thérapeutique et modulent la production des molécules pro-ou anti angiogéniques. De plus, elles favorisent la sélection des cellules cancéreuses résistantes les plus malignes et ayant un pouvoir métastatique. L'hypoxie favorise également l'apparition de résistances à la radiothérapie et la sélection de cellules plus agressives résistantes à l'apoptose (Carmeliet et Jain 2000b). Bien que les cellules musculaires lisses entourent quelques vaisseaux tumoraux, cependant ces cellules ont une activité contractile déficiente. Les vaisseaux tumoraux possèdent également un défaut de maturation. La VE-cadhérine est peu exprimé par les vaisseaux tumoraux (Ribatti et al. 2007a). Les parois vasculaires possèdent des fenestrations avec des jonctions intercellulaires très lâches et une membrane basale discontinue ou absente. Cela aboutit à leur déstabilisation et conduit à un remodelage anormal. De plus, cette déstabilisation permet une extravasation des protéines plasmatiques et facilite la dissémination des cellules tumorales dans la circulation sanguine et la formation de métastases.

Les vaisseaux tumoraux manquent de mécanismes de protection que les vaisseaux normaux ont acquis pendant la croissance. Par exemple, le recouvrement des vaisseaux par des cellules périvasculaires n'est pas optimal. Ces cellules sont nécessaires pour protéger les vaisseaux contre les variations de l'oxygène, pour maintenir un équilibre hormonal et pour induire la quiescence vasculaire (Carmeliet et Jain 2000a).



**Figure 5 : Mécanismes de la vascularisation tumorale** : la vascularisation des tumeurs se produit par six mécanismes potentiels. (a) l'angiogenèse par bourgeonnement (b) La vasculogenèse par recrutement des EPC provenant de la moelle osseuse et / ou de la paroi des vaisseaux préexistants et qui se différencient en cellules endothéliales (c) l'angiogenèse par intussusception (d) La cooption vasculaire où les cellules tumorales cooptent les vaisseaux préexistants (e) Mimétisme vasculaire qui peut se présenter par la construction de vaisseaux mosaïques (mélange de cellules tumorales et endothéliales) ou par la construction des vaisseaux composés entièrement de cellules tumorales adoptant un phénotype endothélial. D'après (Carmeliet et Jain 2011).



## CHAPITRE II : LES TIP CELLS

---

### 1. Méthodes d'analyses

Les Tip cells représentent une sous-population spécialisée de cellules endothéliales et possèdent une signature moléculaire et fonctionnelle unique. Elles sont activées au cours de l'angiogenèse pathologique telle que l'angiogenèse tumorale et ont été récemment considérées comme des cibles privilégiées pour les traitements anti-angiogéniques tels que les agents de blocage de VEGF (del Toro et al. 2010). Pourtant, le développement de telles stratégies thérapeutiques, nécessitent l'identification de marqueurs exprimés spécifiquement par les Tip cells.

Différentes méthodes d'enrichissement en Tip cells ont été décrites dans la littérature afin d'identifier des gènes spécifiques.

*In vitro*, Siemerink et ses collaborateurs ont pu isoler les Tip cells sur la base de l'expression de CD34+ par les HUVECs. CD34 est un protéoglycane transmembranaire exprimé par les cellules endothéliales fraîchement isolées dont l'expression est perdue rapidement lorsque les cellules rentrent en prolifération. D'une manière intéressante, une petite population de CD34+ restent présente dans les passages ultérieurs de cultures de cellules HUVECs (Human Umbilical Endothelial Cells) mais également dans certaines lignées endothéliales immortalisées (HMEC : Human Microvascular Endothelial Cell line; et ECRF24 : immortalized CD31high human endothelial cell line) (Siemerink et al. 2012). Les cellules HUVECs CD34+ sont dotées de filopodes et présentent une faible activité proliférative. De plus, le phénotype endothélial CD34+ est régulé par VEGF et Notch, deux facteurs qui régulent le phénotype Tip cells *in vivo*. Des analyses de qPCR réalisées sur ces cellules endothéliales CD34+ montrent l'expression des principaux marqueurs de Tip cells (Siemerink et al. 2012). Selon ces données, les auteurs ont adopté le phénotype HUVECs CD34+ comme un modèle pour étudier les Tip cells aux niveaux moléculaires et fonctionnels *in vitro*.

*In vivo*, la majorité des travaux de recherches sur les Tip cells repose principalement sur des modèles d'angiogenèse, en particulier sur les modèles de néovascularisations de la rétine chez les rongeurs (del Toro et al. 2010; Recchia et al. 2010; Strasser et al. 2010). En effet, l'angiogenèse rétinienne chez la souris se développe pendant la première semaine postnatale. L'accessibilité relativement simple pour l'imagerie et pour l'intervention rend le

modèle de la rétine idéalement adapté pour la caractérisation des Tip cells (Stahl et al. 2010). De plus, dans la plupart des organes, le système vasculaire se développe en réseau tridimensionnel complexe ce qui rend difficile l'étude de l'expression des gènes dans l'ensemble du réseau vasculaire. D'une manière intéressante, le système vasculaire rétinien se développe en réseau bidimensionnel plus maniable pour la caractérisation des gènes exprimés exclusivement par les Tip cells (Claxton et Fruttiger 2004).

Strasser et coll. ont développé une approche qui permet d'isoler d'une manière efficace les tip cells. Les rétines des nouveaux nés de souris sont collectées à 24 et 36 heures après la naissance. Ensuite des sections des rétines sont fixées et marquées par l'isolectine fluorescent (marqueur endothélial murin) (Strasser et al. 2010). Les Tip cells sont repérés, par leur emplacement dans la région la plus distale du plexus vasculaire et par la présence de nombreux filopodes et sont ensuite excisés par microdissection laser.

Del toro et coll. ont développé une nouvelle technique se basant sur l'utilisation des souris hétérozygotes pour le gène DLL4 (souris DLL4+/-). Comme on l'avait vu précédemment le ligand DLL4 joue un rôle essentiel via son dialogue avec son récepteur Notch dans l'induction du phénotype Tip cells. En effet, la délétion d'un seul allèle du gène DLL4 induit une augmentation significative de cellules endothéliales rétiniennes ayant des caractéristiques morphologiques des Tip cells. Ce modèle facilite ainsi l'isolement de ces cellules pour l'analyse transcriptomique (del Toro et al. 2010). Dans cette étude, 411 gènes ont été observés surexprimés par les cellules endothéliales rétiniennes des souris DLL4+/- par rapport à celles des souris WT. Cependant, les gènes identifiés ne correspondent pas tous au profil moléculaire des Tip cells. En effet, la voie de signalisation DLL4-Notch régule aussi l'expression des gènes autres que ceux des Tip cells et donc l'inhibition de cette voie va induire aussi leur surexpression.

Des analyses transcriptomiques, d'hybridation in situ (ISH) et d'immunohistochimie réalisées sur les Tip cells ont permis d'identifier un certain nombre de gènes dont l'expression est spécifique. Del Toro et ses coll. ont pu classer les gènes identifiés en trois clusters : le premier groupe correspond à des enzymes impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Le deuxième groupe correspond à des molécules composantes de la membrane basale et le dernier groupe correspond à des molécules sécrétées (Tableau 2).

Ainsi, les Tip cells peuvent réguler l'angiogenèse via le remodelage de la matrice extracellulaire, la production de la membrane basale, et la libération de molécules sécrétées.

Gene name	Protein name	Fold change	Method	Expression in WT retinas	Expression in <i>dll4<sup>+/-</sup></i> retinas
<b>ECM/BM molecules</b>					
<i>NID1</i>	Nidogen-1	4.26	ISH	Tip cell-enriched and plexus	Vascular plexus higher than in WT
			IHC	All vessels	All vessels
<i>NID2</i>	Nidogen-2	5.49	ISH	Vascular front enriched	Vascular front and plexus
<i>PLAUR</i>	uPAR	5.23	ISH	Tip cell-enriched	Tip cells and plexus
<i>LOXL2</i>	Lysyl oxidase-like 2	3.15			
<i>TGFB1</i>	TGF- $\beta$ -induced	7.63	ISH	Veins	Veins, signal stronger than in WT
<i>ITGB1</i>	Integrin $\beta$ 1	4.02	IHC	Tip cells and plexus	Tip cells and plexus
<i>LAMB1</i>	Lamininb1	5.44			
<b>Secreted molecules</b>					
<i>APLN</i>	Apelin	3.72	ISH	Tip cell-enriched	Tip cells and plexus
<i>ESM1</i>	Endothelial-specific molecule 1	11.07	ISH	Tip cell-enriched	Tip cells and plexus
			IHC	Tip cells/stalk cells	Tip cells and plexus
<i>ANGPT2</i>	Angiotensin-2	4.64	ISH	Tip cells	Tip cells
<i>IGFBP3</i>	Insulin-like growth factor-binding protein-3	4.08	IHC	Vascular front	Vascular front and plexus
<i>GMFG</i>	Glia maturation factor g	5.86			
<b>TGF-<math>\beta</math> pathway</b>					
<i>ACVRL1</i>	ALK1	2.6	ISH	Arteries/veins	Arteries/veins and plexus
<i>TGFB1</i>	TGF $\beta$ 1	2.88	ISH	Vascular front	Vascular front and plexus
<i>TGFBR2</i>	TGF $\beta$ R2	3.05	ISH	Strongest in arteries (also in vascular front and plexus)	Strongest in arteries (also in vascular front and plexus)
<b>Transcription factors</b>					
<i>ETS1</i>	Ets-1	3.40	ISH	Stronger in veins than arteries, plexus, high in stalk cells, no tip cells	Same as WT, but signal stronger in vascular plexus
<i>MEF2C</i>	Mef2c	2.91			
<i>KLF2</i>	Kruppel-like factor (KLF)-2	3.2	ISH	Arteries/veins	Arteries/veins
<i>KLF4</i>	KLF4	2.49			
<i>FOXC1</i>	FoxC1	3.51			
<i>SOX7</i>	Sox7	4.60			
<i>SOX17</i>	Sox17	4.64			
<i>SNAI2</i>	Slug	3.16			
<b>Others</b>					
<i>SPRY1</i>	Sprouty1	2.72	ISH	Pericytes	Pericytes
<i>AQP1</i>	Aquaporin-1	6.37	ISH	Not detectable	Arteries
<i>CAV1</i>	Caveolin-1	3.46	ISH	Veins	Veins and vascular plexus
			IHC	All vessels	All vessels
<i>CAV2</i>	Caveolin-2	5.18			
<i>EDG1</i>	S1PR1	2.23			
<i>LEPR</i>	Leptin receptor	3.55			
<i>B3GNT1</i>	UDP-GlcNAc: $\beta$ Gal $\beta$ -1,3-N-acetylglucosaminyltransferase1	6.92			
<i>CD38</i>	CD38	7.13			
<i>RASGRP3</i>	RAS guanyl releasing protein 3	5.71			
<i>TYROBP</i>	TYRO protein tyrosine kinase binding protein/DAP12	3.35			
<i>SYK</i>	Syk	2.29			

**Taleau 2 :** Liste des gènes surexprimés par les cellules endothéliales des souris *DLL4<sup>+/-</sup>* par rapport aux souris WT. Certains de ces gènes sont exprimés spécifiquement par les tip cells. Les analyses de transcriptomes sont vérifiées par ISH ou IHC. D'après (Strasser et al. 2010).

## 2. Marqueurs moléculaires des Tip cells

### 2.1 Delta-like ligand 4 (DLL4)

DLL4 est un des cinq ligands canoniques des récepteurs Notch. Il est caractérisé par trois motifs structuraux : un domaine DSL (Delta-Serrate-LAG 2), Deux domaines d'homologies à l'EGF (Epidermal Growth Factor) et un domaine transmembranaire (Falix et al. 2012). Son expression est augmentée par des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF et FGF-2 (Fibroblast Growth Factor), l'hypoxie, Foxc 1 (Forkhead box c1) et Foxc 2 (Forkhead box c2), la voie angiopoïétin-1/Tie-2 (Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains) et la voie laminin /laminin-binding intégrins  $\alpha 2$  and  $\alpha 6$  (Oon et Harris 2011). Son expression est limitée à l'endothélium artériel (Claxton et Fruttiger 2004). Chez la souris, il a été démontré que DLL4 constitue un facteur essentiel pour le développement vasculaire embryonnaire. En effet, une grande majorité des embryons hétérozygotes DLL4 +/- présentaient une haplo insuffisance létale liée à un défaut du développement vasculaire (Duarte et al. 2004; Gale et al. 2004; Krebs et al. 2004). Cependant, certaines souris DLL4 +/- étaient viables et avaient un phénotype normal. Cela suggère que les défauts majeurs liés à la perte de DLL4 sont transitoires. D'une manière intéressante, le croisement entre les souris DLL4 +/- viables a permis l'examen des embryons homozygotes DLL4 -/-. Ces derniers montrent un profil plus grave que celui des embryons hétérozygotes DLL4 +/- et perdent l'identité artérielle de l'endothélium vasculaire. En effet les embryons DLL4 -/- n'exprimaient pas les marqueurs artériels tels que l'ephrinB2, le CD44, le connexin37 et le connexin40 (Duarte et al. 2004; Fischer et al. 2004; Krebs et al. 2004). Ceci suggère que la voie DLL4/Notch régule l'expression des gènes spécifiques aux artères et est impliquée dans la différenciation artério-veineux

Le ligand DLL4 est fortement exprimé au niveau des Tip cells. Son rôle comme un élément clé dans la spécification du phénotype Tip cell a été observé dans plusieurs modèles animaux tels que la néovasularisation de la rétine chez la souris, chez les embryons Zebrafish et dans un modèle de tumeur xenogénique (Hellström et al. 2007; Leslie et al. 2007; Lobov et al. 2007; Noguera-Troise et al. 2007; Siekmann et Lawson 2007a; Suchting et al. 2007). Dans tous ces modèles l'interaction DLL4/Notch aboutit à une régulation du nombre des Tip cells,

une inhibition des filopodes et des branchements vasculaires. Les cellules exprimant le récepteur Notch acquièrent alors un phénotype de Stalk cells, et un pouvoir prolifératif.

DLL4 est surexprimée au niveau de l'endothélium tumoral (Gale et al. 2004; Hainaud et al. 2006). Des études récentes ont identifié DLL4 comme une cible potentielle d'agents anti-angiogéniques (Ridgway et al. 2006; Noguera-Troise et al. 2007; Schemet et al. 2007). Chez les souris, dans divers modèles de tumeur solide, l'administration systématique des anticorps anti-DLL4 inhibe la croissance tumorale (Ridgway et al. 2006; Noguera-Troise et al. 2007). Cependant, ce traitement aboutit à une augmentation de la densité des vaisseaux. En effet, ces néovaisseaux n'étaient pas connectés avec le réseau vasculaire de la tumeur ce qui conduisait à une mauvaise perfusion, une augmentation de l'hypoxie, et par conséquent une inhibition de la croissance tumorale. Ce mécanisme d'inhibition de la croissance tumorale a été appelé angiogenèse non productive (Sainson et Harris 2007; Dufraine et al. 2008). D'une manière intéressante, le traitement avec l'anticorps anti-DLL4 était efficace contre les tumeurs qui étaient résistantes aux traitements avec l'anticorps anti-VEGF-A. De plus, ce traitement pourrait fournir des effets synergiques contre certaines tumeurs lorsqu'il est combiné avec des thérapies anti-VEGF-A (Ridgway et al. 2006; Noguera-Troise et al. 2007; Gridley 2010).

## **2.2 CXCR4**

CXCR4 est le récepteur de la chimiokine SDF-1 (Stromal-cell Derived Factor-1). Il appartient à la famille des récepteurs couplés à la protéine G (GPCRs). Ces protéines possèdent une structure commune à sept hélices alpha transmembranaires avec une extrémité amino terminale extracellulaire et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire. CXCR4 est largement exprimé à la fois à la surface des cellules immunitaires et des cellules du système nerveux (Jazin et al. 1997; Moepps et al. 1997). Ce récepteur est impliqué dans le processus d'angiogenèse physiologique ou pathologique. Les souris déficientes en CXCR4 sont létales et présentent de multiples anomalies du développement vasculaire (Zou et al. 1998). Une surexpression de CXCR4 est observée au niveau de l'endothélium tumoral (Ara et al. 2005). Des analyses transcriptomiques et d'ISH réalisées sur les Tip et les Stalk cell, montrent une expression spécifique de CXCR4 au niveau des Tip cells (Strasser et al. 2010). CXCR4 est un médiateur de la morphologie des Tip cells. L'inhibition de CXCR4 par l'AMD3100 (inhibiteur spécifique de l'interaction CXCR4/SDF-1) dans un modèle murin de néovascularisation de la

rétine chez les nouveaux nés, induit une altération morphologique des Tip cells. En effet, les cellules développent une apparence « spiky » liée à la perte des jonctions latérales entre les Tip cells, ainsi qu'une réduction du nombre de filopodes. De plus, cette inhibition de CXCR4 aboutit à une réduction significative de la densité vasculaire au niveau de la région distale de la rétine où les Tip cells sont particulièrement abondants. Ceci suggère un rôle important de CXCR4 dans le bourgeonnement vasculaire. Unoki et coll. ont montré une diminution de l'expression d'ARNm de certains marqueurs de Tip cells tels que UNC5b, VEGFR2 et PDGFBB suite à une inhibition de CXCR4 (Unoki et al. 2010). Cependant, l'expression de DLL4 était inchangée. Ceci suggère que CXCR4 est capable d'affecter les fonctions des Tip cells indépendamment de l'axe DLL4/NOTCH.

### **2.3 Apelin**

L'Apelin est le ligand endogène du récepteur APJ couplé à la protéine G. Elle est synthétisée en tant qu'une protéine de 77 acides aminés et ensuite clivée en quatre formes bioactives, y compris l'apelin de 12, 13, 17 et 36 aa (Kojima et Quertermous 2008). L'Apelin est impliquée dans l'angiogenèse physiologique et pathologique (Kasai et al. 2004, 2008a; Kidoya et al. 2010). Dans un modèle murin de néovascularisation de la rétine chez les nouveaux nés, une surexpression d'Apelin est observée dans la période précoce du développement vasculaire pour disparaître dans la période avancée de l'angiogenèse (Kasai et al. 2008b). Son expression est stimulée par les facteurs angiogéniques comme le VEGF et le FGF-2. L'Apelin toute seule est incapable d'induire l'angiogenèse. D'une manière intéressante, l'inhibition de l'expression d'Apelin chez les souris KO aboutit à une réduction de la réponse angiogénique vis-à-vis de VEGF et FGF-2. L'apport exogène d'Apelin restaure l'effet angiogénique du VEGF et du FGF-2. Cela indique que l'Apelin a un effet synergique. Des analyses de transcriptome et d'ISH montrent une expression spécifique d'Apelin au niveau des Tip cells (del Toro et al. 2010). Cependant, son récepteur APJ est détecté à la surface des Stalk cells. Ceci suggère, que les Tip cells sont capables de réguler le comportement des Stalk cells via l'interaction de l'Apelin avec son propre récepteur l'APJ exprimé par ces cellules (del Toro et al. 2010). En effet, l'Apelin agit comme médiateur de la prolifération des cellules endothéliales. Chez les souris Apelin  $-/-$ , la vascularisation rétinienne semble être retardée temporellement par rapport à celle des souris sauvages. De plus, une réduction des ramifications vasculaires a été aussi observée. Les mêmes effets, ont été observés dans un autre modèle de

néovascularisation chez les Zebrafish (del Toro et al. 2010). Cependant, une fois que l'angiogenèse est établie, les vaisseaux néoformés ne présentent aucun défaut fonctionnel. Ce retard de croissance est lié à une réduction de la prolifération des cellules endothéliales. En effet, des analyses d'immunohistochimie, réalisées sur des coupes histologiques de la rétine de souris apelin -/- montrent une réduction de l'expression de PH3 (phosphohistone H3, marqueur de prolifération) comparativement aux souris sauvages. D'une manière intéressante, l'effet prolifératif d'Apelin, est indépendant de la voie VEGF ou FGF. En effet, l'inhibition des récepteurs de VEGF et de FGF par des inhibiteurs spécifiques de tyrosine kinase n'empêche pas la prolifération cellulaire des cellules endothéliales induite par l'Apelin. Del Toro et coll., ont montré que l'Apelin induit son activité proliférative via la voie mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) (del Toro et al. 2010).

#### **2.4 Le récepteur 2 pour le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR2)**

VEGFR2 est un récepteur à activité tyrosine kinase (RTKs) de 200 à 230 kDa. Sa structure est composée d'une partie extracellulaire, organisée en 7 domaines de type immunoglobuline (IgG-like), d'une région transmembranaire, d'un domaine juxtamembranaire riche en tyrosine et une queue C-terminale cytoplasmique (Olsson et al. 2006). Son gène est situé sur le chromosome 4 chez l'homme, et 5 chez la souris. VEGFR2 est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, ainsi que d'autres types cellulaires, tels les mégacaryocytes, les cellules souches hématopoïétiques et les cellules musculaires lisses (Kato et al. 1995; Ishida et al. 2001). Il lie principalement le facteur angiogénique VEGF-A. La dégradation protéolytique de VEGF-A en VEGF-C et D permet leur liaison au VEGFR2 avec une affinité inférieure à celle de VEGFR3 (Takahashi et Shibuya 2005). VEGFR2 est surexprimé lors de l'hypoxie (Gerber et al. 1997). Suite à la liaison du VEGF-A au niveau du domaine extracellulaire de VEGFR2, le récepteur est dimérisé, et des résidus tyrosine du domaine intracellulaire sont phosphorylés entraînant une cascade de signalisation intracellulaire. Selon le contexte, ces signaux activent la prolifération, la survie, la migration des cellules endothéliales, ainsi que la perméabilité vasculaire (Olsson et al. 2006). VEGFR2 est régulé négativement par les phosphatases SHP1 et SHP2 (Src-homology phosphatase-1 and 2) (Guo et al. 2000). VEGFR2 joue un rôle important dans le développement de l'endothélium vasculaire embryonnaire et dans le processus de néovascularisation physiologique et pathologique chez les adultes (Ferrara 2002). Chez les souris VEGFR2-/-,

l'inactivation du gène entraîne une létalité embryonnaire précoce à E 8,5 (Shalaby et al. 1995). Les embryons présentaient un défaut de prolifération endothéliale et des anomalies du réseau vasculaire. De plus, VEGFR2 induit la migration des EPC circulantes vers le site d'angiogenèse (Rafii et al. 2002). Des études ont démontré aussi un rôle de VEGFR2 dans la lymphangiogenèse (Nagy et al. 2002; Hong et al. 2004).

En effet, l'expression de VEGFR2 au niveau de l'endothélium est spécifique aux Tip Cells. Une expression remarquable a été observée au niveau des filopodes. L'injection d'anticorps anti VEGFR2 dans la rétine de souris induit une rétraction des filopodes suggérant un rôle essentiel de VEGFR2 dans l'extension des filopodes (Gerhardt et al. 2003). De plus, VEGFR2 joue un rôle essentiel dans l'induction du phénotype Tip cell. La liaison du VEGF-A au VEGFR2 active la voie PI3k/Akt (Phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B) qui induit une augmentation de l'expression de DLL4 (Liu et al. 2003). A son tour DLL4 va induire une inhibition latérale des cellules voisines (Stalk cells) et empêche leur devenir en Tip cells. L'interaction de DLL4 avec son récepteur Notch va inhiber l'expression de VEGFR2 par les Stalk cells et par conséquent amortir l'expression de DLL4 par ces cellules (Jakobsson et al. 2009).

### **2.5 Le récepteur 3 pour le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGFR3)**

VEGFR3 est un récepteur à activité tyrosine kinase de 195 kDa. Son gène est situé sur le chromosome 5 chez l'homme. C'est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D. Contrairement au VEGFR1 et au VEGFR2, le VEGFR3 est clivé par protéolyse au niveau du cinquième domaine Ig et les fragments générés restent assemblés par un pont disulfure (Olsson et al. 2006). Chez l'adulte, il est exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques, les monocytes et les macrophages. Il est impliqué principalement dans le développement et le fonctionnement de système lymphatique. (Adams et Alitalo 2007). Les embryons de souris VEGF-C  $-/-$  ne développent pas de vaisseaux lymphatiques et meurent avant la naissance en raison d'un grave œdème tissulaire. Chez l'embryon, le VEGFR3 est initialement présent aussi bien au niveau de l'endothélium vasculaire que lymphatique. Les embryons de souris VEGFR3  $-/-$  développent des malformations des vaisseaux sanguins et une insuffisance cardiaque. Elles meurent à E9.5 avant que le système lymphatique ne soit



développé, ce qui suggère un rôle important du VEGFR3 dans le développement cardiovasculaire chez l'embryon (Dumont et al. 1998; Karkkainen et al. 2004).

Récemment, il a été démontré que l'expression de VEGFR3 réapparaît chez l'adulte au niveau de l'endothélium vasculaire active (Tammela et al. 2008). Son expression se limite au niveau des Tip cells et principalement au niveau des extensions de filopodes. Chez la souris, l'injection intra-vitréennes par des anticorps anti-VEGFR3 bloquants, diminue la prolifération des cellules endothéliales et le nombre des ramifications vasculaires et aboutit à une réduction de la densité des vaisseaux rétinien. Ceci suggère que VEGFR3 agit comme un régulateur positif de l'angiogenèse.

Au niveau des Tip cells, VEGFR2 induit l'expression de VEGFR3, cependant comme pour VEGFR2 le complexe DLL4/Notch régule négativement son expression au niveau des Stalk cells (Tammela et al. 2008). Siekmann et ses collaborateurs décrivent une surexpression de VEGFR3 dans les cellules Notch déficientes chez le poisson zèbre (Siekmann et Lawson 2007b). De plus, une autre étude réalisée sur les souris DLL4<sup>+/-</sup> montre une surexpression de VEGFR3 dans les cellules endothéliales de la rétine (Tammela et al. 2008).

VEGFR2 et VEGFR3 sont capables de former des hétérodimères, et peuvent transmettre des signaux distincts de récepteurs homodimères qui pourraient être impliqués dans les fonctions des Tip cells (Jakobsson et al. 2009).

## **2.6 Neuropilin-1 (NRP1)**

NRP1 a été identifiée pour la première fois comme un antigène exprimé à la surface des neurones d'embryons *Xenopus* (Takagi et al. 1991). C'est un récepteur dénué d'activité tyrosine kinase de 130 kDa. Sa structure est composée de 5 domaines : une large partie extracellulaire composée de 3 domaines (a1a2, b1b2 et c), un seul domaine transmembranaire, et un court domaine intracellulaire (Pellet-Many et al. 2008). Un homologue de NRP1 a été identifié plus tard et nommé neuropilin-2 (NRP2).

Le NRP1 agit comme un co-récepteur de haute affinité pour deux classes de ligands : les sémaphorin de classe 3 tels que SEMA3A (ou Collapsin-1) et principalement l'isoforme VEGF-A<sub>165</sub>. Cependant le court domaine intracellulaire de NRP1 ne semble pas pouvoir transduire de signal d'où la nécessité d'une interaction avec un corécepteur : la Plexin dans le cas de SEMA3A, le VEGFR2 dans le cas VEGFA<sub>165</sub>. Récemment, il a été démontré que NRP1 est

capable de se lier avec d'autres facteurs de croissance et leurs récepteurs respectifs tels que le TGF- $\beta$ 1, le HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor), le PDGF et le FGF (Pellet-Many et al. 2008; Prud'homme et Glinka 2012).

NRP1 est exprimé par les cellules endothéliales en particulier par les Tip cells lors de l'angiogenèse (Smet et al. 2009). De plus il est exprimé par d'autres types cellulaires comme les neurones, les cellules des îlots pancréatiques, des hépatocytes, les cellules épithéliales, quelques cellules immunitaires et les cellules tumorales (Prud'homme et Glinka 2012).

NRP1 intervient lors du développement embryonnaire du système nerveux et cardiovasculaire et chez l'adulte, notamment en conditions pathologiques (rôle dans l'angiogenèse tumorale) (He et Tessier-Lavigne 1997; Geretti et al. 2008).

Les embryons de souris NRP1-/- meurent entre E12 et E13.5 et présentent des défauts cardiovasculaires et neuronaux (Kitsukawa et al. 1997). De la même manière une surexpression de NRP1 entraîne également une létalité embryonnaire. Les embryons présentent une croissance excessive des capillaires hémorragiques et un cœur mal formé, ainsi qu'une ramification anarchique des fibres nerveuses (Kitsukawa et al. 1995).

L'activation de VEGFR2 par VEGF peut se produire en absence du NRP1, cependant ce récepteur semble être nécessaire pour une activité optimale de VEGF-A. La co-expression de NRP1 et VEGFR2 dans des cellules endothéliales aortiques de porc (PAE) améliore la migration ainsi que l'adhérence des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire (Soker et al. 1998; Murga et al. 2005). De plus, cette liaison augmente la fixation de VEGF-A à VEGFR2, favorise la phosphorylation du VEGFR2 et amplifie la cascade de signalisation consécutive à la fixation de VEGF-A sur son récepteur. L'inhibition du complexe NRP1/VEGFR2 réduit la phosphorylation de VEGFR2, la migration des cellules endothéliales *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo* (Whitaker et al. 2001; Wang et al. 2003; Pan et al. 2007).

L'analyse de la vascularisation du cerveau postérieur chez les souris NRP1-/- montre que NRP1 joue un rôle clé dans la guidance des Tip cells au moment du bourgeonnement des nouveaux vaisseaux. Les Tip cells étendent des longs filopodes, qui détectent les gradients de VEGFA, et subissent une série de mouvements au cours du développement des néovaisseaux. Chez les souris NRP1-/- les Tip cells ne parviennent pas à émettre des extensions filopodiales latérales nécessaires pour la navigation cellulaire (Gerhardt et al.

2004). Ces résultats suggèrent que NRP1 est essentiel pour la détermination des trajectoires de migration des Tip cells.

## **2.7 Platelet Derived Growth Factor BB (PDGF-BB)**

Le PDGF, initialement purifié des plaquettes sanguines, est un facteur dimérique produit par des nombreux types cellulaires. Les progrès de la génomique ont permis d'identifier 4 gènes PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D, permettant l'expression de plusieurs homodimères et hétérodimères (AA, AB, BB, CC, DD) (Andrae et al. 2008). Le PDGF-BB exerce son effet biologique via un récepteur à activité tyrosine kinase le PDGFR- $\beta$ . Les cellules endothéliales expriment le PDGF-BB, alors que les péricytes et les cellules musculaires lisses perivasculaires expriment le récepteur PDGFR- $\beta$ , permettant ainsi une action paracrine du PDGF-BB. Au cours de l'angiogenèse, le PDGF-BB se trouve concentré au niveau des Tip cells (Gerhardt et al. 2003). Une fois secrété, PDGF-BB va se fixer sur son récepteur PDGFR- $\beta$ , et favoriser le recrutement de progéniteurs mésenchymateux et leur différenciation en péricytes (Hoch et Soriano 2003; Betsholtz 2004). De plus, PDGF-BB va induire la prolifération des péricytes, leur migration et leur accolement sur les néovaisseaux, étape indispensable à la maturation vasculaire.

Chez la souris PDGFB-/- ou PDGFR- $\beta$ -/-, une mort périnatale est observée, liée à un dysfonctionnement vasculaire (Levéen et al. 1994; Soriano 1994). La principale cause de ce phénotype létal était le manque de péricytes qui a pour conséquence une hyperplasie endothéliale et des jonctions anormales (Lindahl et al. 1997; Hellström et al. 1999).

Récemment, il a été démontré que PDGF-BB est surexprimé dans le surnageant des EPCs cultivées en hypoxie par rapport à celles cultivées en condition normale. D'une manière intéressante, le PDGF-BB secrété par les EPCs cultivées en hypoxie induit la migration et la prolifération des HUVECs ainsi que la formation de bourgeons vasculaires dans un modèle d'anneau aortique (de rat) sur matrigel *ex vivo* (Urbich et al. 2005; Wyler von Ballmoos et al. 2010). Ces effets n'étaient pas observés lorsque les HUVECs étaient cultivées en milieu de culture contenant du PDGF-BB recombinant. Les cellules endothéliales en général expriment faiblement le récepteur au PDGF-BB. D'une manière intéressante, une surexpression du PDGFR- $\beta$  et sa forme phosphorylée a été observé au niveau des HUVECs cultivées avec le surnageant des EPCs surexprimant le PDGF-BB. Cependant, l'incubation des HUVECs avec un

milieu de culture issu de cellules endothéliales différenciées et surexprimant le PDGF-BB n'induit pas l'expression ni la phosphorylation du PDGFR- $\beta$ . Ces données suggèrent que cette surexpression de PDGFR- $\beta$  par les cellules endothéliales est induite spécifiquement par le surnageant des EPCs riche en PDGF-BB. Ballmoos et ses coll. considèrent que le surnageant des EPCs pourrait induire un changement phénotypique des cellules endothéliales à travers une surexpression de PDGFR- $\beta$  ce qui augmente la sensibilité endothéliale au PDGF-BB et par conséquent favorise l'angiogenèse (Wyler von Ballmoos et al. 2010).

## **2.8 Uncoordinated-5B (UNC5B)**

UNC5B est un récepteur appartenant à la famille des protéines transmembranaires UNC5 (Uncoordinated-5). Chez les mammifères 4 homologues de l'UNC5 ont été identifiés, l'UNC5 A, B, C et D (Castets et Mehlen 2010). La structure d'UNC5B est composée d'une région extracellulaire formée de deux domaines d'immunoglobuline (Ig) et deux domaines de thrombospondin-like, d'une région transmembranaire et d'une région intracellulaire contenant un motif ZO-1 (Zonula Occludens) et un domaine de mort cellulaire (Leonardo et al. 1997; Llambi et al. 2001). L'expression d'UNC5B est largement restreinte au système vasculaire artériel et particulièrement au niveau des Tip cells (Lu et al. 2004). UNC5B est le récepteur de Netrin-1, ligand décrit comme une molécule de guidance durant la neurogenèse mais également impliquée dans l'angiogenèse (Lu et al. 2004; Mehlen et Furne 2005; Navankasattusas et al. 2008). Les récepteurs UNC5 possèdent une propriété fonctionnelle commune particulière. Ils sont capables d'être actifs à la fois en absence ou présence de leur ligand. En présence de Netrin-1, les récepteurs UNC5 induisent une cascade de signalisation aboutissant à la rétraction des axones, la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire. Cependant, en absence du ligand, ces récepteurs induisent la mort cellulaire via l'activation des caspases (Arakawa 2005; Mehlen et Furne 2005). En effet cela suggère que le ligand Netrin-1 agit comme un facteur de survie en bloquant l'apoptose induite par le récepteur libre.

L'UNC5B semble être le principal récepteur du ligand Netrin-1 pour induire ses effets angiogéniques en raison de son expression endothéliale (Navankasattusas et al. 2008; Castets et al. 2009; Castets et Mehlen 2010).

Selon la littérature, les données sur l'effet angiogénique de Netrin-1 via UNC5B sont contradictoires. Certaines études considèrent que Netrin-1 exerce une activité anti-angiogénique, alors que d'autres considèrent qu'elle agit comme une molécule pro-angiogénique. Lu et coll., ont démontré que Netrin-1 via sa fixation sur UNC5B réduit la migration des cellules endothéliales à la fois *in vitro*, dans un modèle de migration sur transwell et *in vivo* dans un modèle de néovascularisation de la rétine. De plus, ce traitement avec le ligand Netrin-1 induit une diminution et une rétraction des filopodes des Tip cells suggérant ainsi un rôle d'UNC5B dans la régulation de la migration des Tip cells (Lu et al. 2004).

L'inactivation du gène UNC5B chez la souris, induit une létalité embryonnaire à E12 associée à une insuffisance cardiaque et une ramification vasculaire anormale et excessive. Toutes ces données sont en faveur avec une activité anti-angiogénique du complexe Netrin-1/UNC5B. Cependant, dans un autre modèle murin d'inactivation du gène UNC5B, l'absence d'UNC5B était associée à une létalité embryonnaire et une déficience structurale et fonctionnelle dans les territoires placentaires suggérant une activité pro-angiogénique (Navankasattusas et al. 2008).

## **2.9 Angiopoitrine 2 (Ang-2)**

Il existe 4 membres de la famille des angiopoïétines, soit Ang1, Ang2, Ang3 et Ang4. Elles constituent une classe de facteurs pro- et anti-angiogéniques agissant par l'intermédiaire d'un récepteur à activité tyrosine kinase, le récepteur Tie-2 (Augustin et al. 2009). Leur structure est constituée d'un domaine N-terminal comprenant un domaine d'homologie au fibrinogène, d'un peptide de liaison, d'un domaine en hélice  $\alpha$  et deux résidus cystéine. Le domaine d'homologie au fibrinogène est impliqué dans la fixation au récepteur. Les multiples hélices  $\alpha$  forment des structures organisées en dimères ou en oligomères.

Ang-1 et Ang-2 sont les ligands physiologiques les plus étudiés du récepteur Tie-2 dont l'un (Ang-1) est agoniste et l'autre (Ang-2) antagoniste. Ang-2 est très faiblement exprimée par l'endothélium quiescent. Le phénotype quiescent des cellules endothéliales est maintenu par la signalisation intracellulaire continue résultante de l'interaction d'Ang-1/Tie-2. L'Ang-1 est exprimé par les cellules murales péri-endothéliales (cellules musculaires lisses et péricytes), les fibroblastes et plusieurs types de cellules non vasculaires. L'interaction Ang-

1/Tie-2 permet de stabiliser la cellule endothéliale, maintenir les jonctions intercellulaires et donc l'intégrité de la barrière endothéliale. De plus, elle régule les dernières étapes de la cascade angiogénique liées à la maturation vasculaire (Augustin et al. 2009).

Les souris déficientes pour Ang-1 meurent entre E 10,5 et E 12,5 jours de vie embryonnaire. Le réseau vasculaire ne se développe pas au-delà du réseau capillaire primitif et ce dernier reste peu organisé, immature présentant un déficit marqué en péricytes et en cellules musculaires lisses (Suri et al. 1996). D'une manière intéressante, les souris transgéniques surexprimant Ang-2 développent un phénotype identique aux souris déficientes pour Ang-1 (Maisonpierre et al. 1997). Cependant, chez les souris invalidées pour le gène Ang-2 la vasculogénèse est normale (Fiedler et al. 2006).

L'expression d'Ang-2 est très fortement induite au niveau de l'endothélium en réponse aux facteurs VEGF, FGF-2, à l'hypoxie et à l'augmentation des forces de cisaillement (Augustin et al. 2009). Del Toro et ses collaborateurs ont montré une expression exclusive d'Ang-2 au niveau des Tip cells et l'ont considéré comme un marqueur de Tip cell néoformé (del Toro et al. 2010). L'induction de l'expression d'Ang-2 est un signal important de la phase d'activation de l'angiogénèse. En effet Ang-2 en tant qu'antagoniste, inhibe l'interaction entre Ang-1 et Tie-2 déstabilisant ainsi la structure des capillaires via la dissociation des jonctions interendothéliales (Gerald et al. 2013). De plus, Ang-2 renforce la déstabilisation vasculaire via l'internalisation et la dégradation des intégrines exprimées à la surface des cellules endothéliales ce qui peut éventuellement entraîner leur apoptose (Thomas et al. 2010; Gerald et al. 2013). Cette étape de déstabilisation est considérée comme un pré-requis pour la migration des cellules endothéliales, et leur confère une sensibilité accrue aux cytokines exogènes. Ainsi, la présence ou l'absence d'Ang-2 contribue à la plasticité adaptative de l'endothélium vasculaire.

En effet, plusieurs études *in vivo* suggèrent qu'Ang-2 selon le contexte cellulaire peut agir comme un agoniste partiel de Tie-2 et induire une activité pro-angiogénique. En présence d'Ang-1, Ang-2 joue son rôle d'antagoniste, inhibiteur du signal. Cependant, en son absence, Ang-2 agit comme un ligand activateur du récepteur Tie-2 pour induire ses fonctions pro-angiogéniques (Gerald et al. 2013).

Récemment, il a été démontré qu'Ang-2 est capable d'induire ces fonctions pro-angiogéniques aussi d'une manière indépendante du récepteur Tie-2 (Felcht et al. 2012). En

effet, les Tip cells activés réduisent l'expression du récepteur Tie-2. Ang-2 induit alors une signalisation via les intégrines activées pour promouvoir la signalisation de FAK (Focal Adhesion Kinase) et par la suite induire le bourgeonnement vasculaire.

L'Ang-2 est impliqué dans plusieurs processus pathologique tels que l'angiogenèse tumorale et l'inflammation.

L'Ang-2 joue un rôle crucial au cours de la vascularisation tumorale. La surexpression d'ARNm d'Ang-2 par l'endothélium tumoral le rend un marqueur circulaire puissant de l'angiogenèse. En effet, l'activation des cellules endothéliales induit une expression marquée d'Ang-2 qui à son tour va induire une déstabilisation et une régression vasculaire. Il en résulte une phase avasculaire et une hypoxie locale à l'origine de l'activation de l'expression de VEGF (Augustin et al. 2009). De plus, les Tip cells les plus immatures régulent négativement l'expression de Tie-2, créant ainsi un milieu où l'Ang-2 signale via les intégrines. L'ensemble de ces étapes favorise le déclenchement d'une angiogenèse massive (Felcht et al. 2012; Gerald et al. 2013).

Durant l'inflammation Ang-2 inhibe l'interaction Ang-1/Tie-2 et contrôle l'adhésion ferme des leucocytes et leur migration transendothéliale. Les souris déficientes pour l'Ang-2 présentent une réponse inflammatoire altérée et une incapacité à augmenter l'expression des molécules d'adhésion en réponse au TNF $\alpha$  (pro-inflammatoire). En effet, l'Ang-2 potentialise les effets du TNF $\alpha$  sur la transcription des gènes induits par les cytokines pro-inflammatoires comme les molécules d'adhésion ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule-1) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) (Augustin et al. 2009).

### **2.10 Urokinase-type Plasminogen Activator Receptor (uPAR)**

uPAR également connu sous le code CD87 est une glycoprotéine de 335 acides aminés, contenant 3 domaines de 90 acides aminés désignés DI-DII-DIII connectés entre eux par de courtes régions « Linker ». Il est ancré à la membrane plasmique via le GPI (Glycosyl phosphatidylinositol) (Ploug et al. 1991). uPAR est exprimé principalement par l'endothélium activé et préférentiellement au niveau des Tip cells (del Toro et al. 2010). Il est également exprimé par les monocytes, les macrophages, les fibroblastes, les neurones et les cellules musculaires lisses (Hajjar 1995; Okada et al. 1995). Ce récepteur est capable de lier l'urokinase (uPA) et la vitronectin (Breuss et Uhrin 2012). Malgré l'absence de domaines

transmembranaire et cytosolique, il est capable de transduire une voie de signalisation cellulaire via des interactions latérales avec des récepteurs transmembranaires (Intégrine  $\alpha 5\beta 1$ , LPR-1, EGFR, PDGFR) (Breuss et Uhrin 2012). Il est impliqué de nombreux processus, tels que l'inflammation, l'athérosclérose, le remodelage des tissus au cours de la cicatrisation des plaies, l'angiogenèse, la tumorigenèse et la métastase.

uPAR joue un rôle essentiel lors de la néoangiogenèse physiologique ou pathologique chez l'adulte. Par exemple, chez les souris déficientes en uPA, dans un modèle d'infarctus du myocarde, la néovascularisation était sévèrement altérée (Heymans et al. 1999). D'une manière intéressante, il a été démontré que l'inhibition du système uPAR réduit la croissance tumorale et les métastases dans plusieurs modèles animaux (Zhang et al. 2011).

La fonction traditionnelle d'uPAR correspond à une activité protéolytique (Ellis et al. 1991; Breuss et Uhrin 2012). En effet lors de l'angiogenèse, la dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire constitue une étape essentielle afin de permettre la migration et l'invasion des cellules endothéliales. Cette étape est fortement contrôlée par la régulation de l'activité des sérines protéase plasminogène/plasmine. L'uPA est l'enzyme clef pour la génération de la plasmine. La stimulation des cellules endothéliales par VEGF-A induit la conversion du pro-uPA en une forme active uPA (Prager et al. 2004a). A son tour, l'uPA clive le plasminogène en plasmine qui va induire l'activation des métalloprotéases ce qui contribue à la libération des composants de la matrice extracellulaire et facilite la migration, l'adhérence et l'invasion cellulaires. Ces métalloprotéases induisent une boucle de rétrocontrôle positif qui permet l'activation d'uPA (Pepper 2001; Blasi et Carmeliet 2002). Cette régulation positive de uPA / uPAR va également provoquer une perméabilité vasculaire via une dégradation accrue de la VE-cadhérine.

D'une manière intéressante, il a été démontré que l'activation d'uPA par VEGF-A est médiée via le VEGFR2 et pas le VEGFR1 (Prager et al. 2004b). Cette stimulation conduit à une redistribution d'uPAR au niveau des Tip cells et à la concentration de l'activité protéolytique à la pointe du capillaire en bourgeonnement.

Outre le VEGF, plusieurs facteurs de croissance, y compris le FGF-2, l'EGF et le HGF/SF ont été récemment montrés capables d'induire l'activation d'uPA conduisant à la migration des cellules endothéliales (Poettler et al. 2012).



L'uPAR via son interaction avec d'autres récepteurs (Intégrines  $\alpha 5\beta 1$ , LPR-1, IEGFR, PDGFR) peut agir via de nombreuses voies de signalisation tels que FAK (Focal Adhesion Kinase), Src, Rac, ERK et JAK/STAT et favoriser ainsi la migration, la survie, et la prolifération cellulaires (Breuss et Uhrin 2012).

### **2.11 Nidogen-1**

Le nidogen-1 ou entactine-1 est une glycoprotéine de 150 kDa. Sa structure est composée d'une chaîne polypeptidique repliée en trois domaines globulaires G1 et G2 à l'extrémité amino-terminale, et G3 à la partie carboxy-terminale (Yurchenco et Patton 2009). Il possède un homologue appelé Nidogen-2, ayant une structure très similaire. Au cours du développement, les Nidogens sont principalement exprimés par les cellules mésenchymateuses et sont déposés sur la membrane basale épithéliale et endothéliale (Dziadek 1995). Récemment, del Toro et coll. ont démontré que Nidogen-1 appartient au cluster des gènes surexprimés par les Tip cells (del Toro et al. 2010). L'ARNm de Nidogen-1 était exprimé à des taux très élevés par les Tip cells, cependant cette expression ne leur était pas exclusive. Une expression moins importante a été observée au niveau des Stalk cells. Des analyses d'IHC réalisées sur la rétine des souris WT et DLL4+/- montrent une expression de Nidogen-1 au niveau de toute la membrane basale des vaisseaux de la rétine à l'exception des filopodes des Tip cells (del Toro et al. 2010). Ceci suggère que Nidogen-1 est essentiellement produit par les Tip cells et par la suite déposé sur la membrane basale.

Les deux homologues Nidogen-1 et 2 possèdent des similarités fonctionnelles de telle sorte que l'un est capable de compenser la fonction de l'autre. En effet les souris déficientes en Nidogen-1 ou Nidogen-2 ne montrent pas une altération de la membrane basale, en raison d'une expression redondante (Murshed et al. 2000). Cependant, les souris double déficientes en Nidogen-1 et -2 meurent peu après la naissance en raison des anomalies dans le cœur et les poumons et du défaut de la membrane basale (Mokkapati et al. 2008a).

Nidogen-1 et -2 sont connus pour interagir avec une variété des protéines de la matrice extracellulaire. Nidogen-1 via son domaine G3 interagit avec la laminine  $\gamma 1$  exprimée par la membrane basale, formant ainsi un complexe stable (Takagi et al. 2003). Ce complexe laminine - Nidogen-1 a été montré important au cours du développement des organes (Ekblom et al. 1994; Dziadek 1995). De plus, les domaines G2 et G3 de nidogen-1 se lient au

collagène de type IV, ainsi qu'au perlecan et à la fibuline (Yurchenco et Patton 2009). Nidogen-1 connecte ainsi les réseaux de la laminine et du collagène IV. La membrane basale des capillaires chez les souris déficientes en Nidogen-1 et 2 est hémorragique et révèle une perte presque complète de la laminine et une réduction de collagène IV et de perlecan (Mokkapati et al. 2008b). La liaison laminine/nidogen-1/collagène assure une stabilité des membranes basales (Yurchenco et Patton 2009).

Par ailleurs, bien que le Nidogen-1 soit impliqué dans l'entretien et la stabilité des membranes basales, il est très sensible au clivage protéolytique préférentiellement par le MMP-19 (Matrix Metalloproteinase 19), la Cathepsin S, la thrombine et l'élastase leucocytaire (Mayer et al. 1995; Titz et al. 2004; Sage et al. 2012). Ce clivage facilite le remodelage rapide des tissus et peut être la première étape dans la dégradation de la membrane basale (Breitkreutz et al. 2009).

Outre sa fonction dans la stabilisation de la membrane basale Nidogen-1 joue un rôle dans l'inflammation (Senior et al. 1992). Nidogen-1 induit une activation des neutrophiles. Gresham et coll. ont montré que Nidogen-1 via sa liaison aux intégrines exprimées par les neutrophiles active des fonctions distinctes telles que le chimiotactisme ou la phagocytose (Gresham et al. 1996).

## **2.12 Sox 17**

Les protéines de la famille Sox sont des facteurs de transcription hautement conservés au cours de l'évolution et caractérisées par la présence du domaine HMG (High Mobility Group) nécessaire pour la liaison à l'ADN. La famille compte actuellement 20 membres chez l'homme et la souris (Kamachi et Kondoh 2013). Elle est subdivisée en 8 groupes (A à H), en fonction des homologies entre les différents membres au niveau et en dehors de la boîte HMG. Le facteur de transcription Sox17 appartient au groupe Sox F. Il est exprimé sélectivement dans les cellules endothéliales artérielles dans les premiers stades du développement embryonnaire, et il maintient la même distribution après la naissance et chez l'adulte (Corada et al. 2013). Sox17 est impliqué dans de nombreux processus tels que la différenciation en endoderme, l'hématopoïèse fœtale et le développement cardiovasculaire correct (Kim et al. 2007; Francois et al. 2010). De plus, Sox17 est indispensable pour l'acquisition et la maintenance de l'identité artérielle en régulant

l'expression de DLL1 (Delta Like Ligand-1), DLL4 et Notch4 (Corada et al. 2013; Lee et al. 2014a). Sox17 induit l'expression des marqueurs artériels tels que CXCR4, EphrinB2 et inhibe celle des veines telle EphrinB4.

Sox17 est indispensable lors de l'angiogenèse embryonnaire et son expression est cruciale pour la formation de vaisseaux fonctionnels et stables. Chez la souris, l'examen de Sox17 au moment de l'angiogenèse embryonnaire montre une expression robuste dans les noyaux des cellules endothéliales des vaisseaux angiogéniques. L'inactivation endothéliale du gène Sox17 induit une létalité embryonnaire à E 11,5 associée à une perte de la différenciation artérielle, un défaut de remodelage vasculaire et une absence des vaisseaux matures. En revanche, la surexpression du gène Sox17 aboutit à une angiogenèse excessive caractérisée par l'apparition des ramifications vasculaires et des vaisseaux non fonctionnels (Corada et al. 2013; Lee et al. 2014b).

Sox17 est aussi indispensable lors de l'angiogenèse post natale. Chez la souris, l'expression de Sox17 a été observée au niveau des cellules endothéliales lors la néovascularisation post natale de la rétine (Corada et al. 2013; Lee et al. 2014b). L'inhibition de Sox17 induit une diminution du nombre des Tip cells, des extensions de filopodes et des ramifications vasculaires. La surexpression de Sox17 induit une augmentation des ramifications vasculaires et de la densité vasculaire.

En effet, Sox17 favorise la migration endothéliale en agissant à plusieurs niveaux. Il induit une déstabilisation des jonctions endothéliales et un réarrangement du cytosquelette. De plus, il induit l'expression des gènes préférentiellement exprimés par les Tip cells tels que Ang2, PDGFB, Apelin, DLL4, VEGFR2 et ESM-1 (Endothelial Specific Molecule-1/Endocan) (Lee et al. 2014b).

D'une manière intéressante, l'expression nucléaire de Sox17 observée lors de l'angiogenèse embryonnaire et post natale était spécifique des Tip cells. Son expression au niveau des Stalk était significativement réduite (Corada et al. 2013; Lee et al. 2014b). Ceci suggère que l'expression de Sox17 est régulée lors de la spécification du phénotype Tip ou Stalk cell. En effet, l'inhibition de l'expression de Sox17 au niveau des Stalk cells est médiée par la voie Notch. L'activation de la voie Notch via la surexpression de son domaine intracellulaire (NICD: Notch Intracellular Domain) réduit l'expression de Sox17 dans les cellules endothéliales primaires et lors de l'angiogenèse rétinienne (Lee et al. 2014b). En revanche,

l'inhibition de la voie Notch en utilisant un anticorps bloquant de DLL4 induit une augmentation de Sox17. La voie Notch via l'inhibition de Sox17, empêche l'expression des gènes spécifiques des Tip cells induites par Sox17 et limite par conséquent le nombre de Tip cells. De plus cette inhibition favorise la stabilisation des réseaux vasculaires néoformés.

Sox17 est également impliqué dans l'angiogenèse tumorale. *In vitro*, Sox17 induit la migration et la prolifération des cellules endothéliales tumorales et stimule l'expression du VEGFR2. *In vivo*, dans deux modèles de xénogreffes des lignées tumorigènes B16F10 (mouse melanoma cell line) et LLC (Lewis lung carcinoma), une surexpression de Sox17 a été observée au niveau des cellules endothéliales tumorales (Yang et al. 2013). Cependant, son expression était à peine détectable dans les vaisseaux quiescents. L'inhibition inductible du gène Sox17 aboutit à une réduction de la croissance tumorale et une diminution du nombre de métastases. De plus, cette inhibition est associée également à une réduction de la densité vasculaire et des extensions de filopodes. Les vaisseaux adoptent une morphologie normale. De la même manière, la surexpression du gène Sox17 promeut la croissance tumorale et l'angiogenèse tumorale et aboutit à un développement anormal des vaisseaux.

### **2.13 PlexinD1**

PlexinD1 appartient à la famille des protéines transmembranaires de 200 kDa divisées en 4 classes : PlexinA à D (Klagsbrun et Shimizu 2010). Ce sont des protéines à un seul domaine transmembranaire, possédant du côté cytoplasmique un domaine GAP. Elles possèdent un domaine de liaison à des protéines comme Rho-D, RND1, et Rac1. La partie extracellulaire contient un domaine de liaison aux semaphorines (SEMA). Les SEMA sont des protéines de guidance impliquées dans la répulsion des axones, la régulation de l'angiogenèse et la progression tumorale (Bielenberg et Klagsbrun 2007; Neufeld et Kessler 2008). PlexinD1 est le récepteur spécifique de SEMA3E. Contrairement aux autres membres de la famille SEMA3, la signalisation de SEMA3E via son récepteur PlexinD1 est indépendante de l'interaction avec les corécepteurs NRPs (Gu et al. 2005). L'expression de PlexinD1 est restreinte au niveau des cellules endothéliales. Il contrôle le positionnement des cellules endothéliales et la structuration du système vasculaire (Gitler et al. 2004; Gu et al. 2005). PlexinD1 est nécessaire pour le développement du système cardiovasculaire. En effet, les souris PlexinD1-

/- meurent 2 jours après la naissance, en raison des défauts cardiovasculaires (Gitler et al. 2004).

Une surexpression de PlexinD1 est observée lors de l'angiogenèse physiologique et tumorale. De nombreuses études montrent son expression par les cellules endothéliales localisées à la pointe du capillaire en bourgeonnement et en particulier par les Tip cells (Kim et al. 2011). Kim et coll. ont montré dans un modèle de néovascularisation de la rétine chez la souris que l'expression de PlexinD1 est induite par le VEGF. A son tour, le complexe PlexinD1/SEMA3E exerce un rétrocontrôle négatif sur l'activité de VEGF. Ce complexe réduit l'expression de DLL4 et par la suite régule la signalisation DLL4/Notch nécessaire dans la détermination du phénotype Tip/Stalk cells. D'une manière intéressante, l'inactivation du gène SEMA3A dans un modèle de néovascularisation de la rétine chez la souris induit une surexpression de DLL4 et une diminution de l'expression d'Ang-2 (marqueur spécifique des Tip cells). Au contraire, l'injection de SEMA3A aboutit à une réduction de l'expression de DLL4 et une augmentation de l'expression d'Ang-2. Ceci suggère que le complexe SEMA3E/PlexinD1 est nécessaire pour garder un ratio équilibré entre les Tip et les Stalk cells et pour assurer une angiogenèse coordonnée (Kim et al. 2011).

D'autres études ont montré que le complexe PlexinD1/SEMA3E représente un inhibiteur puissant de l'angiogenèse physiologique et tumorale chez l'adulte. In vivo, dans un mode de vascularisation de la cornée chez la souris, l'injection de Sema3E inhibe l'angiogenèse induite par VEGF ou FGF. En effet, le complexe PlexinD1/SEMA3E provoque la rétraction des filopodes des Tip cells et inhibe l'adhésion des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire via l'internalisation de l'intégrine  $\beta 1$  (Sakurai et al. 2010).

En général la famille de SEMA3 (SEMA3B, SEMA3F) est considérée comme des molécules impliquées dans l'inhibition de la croissance tumorale et les métastases. D'une manière intéressante, Casazza et ses collaborateurs ont montré *in vitro* et par des études cliniques un effet paradoxal induit par le complexe PlexinD1/SEMA3E. En effet, ce complexe inhibe la croissance tumorale mais promeut et favorise l'invasion métastatique (Casazza et al. 2010). Une corrélation positive entre l'expression de PlexinD1 et la progression des métastases a été observée dans trois types de cancers humains : Cancer du colon, du mélanome et le cancer du foie. Dans un modèle de xénogreffes des cellules tumorales humaines, l'inactivation du gène de PlexinD1 ou de SEMA3E inhibe le pouvoir métastatique de ces

cellules. Cependant la surexpression de SEMA3E promeut la dissémination métastatique. En effet, le complexe PlexinD1 /SEMA3E agit à deux niveaux. D'un coté, il inhibe l'angiogenèse au sein de la tumeur et réduit son approvisionnement en oxygène et en nutriment ce qui contribue à une inhibition de la croissance tumorale. De l'autre coté, il stimule la mobilité, la migration transendothéliale et l'extravasation des cellules tumorales et donc favorise l'évasion des cellules tumorales et promeut la dissémination métastatique (Casazza et al. 2010).

#### **2.14 Endocan**

Endocan ou ESM-1 pour Endothelial Specific Molecule-1 est un protéoglycane de 50 kDa. Cette molécule fait partie des clusters des gènes exprimés par les Tip Cells et fait l'objet d'un chapitre détaillé ci-dessous.

## CHAPITRE III : ENDOCAN

---

Endocan ou ESM-1 pour Endothelial Specific Molecule-1 est un protéoglycane de type dermatane sulfate cloné dans notre laboratoire en 1996. Son expression préférentielle par l'endothélium pulmonaire et sa régulation par des facteurs de croissance et des cytokines, lui confèrent un rôle dans les pathologies inflammatoires et tumorales.

### 1. Organisation génomique

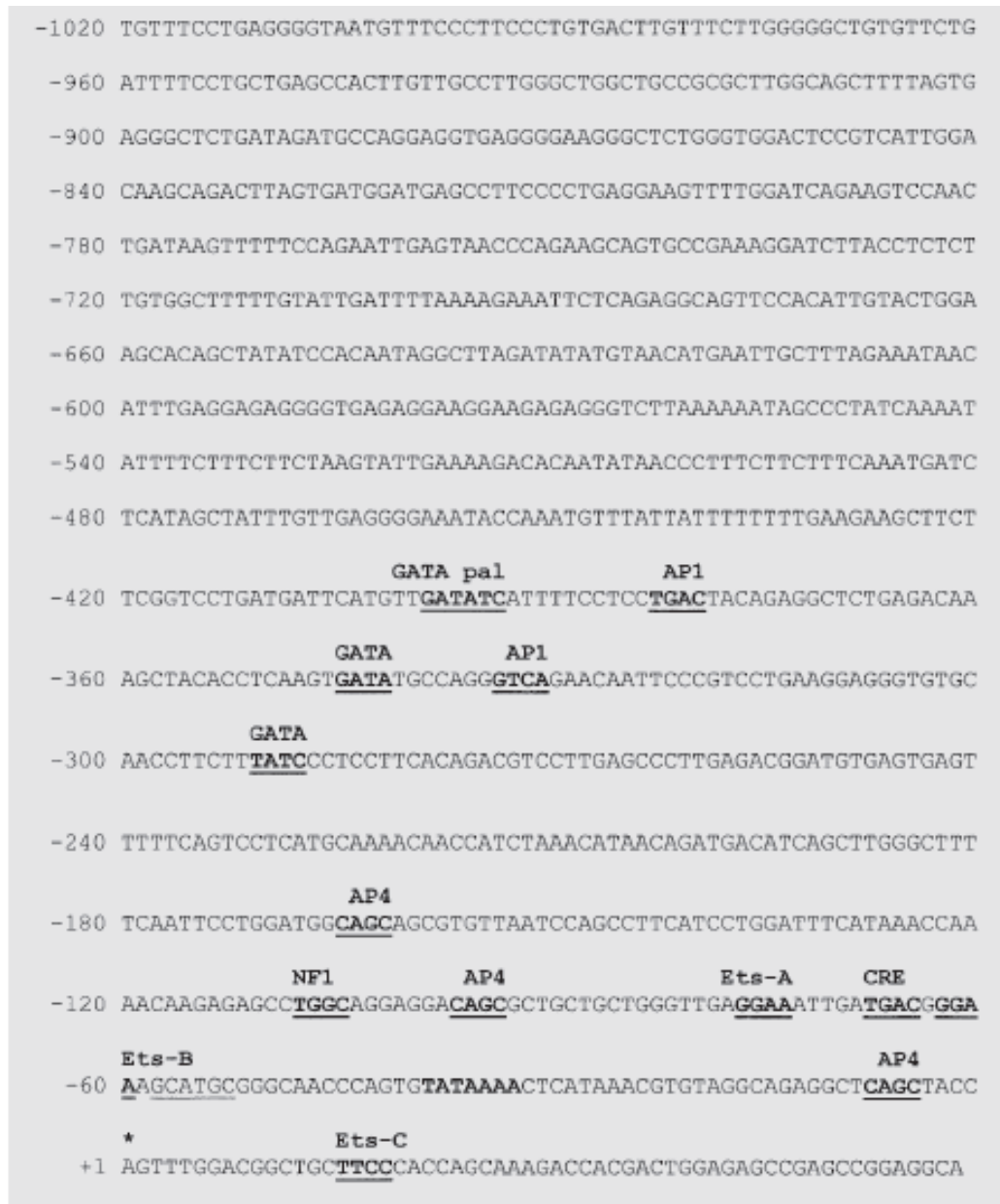
#### 1.1 Gène et ADNc

Endocan a été cloné par hasard suite à un criblage d'une banque d'ADNc d'HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) afin d'isoler l'ADNc codant pour un auto-antigène de 55 kDa impliqué dans l'asthme sévère. Un sérum immun dirigé contre cet antigène a été obtenu et utilisé pour le criblage. Un ADNc de 2 kb fut isolé, correspondant à un ARNm de séquence inconnue et dont l'expression est apparue restreinte aux cellules endothéliales, d'où sa première dénomination, Endothelial Specific Molecule-1 (ESM-1) (Lassalle et al. 1996).

Endocan est le produit d'un gène unique localisé sur la partie proximale du bras long du chromosome 5 (5q11.2). Le gène est organisé en 3 exons (362 pb, 150 pb, 1560 pb) séparés par deux introns (Lassalle et al. 1996). Son promoteur est composé de 3888 pb et comprenant la boîte TATA classique (<sup>-39</sup>TATAAAA) (Fig.6). De plus, il comporte plusieurs sites putatifs de liaison aux facteurs de transcription : Trois motifs ETS (-77 au -74, -63 au -60 et +16 au +19), 3 sites GATA dont 1 est palindromique (GATATC) présent entre -398 et -393, deux sites AP1, trois sites AP4, un site NF1, un site CRE-Like (dit CREB/ATF), un site SMAD3/Runx2 (-1172) et une séquence palindrome de 6 pb (<sup>-58</sup>GCATGC) (Tsai et al. 2002; Kirwan et al. 2005). Dix motifs de liaison du facteur Hhex ont été décrits (5 dans le promoteur entre -8835 et -2572 ; 2 dans le premier intron, un dans le deuxième intron et 2 après l'exon 3) (Cong et al. 2006).

L'ARNm d'endocan est composé de 2006 pb avec un cadre de lecture fermée de 552 nucléotides. Une séquence consensus de Kozak (AAC<sup>+1</sup>AUGA) a été identifiée au niveau du nucléotide 56 comprenant le codon d'initiation AUG. L'ARNm d'endocan montre une large région 3'UTR (3'-Untranslated Region) composée de 1398 nucléotides. Cette région contient une série de domaines AREs (AU-Rich elements) impliqués dans l'instabilité de l'ARNm. La

présence de ces motifs augure une dégradation rapide de l'ARNm (Lassalle et al. 1996). Cependant, des protéines comme HuR sont capables de stabiliser l'ARNm d'endocan en se fixant sur les domaines riches en AU (Tschernatsch et al. 2006). Cette région possède également 5 sites de polyadénylations, mais seul le dernier semble être fonctionnel (Lassalle et al. 1996).

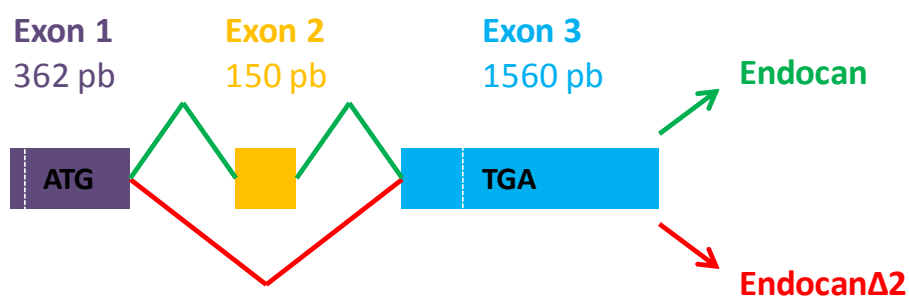


**Figure 6:** Séquence du promoteur du gène d'endocan humain. Seulement 1200 pb parmi 3888 pb du promoteur sont présentés dans la figure. Le site d'initiation de la transcription est marqué par un astérisque. Les nucléotides en gras correspondent aux sites TATA box. Les sites putatifs de liaison aux facteurs de transcription localisés entre -420 à +58 sont marqués en gras et soulignés. GATA pal réfère aux sites GATA palindromique. Une séquence palindrome de 6 pb est soulignée (D'après Tsai et al. 2002).



Des orthologues d'endocan ont été retrouvés chez le singe, la souris, le rat, le chien, la vache et le lapin. Cependant, aucun orthologue n'a été détecté chez le poulet et la levure. L'analyse par Southern-blot montre que les gènes sont uniques et hautement conservés (Lassalle et al. 1996). L'analyse du promoteur de l'orthologue murin montre que tous les sites putatifs de liaison aux facteurs de transcription sont présents et que la région régissant la spécificité endothéliale (-81 à +58) est hautement conservée (91% d'homologie) (Tsai et al. 2002). De même, l'ADNc de l'orthologue du rat, composé de 2000 nucléotides contient un cadre de lecture fermé de 552 pb et une longue région 3'UTR de 1,4 kb très semblable à la région 3'UTR humaine (Wang et al. 1997).

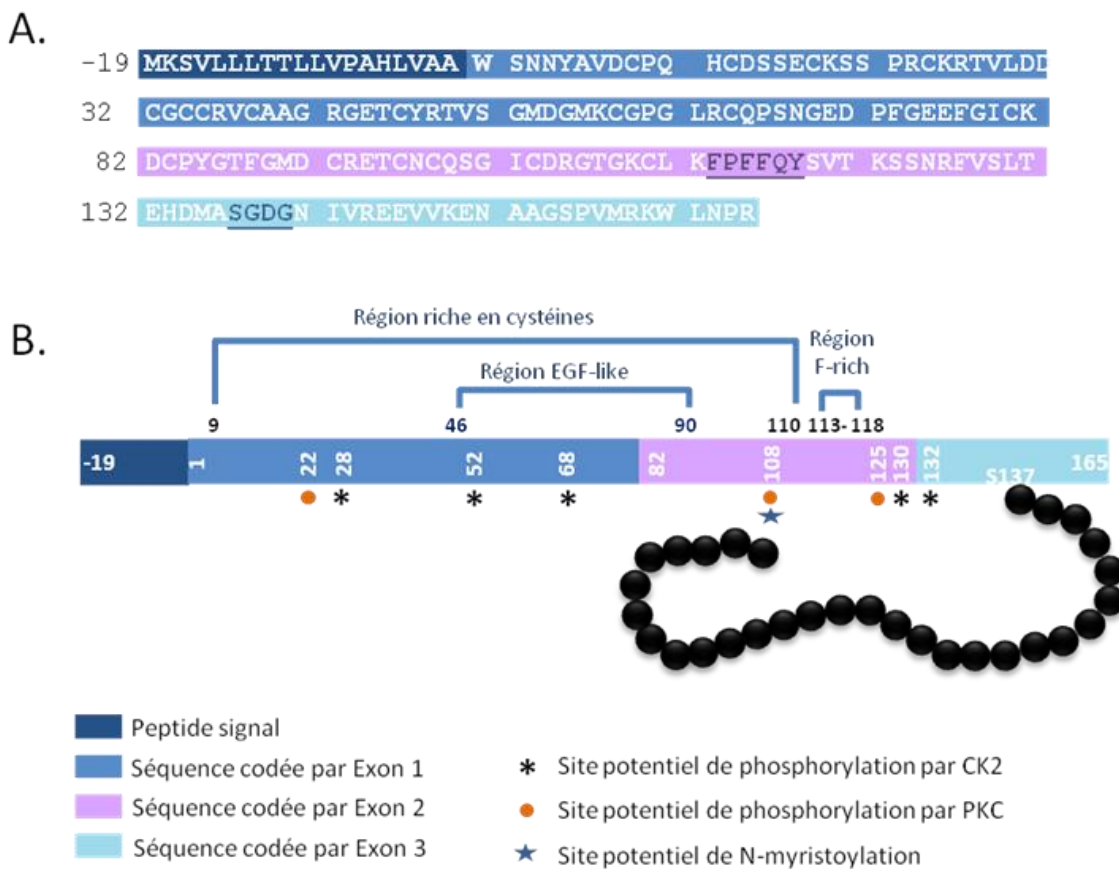
L'épissage alternatif du gène d'endocan aboutit à la formation de deux isoformes d'ARNm (Aitkenhead et al. 2002). La première isoforme nommée endocan, a été détectée par Northern blot dans les cellules endothéliales primaires issues d'HUVEC et est composée de 3 exons (Lassalle et al. 1996) (Fig. 7). La seconde isoforme a été observée pour la première fois par RT-PCR dans des cellules endothéliales de capillaires adipocytaires et ultérieurement dans des HUVECs (Aitkenhead et al. 2002; Grigoriu et al. 2006). Cette isoforme est dépourvue de son exon 2 et nommé par endocan $\Delta$ 2 (Fig. 7). Dans les HUVECs, l'ARNm d'endocan $\Delta$ 2 apparaît moins exprimé que l'ARNm d'endocan. L'ARNm d'endocan $\Delta$ 2 a été observé dans les poumons de primates (homme et singe) mais pas dans les poumons des souris et des rats (Depontieu et al. 2008).



**Figure 7 :** Représentation des ADNc rétro-transcrits des ARNm d'endocan et d'endocan $\Delta$ 2, issus de l'épissage alternatif de l'exon 2. L'épissage alternatif du gène d'endocan aboutit à la formation de deux ARNm, l'un composé des trois exons et correspond à l'ARNm d'endocan, et un second dépourvu de l'exon 2 de 150 paires de bases (pb) et nommé endocan $\Delta$ 2. ATG : codon d'initiation et TGA : codon stop.

## 1.2 Structure du protéoglycane

L'ARNm d'endocan code pour une protéine de 184 acides aminés. Le clivage du peptide signal hydrophobe de 19 acides aminés aboutit à la sécrétion d'un polypeptide mature de 165 acides aminés et de poids moléculaire apparent de 20 kDa. L'analyse de la séquence d'endocan montre une région N-terminale de 110 acides aminés et riche en cystéines codée par l'exon 1 et une partie de l'exon 2, une région riche en acides aminés aromatiques ( $^{113}\text{FPFFQY}^{118}$ ) codée par l'exon 2 (F-rich), et une région C-terminale composée de 34 acides aminés codée par l'exon 3 (Sarrazin et al. 2006) (Fig. 8).



**Figure 8 : Structure d'endocan.** (A) Séquence peptidique d'endocan avec en gras et souligné la région riche en phénylalanine puis le site consensus de O-glycosylation. (B) Représentation schématique d'endocan. Sur la figure sont mis en évidence la région N-terminale riche en cystéines (18 cystéines pour 110 acides aminés), la région potentielle EGF-like (a.a. 46 à 90), la région riche en phénylalanine ( $^{113}\text{FPFFQY}^{118}$ ) et la sérine 137 sur laquelle l'unique chaîne de DS est liée. Cette figure met en valeur différents sites potentiels de modifications post-traductionnelles tels que 3 sites de type PKC, un unique site de N-myristoylation et les 5 sites de CK2 (Casein Kinase II). Adapté de (Sarrazin et al. 2006).

L'ARNm d'endocan $\Delta$ 2 code pour une protéine de 115 acides aminés. Cette isoforme possède les mêmes extrémités N- et C-terminales d'endocan mais dépourvue des 50 acides aminés codés par l'exon 2 (Depontieu et al. 2008).

L'analyse bioinformatique du polypeptide endocan identifie 3 sites potentiels d'O-glycosylation correspondant à la sérine 16, la thréonine 120 et la sérine 137 (Sarrazin et al. 2006). Parmi ces 3 sites de O-glycosylation, seule la sérine 137 a montré une capacité à lier d'une manière covalente une chaîne de glycosaminoglycane (GAG) (Bécharde et al. 2001a). Aucun site de N-glycosylation n'est présent (Lassalle et al. 1996). Cependant, il a été identifié un seul site potentiel de N-myristoylation et des sites de phosphorylations (dont 3 pour la protéine kinase C et 5 pour la casein kinase II) (Sarrazin et al. 2006). La modélisation tridimensionnelle, à partir des structures connues, prédit un polypeptide similaire à un dipôle avec une face électronégative et une autre électropositive (Sarrazin et al. 2006). Les mutations des phénylalanines 115 et/ou 116 réduisent la capacité d'endocan à se fixer sur la colonne de phenyl-sepharose, suggérant une localisation de la région F-rich à la surface de la molécule (Scherpereel et al. 2003) (Fig. 8).

Dans le lysat cellulaire des cellules endothéliales (HUVEC et SV1), endocan apparaît sous forme de deux doublets de 14 et 18 kDa en condition non réduite (Becharde et al. 2000). Endocan a révélé un poids moléculaire apparent de 21,8 kDa sur gel de filtration concordant avec le poids moléculaire apparent de 20 kDa sur gel d'acrylamide en condition réduite (Bécharde et al. 2001a). La différence de poids moléculaire apparent entre la condition réduite et non réduite suggère la présence de ponts disulfures dans la structure secondaire d'endocan.

Dans le surnageant d'HUVEC et dans le plasma humain, le poids moléculaire apparent d'endocan par gel de filtration est de 400 kDa tandis que le poids moléculaire sur gel d'acrylamide est de 50 kDa (Bécharde et al. 2001a). La présence d'agent réducteur ne modifie pas le poids moléculaire apparent suggérant qu'il n'y a pas de multimérisation via des ponts disulfures entre polypeptides. La détection d'endocan en bleu Alcian et non pas en bleu de Coomassie indique une glycosylation d'endocan (Bécharde et al. 2001a). En effet, avant d'être secrété, le polypeptide subit des modifications post-traductionnelles au cours desquelles, une chaîne de GAG va se lier d'une manière covalente au niveau de la sérine 137. La forme

secrétée d'endocan voit son poids moléculaire apparent passer alors de 20 à 50 kDa (Bécharde et al. 2001b).

En ce qui concerne l'endocan $\Delta$ 2, il révèle un déficit de glycosylation de la protéine. Il est secrété sous deux formes : glycosylée (protéoglycane) et non glycosylée (polypeptide). Cette isoforme produite à des taux très faibles par les cellules HEK293 transfectées, n'est pas retrouvée secrétée dans le surnageant d'HUVECs (Depontieu et al. 2008).

La caractérisation de la chaîne glycanique d'endocan par digestion enzymatique, a montré que celui-ci appartenait à la famille des chondroïtines sulfates (CS). La présence d'acide iduronique dans la composition du GAG ainsi que sa sensibilité à la chondroïtinase B (spécifique des dermatanes sulfates) permettent d'affirmer sa nature exacte en tant que dermatane sulfate. Le taux d'acides iduroniques est relativement minime (6%). Le GAG est hautement sulfaté (97,8%) principalement mono-4-O sulfaté (66,5%) (Bécharde et al. 2001a). Le polypeptide entier d'endocan ne possède pas d'homologie structurale permettant de le classer dans une famille connue de protéoglycane. Endocan représente un des rares PG circulants décrits, la plupart étant des PGs solubles issus d'un shedding membranaire ou interstitiel. Néanmoins, des homologies de séquences ont été trouvées entre la région N-terminale d'endocan et les protéines riches en cystéines tels que les intégrines  $\beta$ 2 et les membres de la famille IGFBP (Insulin-like Growth Factor Binding Protein) (Sarrazin et al. 2006). Cependant, aucune étude n'a montré de fixation de l'IGF (Insulin Growth Factor) sur endocan. Aucune homologie significative concernant son extrémité C-terminale n'a encore été décrite (Lassalle et al. 1996).

En conclusion, endocan est un protéoglycane de 50 kDa, constitué d'un polypeptide mature de 165 acides aminés (20kDa) et une seule chaîne de dermatane sulfate liée d'une manière covalente à un résidu sérine en position 137.

## **2. Expression et régulation**

### **2.1 Au niveau de l'ARNm**

L'ARNm d'endocan est exprimé spécifiquement au niveau de l'endothélium. Cette spécificité endothéliale est gouvernée par la structure de son promoteur. Tsai et collaborateurs ont montré par des approches de mutagénèse des régions du promoteur que le motif Ets-A (-77

à -74) et le motif Cre-like (-68 à -62) induisent une expression d'endocan spécifique et restreinte aux cellules endothéliales. Ces deux motifs sont aussi responsables de la spécificité endothéliale d'autres gènes comme eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) ou ICAM-2. Cependant, l'expression endothéliale d'endocan était plus forte et plus spécifique que pour le eNOS et l'ICAM-2 (Tsai et al. 2002).

Quant au second motif Ets-B (-63 à -60) et le palindrome de 6 pb, il a été démontré qu'ils fonctionnent comme des facteurs répresseurs de transcription d'endocan au niveau endothélial. L'analyse des empreintes à la DNase du promoteur montre que les deux motifs Ets sont protégés spécifiquement dans les cellules endothéliales, tandis que les éléments CRE-like et le palindrome sont protégés dans les cellules endothéliales et non endothéliales (Tsai et al. 2002). De plus, Hhex 1 a montré une activité répressive sur l'expression d'endocan (Cong et al. 2006). Ceci suggère un mécanisme de régulation transcriptionnelle de l'endocan subtil et spécifique à l'endothélium vasculaire.

L'ARNm d'endocan a été originellement décrit comme étant spécifique du poumon et du rein (Lassalle et al. 1996). Cependant, une expression moins importante a été observée au niveau des adipocytes isolés et des extraits des testicules, de la rate et de l'intestin grêle (Aitkenhead et al. 2002; Wellner et al. 2003; Janke et al. 2006). Aucune expression n'a pu être détectée dans le cerveau, le placenta, le pancréas et le cœur qui sont des organes hautement vascularisés (Lassalle et al. 1996).

L'expression d'endocan au niveau ARNm est régulée par des cytokines pro-inflammatoires et des composants bactériens. La stimulation des HUVECs par le TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ ) ou l'IL-1 $\beta$  (Interleukine-1 $\beta$ ) ou le LPS (Lipopolysaccharide) induit une surexpression d'endocan débutant à la 4<sup>ème</sup> heure de stimulation, pour se poursuivre au delà de 72 h (Lassalle et al. 1996; Scherpereel et al. 2003). Cependant, aucun effet n'est observé lorsque les HUVECs sont incubées avec l'IL-4 (Interleukine-4) ou l'INF- $\gamma$  (Interféron- $\gamma$ ). D'une manière surprenante, la co-incubation d'INF $\gamma$  avec le TNF $\alpha$  inhibe la stimulation d'endocan induite par ce dernier (Lassalle et al. 1996). Le TGF- $\beta$ 1 (Tumor Growth Factor- $\beta$ 1) et non le TGF- $\beta$ 2 stimule également l'expression d'ARNm d'endocan (Zhao et al. 2004). Ceci est en concordance avec le motif Smad3/Runx2 de réponse au TGF- $\beta$ 1 identifié dans le promoteur d'endocan (Janke et al. 2006).

L'ARNm d'endocan est aussi régulé par des facteurs angiogéniques tels que le VEGF-A et le FGF-2 (Gerritsen et al. 2003; Grigoriu et al. 2006). La stimulation des HUVECs avec du VEGF-A pendant 24 h augmente l'expression d'ARNm d'endocan de 2,4 fois. Cependant, la stimulation avec du HGF n'induit aucun changement de l'expression (Gerritsen et al. 2003). Le VEGF-C est apparu aussi comme un facteur stimulant l'expression d'endocan. La stimulation des cellules endothéliales lymphatiques (LEC) avec du VEGF-C induit une augmentation de l'ARNm d'endocan de 4 fois pendant 24 h (Shin et al. 2008).

Les esters de phorbol et l'acide rétinoïque, induisent l'expression d'ARNm d'endocan dans les adipocytes chez l'homme et le rat. Ces deux agents tumorigènes induisent la voie PKC activant le facteur de transcription AP-1 qui a deux sites de liaison dans le promoteur d'endocan (Tsai et al. 2002; Wellner et al. 2003). Cependant, l'hydrocortisone et l'insuline diminuent l'expression d'ARNm d'endocan dans les adipocytes. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 ne modifient pas l'expression de l'ARNm d'endocan dans ce type cellulaire. La lipolyse par la lipase lipoprotéique (LPL) du VLDL (Very low density lipoprotein) induit l'expression de l'ARNm du TNF- $\alpha$  et d'endocan (Tschernatsch et al. 2006).

Les voies de signalisation impliquées dans la régulation d'expression d'endocan restent encore mal définies. Abid et ses coll. ont étudié les voies intracellulaires qui régulent l'expression d'endocan suite à une stimulation des HUVECs par VEGF-A. Il a été démontré que le VEGF-A via sa liaison au VEGFR2 est capable d'induire deux voies de signalisations distinctes. La première voie stimule l'expression d'endocan et correspond à la voie PKC/NF $\kappa$ B. La deuxième voie inhibe l'expression d'endocan et correspond à la voie PI3K/Akt/FOXO (Abid et al. 2006). Différentes analyses de microarray et de Northern blot réalisées sur des HUVECs ont démontré que la protéine FOXO induit l'expression d'ARNm d'endocan (Daly et al. 2004, 2006; Abid et al. 2006). En effet, la voie Akt inhibe l'expression d'endocan en phosphorylant et inactivant la protéine FOXO.

## **2.2 Au niveau de la protéine**

Les analyses par immunohistochimie montrent qu'endocan est exprimé par l'endothélium de plusieurs organes. Dans le poumon, endocan est exprimé au niveau des veinules, des capillaires alvéolaires mais aussi au niveau des cellules épithéliales bronchiques et des glandes sous-muqueuses. Dans le rein, il est détecté au niveau de l'endothélium vasculaire

mais également au niveau de l'épithélium tubulaire. Dans l'intestin, il est observé au niveau des capillaires et des veinules de la lamina propria (Bechard et al. 2000). Des analyses d'immunohistochimie réalisées sur des HUVECs dans le but de regarder la distribution d'endocan au niveau cellulaire, montrent un marquage diffus dans le cytoplasme mais pas de marquage membranaire (Bechard et al. 2000).

Comme pour l'ARNm, le TNF- $\alpha$ , l'IL1- $\beta$  et le LPS induisent une augmentation de la sécrétion d'endocan par les cellules endothéliales. Quant à INF $\gamma$ , il inhibe l'habilité du TNF- $\alpha$  à induire une sécrétion d'endocan, tout en synergisant avec le TNF- $\alpha$  dans l'augmentation de l'expression de l'ICAM-1 (Bechard et al. 2000; Scherpereel et al. 2003). Ces résultats suggèrent une régulation fine de l'expression d'endocan durant le processus inflammatoire. Au niveau des adipocytes, endocan est surexprimé par l'acide rétinoïque et par le PMA (Wellner et al. 2003).

*In vivo*, dans le torrent circulatoire des sujets sains, le taux moyen d'endocan sérique est d'environ 1,081 ng/mL (20 sujets) (Bechard et al. 2000). Les taux sériques d'endocan sont nettement plus élevés dans diverses pathologies.

Des études réalisées sur des patients admis en soins intensifs et atteints du sepsis montrent que les taux sériques d'endocan sont significativement augmentés. De plus, ces études montrent une corrélation positive entre le taux d'endocan et la sévérité de la maladie. En effet, les taux d'endocan sont beaucoup plus élevés chez les patients avec un choc septique que chez les patients avec un sepsis sévère ou un sepsis. L'augmentation du taux sérique d'endocan chez les sujets avec un choc septique constitue un mauvais pronostic (Bechard et al. 2000; Scherpereel et al. 2003). Récemment, une étude clinique réalisée chez des patients polytraumatisés montre que les taux d'endocan permettent de prédire la survenue d'une défaillance pulmonaire. En effet, les patients ayant un taux d'endocan élevé ne développent pas une atteinte pulmonaire alors qu'un taux d'endocan bas prédit un haut risque de défaillance pulmonaire (Mikkelsen et al. 2012).

Une nouvelle étude réalisée chez des sujets atteints de psoriasis vulgaris montre une corrélation positive entre le taux d'endocan avec la sévérité de la maladie et les risques cardiovasculaires associées (Balta et al. 2013). De plus, une surexpression d'endocan est détectée chez des sujets atteints d'hypertension (Balta et al. 2014).

Des taux sériques d'endocan ont été aussi mesurés chez des patients recevant des allogreffes rénales. En effet, les résultats montrent qu'endocan est surexprimé chez les sujets développant un rejet de la greffe. Endocan pourrait servir comme un marqueur clinique du degré des lésions endothéliales et par conséquent du rejet d'une allogreffe rénale (Li et al. 2012; Su et al. 2014).

Bien qu'endocan soit étudié dans diverses maladies inflammatoires aiguës ou chroniques, une grande majorité des recherches s'est intéressée au rôle d'endocan dans le cancer et dans l'angiogenèse tumorale.

### **3. Endocan et tumeurs épithéliales/endocrines**

Chez l'homme, de nombreuses études par biopuces, immunohistochimie ou dosages sanguins ont montré une surexpression d'endocan dans plusieurs cancers. Le tableau 3 représente un récapitulatif des principaux cancers surexprimant endocan.

Dans le cancer du poumon, une surexpression d'endocan est observée au niveau de l'endothélium tumoral et au niveau sérique (Scherpereel et al. 2003; Grigoriu et al. 2006). Endocan fait partie d'un cluster de 42 gènes qui prédit un important risque de décès dans les 12 mois (Borczuk et al. 2004). Grigoriu et coll. ont montré une corrélation inverse entre le taux sériques d'endocan et la survie des patients atteints du cancer du poumon. De plus, une corrélation positive entre le taux sérique d'endocan et la présence des métastases a été observée. Endocan est considéré comme un marqueur qui prédit un mauvais pronostic (Grigoriu et al. 2006).

Dans le cancer du rein, de nombreuses études transcriptomiques ont identifié endocan comme un des gènes les plus surexprimés (Lenburg et al. 2003; Seliger et al. 2003; Amatschek et al. 2004; Cifola et al. 2008). Au niveau sanguin, le taux d'endocan circulant est apparu nettement plus élevé chez les patients ayant un cancer du rein (n=14 ; médiane = 4,81 ng/mL) par rapport aux sujets sains (n=15 ; médiane = 0,3 ng/mL) (Leroy et al. 2010). De plus, parmi le groupe des sujets atteints du cancer du rein, le taux d'endocan a été significativement plus élevé chez les patients au stade 3-4 (n=8 ; médiane = 6.9 ng/mL) que chez les patients au stade 2 (n=6 ; médiane = 2 ng/mL). Par des techniques d'immunofluorescence, une expression d'endocan a été observée au niveau de l'endothélium tumoral ainsi qu'au niveau des cellules tumorales (Rennel et al. 2007).



Dans le cancer du sein, endocan est considéré comme un marqueur de mauvais pronostic. Une étude par RNA microarray réalisée sur 78 patientes a permis d'associer endocan parmi les 70 gènes qui prédisent un risque élevé de développer des métastases à 5 ans (van 't Veer et al. 2002).

Dans le carcinome hépatocellulaire (HCC), des taux sanguins élevés ont été trouvés chez les patients atteints de HCC (87,30 +/- 25,69 pg/mL ; n=40) comparativement aux sujets sains (26,82 +/- 10,80 pg/mL ; n=40) (Kang et al. 2011). De plus, endocan sanguin était particulièrement plus important chez les patients avec Edmond grade 2 HCC (99,98 +/- 10,06 pg/mL) par rapport aux patients avec Edmond grade 1 HCC (68,03 +/- 0,66 pg/mL). L'expression d'endocan au niveau du tissu tumoral est limitée au niveau de l'endothélium tumoral. Cette expression est corrélée à une survie plus courte et constitue un facteur de mauvais pronostic (Chen et al. 2010). Récemment, une étude a montré que l'expression d'endocan sur biopsie d'HCC représente un facteur prédictif de récurrence précoce chez les patients atteints de HCC traités par radiofréquence (Ziol et al. 2013).

Une étude de microarray d'ADNc réalisée sur 30 lignées cellulaires de mélanomes humains dans le but de comparer les gènes régulés différemment entre le mélanome invasif/agressif et le mélanome non agressif. Endocan est apparu comme un des gènes les plus surexprimés (44 fois plus) (Seftor et al. 2002; Hendrix et al. 2003). Connu par son phénotype endothélial, les auteurs proposent endocan comme une molécule associée au processus de mimétisme vasculaire subi par les cellules tumorales du mélanome agressif.

Dans le cancer de la prostate, l'expression d'endocan (associé à 9 autres gènes) a été décrite comme une signature des tumeurs métastatiques (Glinskii et al. 2003).

Dans le cancer d'ovaire, une surexpression d'endocan a été observée au niveau de l'endothélium tumoral (Buckanovich et al. 2007; El Behery et al. 2013). La survie globale des patientes était inversement associée à l'expression tissulaire d'endocan (El Behery et al. 2013).

Dans le cancer gastrique, une surexpression d'endocan a été détectée par immunohistochimie, au niveau des vaisseaux intratumoraux (120 cas/159) ainsi que l'épithélium tumoral (92 cas/159). Cette surexpression est associée avec des facteurs clinicopathologiques tels que l'invasion vasculaire ou lymphatique, l'incidence des métastases distantes et à une survie plus courte (Liu et al. 2010).

Dans le cancer colorectal (CRC), une surexpression d'endocan est détectée par immunohistochimie au niveau du cytoplasme des cellules tumorales du CRC par rapport aux tissus normaux. De plus, des taux sériques d'endocan étaient significativement plus importants chez les sujets avec un CRC (n=100 ; 70,1 +/- 29 pg/mL) comparativement aux sujets sains (n=78 ; 29,7 +/- 14,9 pg/mL). En outre, les taux sériques d'endocan étaient plus élevés chez les patients atteints de CRC en stade avancé (stade III et IV) par rapport aux patients en stade précoce. Cette surexpression sérique d'endocan est associée à un mauvais pronostic (Ji et al. 2010).

Dans le cancer invasif de la vessie, une surexpression d'endocan a été observée au niveau de l'endothélium tumoral. D'une manière intéressante, des analyses d'immunohistochimies réalisées sur des tissus issus d'un cancer invasif et non invasif de la vessie, ont montré une surexpression d'endocan dans les échantillons invasifs. Ceci suggère que l'expression d'endocan corrèle avec l'invasivité du cancer. Des taux significativement plus élevés d'endocan sont détectés dans le plasma des patients atteints d'un cancer invasif de la vessie (n=53 ; moyenne : 0,79 ng/ml ; valeurs comprises entre 0,23-3,53 ng/mL) par rapport aux sujets normaux (n=60 ; moyenne : 0,43 ng/ml ; valeurs comprises entre 0-1 ng/mL) (Roudnicky et al. 2013).

Dans le carcinome du nasopharynx (NPC) associé à une infection par le virus d'Epstein-Barr, des analyses par immunohistochimie montrent une surexpression d'endocan. D'une manière intéressante, cette surexpression a été majoritairement détectée au niveau de l'épithélium tumoral plutôt que l'endothélium tumoral. Endocan a été détecté dans le cytoplasme et la membrane cellulaire des cellules tumorales de NPC, alors qu'aucune expression n'a été détectée dans les cellules épithéliales normales adjacentes. Cette surexpression d'endocan est associée à une survie plus courte. Endocan est considéré comme facteur pronostic potentiel de NPC (Yu et al. 2013).

Dans les glioblastomes, endocan a été détecté par immunohistochimie au niveau des cellules endothéliales hyperplasiques de gliomes de haut grade. Cependant, aucune expression n'est observée dans les gliomes de bas grade (I et II). De plus, une expression d'endocan au niveau des cellules tumorales de gliomes de haut grade a été aussi observée. Cette expression d'endocan est corrélée au mauvais pronostic (Maurage et al. 2009).

Dans le cancer folliculaire de la thyroïde, une étude de microarray a été réalisée afin d'identifier des gènes associés à une translocation PAX8-PPAR $\gamma$ 1. Endocan a été identifié parmi le cluster des gènes qui différencient un cancer folliculaire de la thyroïde avec ou sans réarrangement PAX8-PPAR $\gamma$ 1 (Lacroix et al. 2005).

Enfin, dans l'adénome hypophysaire, des analyses par immunohistochimie montrent qu'endocan est exprimé au niveau de l'endothélium et dans certaines cellules tumorales endocrines. Cependant, chez les sujets sains, l'expression d'endocan n'a été observée qu'au niveau de quelques cellules endocrines de l'hypophyse. Dans le tissu de l'adénome, une forte corrélation a été observée entre l'immunoréactivité d'endocan au niveau endothélial et la progression, la taille de la tumeur, les divisions mitotiques et la P53. De plus, des analyses morphologiques des microvaisseaux montrent que la superficie moyenne des vaisseaux était plus importante dans le groupe des patients ayant une immunoréactivité endothéliale positive (Cornelius et al. 2012).

Cancer	Expression	
<b>Cancer du poumon</b>	Endothélium tumoral, taux sériques élevés (ARN/Protéine)	Mauvais pronostic
<b>Cancer du rein</b>	Endothélium tumoral, cellules tumorales, taux sériques élevés (ARN/Protéine)	
<b>Cancer du sein</b>	Toute la tumeur (ARN)	Mauvais pronostic
<b>Mélanome</b>	Cellules tumorales (ARN)	
<b>Carcinome hépatocellulaire</b>	Endothélium tumoral, taux sériques élevés (ARN/Protéine)	Mauvais pronostic
<b>Glioblastome</b>	Endothélium tumoral, cellules tumorales (Protéine)	Mauvais pronostic
<b>Cancer de la vessie</b>	Endothélium tumoral, taux sériques élevés (ARN/Protéine)	
<b>Cancer colorectal</b>	Cellules tumorales, taux sériques élevés (Protéine)	Mauvais pronostic
<b>Cancer gastrique</b>	Endothélium tumoral et épithélium tumoral (ARN/Protéine)	
<b>Cancer de l'ovaire</b>	Endothélium tumoral (Protéine)	
<b>Adénome hypophysaire</b>	Endothélium tumoral, cellules tumorales (Protéine)	

**Tableau 3 :** Principaux types de cancers surexprimant endocan dont certains est associé à un mauvais pronostic.

#### 4. Endocan marqueur de l'angiogenèse tumorale

De nombreuses études ont pu corrélérer l'expression d'endocan avec la vascularisation et l'agressivité de la tumeur. En effet, une forte corrélation a pu être mise en évidence entre le taux d'endocan et les marqueurs d'angiogenèse tels que VEGF-A et VEGFR2 dans le cancer du rein, du sein, de l'utérus, de l'estomac, du rectum et le cancer de la vessie (Aitkenhead et al. 2002; Roudnicky et al. 2013). Des molécules anti-angiogéniques comme un anticorps anti-VEGF ou des inhibiteurs de tyrosine kinases comme le sunitinib abolissent la sécrétion d'endocan par des HUVECs stimulées par le VEGF (Grigoriu et al. 2006; Leroy et al. 2010). D'une manière intéressante, il a été démontré que l'immunoréactivité d'endocan dans les réseaux microvasculaires tumorales (MVD : Microvascular density) corrèle fortement avec le taux de VEGF-A, l'agressivité, l'invasivité, et la courte durée de survie. Cette surexpression d'endocan dans les MVD a été observée dans le cancer du colon, de l'ovaire, de l'hypophyse et le carcinome hépatocellulaire (Huang et al. 2009; Chen et al. 2010; Liu et al. 2010; Cornelius et al. 2012; El Behery et al. 2013).

Bien que l'expression d'endocan est stimulée par des facteurs angiogéniques tels que VEGF-A ou VEGF-C, de nombreuses études montrent qu'endocan à son tour modulent les activités médiées par ces facteurs de croissance sur l'endothélium. *In vitro*, Shin et collaborateurs ont montré qu'endocan tout seul, n'induit pas la prolifération ni la migration des cellules endothéliales lymphatiques. En revanche, en présence du VEGF-A/C, endocan promeut la prolifération et la migration des LECs induites par ces deux facteurs de croissance. De plus, l'inhibition d'endocan par siARN abolit les effets induits par VEGF-A/C sur les LEC. D'une manière surprenante, l'addition d'endocan recombinant restaure partiellement la prolifération et la migration des LEC stimulées par VEGF-A/C (Shin et al. 2008). Une étude récente et similaire à l'étude précédente, a été réalisée afin d'évaluer aussi l'effet d'endocan sur la migration des cellules endothéliales HUVEC (Roudnicky et al. 2013). De la même manière, les résultats montrent qu'en absence du VEGF-A, endocan était incapable d'induire la migration des HUVECs. Cependant, l'inhibition d'endocan par siRNA inhibe l'effet migratoire induit par le VEGF-A. D'une manière intéressante, Roudnicky et ses coll. ont démontré que le silencing d'endocan dans des HUVECs stimulées par VEGF-A, aboutit à une forte réduction de la forme phosphorylée de VEGFR2 (Roudnicky et al. 2013). Ceci suggère

qu'endocan stimulé par VEGF-A exerce à son tour un rétrocontrôle sur l'activité de VEGF-A en régulant la phosphorylation de VEGFR2 (Roudnicky et al. 2013).

Dans un modèle d'angiogenèse *in vitro*, des HUVECs prétraitées par siRNA<sub>endocan</sub> ou siRNA<sub>contrôle</sub> ont été stimulées par VEGF-A et cultivées sur un matrigel pendant 12 h. L'inhibition d'endocan par siRNA affecte la formation des tubes capillaires (tube like structure) (Roudnicky et al. 2013). Cependant, une étude initiale réalisée aussi sur des HUVECS a montré des résultats différents. Les HUVECs ont été cultivées sur une matrice 3D de collagène et stimulées par le VEGF-A et le FGF-2, endocan est apparu l'un des gènes les plus surexprimés au cours de la formation de tubes. D'une manière surprenante, le blocage de l'expression d'endocan par siRNA n'a pas altéré la formation des pseudo-capillaires (Aitkenhead et al. 2002). Dans une autre étude utilisant des cellules TIME (Telomerase immortalized microvasculaire endothelial cells) cultivées sur gel de fibrine et stimulées avec du VEGF-A, le blocage d'endocan par un anticorps neutralisant anti-endocan n'a pas altéré la formation des bourgeons capillaires (Rennel et al. 2007). Ces deux effets contradictoires pourraient être expliqués par l'utilisation de modèles d'angiogenèse différents.

*In vivo*, dans un modèle de lymphangiogenèse basé sur l'injection d'implants en matrigel imbibé de VEGF-A/PBS avec siARN<sub>endocan</sub> versus siARN<sub>contrôle</sub>, endocan s'est révélé comme un facteur promouvant la formation des vaisseaux lymphatiques par VEGF-A. L'inhibition d'endocan par siARN n'altère pas la formation des vaisseaux lymphatiques, mais révèle une réduction de leur taille (Shin et al. 2008).

Endocan a été décrit comme un des gènes associés aux deux événements majeurs de la progression tumorale : le switch angiogénique et le mimétisme vasculaire (Seftor et al. 2002; Hendrix et al. 2003; Almog et al. 2009). Endocan est apparu comme un des six gènes les plus surexprimés dans des lignées humaines issues de cancer du sein, de liposarcome, de l'ostéosarcome, et de glioblastome, lors de la transition entre le phénotype dormant et le phénotype angiogénique agressif (Almog et al. 2009). A l'inverse, une faible expression d'endocan est révélée caractéristique des clones de phénotype dormant issus des lignées humaines du glioblastome (Satchi-Fainaro et al. 2012). Seftor et coll., étaient les premiers à démontrer qu'endocan est associé au processus du mimétisme vasculaire. Durant ce processus, les cellules cancéreuses acquièrent un phénotype endothélioïde pour former des structures tubulaires pseudovasculaires (Maniotis et al. 1999; Seftor et al. 2002; Hendrix et

al. 2003; Ricci-Vitiani et al. 2010). En effet, endocan était l'un des gènes les plus surexprimés (44 fois) *in vitro* dans le mélanome agressif malin comparativement au mélanome non agressif (Seftor et al. 2002).

## 5. Endocan et Tip cells

Récemment, un lien a été établi entre endocan et les Tip cells. Dans trois modèles animaux de néovascularisation rétinienne chez les rongeurs, l'ARNm d'endocan est apparu comme un des gènes les plus surexprimés au niveau des Tip cells (del Toro et al. 2010; Recchia et al. 2010; Strasser et al. 2010). De plus, une légère expression a été observée au niveau des Stalk cells.

Del Toro et coll. ont pu démontrer pour la première fois qu'endocan est capable de se lier à la surface des Stalk cells via un récepteur pas encore connu. Ceci suggère qu'endocan est sécrété par les Tip cells et agit sélectivement sur les Stalk cells pour réguler leur comportement au cours de l'angiogenèse. L'expression d'endocan au niveau de ces Tip cells est régulée par le VEGF-A (del Toro et al. 2010). En effet, l'injection intraoculaire du VEGFR1 soluble abolit complètement l'expression d'endocan par les Tip cells (del Toro et al. 2010).

Chez l'homme, des analyses en immunohistochimie réalisées sur des cellules endothéliales issues du cancer invasif de la vessie montrent une surexpression d'endocan au niveau des filopodes des Tip cells (Roudnicky et al. 2013).

## 6. Fonctions d'endocan

Les fonctions attribuées à endocan restent pour le moment assez mal connues. Sa nature protéoglycanique indique une certaine dichotomie fonctionnelle attribuée de manière distincte à la partie glycanique ou à la partie protéique.

### ➤ Action mitogène du dermatane sulfate d'endocan

Endocan participe à la régulation de la prolifération épithéliale induite par les facteurs de croissance. L'HGF/SF (Hepatocyte Growth Factor/Scatter Factor) peut se fixer sur endocan avec une constante d'affinité de  $6,6 \times 10^{-9}$  M (Bécharde et al. 2001a). Cette fixation forte est dite monophasique, c'est à dire qu'il n'y a qu'un seul site de liaison de l'HGF/SF sur endocan, requérant la présence de l'acide iduronique. L'HGF/SF induit une augmentation de la

prolifération de cellules épithéliales HEK293 (Human Embryonic Kidney 293). Alors qu'endocan tout seul n'a aucun effet mitogène sur la lignée HEK293, son incubation avec le HGF/SF amplifie l'effet proliférateur de ce dernier, de manière similaire à l'héparine. Cette activité comitogène d'endocan est strictement dépendante de la présence du dermatane sulfate d'endocan. *In vitro*, l'incubation de HGF/SF avec le dermatane sulfate seul reproduit entièrement l'activité comitogène d'endocan (Bécharde et al. 2001a). Parallèlement, le polypeptide d'endocan dénué de son dermatane sulfate (mutant humain non glycosylé endocan/S137A), était incapable de promouvoir la prolifération des cellules HEK293.

➤ **Action chimiotactique du dermatane sulfate d'endocan sur les cellules endothéliales**

Endocan est capable d'induire la migration des cellules endothéliales. *In vitro*, le silencing d'endocan dans les HUVECs ou les LECs abolit la migration induite par VEGF-A (Shin et al. 2008; Roudnicky et al. 2013). D'une manière intéressante, l'addition d'endocan recombinant restaure la migration des cellules endothéliales, ce qui suggère qu'endocan agit d'une manière exocrine (Shin et al. 2008). Récemment il a été démontré qu'endocan induit la migration des cellules endothéliales via une activité chimiotactique (Yu et al. 2013). Ces auteurs ont montré que cette activité est portée par la chaîne glycanique. Contrairement à la forme glycosylée, l'incubation du mutant humain non glycosylé endocan/S137A en chambre de Boyden n'induit pas la migration des HMECs.

➤ **Action protumorale liée à sa chaîne glycanique**

*In vivo*, dans un modèle de xénogreffe de tumeur humaine chez des souris immunodéficientes SCID (Severe Combined Immuno Deficiency), endocan a montré une activité tumorigène (Scherpereel et al. 2003). En effet, endocan promeut le développement d'une tumeur à cellules HEK-293 non tumorigènes et accélère le développement d'une tumeur à cellules HT-29 tumorigènes. Cette propriété protumorale d'endocan est portée par sa chaîne glycanique puisque le mutant humain non glycosylé endocan/137A était incapable d'induire une tumeur dans le modèle d'HEK-293 (Scherpereel et al. 2003). Outre sa chaîne glycanique, le polypeptide d'endocan semble également jouer un rôle car la mutation de la phénylalanine 116 abolit la croissance tumorale des HEK293 induite par endocan, malgré la présence du dermatane sulfate.

➤ **Contrôle de la réaction inflammatoire par le protéoglycane endocan**

Endocan pourrait intervenir dans le contrôle du recrutement leucocytaire en tant que compétiteur de l'ICAM-1 dans l'interaction LFA-1 (Lymphocyte Function associated antigen-1)/ICAM-1 (Bécharde et al. 2001b). En effet, Bécharde et coll. ont démontré *in vitro* qu'endocan est capable de se fixer aux lymphocytes, aux monocytes ainsi qu'à des lignées lymphoblastoïdes humaines tels que Jurkat et SI-B1. La liaison physique avec la famille des intégrines  $\beta 2$ , molécules membranaires présentes à la surface de ces cellules, a été confirmée par la coimmuno-précipitation du LFA-1 et d'endocan (Bécharde et al. 2001b). La constante d'affinité de cette liaison est de  $18,7 \times 10^{-9}$  M. D'une manière intéressante, endocan se lie à LFA-1 via un site de liaison distincte de celui d'ICAM-1. Cependant, cette liaison inhibe à 64 % la fixation de l'ICAM-1 sur le LFA-1. Ceci suggère que la liaison endocan/LFA-1 induit un changement conformationnel qui empêche la fixation d'ICAM-1.

Par ailleurs, il a été montré *in vivo* que l'augmentation du taux circulant d'endocan est associée à la diminution de l'adhérence des leucocytes à la cellule endothéliale dans un modèle d'inflammation chez le rat (Tissier et al. 2004).

Ces études suggèrent que dans un contexte inflammatoire, endocan pourrait induire une activité anti-inflammatoire en inhibant les phénomènes d'adhérence leucocytaire qui passent par la voie du LFA-1, et par conséquent en inhibant le recrutement des leucocytes vers les sites inflammatoires.

L'implication de ce mécanisme d'action dans le développement d'une tumeur n'a pas été jusqu'à présent démontrée. Mon travail de thèse a permis de mettre en évidence l'implication potentielle de ce mécanisme.



## CHAPITRE IV : OBJECTIFS DE LA THESE

---

L'endocan humain est un protéoglycane circulant surexprimé dans les vaisseaux tumoraux de la plupart des tumeurs solides. Son expression par les Tip cells ainsi que sa capacité à se fixer sur les Stalk cells et à induire la migration endothéliale lui confèrent un rôle dans l'angiogenèse. De plus, plusieurs modèles de xénogreffe chez les souris immunodéficientes SCID ont permis d'établir formellement l'activité pro-tumorale de l'endocan humain, porté principalement par sa chaîne glycanique.

Afin de pouvoir disséquer les mécanismes sous-jacents à cette activité pro-tumorale, mon travail de thèse s'est intéressé à l'endocan murin, qui, avant ce travail, n'était connu qu'à travers sa séquence nucléotidique.

Le gène d'endocan murin a été cloné au sein du laboratoire et révèle une structure génomique similaire à celle de l'endocan humain avec trois exons hautement conservés (entre 61 et 81,7%). L'ARNm unique d'endocan murin code pour une protéine mature de 165 acides aminés, et présente 75% d'homologie avec l'endocan humain. Le polypeptide est composé d'une région N-terminale riche en cystéine, une région riche en phénylalanine (<sup>113</sup>FPFFQY) et un site consensus de O-glycosylation en sérine 138.

Mes travaux de recherche ont été divisés en deux parties :

**Le chapitre I** a eu pour objectif principal la caractérisation biochimique et fonctionnelle d'endocan murin. Nous avons montré que l'endocan murin est aussi un protéoglycane de type chondroïtine sulfate. Mais contrairement à son homologue humain, l'endocan murin n'est que partiellement glycosylé. Dans des modèles animaux nous avons eu la surprise de constater que l'endocan murin exhibait une activité anti-tumorale, opposée à son homologue humain, porté principalement par la forme non glycosylée d'endocan. Les mécanismes impliqués ne semblaient pas être supportés par une action sur les cellules tumorales mais plutôt vers une régulation de la réaction inflammatoire stromale par l'endocan.

**Le chapitre II** a eu pour objectif principal de comprendre quelle(s) différence(s) structurale(s) pouvait(aient) rendre compte d'une glycosylation variable de l'endocan murin. Les résultats indiquent qu'une combinaison de séquences peptidiques codées par l'exon 1 et l'exon 2 gouvernent la glycosylation d'endocan.

---

## **PARTIE II : RESULTATS**

---

## CHAPITRE I :

---

### Effet de la perte de la chaîne glycanique d'endocan sur sa propriété tumorale

---

## MATERIELS ET METHODES :

### *Culture cellulaire*

Les lignées HEK-293 (Human embryonic kidney 293), HT-29 (Human colon adenocarcinoma), A549 (human lung adenocarcinoma), EL-4 (mouse lymphoma cell line), NIH3T3 (mouse embryonic fibroblast cell line), K1000 (human FGF-2-transfected NIH3T3) et B16F10 (mouse melanoma) sont cultivées dans un milieu DMEM (Gibco, USA) contenant 10% SVF décomplémenté et 2 mM L-glutamine. La lignée CHO-DG44 (Chinese Hamster Ovarian) est cultivée en milieu  $\alpha$ -MEM (Gibco) avec 10 % SVF décomplémenté et 2 mM L-glutamine. Les cellules sont incubées à 37 °C dans un environnement à 5 % CO<sub>2</sub>.

### *Expression d'endocan humain et murin*

Les transfections transitoires des lignées HEK293, HT-29, A549, CHO-DG44, B16F10 et NIH3T3 par le vecteur pcDNA3.1 exprimant le gène d'endocan humain ou murin sont réalisées par l'agent transfectant FUGEN-6 (Promega, USA). Après 48 h, le surnageant de différentes lignées transfectées est récupéré, centrifugé, filtré à 0,2 $\mu$  pour l'ultérieure immunoprécipitation. Les lignées HEK293 qui expriment stablement l'endocan murin WT, l'endocan humain WT et l'endocan humain non glycosylé « endocan/S137A » ont été déjà établies dans le laboratoire (Béchar et al. 2001a). L'endocan murin non glycosylé « endocan/S138A », est obtenu par mutagenèse dirigée selon les modalités décrites par le fabricant (PCR with the Quick-Change site directed mutagenesis, Agilent technologies, USA). La transfection stable des lignées HEK293, HT29, K1000 et A549 par l'endocan/S137A ou l'endocan/S138A est réalisée par une transfection transitoire suivie d'une sélection avec l'agent G418 (350  $\mu$ g/mL) (Gibco). Des étapes de sous clonage sont effectuées par dilution limite afin de cribler les clones qui produisent les protéines en quantités très élevées.

L'endocan/S137A est produit par les cellules HEK293 cultivées en milieu de culture dépourvu de sérum veau fœtal (SFM) et dans des bioréacteurs CL1000 (IBS Integra Bioscience, Switzerland) (Adam et al. 2008). Le surnageant de culture est récupéré et conservé à -20 °C avant purification.

### ***Caractérisation d'endocan murin***

***Chromatographie d'échange d'anion*** : Les surnageants des lignées HEK-293 surexprimant l'endocan humain ou murin sont passés sur une colonne de diéthylaminoethyl DEAE / ou Q sepharose de 0.2 cm x 1.3 cm (Biorad, France). La fraction retenue par la colonne est éluée avec un gradient NaCl allant de 0 à 1 M. Les fractions éluées d'endocan sont dosées en ELISA et ensuite analysées en Western blot.

Digestion enzymatique par la chondroitinase ABC: les fractions d'endocan éluées par la colonne de DEAE sépharose sont digérées avec 1 unité/mL de chondroitinase ABC (Sigma, USA) pendant toute la nuit à 37 °C.

### ***Immunoprécipitation d'endocan***

L'immunoprécipitation d'endocan à partir des surnageants de différentes lignées cellulaires et du sérum de 4 souches murines, est réalisée à l'aide d'anticorps monoclonal MEP14 couplés à des billes d'agarose (Lunginnov, France). Les billes MEP14-agarose sont lavées au préalable avec un tampon MgCl<sub>2</sub> (4 M) et puis ont subi trois lavages successifs avec du PBS/anti-protéases. Les surnageants cellulaires et les sérums murins sont ensuite incubés avec les billes MEP14-agarose pendant la nuit à 4°C et sous agitation. Après incubation les billes MEP14-agarose sont centrifugées et lavées 3 fois avec du tampon PBS/ 0,5% NP40/anti-protéases, puis trois fois avec du tampon PBS/anti-protéases. Endocan est ensuite élué avec 50µL du bleu charge 2X. Les éluats sont analysés ensuite en Western blot en condition non réduite (-DTT). L'injection de l'anticorps monoclonal GGR237 en intrapéritonéal augmente la concentration sérique d'endocan de 8 à 10 fois. Cette propriété de GGR237 a été utilisée afin de pouvoir doser la concentration d'endocan circulant chez les 4 souches murines.

### ***ELISA d'endocan murin***

La concentration d'endocan murin dans le sérum et les surnageants cellulaires est déterminée par ELISA de type sandwich selon les modalités décrites par le fabricant (DIYEK M1, Lunginnov). Deux anticorps monoclonaux dirigés contre l'endocan murin sont utilisés : MEP14 et GGR237 biotinylé. MEP14 (5 ng/μL) est adsorbé sur des microplaques 96 puits pendant une nuit à 4 °C. Les puits sont ensuite lavés trois fois et saturés d'1h en tampon ELISA (PBS, 0,1 mM EDTA, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween20). Dans chaque puits, des dilutions au demie en tampon ELISA sont réalisées pour le standard (10 ng/mL à 0 ng/mL), les surnageants cellulaires ou les sérums. L'anticorps de détection GGR237 biotinylé dilué au 1/5000 en tampon ELISA NaCl (2,5 M) est déposé en coincubation pendant toute la nuit sous agitation constante. Les puits sont ensuite lavés 3 fois et incubés pendant 30 minutes avec une solution de stréptavidine-HRP dilué au 1/10000 (Invitrogen, France). Après une nouvelle série de 3 lavages, la révélation est induite par ajout du TMB (Interchim, France). La réaction est stoppée par ajout de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N). La densité optique est mesurée en spectrométrie en longueur d'onde de 450 nm.

### ***ELISA d'endocan humain***

La concentration d'endocan humain dans le sérum et le surnageants cellulaires est déterminée par ELISA de type sandwich selon les modalités décrites par le fabricant (DIYEK H1, Lunginnov). Deux anticorps monoclonaux dirigés contre l'endocan humain sont utilisés : MEP14 et MEC15 biotinylé. MEP14 (100 μL à 5 ng/μL) est adsorbé sur des microplaques 96 puits pendant une nuit à 4 °C. Les puits sont ensuite lavés trois fois et saturés d'1h en tampon ELISA (PBS, 0,1 mM EDTA, 0,1 % BSA, 0,1 % Tween20). Dans chaque puits, des dilutions au demie en tampon ELISA sont réalisées pour le standard (10 ng/mL), les surnageants cellulaires ou les sérums. Après 1 h d'incubation, les puits sont lavés et incubés avec l'anticorps de détection MEC15 biotinylé dilué au 1/10000 en tampon ELISA pendant 1 heure et sous agitation constante. Les puits sont ensuite lavés 3 fois et incubés pendant 30 minutes avec une solution de stréptavidine-HRP dilué au 1/10000 (R&D, France). Après une nouvelle série de 3 lavages, la révélation est induite par ajout du TMB (Interchim, France). La réaction est stoppée par ajout de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (2N). La densité optique est mesurée en spectrométrie en longueur d'onde de 450 nm.

## ***Western blot***

Les polypeptides issus de l'immunoprécipitation d'endocan sont séparés par électrophorèse sur gel SDS à 15% d'acrylamide, en conditions non réduites, puis transférés sur membranes de nitro-cellulose (Hybond ECL, Amersham, Germany). Après une étape de saturation en PBS, 0,1% Tween 20, 5% lait, les membranes sont incubées avec l'anticorps monoclonal MEP14 marqué à la peroxydase (1/10000) (Lunginnov). L'anticorps est incubé pendant 2 h à température ambiante ou pendant la nuit à 4 °C. Après 4 lavages en tampon PBS, 0,1% Tween, la membrane est révélée par chimioluminescence (ECL detection kit, Pierce). Les échantillons non issus d'immunoprécipitation, sont analysés en conditions réduite (+0,1 M DTT) et non réduite (-DTT).

## ***Purification d'endocan/S137A recombinant***

Le surnageant des lignées HEK293 cultivées en bioréacteurs CL1000 et surexprimant l'endocan/S137A recombinant est purifié en deux étapes. Un premier enrichissement est réalisé à l'aide d'une colonne d'échange d'anion de 2 x 5 cm (Capto Q GE Healthcare). La colonne est préalablement équilibrée en tampon Tris 20 mM pH 8 et ensuite chargée en surnageant. Ensuite la colonne est lavée avec un tampon Tris 20 mM pH 8. L'endocan/S137A fixé par la colonne est élué par un gradient NaCl allant de 0 à 1 M dans du tampon Tris 20 mM, pH 8. Les fractions récoltées sont dosées en ELISA pour vérifier la présence d'endocan. Dans la deuxième étape, les fractions éluées sont chargées sur une colonne d'immuno-affinité MEP14 préalablement équilibrée en tampon Tris 50 mM, NaCl 0,2 M pH 8. L'élution d'endocan /S137A est réalisée avec un tampon MgCl<sub>2</sub> 4 M. La pureté d'endocan/S137A est vérifiée sur un gel SDS-PAGE en condition réduite (+ 0,1 M DTT) ou non réduite (- DTT), suivi d'une coloration au nitrate d'argent.

## ***Test de prolifération / viabilité cellulaire***

La prolifération et la survie cellulaire de la lignée HT-29 sont mesurées respectivement par l'incorporation du BrdU et par réduction du MTT. Les cellules sontensemencées dans un milieu complet, à une densité de  $0,5 \times 10^4$  cellule/puit d'une plaque de 96 puits. Après 24 h de sevrage dans un milieu dépourvu du sérum de veau foetal, les cellules sont soumises à des traitements par des concentrations croissantes (1 ng/mL à 1 µg/mL) d'endocan recombinant

(humain ou murin) glycosylé ou non glycosylé (endocan/S137A, endocan/S138A). La mitomycine (100 ng/mL) est utilisée comme contrôle positif. Après 24 h de traitement, l'incorporation de BrdU et la réduction du MTT sont performés selon les modalités décrites par le fabricant.

### ***Modèle de tumeur xénogénique***

Le modèle de tumeur xénogénique utilisé est établi comme décrit précédemment (Scherpereel et al. 2003). Des lignées spontanément tumorigènes ( $0.25 \times 10^6$  cellules HT-29,  $10^6$  cellules A549,  $10^5$  cellules K1000) et non tumorigènes ( $10^6$  cellules HEK293) sont injectées en sous cutanée au niveau du flanc latéral droit à des souris CB-17 *scid/scid* homozygotes (mâles, âgés de 5 à 6 semaines). Les cellules injectées sont resuspendues dans 200  $\mu$ L de PBS. Le volume tumoral est mesuré une fois par semaine et les souris sont mises à mort lorsque la taille de la tumeur dépasse un diamètre de 1 cm<sup>3</sup>. Toutes les procédures ont été validées par le comité d'éthique de l'Institut Pasteur de Lille et réalisées en conformité avec les principes d'éthiques français et européens.

### ***Administration d'endocan/S137A***

Le traitement des souris par l'endocan/S137A est réalisé par des pompes osmotiques (Alzet, Cupertino, USA), capables de retenir un volume de 200  $\mu$ L et qui fonctionnent pendant une durée de 4 semaines. Les souris SCID sont injectées en sous cutanée au niveau du flanc latéral droit avec des lignées HT-29. Une semaine avant l'implantation des cellules HT-29, les souris SCID reçoivent en position dorsale des pompes osmotiques chargées en endocan/S137A ou PBS. Le volume tumoral est mesuré une fois par semaine et les souris sont mises à mort lorsque la taille de la tumeur dépasse un volume de 1 cm<sup>3</sup>.

Pour la pharmacocinétique d'endocan/S137A, des prélèvements sanguins ( $V=100 \mu$ L) par ponction retro-oculaire sont réalisés une fois par semaine. Le taux d'endocan circulant est ensuite dosé en ELISA.

### ***Déplétion des leucocytes CD122<sup>+</sup> in vivo***

Pour la déplétion des leucocytes CD122+ *in vivo*, 400  $\mu$ g de l'anticorps TM $\beta$ 1 (anti-mouse CD122) sont injectés en intra-péritonéal, gracieusement offerts par Dr. Toshiyuki TANAKA

(Université d'OSAKA, Japan). Les souris contrôles sont injectées avec 400 µg de l'isotype contrôle (IgG2b de rat), gracieusement offert par Dr. Jamal Khalife (Institut Pasteur de Lille). La déplétion des leucocytes CD122+ est vérifiée par l'absence des cellules NKP46+/CD3- dans la rate des souris sentinelles à jours 1, 19 et 42. Les souris présentant un pourcentage de cellules NKP46+/CD3- < à 2 % sont considérées comme déplétées. Un jour après l'administration de l'anticorps TMβ1, les souris SCID sont injectées en sous cutanée avec  $0,25 \times 10^6$  cellules HT-29 surexprimant l'endocan/S137A ou le vecteur contrôle.

### ***Coupe histologique des tumeurs HT-29***

Les souris SCID sont mises à mort lorsque le volume de la tumeur atteint  $1 \text{ cm}^3$ . Une analyse macroscopique est réalisée sur la tumeur et les différents organes afin de déceler la présence de métastases. Ensuite la tumeur est récoltée, fixée par une solution AFA (contenant de l'éthanol, du formol et de l'acide acétique) (LaboNord, Templemars, France) et imprégnée dans la paraffine. Le bloc de paraffine contenant la tumeur est ensuite débité en coupe de  $3 \text{ µm}$  d'épaisseur. Les tranches de paraffine obtenues sont colorées avec l'hématoxyline éosine.



## RESULTATS :

### **Endocan murin est un protéoglycane de type chondroïtine sulfate secrété sous forme glycosylée et non glycosylée**

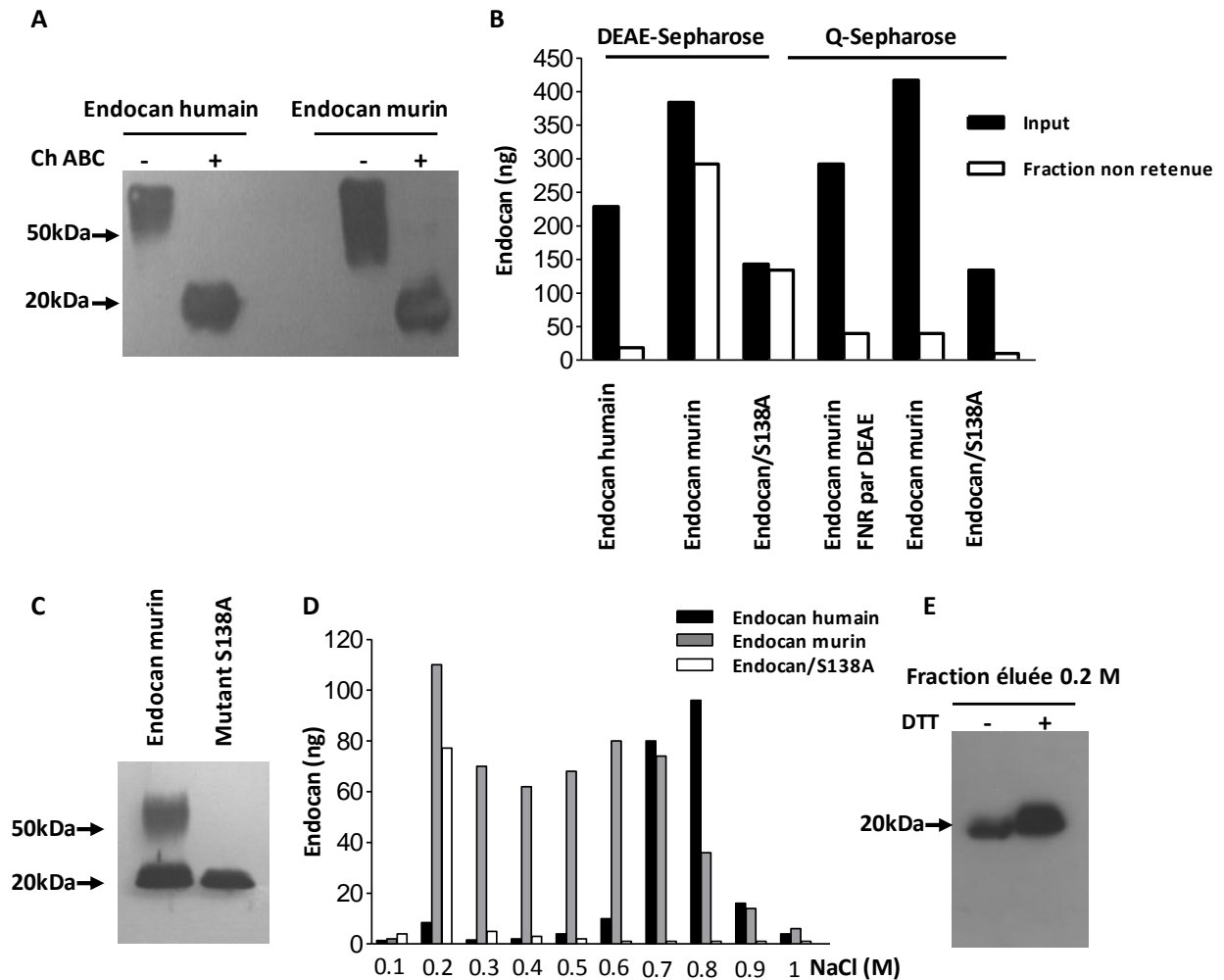
Dans la première partie, nous avons voulu faire une caractérisation biochimique simple et comparative d'endocan murin. Les surnageants de la lignée HEK293 surexprimant l'endocan humain et murin sont chargés sur la colonne de DEAE sépharose. La fraction d'endocan murin retenue par la colonne de DEAE est détectée à une bande à 50 kDa identique à celle de l'endocan humain (Fig. 1A). Suite à la digestion enzymatique par la chondroïtinase ABC, le poids moléculaire apparent d'endocan murin passe de 50 kDa à 20 kDa, cohérent avec le poids moléculaire apparent du corps protéique (Fig. 1A). Endocan murin est donc un protéoglycane de type chondroïtine sulfate.

Une première surprise a été de constater qu'endocan murin présente un comportement différent de celui de l'endocan humain sur la colonne de DEAE. Contrairement à l'endocan humain qui se fixe complètement sur cette colonne, l'endocan murin ne se fixe que très partiellement. Une proportion importante est aussi détectée dans la fraction non retenue (Fig. 1B). L'analyse en Western blot du surnageant brut d'endocan murin révèle la présence d'une bande de 50 kDa et d'une deuxième bande de 20 kDa (Fig. 1C). La bande de 20 kDa d'endocan murin est similaire à celle du mutant murin non glycosylé, endocan/S138A. La bande de 50 kDa correspond alors à la forme glycosylée fixée par colonne de DEAE et la bande de 20 kDa correspond au core protéique.

Ensuite, pour séparer les deux formes d'endocan murin, nous avons utilisé une colonne de plus grande affinité, la colonne de Q-sépharose. La fraction non retenue par la colonne de DEAE ainsi que les surnageants des lignées HEK293 surexprimant l'endocan murin et le mutant murin non glycosylé endocan/S138A sont passés sur la colonne de Q-sépharose. Contrairement à la colonne de DEAE, la colonne de Q-sépharose est capable de tout fixer : endocan murin glycosylé et non glycosylé (Fig. 1B). Une très faible quantité d'endocan est détectée dans la fraction non retenue. Ensuite, l'élution a été réalisée en utilisant un gradient croissant de NaCl. L'endocan humain et le mutant murin non glycosylé endocan/S138A sont utilisés comme contrôles de la forme glycosylée et non glycosylée

respectivement. L'endocan humain est élué majoritairement à 0,7 M NaCl alors que le mutant murin non glycosylable endocan/S138A est élué à 0,2 M NaCl.

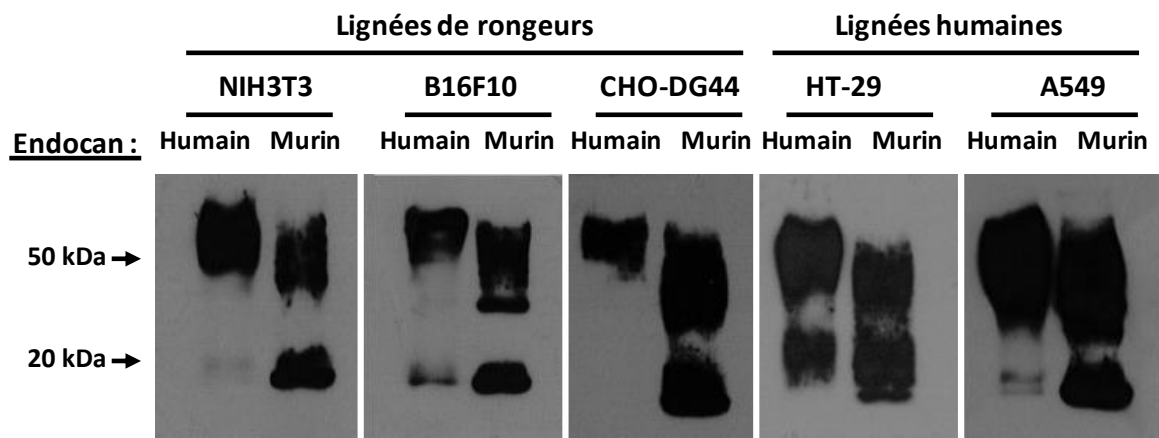
L'endocan murin est élué en deux pics majeurs, le premier à 0,2 M NaCl et le deuxième à 0,6-0,7 M NaCl (Fig. 1D). L'analyse en Western blot de la fraction éluée à 0,2 M NaCl montre une bande de 20 kDa cohérent avec le poids moléculaire de la forme non glycosylée (Fig. 1E).



**Figure 1 : Caractérisation biochimique d'endocan murin.** (A) Les surnageants de la lignée HEK293 surexprimant l'endocan humain et murin sont chargés sur la colonne de DEAE sépharose. La fraction retenue est digérée par la chondroitinase ABC et analysée en western blot avec l'anticorps monoclonal MEP14 HRP en condition non réduite (- DTT). (B) Analyse du profil d'élué de la colonne de DEAE et Q sépharose. Les surnageants chargés ainsi que les fractions non retenues par les deux colonnes sont dosés en ELISA (humaine ou murine). (C) Western blot en condition non réduite du surnageant brut d'endocan murin WT et du mutant murin non glycosylé endocan/S138A. (D) Profil d'élué d'endocan humain, d'endocan murin et d'endocan/S138A de la colonne de Q sépharose. Les différents surnageants sont chargés sur la colonne de Q sépharose et sont élués avec un gradient croissant de NaCl (0,1 à 1 M NaCl). (E) Analyse en western blot sous condition réduite (+ 0,1 M DTT) et non réduite (- DTT) de la fraction d'endocan murin éluée à 0,2 M de NaCl. FNR : Fraction Non Retenue.

## Le déficit de glycosylation d'endocan murin est indépendant de la cellule hôte

Par la suite, nous avons voulu vérifier si ce déficit de glycosylation observé chez l'endocan murin est lié à la cellule hôte utilisée pour la transfection. Pour cela, nous avons procédé à une série de transfections transitoires d'endocan humain et murin dans deux lignées humaines (HT-29 et A549) et trois lignées de rongeurs (B16F10, NIH3T3 et CHO-DG44). L'immunoprécipitation des surnageants des différentes lignées cellulaires montre que quelque soit le type cellulaire utilisé, endocan murin est toujours présent à la fois sous forme glycosylée et non glycosylée (Fig. 2).

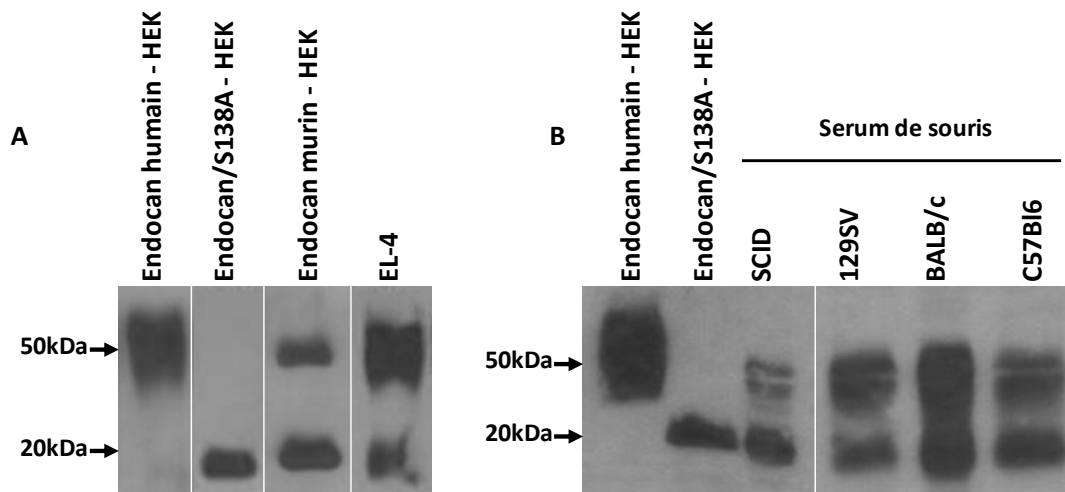


**Figure 2 : Caractérisation d'endocan murin dans différentes lignées cellulaires.** Immunoprécipitation suivie d'un western blot d'endocan à partir de surnageants des différentes lignées humaine et murines surexprimant l'endocan humain et murin. Endocan a été immunoprécipité par des billes MEP14-agarose et révélé en western blot avec l'anticorps monoclonal MEP14 HRP. Les échantillons sont analysés en conditions non réduites.

## Les deux formes d'endocan murin sont aussi observées au niveau naturel et endogène

Ensuite, nous avons voulu vérifier si l'endocan murin naturel manifeste aussi une telle variabilité de glycosylation. Parmi les lignées murines disponibles au laboratoire, nous avons trouvé que lignée lymphoïde murine EL-4 était capable de sécréter spontanément endocan. L'immunoprécipitation d'endocan dans le surnageant de cette lignée, révèle la présence à la fois d'une forme glycosylée (50 kDa) et non glycosylée (20 kDa) (Fig. 3A).

Pour confirmer ce résultat, nous avons réalisé une immunoprécipitation des sérums de 4 souches murines (SCID, 129Sv, Balb/C et C57Bl6). De la même manière, les résultats montrent la présence simultanée des deux formes (Fig. 3B). En conclusion, ces résultats confirment la présence d'une forme glycosylée et non glycosylée d'endocan murin à la fois au niveau recombinant, naturel ou endogène.

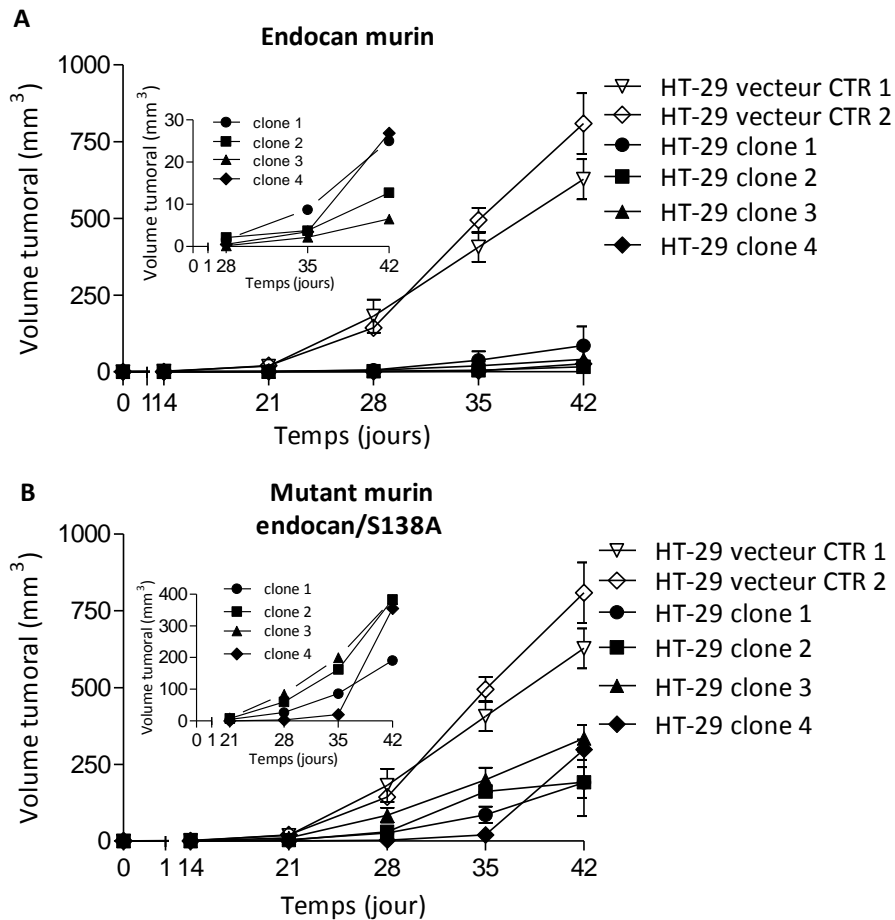


**Figure 3 : Caractérisation d'endocan murin endogène.** (A) Immunoprécipitation suivie d'un western blot d'endocan murin à partir de surnageant de la lignée HEK293 surexprimant l'endocan murin et le surnageant de la lignée murine EL-4 et (B) dans le sérum de 4 souches murines : SCID, SV129, BALB/c et C57Bl6. Endocan a été immunoprécipité par des billes MEP14-agarose et révélé en western blot avec l'anticorps monoclonal MEP14 HRP. Les échantillons sont analysés en conditions non réduites.

### Endocan murin ralentit la croissance tumorale

Par analogie au modèle de xéno greffe qui a permis d'étudier l'activité pro-tumorale d'endocan humain, nous avons voulu étudier la propriété tumorale d'endocan murin. Les cellules HT-29 spontanément tumorigènes et surexprimant l'endocan murin ou le vecteur contrôle sont injectées à des souris SCID. D'une manière surprenante, les cellules HT-29 surexprimant endocan montrent un retard d'apparition et un ralentissement de la croissance de la tumeur par rapport aux souris témoins porteuses de tumeur HT-29 (Fig. 4A). Chez les souris témoins, les tumeurs commencent à se développer au delà du 21<sup>ème</sup> jour avec une vitesse de croissance atteignant un volume de 1 cm<sup>3</sup> vers la septième semaine. Cependant, les souris surexprimant l'endocan murin, commencent à développer des

tumeurs de quelques mm<sup>3</sup> au début de la sixième semaine. Cet effet a été observé pour quatre clones distincts d'HT-29 sécrétant des taux similaires d'endocan murin (22; 20; 28; 33 ng/24h/10<sup>6</sup> cellules). Ces résultats révèlent un effet anti-tumoral d'endocan murin.



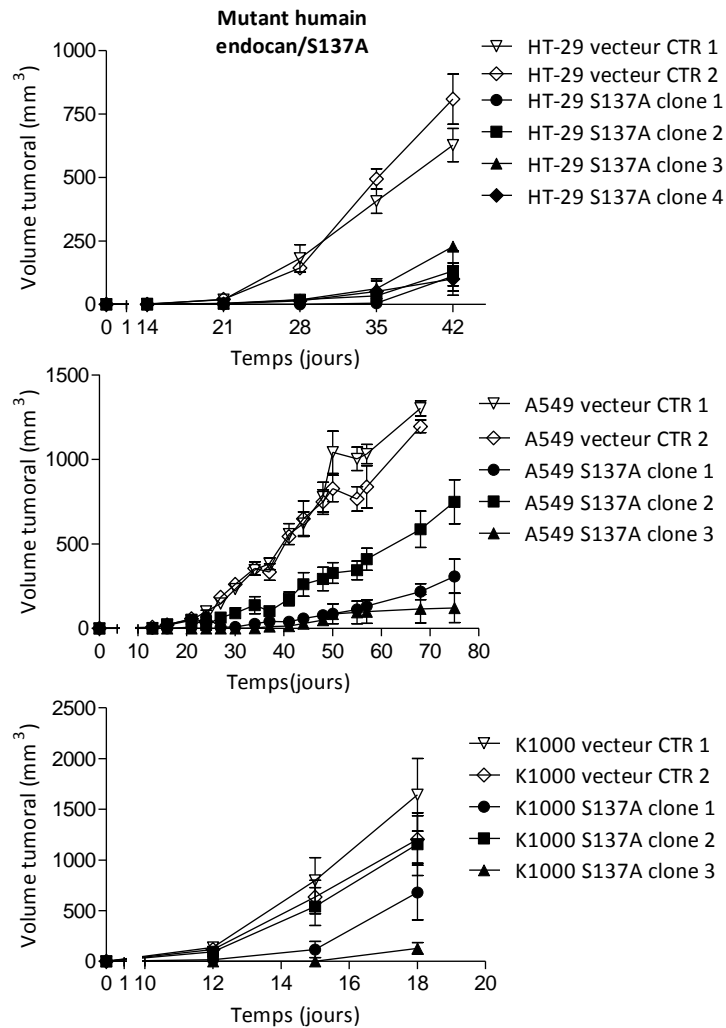
**Figure 4 : Caractérisation de la propriété tumorale d'endocan murin.**

**(A)** Les souris SCID sont injectées en sous cutanées avec la lignée HT-29 surexprimant l'endocan murin WT et **(B)** le mutant murin non glycosylé endocan/S138A (n=4/groupe). Les souris contrôles sont injectées avec la lignée HT-29 exprimant le vecteur vide. Quatre clones distincts HT-29 surexprimant l'endocan murin WT et l'endocan/S138A sont testés. Le volume tumoral est mesuré une fois/semaine.

## **La forme non glycosylée d'endocan supporte cette propriété anti-tumorale**

Sachant que la chaîne glycanique d'endocan humain est nécessaire pour induire une activité pro-tumorale, nous avons voulu tester si le corps protéique d'endocan pouvait exercer une activité opposée. La surexpression du mutant non glycosylé endocan/S138A dans les cellules HT-29, génère des tumeurs à croissance ralentie par rapport aux tumeurs à cellules HT-29 contrôles (Fig. 4B). Pour conforter ce résultat, nous nous sommes demandés si le mutant humain non glycosylé endocan/S137A ne pouvait pas générer le même type de résultat. D'une manière similaire, les souris surexprimant le mutant endocan/S137A montrent une croissance retardée de la masse tumorale par rapport aux souris témoins (Fig. 5A).

Ensuite, nous avons voulu vérifier si cet effet anti-tumoral du polypeptide endocan s'applique à d'autres lignées tumorigènes. La surexpression du mutant non glycosylé endocan/S137A dans les lignées A549 et K1000 a provoqué en une apparition tardive de la masse tumorale associée à une croissance plus lente par rapport aux souris témoins (Fig. 5B, C). Cet effet est observé pour deux clones parmi trois d'A549 et K1000. Ces résultats suggèrent que le polypeptide d'endocan murin ou humain exerce un effet anti-tumoral dans plusieurs modèles de xéno greffes.



**Figure 5 : Caractérisation de la propriété tumorale de la forme non glycosylée d'endocan humain.** Les souris SCID sont injectées en sous cutanés avec des lignées spontanément tumorigènes (A) HT-29 (n=4/groupe), (B) A549 (n=5/groupe) et (C) K1000 (n=4/groupe) surexprimant le mutant humain non glycosylé endocan/S137A. L'effet tumoral d'endocan/S137A a été étudié pour 4 clones distincts d'HT-29 et pour 3 clones distincts de K1000 et d'A549 produisant des taux similaires d'endocan.

### Relation de causalité entre l'endocan non glycosylé circulant et la croissance tumorale retardée

Nous avons voulu savoir si le polypeptide d'endocan était bien responsable de la croissance tumorale retardée observée dans les expériences précédentes. Pour cela nous avons évalué l'effet d'une administration systémique du mutant non glycosylé endocan/S137A à des souris porteuses d'une tumeur HT-29.

Dans une première partie, nous avons mesuré la concentration d'endocan/S137A circulant dans le sang des souris SCID porteuses de tumeurs HT-29 surexprimant l'endocan/S137A ou le vecteur contrôle. D'une manière intéressante, les taux d'endocan/S137A augmentent parallèlement avec la taille de la tumeur (Fig. 6A). En effet, le taux circulant d'endocan/S137A atteint des concentrations supérieures à 20 ng/mL. De la figure 6A, nous avons considéré la concentration de 20 ng/mL d'endocan/S137A comme la concentration minimale efficace. A cette concentration, la différence de taille des tumeurs induites par HT-29 surexprimant endocan/S137A ou vecteur contrôle est maximale.

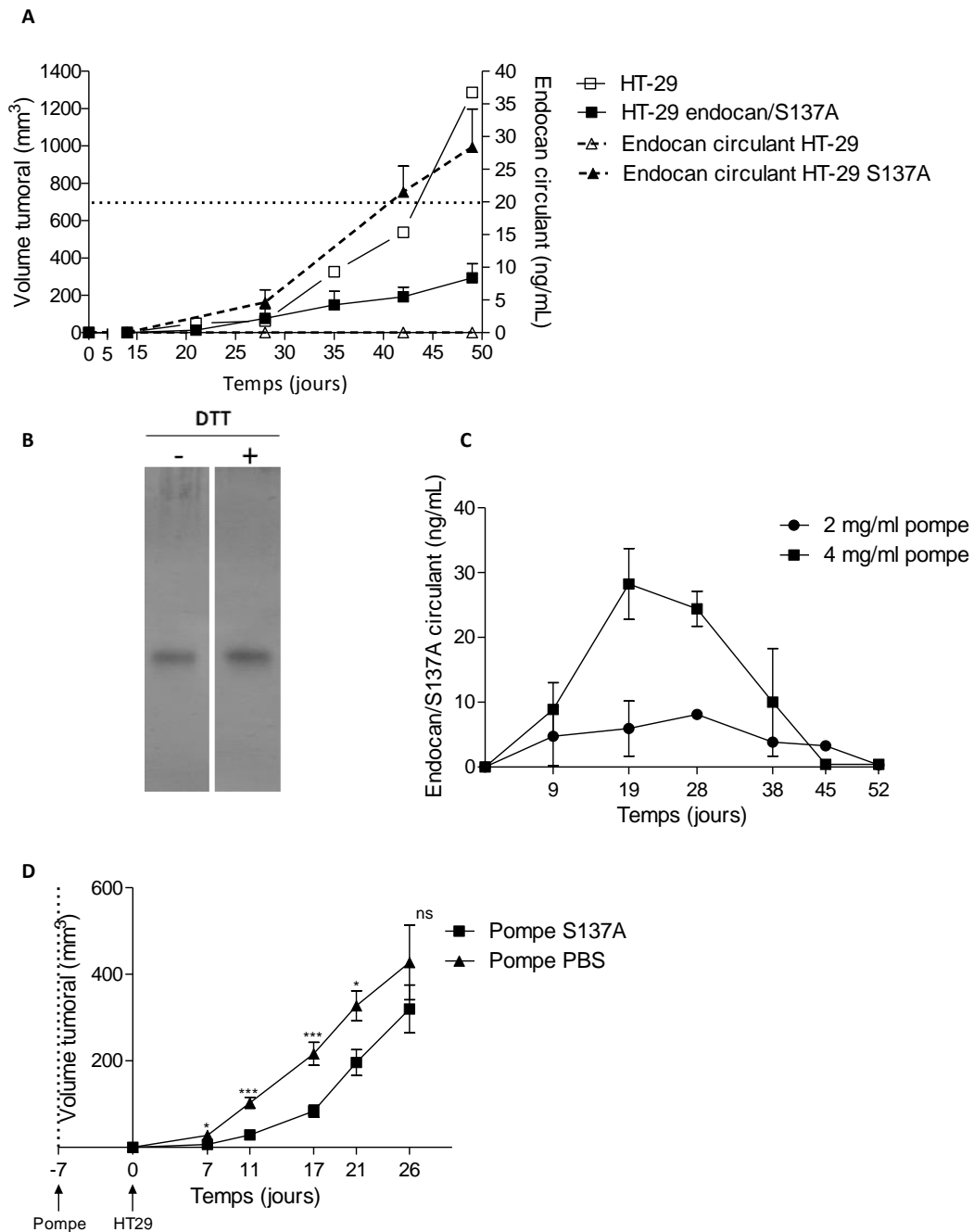
L'endocan/S137A est ensuite produit et purifié pour l'ultérieure administration. L'analyse sur gel SDS-Page de l'endocan/S137A recombinant montre une pureté supérieure à 95% (Fig. 6B).

Ensuite, nous avons réalisé une cinétique de stabilité d'endocan/S137A afin de pouvoir maintenir une concentration circulante de 20 ng/mL. Des pompes osmotiques chargées avec deux concentrations d'endocan/S137A (2 mg/mL et 4 mg/mL) sont injectées à des souris SCID. De la figure 6C, on peut constater, qu'avec la concentration de 2 mg/mL, le taux circulant d'endocan/S137A est aux alentours de 10 ng/mL. Cependant, la concentration de 4 mg/mL d'endocan/S137A est capable de maintenir une concentration de 20 ng/mL. Néanmoins, un délai de quelques jours semble être nécessaire pour atteindre le seuil de 20 ng/mL (Fig. 6C).

Nous avons finalement évalué l'effet d'une perfusion d'endocan/S137A à des souris porteuses d'une tumeur HT-29. Les pompes osmotiques chargées de 4 mg/mL d'endocan/S137A ou du PBS sont injectées une semaine avant l'implantation des lignées HT-29. D'une manière intéressante, les souris traitées avec de l'endocan/S137A montrent un ralentissement significatif de la croissance tumorale par rapport aux souris traitées avec du PBS (Fig. 6D). Cet effet est observé jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour de l'implantation des cellules HT-29 et qui correspond normalement au 28<sup>ème</sup> jour du durée de vie de la pompe.

Ces résultats suggèrent une relation de causalité entre le polypeptide d'endocan et le ralentissement de la croissance tumorale.

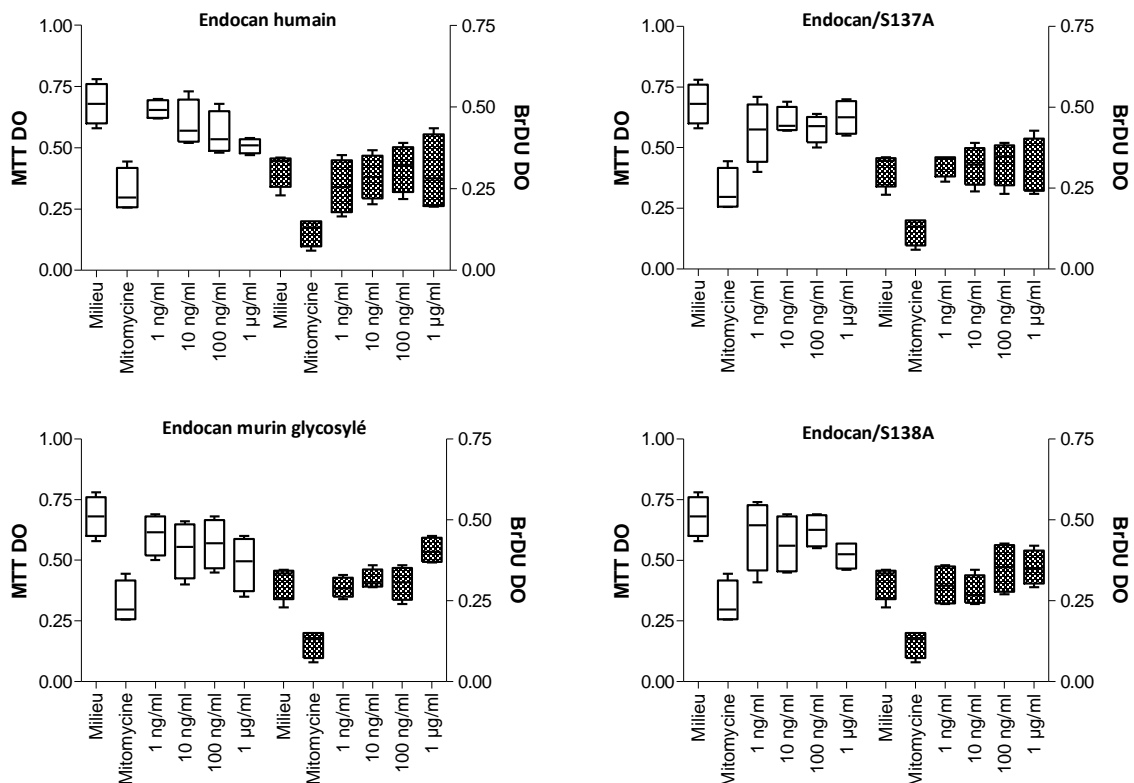




**Figure 6 : Mise en évidence d'une relation de causalité entre la forme non glycosylée d'endocan et la croissance tumorale retardée.** (A) Les souris SCID sont injectées par la lignée HT-29 contrôle (n=1) ou surexprimant l'endocan/S137A (n=3). Les taux sériques d'endocan/S137A sécrété par la tumeur sont dosés une fois /semaine en ELISA (humaine). (B) La pureté d'endocan/S137A est vérifiée en gel SDS-PAGE sous condition réduite (0,1 M DTT) et non réduite, suivie d'une coloration au nitrate d'argent. (C) La cinétique de stabilité d'endocan/S137A est étudié par injection chez des souris SCID des pompes osmotiques chargées par deux concentrations d'endocan/S137A : 2 mg/mL et 4mg/mL (n=2/groupe). Le taux d'endocan/S137A circulant est dosé en ELISA une fois/semaine. (D) Les souris SCID sont injectées avec des pompes osmotiques chargées avec 4 mg/mL d'endocan/S137A (n=8) ou du PBS (n=4). Une semaine après l'implantation des pompes les souris sont injectées avec la lignée HT-29 et le volume tumoral est mesuré une fois/semaine. \* : p<0,05, \*\* : p<0,01, \*\*\* : p<0,001.

## L'endocan non glycosylé n'affecte ni la prolifération ni la viabilité des cellules HT-29

Pour comprendre le mode d'action d'endocan non glycosylé, nous avons étudié son effet direct sur la prolifération et la viabilité des lignées HT-29. On peut constater sur la figure 8 que le mutant endocan/S137A ainsi que le mutant endocan/S138A n'altèrent pas la prolifération ni la viabilité des lignées HT-29. De plus, aucune différence n'est observée lorsqu'on compare l'effet de la forme glycosylée (humaine et murine) et non glycosylée (mutant humain et murin) sur la prolifération et la viabilité des lignées HT-29 (Fig. 7). Ces résultats suggèrent que le polypeptide d'endocan n'a pas d'action directe sur la prolifération des cellules tumorales.



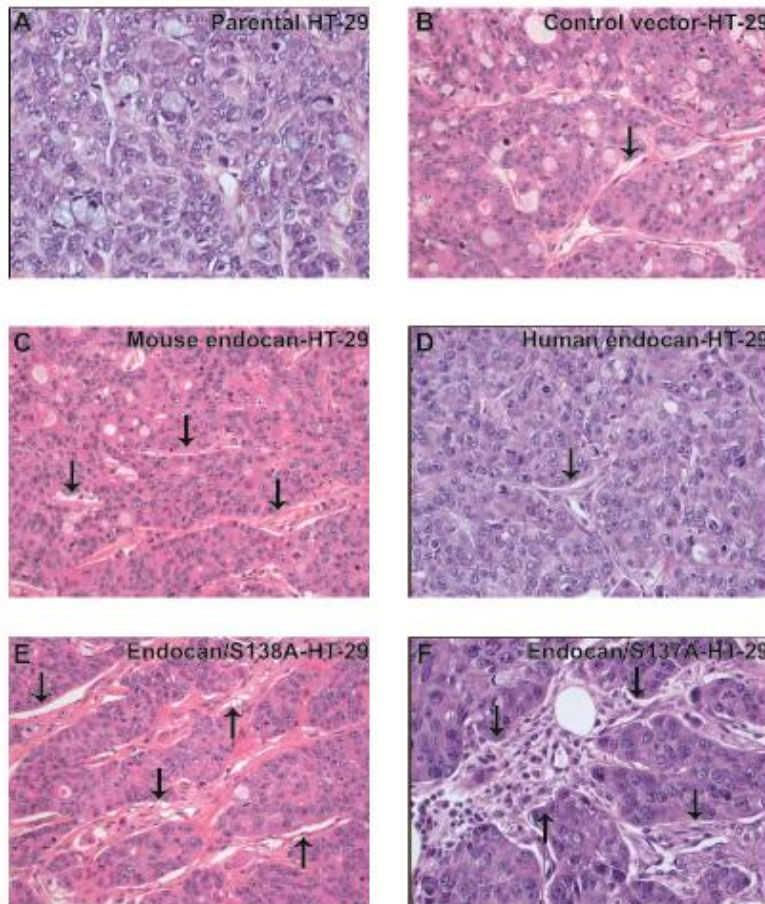
**Figure 7 : Effet de la forme non glycosylée d'endocan sur la prolifération et la viabilité cellulaire d'HT-29.** Les lignées HT-29 sont traitées pendant 24 heures avec des concentrations croissantes d'endocan glycosylé (humain et murin ; graphe du côté gauche) et non glycosylé (humain S137A et murin S138A ; graphe du côté droit). Les rectangles blancs représentent la densité optique liée au test de viabilité cellulaire (MTT). Les rectangles hachés représentent la densité optique liée au test de prolifération cellulaire (BrDU). La mitomycine à 100µg/mL est utilisée comme contrôle positif. Les traits du haut, du milieu et du bas des rectangles blancs et hachés correspondent aux 25, 50 et 75 percentiles. La ligne verticale montre la plage des valeurs comprises entre 5 et 95 percentiles.

## **Participation des leucocytes CD122+ dans la propriété anti-tumorale d'endocan non glycosylé**

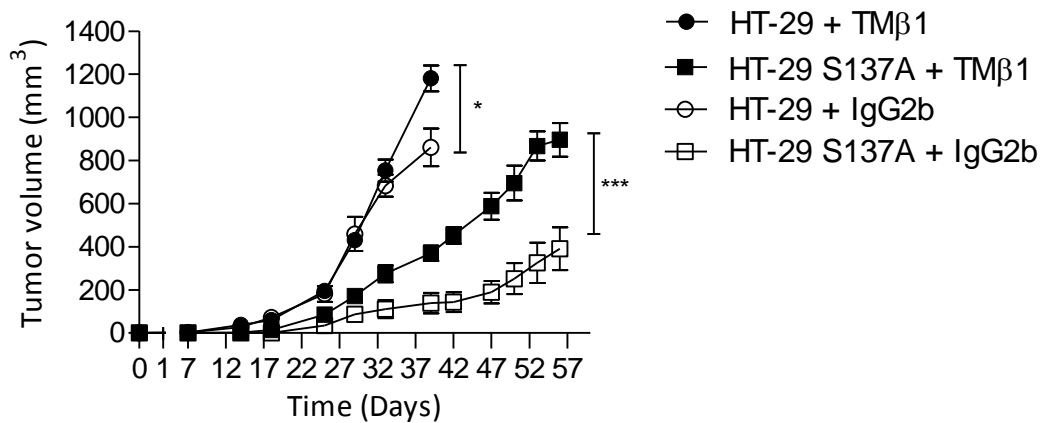
Pour comprendre le mécanisme d'action d'endocan non glycosylé, nous avons réalisé des analyses pathologiques des tumeurs HT-29 surexprimant l'endocan humain ou murin (WT, mutant non glycosylable). Au niveau macroscopique, toutes les souris recevant les lignées HT-29 développent des tumeurs locales sans aucune invasion métastatique. Au niveau microscopique, le pourcentage des zones nécrotiques ne diffèrent pas entre les différents types de tumeurs. D'une manière intéressante, on peut constater que les tumeurs HT-29 surexprimant l'endocan murin WT ou les mutants non glycosylé (S137A, S138A) montrent une réaction inflammatoire stromale (Fig. 8C, E, F) comparativement aux tumeurs HT-29 parentales ou surexprimant le vecteur vide ou l'endocan humain WT (Fig. 8A, B, D). En effet, une infiltration pan-leucocytaire (comprenant les macrophages, les cellules mono et polynucléaires) est observée à la périphérie et au sein de la tumeur. Ces observations évoquent une association entre le polypeptide d'endocan et la réaction inflammatoire stromale.

Ensuite, nous avons voulu savoir si cette réaction inflammatoire stromale pourrait être impliquée dans la propriété anti-tumorale d'endocan non glycosylé.

Pour ce faire, nous avons évalué l'effet de la déplétion des leucocytes exprimant le récepteur IL2R- $\beta$  (CD122 : exprimé par toutes les cellules NK) sur la croissance tumorale. Les leucocytes CD122+ des souris SCID sont déplétés par administration de l'anticorps TM $\beta$ 1 (anti-CD122). La déplétion dure pendant 5 semaines et est vérifiée par l'absence des cellules NKP46+/CD3- au niveau de la rate des souris sentinelles. D'une manière intéressante, la déplétion des leucocytes CD122+ abolit partiellement l'effet du mutant non glycosylé endocan/S137A (Fig. 9). En présence de l'anticorps TM $\beta$ 1, les cellules HT-29 surexprimant l'endocan/S137A voient leur croissance s'accélérer. Cet effet est spécifique à l'anticorps TM $\beta$ 1 puisque le traitement des souris avec l'isotype contrôle (IgG2b) n'affecte pas la propriété d'endocan/S137A. De plus, l'effet de l'anticorps TM $\beta$ 1 est plus prononcé sur les cellules HT-29 surexprimant l'endocan/S137A par rapport aux cellules HT29 contrôle. Ces résultats suggèrent que les leucocytes CD122+ pourraient être une voie par laquelle l'endocan non glycosylé exerce son effet anti-tumoral.



**Figure 8 : Analyse pathologique des tumeurs HT-29 surexprimant endocan.** Coupe histologique de la tumeur (A) HT-29 parentale et transfectée par (B) le vecteur contrôle (C) l'endocan murin WT (D) l'endocan humain WT (E, F) les mutants non glycosylés S138A et S137A. Les différentes coupes sont colorées à l'hématoxyline éosine.



**Figure 9 : Effet tumoral de la forme non glycosylée d'endocan chez les souris SCID déplétées en leucocytes CD122+.** Les souris SCID sont injectées avec 400 µg d'anticorps TMβ1 (anti-CD122+ de souris) ou 400 µg de l'isotype contrôle (IgG2b de rat). Après 24 heures, les souris sont injectées avec des lignées HT-29 contrôles ou surexprimant le mutant humain non glycosylé endocan/S137A (n=6/groupe).

## CHAPITRE II :

### Comprendre le déficit de glycosylation observé chez l'endocan murin

## MATERIELS ET METHODES

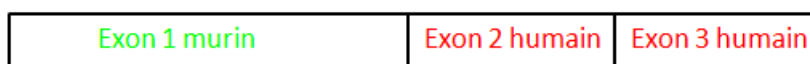
### *Construction chimérique et transfection*

Les cellules HEK293 sont transfectées avec des constructions chimériques composées de combinaisons des exons humains et murins d'endocan. Les différents fragments sont amplifiés par PCR en utilisant des couples d'amorces spécifiques : des amorces avec des sites de restriction Hind III en 5' ou Not I en 3' et des amorces à bouts francs (Eurofins, France). Les fragments amplifiés par PCR sont ensuite digérés avec les enzymes de restriction Hind III et Not I (New England Biolabs) et purifiés sur colonne de silice (Nucleospin gel and PCR Clean-up, Macherey-Nagel, France). Les bouts francs sont soudés entre eux par l'enzyme T4 DNA ligase (New England Biolabs, France). Ensuite une nouvelle PCR est réalisée pour amplifier le fragment soudé. Le produit de PCR amplifié, vérifié sur gel d'agarose 1%, digéré par les enzymes de restriction Hind III et Not I, purifié sur colonne de silice, puis intégré dans le vecteur pcDNA3.1 ouvert Hind III et Not I. Les bactéries E.Coli TOPO10 (Invitrogen, France) sont ensuite transformées avec le vecteur contenant l'insert et sélectionnées par résistance à l'ampicilline. Après amplification bactérienne et purification plasmidique, les séquences obtenues sont vérifiées par séquençage SANGER (Genoscreen, France).

La transfection transitoire des lignées HEK293 est réalisée en utilisant l'agent transfectant FUGEN-6 (Promega, USA), selon les instructions du fournisseur. Après 48 h, le surnageant des lignées transfectées est récupéré, centrifugé, filtré à 0,2 µm, puis stocké à -20°C jusqu'à immunoprécipitation.

#### **Liste des amorces :**

1) Construction **Exon 1 murin** \_\_ **Exon2 et 3 humain** :



Amorce sens (Exon1 Hind III) : ataaagcttGGAGCTGAGCAGGAGCCAGCT

Amorce anti-sens (Exon1) : TTTGCAGATACCAAACCTCGTC

Amorce sens (Exon2) : GACTGTCCCTACGGCACCTTC

Amorce anti-sens (Exon3 Not I) : atagcggccgcATGCTATATCTAGAAAGTTCC

2) Construction **Exon 1 humain\_\_ Exon2 et 3 murin** :



Amorce sens (Exon1 Hind III) : ataAAGCTTGAGCCGAGCCGGAGGCAGCTG

Amorce anti-sens (Exon1) : TTTGCAGATACCAAACCTCTTC

Amorce sens (Exon2) : GACTGTCCCTATGGCACCTTC

Amorce anti-sens (Exon3 Not I) : atagcggccgcCTTAAAATGTTGGCTGAATGT

3) Construction **Exon 1 humain\_\_ Exon 2 murin\_\_ Exon 3 humain** :



Amorce sens (Exon1 Hind III) : ataaagcttGAGCCGAGCCGGAGGCAGCTG

Amorce anti-sens (Exon1) : TTTGCAGATACCAAACCTCTTC

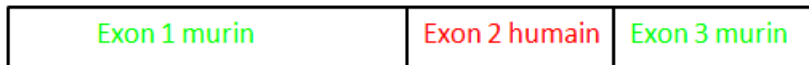
Amorce sens (Exon2) : GACTGTCCCTATGGCACCTTC

Amorce anti-sens (Exon2) : CAGGACCTCTGCCTCCACAC

Amorce sens (Exon3) : GAAGAAGTTGTGAAAGAGAAT

Amorce anti-sens (Exon3 Not I) : atagcggccgcATGCTATATCTAGAAAGTTCC

4) Construction **Exon 1 murin\_\_ Exon 2 humain\_\_ Exon 3 murin** :



Amorce sens (Exon1 Hind III) : ataaagcttGGAGCTGAGCAGGAGCCAGCT

Amorce anti-sens (Exon1) : TTTGCAGATACCAAACCTCGTC

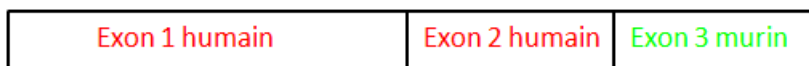
Amorce sens (Exon2) : GACTGTCCCTACGGCACCTTC

Amorce anti-sens (Exon2) : TGAGAGAAACAAATCTGTTGG

Amorce sens (Exon3) : GAAGAGATTGGAGAAGGGAAC

Amorce anti-sens (Exon3 Not I) : atagcggccgcCTTAAAATGTTGGCTGAATGT

5) Construction **Exon 1 et 2 humain\_\_ Exon 3 murin** :



Amorce sens (Exon1 Hind III) : ataaagcttGAGCCGAGCCGGAGGCAGCTG

Amorce anti-sens (Exon2) : TCTACAATATTGCCATCTCC

Amorce sens (Exon3) : GAAGAGATTGGAGAAGGGAAC

Amorce anti-sens (Exon3 Not I) : atagcggccgcCTTAAAATGTTGGCTGAATGT

## 6) Construction Exon 1 et 2 murin\_\_Exon3 humain :

Exon 1 murin	Exon 2 murin	Exon 3 humain
--------------	--------------	---------------

Amorce sens (Exon1 Hind III) : ataaagcttGGAGCTGAGCAGGAGCCAGCT

Amorce anti-sens (Exon2) : TCTCACAGCGTTGCCATCTCC

Amorce sens (Exon3) : GAAGAAGTTGTGAAAGAGAAT

Amorce anti-sens (Exon3 Not I) : atagcggccgcATGCTATATCTAGAAAGTTCC

### ***Génération de mutants d'endocan humain et murin***

Les différents mutants d'endocan humain (M135S, PSNG/FYSE) et murin (S136M, FYSE/PSNG,) sont obtenus par mutagenèse dirigée selon les modalités décrites par le fournisseur du kit QuickChange Site directed mutagenesis (Stratagene, France). Des amorces spécifiques sont désignées et utilisées en PCR pour l'amplification des différents mutants.

#### **Listes des amorces :**

##### **1) Murinisation d'endocan humain : mutation de méthionine 135 en sérine**

###### **Méthionine en sérine**

CTCACGGAGCATGACATGGCATCTGGAGATGGC

Amorce sens: CTC ACG GAG CAT GAC **TCT** GCA TCT GGA GAT GGC

Amorce anti-sens:GCC ATC TCC AGA TGC **AGA** GTC ATG CTC CGT GAG

##### **2) Murinisation d'endocan humain : mutation de la séquence PSNG humaine en FYSE murine**

###### **Proline en Phénylalanine**

GGGCTGAGGTGTCAG**CCT**TCTAATGGGGAGGAT

Amorce sens : GGGCTGAGGTGTCAG**TTT**TCTAATGGGGAGGAT

Amorce anti-sens : ATCCTCCCCATTAGAA**AA**CTGACACCTCAGCCC

###### **Sérine en Tyrosine**

CTGAGGTGTCAG**TTT**TCTAATGGGGAGGATCCT

Amorce sens : CTGAGGTGTCAG**TTT**TCTAATGGGGAGGATCCT

Amorce anti-sens : AGGATCCTCCCCATT**GTA**AAACTGACACCTCAG

### Asparagine en Sérine

AGGTGTCAGTTT **TACAAT**GGGGAGGATCCTTTT

Amorce sens : AGGTGTCAGTTTTACT**TCT**GGGGAGGATCCTTTT

Amorce anti-sens : AAAAGGATCCTCCCC**AGA**GTAAACTGACACCT

### Glycine en Acide glutamique

TGTCAGTTTTACT**TCTGGG**GAGGATCCTTTTGGT

Amorce sens : TGTCAGTTTTACT**TCTGAA**GAGGATCCTTTTGGT

Amorce anti-sens : ACCAAAAGGATCCT**TTC**CAGAGTAAACTGACA

### 3) Humanisation d'endocan murin : mutation de la sérine 136 en méthionine

#### Sérine en méthionine

CACACAGAGCGTGACT**CA**GCATCCGGAGATGGC

Amorce sens : CACACAGAGCGTGAC**ATG**GCATCCGGAGATGGC

Amorce anti-sens : GCCATCTCCGGATGC**CAT**GTCACGCTCTGTGTG

### 4) Humanisation de l'exon 1 murin : mutation de la séquence FYSE murine en PSNG humaine

#### Phénylalanine en Proline

GGGCTGAAGTGTCAC**TTTT**TACAGCGAGGAGGAT

Amorce sens : GGGCTGAAGTGTCAC**CCCT**TACAGCGAGGAGGAT

Amorce anti-sens : ATCCTCCTCGCTGTAG**GGG**GTGACACTTCAGCCC

#### Tyrosine en Sérine

CTGAAGTGTCAC**CCCTAC**AGCGAGGAGGATGAT

Amorce sens: CTGAAGTGTCAC**CCCTCT**AGCGAGGAGGATGAT

Amorce anti-sens: ATCATCCTCCTCGCT**AGA**GGGGTGACACTTCAG

#### Sérine en Asparagine

CTGAAGTGTCAC**CCCTCTAGC**GAGGAGGATGATTTT

Amorce sens : AAGTGTCAC**CCCTCTGAC**GAGGAGGATGATTTT

Amorce anti-sens : AAAATCATCCTCCT**GTC**CAGAGGGGTGACACTT

#### Acide glutamique en Glycine

TGTCAC**CCCTCTGACGAG**GAGGATGATTTTGGT

Amorce sens: TGTCAC**CCCTCTGACGGC**GAGGATGATTTTGGT

Amorce anti-sens: ACCAAAATCATCCT**CGCC**GTCAGAGGGGTGACA



## ***Clonage des gènes endocan de chien, de cheval et de porc***

Les gènes d'endocan du chien, du cheval et du porc ont été clonés à partir d'une banque d'ADNc complémentaire de chaque espèce. Le cDNA d'endocan a été amplifié par PCR avec des amorces contenant des sites de restriction Hind III en 5' et EcoR I en 3'. Une fois le gène amplifié, le produit de PCR est purifié sur colonne de silice et ensuite digéré par les enzymes de restriction Hind III et EcoR I. Le produit de PCR est ensuite cloné dans un vecteur pcDNA3.1 (+) codant pour la partie constante humaine de l'IgG1 (Fc). La chimérisation avec la région Fc était nécessaire puisqu'on ne dispose pas des anticorps spécifiques qui reconnaissent l'endocan des différentes espèces étudiées. L'intégration de l'insert dans le vecteur pcDNA3.1 nécessite la linéarisation préalable du vecteur via les enzymes de restrictions Hind III et EcoR I. Les amorces contenant le site de restrictions EcoRI sont désignées d'une manière à respecter le cadre de lecture après chimérisation entre la séquence d'endocan et la région Fc humaine d'IgG1 (Immunoglobulin G1). Les bactéries E.Coli TOPO10 (Invitrogen, France) sont ensuite transformées avec le vecteur contenant l'insert et sélectionnées par résistance à l'ampicilline. Les séquences obtenues sont vérifiées par séquençage SANGER (Genoscreen, France) et transfectées dans les lignées HEK293.

### **Liste des amorces :**

#### **Endocan de porc :**

Amorce sens (Hind III): ataaagcttGCCGCGGGAAACATGAAGAGC

Amorce anti-sens (EcoR I) : GAGAGaattccACCGCGTGGATTTAACCACTTCAT

#### **Endocan de cheval:**

Amorce sens (Hind III) : ataaagcttAAACATGAAGAGCCTGTTGCT

Amorce anti-sens (EcoR I) : GAGAGaattccACCGCGGGGATTTAACCATTTCAT

#### **Endocan du chien :**

Amorce sens (Hind III) : ataaagcttCGGGGAGACATGAAGAGCCTC

Amorce anti-sens (EcoR I) : GAGAGaattccACCGCGAGGATTTAACCATTTCATT

## ***Immunoprécipitation***

L'immunoprécipitation des différentes constructions chimériques ainsi que des différents mutants d'endocan est réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal MEP14 couplé à des billes d'agarose. Le protocole d'immunoprécipitation a déjà été expliqué dans le chapitre 1. Les endocan-Fc du porc, du cheval et du chien sont immunoprécipités à l'aide d'anticorps anti-Fc humain (IgG de chèvre) couplés à des billes d'agarose (Sigma, France). Les différentes étapes de lavage et d'élution sont identiques au protocole d'immunoprécipitation précédent.

## ***Western blot***

- *Polypeptide issu de l'immunoprécipitation des constructions chimériques et des mutants d'endocan*

Les constructions chimériques et les mutants d'endocan sont séparés par électrophorèse sur gel SDS à 15% d'acrylamide, en conditions non réduites, puis transférés sur membrane de nitro-cellulose. Après une étape de saturation en PBS, 0,1% Tween 20, 5% lait, les membranes sont incubées avec l'anticorps monoclonal MEP14 marqué à la peroxydase (1/10000) (LIA-1001, Lunginnov, Lille). L'anticorps est incubé pendant 2 h à température ambiante ou pendant la nuit à 4 °C. Après 4 lavages en tampon PBS, 0,1% Tween, la membrane est révélée par chimioluminescence (ECL detection kit, Pierce).

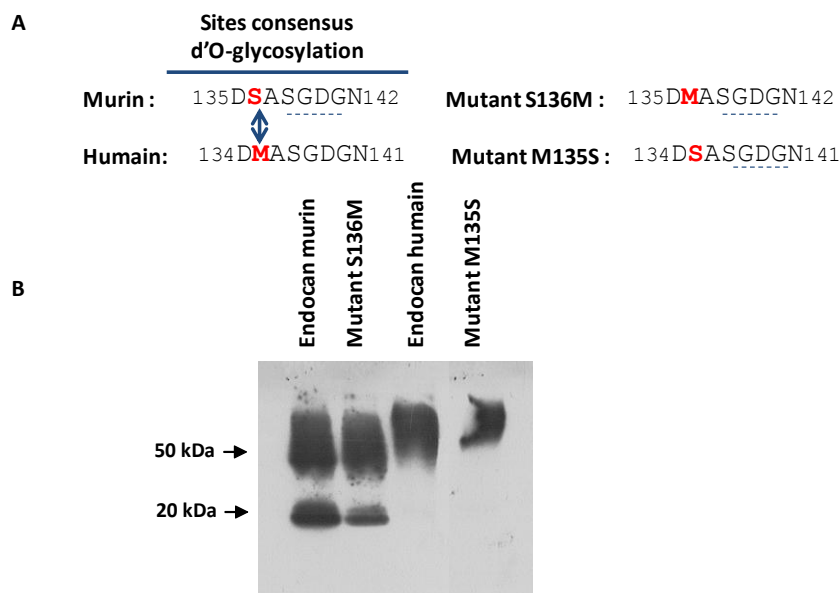
- *Polypeptide issu de l'immunoprécipitation de l'endocan-Fc*

Les endocan-Fc du chien, du cheval et du porc sont séparés par électrophorèse sur gel SDS à 15% d'acrylamide, en conditions réduites, puis transférés sur membranes de nitro-cellulose. Après une étape de saturation en PBS, 0,1% Tween 20, 5% lait, les membranes sont incubées avec l'anticorps polyclonal anti-Fc humain (IgG de chèvre) marqué à la peroxydase (1/25000) (Sigma, France). L'anticorps est incubé pendant 2 h à température ambiante ou pendant la nuit à 4 °C. Après 4 lavages en tampon PBS, 0,1% Tween, la membrane est révélée par chimioluminescence.

## RESULTATS :

### La séquence consensus de O-glycosylation n'est pas impliquée dans la glycosylation d'endocan

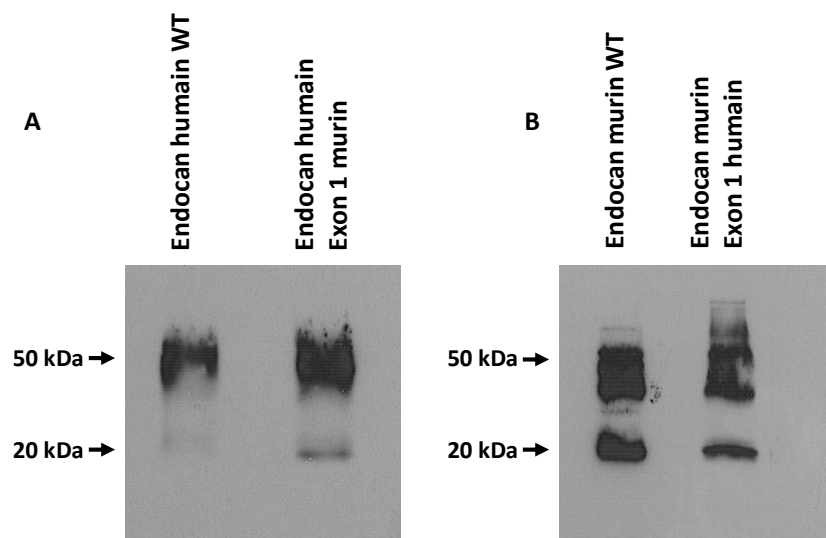
Pour comprendre le déficit de glycosylation observé chez l'endocan murin, nous avons comparé les séquences consensus de O-glycosylation entre l'endocan humain et murin. Un seul acide aminé distingue les deux séquences consensus. La sérine en position 136 d'endocan murin est remplacée par une méthionine. Pour vérifier si cet acide aminé pouvait être impliqué dans la glycosylation, la sérine en position 136 d'endocan murin a été substituée par une méthionine et inversement (Fig. 1A). Les résultats montrent que la substitution de la sérine 136 en méthionine ne change pas la glycosylation d'endocan murin. Deux bandes sont toujours observées et correspondent à la forme glycosylée et non glycosylée (Fig. 1B). De la même manière, la substitution de la méthionine 135 par une sérine n'altère pas la glycosylation d'endocan humain. Une bande de 50 kDa est observée et correspond à la forme glycosylée (Fig. 1B). Ces résultats suggèrent que la séquence consensus de O-glycosylation n'intervient pas dans la glycosylation d'endocan.



**Figure 1 : Effet de la séquence située au voisinage du site consensus de O-glycosylation. (A)** Comparaison de séquences peptidiques entre l'endocan humain et murin. **(B)** Immunoprécipitation suivie d'un western blot de surnageant de la lignée HEK-293 surexprimant l'endocan humain (WT et M135S) et murin (WT, S136M). Endocan est révélé en western blot avec l'anticorps monoclonal MEP14 HRP. Les échantillons sont analysés en conditions non réduites.

## La séquence peptidique codée par l'exon 1 est impliquée dans la glycosylation d'endocan

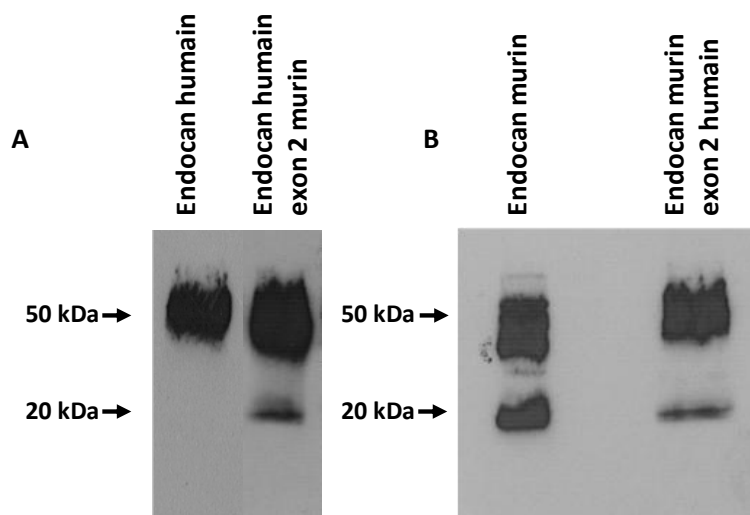
Ensuite, nous avons voulu étudier l'effet des autres domaines du corps protéique sur la glycosylation d'endocan. Les zones codantes pour les deux endocans humain et murin sont réparties en trois exons très similaires en taille. Tout d'abord, nous avons étudié l'effet de l'exon 1. Pour ce faire, nous avons remplacé l'exon 1 humain par celui du murin et vice versa. D'après la figure 2, nous pouvons constater que l'exon 1 a un effet sur la glycosylation d'endocan. Contrairement à l'endocan humain WT, l'endocan humain ayant l'exon 1 murin est présent à la fois sous forme glycosylée (50 kDa) et non glycosylée (20 kDa) (Fig. 2A). En ce qui concerne l'endocan murin ayant l'exon 1 humain, nous pouvons constater qu'il y a eu une correction partielle de la glycosylation. En effet, chez l'endocan murin ayant l'exon 1 humain, on observe une diminution de la forme non glycosylée par rapport à l'endocan murin WT (Fig. 2B).



**Figure 2 : Effet de l'exon 1 sur la glycosylation d'endocan.** (A) Remplacement de l'exon 1 humain par l'exon 1 murin. (B) Remplacement de l'exon 1 murin par l'exon 1 humain. Les surnageants sont immunoprécipités par des billes MEP14-agarose et analysés en Western blot avec l'anticorps monoclonal anti-endocan MEP14-HRP. Les échantillons sont analysés en conditions non réduites.

## La séquence peptidique codée par l'exon 2 est impliquée dans la glycosylation d'endocan

Ensuite, nous avons voulu étudier l'effet de la séquence peptidique codée par l'exon 2. D'une manière similaire, l'exon 2 humain a été remplacé par celui du murin et inversement. Les résultats montrent que l'exon 2 murin est autant capable d'altérer la glycosylation d'endocan humain (Fig. 3A). En effet, chez l'endocan humain ayant l'exon 2 murin, on constate l'apparition d'une bande non glycosylée. Contrairement à l'exon 2 murin, l'exon 2 humain est capable de corriger partiellement la glycosylation d'endocan murin (Fig. 3B). Le remplacement de l'exon 2 murin par celui de l'humain favorise une augmentation de la forme glycosylée. La bande non glycosylée d'endocan murin ayant l'exon 2 humain est moins importante que celle d'endocan murin WT.

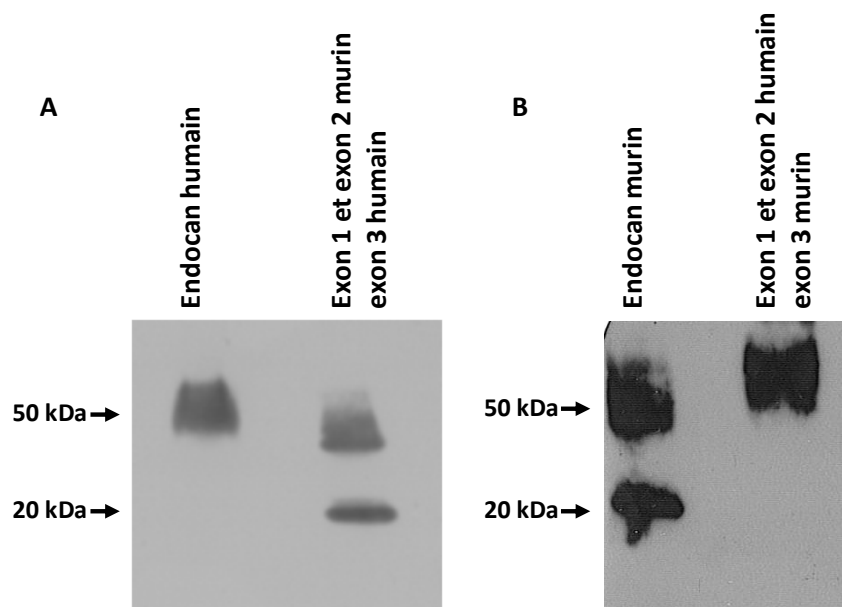


**Figure 3 : Effet de l'exon 2 sur la glycosylation d'endocan. (A)** Remplacement de l'exon 2 humain par l'exon 2 murin. **(B)** Remplacement de l'exon 2 murin par l'exon 2 humain. Les surnageants sont immunoprécipités en bille MEP14-agarose et analysés en Western blot avec l'anticorps monoclonal anti-endocan MEP14-HRP en conditions non réduites.

## La séquence peptidique impliquée dans la glycosylation d'endocan est réparti entre l'exon 1 et l'exon 2

Après avoir étudié l'effet des exons 1 et 2, nous avons voulu étudier l'effet de l'exon 3. L'exon 3 humain a donc été remplacé par l'exon 3 murin et inversement. D'après la figure 4,

on constate que l'exon 3 n'est pas impliqué dans la glycosylation d'endocan. Lorsqu'on compare l'endocan humain WT avec l'endocan humain ayant l'exon 3 murin, on n'observe aucun changement dans la glycosylation. De la même manière, lorsqu'on compare l'endocan murin WT avec l'endocan murin ayant l'exon 3 humain, on ne constate aucun changement de la glycosylation. D'une manière intéressante, les résultats obtenus dans la figure 4 confirment les résultats obtenus dans les figures 2 et 3. En effet, d'après la figure 4 on peut conclure que la présence simultanée des exons 1 et 2 humains est nécessaire pour avoir un profil d'endocan complètement glycosylé. A l'inverse, la présence simultanée des exons 1 et 2 murin est responsable du déficit de glycosylation.



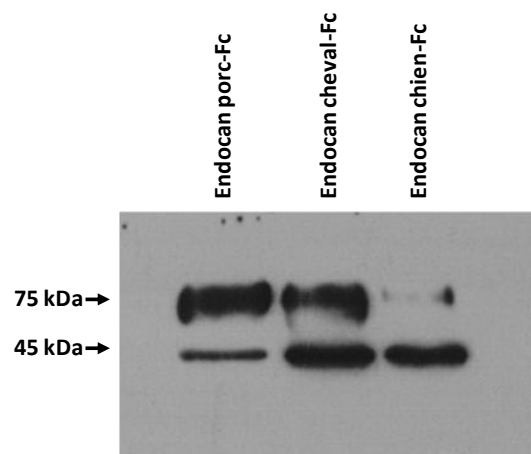
**Figure 4 : Effet de l'exon 3 sur la glycosylation d'endocan. (A)** Remplacement de l'exon 3 murin par l'exon 3 humain. **(B)** Remplacement de l'exon 3 humain par l'exon 3 murin. La figure A, compare l'effet de la présence simultanée de l'exon 1 et de l'exon 2 murin sur la glycosylation d'endocan humain. La figure B, compare l'effet de la présence simultanée de l'exon 1 et de l'exon 2 humain sur la glycosylation d'endocan murin. Les surnageants sont immunoprécipités en bille MEP14-agarose et analysés en Western blot avec l'anticorps monoclonal anti-endocan MEP14-HRP en conditions non réduites.

### **Endocan est présent à la fois sous forme glycosylée et non glycosylée chez différentes espèces**

Ensuite, nous avons voulu déterminer l'état de glycosylation d'endocan chez différentes espèces et établir une banque de séquences peptidiques d'endocan de chacune d'elles. En

effet, la comparaison de la séquence peptidique d'endocan entre les espèces pourrait faciliter l'identification des acides aminés spécifiques impliqués dans la régulation de la glycosylation.

L'immunoprécipitation des surnageants de cellules HEK293 transfectées par l'endocan-Fc du porc, du chien et du cheval montre la présence d'une bande de 75 kDa (50 kDa d'endocan et 25 kDa de Fc), et une bande de 45 kDa (20 kDa d'endocan et 25 kDa de Fc) (Fig. 5). Ces résultats suggèrent que l'endocan de ces différentes espèces possède un déficit de glycosylation similaire à celui de la souris.



**Figure 5 : Etat de glycosylation d'endocan de porc, de cheval et de chien.** Les surnageants de la lignée HEK293 surexprimant l'endocan-Fc de porc, de cheval et de chien est immunoprécipité par des anticorps anti-Fc humain couplés à des billes d'agarose et analysés en Western blot avec l'anticorps polyclonal anti-Fc humain marqué à la peroxydase. Les échantillons sont analysés en conditions réduites.

### **La séquence peptidique PSNG ou FYSE n'est pas impliquée dans la glycosylation d'endocan**

Lors de la comparaison des séquences peptidiques d'endocan de différentes espèces, nous nous sommes intéressés à une séquence peptidique particulière située dans l'exon 1 (Fig. 6). En effet, la séquence PSNG observée chez l'endocan humain est remplacée par une séquence FYSE chez l'endocan de souris, de porc, de cheval et du chien. Nous avons remplacé la séquence PSNG humaine par la séquence FYSE et inversement. D'après la figure 7, on constate que cette région n'a aucun effet sur la glycosylation. La perte de la séquence PSNG n'altère pas la glycosylation d'endocan humain. De plus, le remplacement de la





---

## **PARTIE III : DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

---

## DISCUSSION

Endocan est un protéoglycane circulant dont l'expression est de plus en plus étudiée dans de nombreux cancers humains. Il est surexprimé au niveau de l'endothélium tumoral et est associé au processus du mimétisme vasculaire (Seftor et al. 2002; Grigoriu et al. 2006; Chen et al. 2010; Leroy et al. 2010; Roudnicky et al. 2013). Dans certains cancers, son augmentation dans le torrent circulatoire est associée à un mauvais pronostic (Grigoriu et al. 2006; Huang et al. 2009; Maurage et al. 2009). Son expression au niveau des cellules endothéliales spécialisées « Tip cells », ainsi que son effet sur la migration endothéliales suggèrent son implication dans l'angiogenèse (Shin et al. 2008; Roudnicky et al. 2013; Yu et al. 2013). Par ailleurs, de multiples modèles de xéno greffes associent endocan humain au switch angiogéniques et à une accélération du développement tumoral (Scherpereel et al. 2003; Depontieu et al. 2008; Almog et al. 2009; Satchi-Fainaro et al. 2012).

Alors que la majorité des études décrites ci-dessus s'adressaient à l'endocan humain, très peu d'informations étaient disponibles sur l'endocan murin.

Le présent travail s'est attaché à décrire pour la première fois la structure et la fonction de l'endocan murin.

### **Un 1<sup>er</sup> caractère distinctif de l'endocan murin est lié sa glycosylation variable.**

Si nous démontrons que l'endocan murin est bien un protéoglycane de type chondroïtine sulfate au même titre que l'endocan humain, l'endocan murin est partiellement glycosylé et sécrété à la fois sous forme glycosylée de 50 kDa et non glycosylée de 20 kDa. Ce déficit de glycosylation est indépendant de la cellule hôte utilisée pour la transfection. De plus, ce déficit n'est pas un artefact de la transfection puisque les deux formes d'endocan sont observées aussi bien au niveau naturel (lignée EL-4) qu'au niveau endogène (sérum de quatre souches murines). La biosynthèse de la chaîne O-glycanique est initiée par l'addition d'une amorce tétrasaccharidique [xylose-galactose-galactose-acide glucuronique] sur le résidu sérine du motif Ser-Gly (site de glycosylation). L'élongation de cette amorce s'effectue par ajout successif d'un motif disaccharidique, N-acetyl galactosamine puis acide glucuronique dans le cas du chondroïtine sulfate. Malgré l'abondance du motif Ser-Gly dans les séquences de nombreuses protéines, un nombre très faible de protéines est substitué par une chaîne glycanique (Kokenyesi et Bernfield 1994). De nombreuses études réalisées sur le perlecan et le syndecan suggèrent que la synthèse de la chaîne glycanique est

dépendante des séquences peptiques du corps protéique situées à proximité et à distance du site de O-glycosylation (Kokenyesi et Bernfield 1994; Piepkorn et al. 1997; Romarís et al. 1999). Par exemple, le syndecan-1 est un protéoglycane qui contient des chaînes d'héparane sulfate et une chaîne de chondroïtine sulfate au niveau de la région N-terminale et C-terminale respectivement. Contrairement à la région N-terminale qui est toujours glycosylée, la région C-terminale est variablement glycosylée (Kokenyesi et Bernfield 1994). Kokenyesi et coll. suggèrent que le syndecan-1 ne contient pas la séquence peptidique complète appropriée pour diriger l'attachement invariable de la chaîne de chondroïtine sulfate.

Nos résultats confortent ces observations : le déficit de glycosylation d'endocan murin n'est pas lié à la séquence peptidique située à proximité du site de glycosylation, mais bien en rapport avec des séquences à distance, ces séquences seraient présentes chez l'homme, absentes chez la souris et les autres espèces. De plus, endocan $\Delta$ 2 est secrété aussi sous forme glycosylée et non glycosylée (Depontieu et al. 2008). La perte de la séquence dérivée de l'exon 2 humain modifie la fréquence de substitution du site unique de glycosylation. En effet, cela conforte le concept de Kokenyesi et ses coll. par le fait de l'altération de l'état de glycosylation d'endocan humain suite à la perte des séquences peptiques essentielles du corps protéique. D'après l'ensemble de ces données, on spécule que l'endocan murin contrairement à son homologue humain pourrait ne pas contenir la séquence peptidique appropriée pour une synthèse invariable de la chaîne glycanique. Nous avons pu démontrer qu'une combinaison de séquences peptidiques codées par l'exon 1 et l'exon 2 détermine l'état de glycosylation d'endocan. Bien que les acides aminés précis impliqués dans la détermination de la synthèse d'une chaîne glycanique restent pour le moment inconnus, on peut penser qu'ils pourraient être compris parmi les 12 % d'acide aminés qui distinguent l'exon 1 et 2 de l'endocan humain de ceux de l'endocan murin.

### **Un 2<sup>nd</sup> caractère distinctif de l'endocan murin tient au fait que son expression spontanée est non endothéliale**

Chez la souris adulte saine, l'expression d'endocan est limitée au niveau du rein, de la rate et du poumon. D'une manière surprenante, des analyses d'hybridation in situ montrent que l'expression d'endocan diffère de la distribution du marqueur endothélial CD31 (Abid et al. 2006). Endocan est exprimé majoritairement par les cellules non endothéliales du rein et de

la rate. Dans le poumon, la source cellulaire n'a pas encore été identifiée. Cela suggère que les deux formes glycosylée et non glycosylée observées chez l'endocan murin pourraient être d'origine non endothéliale contrairement à l'endocan humain dont l'expression est exclusivement endothéliale. Dans un contexte pathologique, tel que des modèles de xénogreffe des lignées tumorigènes humaine et murine, une surexpression d'endocan murin a été observée au niveau de l'endothélium tumoral (Abid et al. 2006). Si à l'état physiologique, l'endocan murin serait d'origine non endothéliale, et si à l'état tumoral, son origine deviendrait endothéliale, on se permet de poser les questions suivantes: au sein d'un contexte tumoral, la balance entre les deux formes d'endocan murin penche-t-elle en faveur de la forme glycosylée? Et le microenvironnement de la tumeur est-il capable de réguler la glycosylation d'endocan murin?

**Un 3<sup>ème</sup> caractère distinctif révèle une propriété inattendue du polypeptide endocan *in vivo*.**

Il est largement reconnu que la variation de glycosylation des protéoglycanes est capable d'induire un changement dans leur fonction (Romarís et al. 1999). Nos résultats confortent cette idée : si endocan est glycosylé, il exerce une activité protumorale alors que s'il ne l'est pas, il exerce une activité opposée. D'une manière surprenante, nos données montrent que le corps protéique d'endocan est directement responsable du freinage de la croissance tumorale. Ces résultats suggèrent que la différence d'activité entre l'endocan humain et son homologue murin est bien liée à la variation de glycosylation de ce dernier.

Un point très important est que l'activité d'endocan non glycosylé dépasse les différences entre les espèces. En effet, dans notre modèle de perfusion d'endocan non glycosylé, nous avons pu démontrer la capacité de l'endocan humain non glycosylé à agir chez la souris. Cela suggère que le corps protéique d'endocan humain ou murin est capable d'interagir avec ses cibles via une séquence peptidique commune aux deux espèces. De plus, cela renforce l'intérêt du modèle souris pour étudier le mécanisme d'action de l'endocan humain non glycosylé.

**Le mécanisme exact par lequel endocan non glycosylé exerce son activité reste inconnu.**

Endocan humain induit une activité pro-tumorale via deux mécanismes dépendants de la chaîne glycanique. Il amplifie la prolifération cellulaire induite par les facteurs de croissance

et favorise l'angiogenèse en induisant la migration endothéliale (Bécharde et al. 2001a; Shin et al. 2008; Roudnicky et al. 2013; Yu et al. 2013). Nous avons montré que l'endocan non glycosylé ne modifie pas *in vitro* la prolifération et la viabilité des cellules HT-29. De plus, Yu et coll. montrent que la forme non glycosylée d'endocan n'agit pas sur la migration des cellules endothéliales (Yu et al. 2013). Un autre mécanisme est donc évoqué.

Il a été démontré précédemment *in vitro* qu'endocan se fixe sur le LFA-1 (Bécharde et al. 2001b) et inhibe son interaction avec ICAM-1. Cela suggère qu'endocan pourrait intervenir dans le contrôle du recrutement leucocytaire au sein de la masse tumorale. Nous avons pu démontrer que le corps protéique d'endocan est associé à une réaction inflammatoire stromale. On peut donc penser que le corps protéique d'endocan ralentit la croissance tumorale par le biais d'un recrutement de leucocytes au sein de la tumeur. En effet, le ralentissement de la croissance tumorale induit par l'endocan non glycosylé, est supprimé lorsque les leucocytes CD122+ (notamment les cellules NK chez la souris SCID) sont déplétés. Ceci suggère que les cellules NK pourraient représenter un des acteurs par lesquelles l'endocan non glycosylé médie son activité anti-tumorale.

### **Par quel(s) mécanisme(s) ?**

Le(s) mécanisme(s) d'action de l'endocan sur les leucocytes demeure(nt) à l'heure actuelle mal connu(s).

On peut penser à une activité chimiotactique propre au polypeptide. Malgré l'absence d'homologie avec les différentes familles de chimiokines connues, cette hypothèse mériterait d'être vérifiée. En effet, la production locale de polypeptide par les cellules tumorales transfectées génère un gradient chimiotactique, qui serait inhibable par son administration systémique concomitante.

On peut aussi penser à une action antagoniste vis-à-vis de l'endocan glycosylé. Nous savons que celui-ci se fixe sur le LFA-1. On peut penser que c'est par sa partie protéique puisque l'affinité de liaison mesurée entre endocan et LFA-1 ( $18,7 \times 10^{-9}$  M) est trop élevée pour être en rapport unique avec sa chaîne glycanique. Nous savons que l'endocan glycosylé inhibe les interactions entre le LFA-1 et l'ICAM-1. On peut donc suggérer que la surexpression de l'endocan glycosylé par l'endothélium tumoral puisse freiner toute intrusion des leucocytes au sein de la tumeur. Par conséquent, on peut émettre une hypothèse, certes risquée, selon

laquelle la présence d'endocan non glycosylé viendrait bloquer le mécanisme d'action de l'endocan glycosylé au niveau des leucocytes.

L'ensemble de ces données ouvrent une nouvelle voie par laquelle endocan en tant que glycosylé intervient dans la croissance tumorale. Outre son activité de modulation des facteurs de croissance ainsi que sa capacité à induire la migration endothéliale, endocan est capable de diminuer le recrutement de cellules inflammatoires au niveau tumoral. Il est donc possible qu'endocan représente un point de contrôle endothélial qui tend à limiter l'infiltration leucocytaire dans les tissus.

## **PERSPECTIVES :**

Nos travaux ont mis en évidence deux points majeurs qui feront l'objet des études à venir :

1 - Endocan murin est partiellement glycosylé contrairement à son homologue humain.

2 - La forme non glycosylée d'endocan induit un ralentissement de la croissance tumorale et cet effet est associé à une augmentation de l'infiltration leucocytaire. Le mécanisme précis par lequel le corps protéique d'endocan intervient fait l'objet d'une étude exploratoire approfondie, menée au sein de l'équipe par Dr. Nathalie De Freitas Caires et collaborateurs.

Dans les perspectives ci-dessous on va se focaliser sur les mécanismes de régulation de glycosylation d'endocan.

### **1. Modulation de la biosynthèse de la chaîne glycanique**

#### **1.1 Identification des acides aminés clefs impliqués dans la glycosylation**

Dans un premier temps, il faut identifier quels acides aminés déterminent le profil de glycosylation d'endocan, sachant que ceux-ci sont répartis sur au moins 2 sites distincts. Pour se faire on va utiliser la même stratégie utilisée précédemment, basée sur la comparaison des séquences peptidiques d'endocan humain et murin. On va se limiter à étudier les acides aminés codés par l'exon 1 et l'exon 2 d'endocan puisque l'exon 3 n'a montré aucun effet sur la glycosylation. Le pourcentage des acides aminés qui distinguent la région N-terminale d'endocan humain et murin ne dépasse pas les 12 %. Les acides aminés seront substitués d'une manière séquentielle par mutagenèse dirigée. Les mutants seront transfectés, immunoprecipités et analysés en western blot.

#### **1.2 Comparer l'endocan murin non endothélial avec celui d'origine endothéliale**

Il est possible que l'endocan murin d'origine endothéliale soit différent en termes de glycosylation. En effet, des résultats préliminaires d'immunoprécipitation d'endocan à partir de surnageants d'une lignée endothéliale murine de pancréas (MS1) montrent la présence d'une forme glycosylée unique. On peut penser qu'il existe une certaine spécificité endothéliale au niveau de la glycosylation d'endocan et que cette glycosylation pourrait

aussi être régulée différemment dans le cadre de l'angiogenèse. Afin de pouvoir valider ce résultat préliminaire, il serait intéressant d'isoler des cellules endothéliales murines à partir des organes qui expriment endocan tels que le poumon, le rein et la rate. Le surnageant de la culture primaire sera immunoprécipité et analysé en western blot.

### **1.3 Etudier la régulation de la glycosylation d'endocan au niveau des cellules endothéliales primaires stimulées par des facteurs angiogéniques**

Les cellules endothéliales primaires isolées à partir des différents organes seront stimulées par des facteurs pro-angiogéniques tels que le VEGF et le FGF-2 ou pro-inflammatoires (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN $\gamma$ ). Le but de cette stimulation est de pouvoir étudier si l'environnement pro-angiogénique ou inflammatoire est capable de réguler la glycosylation d'endocan murin.



## **A**

- Abid MR, Yi X, Yano K, Shih S-C, Aird WC. Vascular endocan is preferentially expressed in tumor endothelium. *Microvasc Res.* nov 2006;72(3):136-45.
- Adam E, Sarrazin S, Landolfi C, Motte V, Lortat-Jacob H, Lassalle P, et al. Efficient long-term and high-yielded production of a recombinant proteoglycan in eukaryotic HEK293 cells using a membrane-based bioreactor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2 mai 2008;369(2):297-302.
- Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juin 2007;8(6):464-78.
- Aitkenhead M, Wang S-J, Nakatsu MN, Mestas J, Heard C, Hughes CCW. Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. *Microvasc Res.* mars 2002;63(2):159-71.
- Almog N, Ma L, Raychowdhury R, Schwager C, Erber R, Short S, et al. Transcriptional switch of dormant tumors to fast-growing angiogenic phenotype. *Cancer Res.* 1 févr 2009;69(3):836-44.
- Amatschek S, Koenig U, Auer H, Steinlein P, Pacher M, Gruenfelder A, et al. Tissue-wide expression profiling using cDNA subtraction and microarrays to identify tumor-specific genes. *Cancer Res.* 1 févr 2004;64(3):844-56.
- Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev.* 15 mai 2008;22(10):1276-312.
- Andres A-C, Djonov V. The mammary gland vasculature revisited. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* sept 2010;15(3):319-28.
- Arakawa H. p53, apoptosis and axon-guidance molecules. *Cell Death Differ.* août 2005;12(8):1057-65.
- Ara T, Tokoyoda K, Okamoto R, Koni PA, Nagasawa T. The role of CXCL12 in the organ-specific process of artery formation. *Blood.* 15 avr 2005;105(8):3155-61.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 6 août 1999;85(3):221-8.
- Auguste P, Lemièrre S, Larrièrre-Lahargue F, Bikfalvi A. Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol.* avr 2005;54(1):53-61.
- Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mars 2009;10(3):165-77.

## **B**

- Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol.* oct 2009;19(5):329-37.
- Balta I, Balta S, Demirkol S, Mikhailidis DP, Celik T, Akhan M, et al. Elevated serum levels of endocan in patients with psoriasis vulgaris: correlations with cardiovascular risk and activity of disease. *Br J Dermatol.* nov 2013;169(5):1066-70.
- Balta S, Mikhailidis DP, Demirkol S, Ozturk C, Kurtoglu E, Demir M, et al. Endocan--A Novel Inflammatory Indicator in Newly Diagnosed Patients With Hypertension: A Pilot Study. *Angiology.* 8 janv 2014;
- Bécharde D, Gentina T, Delehedde M, Scherpereel A, Lyon M, Aumercier M, et al. Endocan is a novel chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycan that promotes hepatocyte growth factor/scatter factor mitogenic activity. *J Biol Chem.* 21 déc 2001a;276(51):48341-9.
- Becharde D, Meignin V, Scherpereel A, Oudin S, Kervoaze G, Bertheau P, et al.

Characterization of the secreted form of endothelial-cell-specific molecule 1 by specific monoclonal antibodies. *J Vasc Res.* oct 2000;37(5):417-25.

Béchar d, Scherpereel A, Hammad H, Gentina T, Tsicopoulos A, Aumercier M, et al. Human endothelial-cell specific molecule-1 binds directly to the integrin CD11a/CD18 (LFA-1) and blocks binding to intercellular adhesion molecule-1. *J Immunol Baltim Md* 1950. 15 sept 2001b;167(6):3099-106.

Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* juin 2003;3(6):401-10.

Betsholtz C. Insight into the physiological functions of PDGF through genetic studies in mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* août 2004;15(4):215-28.

Bielenberg DR, Klagsbrun M. Targeting endothelial and tumor cells with semaphorins. *Cancer Metastasis Rev.* déc 2007;26(3-4):421-31.

Blasi F, Carmeliet P. uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol.* déc 2002;3(12):932-43.

Borcuk AC, Shah L, Pearson GDN, Walter KL, Wang L, Austin JHM, et al. Molecular signatures in biopsy specimens of lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 juill 2004;170(2):167-74.

Breitkreutz D, Mirancea N, Nischt R. Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions? *Histochem Cell Biol.* juill 2009;132(1):1-10.

Breuss JM, Uhrin P. VEGF-initiated angiogenesis and the uPA/uPAR system. *Cell Adhes Migr.* déc 2012;6(6):535-615.

Buckanovich RJ, Sasaroli D, O'Brien-Jenkins A, Botbyl J, Hammond R, Katsaros D, et al. Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 mars 2007;25(7):852-61.

## C

Caduff JH, Fischer LC, Burri PH. Scanning electron microscope study of the developing microvasculature in the postnatal rat lung. *Anat Rec.* oct 1986;216(2):154-64.

Carmeliet P. Developmental biology: Controlling the cellular brakes. *Nature.* 14 oct 1999;401(6754):657-8.

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 15 déc 2005;438(7070):932-6.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 14 sept 2000a;407(6801):249-57.

Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 14 sept 2000b;407(6801):249-57.

Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature.* 19 mai 2011;473(7347):298-307.

Carmeliet P, De Smet F, Loges S, Mazzone M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol.* juin 2009;6(6):315-26.

Casazza A, Finisguerra V, Capparuccia L, Camperi A, Swiercz JM, Rizzolio S, et al. Sema3E-Plexin D1 signaling drives human cancer cell invasiveness and metastatic spreading in mice. *J Clin Invest.* août 2010;120(8):2684-98.

Castets M, Coissieux M-M, Delloye-Bourgeois C, Bernard L, Delcros J-G, Bernet A, et al. Inhibition of endothelial cell apoptosis by netrin-1 during angiogenesis. *Dev Cell.* avr 2009;16(4):614-20.

Castets M, Mehlen P. Netrin-1 role in angiogenesis: to be or not to be a pro-angiogenic

factor? *Cell Cycle Georget Tex.* 15 avr 2010;9(8):1466-71.

Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK, Munn LL. Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 19 déc 2000;97(26):14608-13.

Chen L-Y, Liu X, Wang S-L, Qin C-Y. Over-expression of the Endocan gene in endothelial cells from hepatocellular carcinoma is associated with angiogenesis and tumour invasion. *J Int Med Res.* avr 2010;38(2):498-510.

Cifola I, Spinelli R, Beltrame L, Peano C, Fasoli E, Ferrero S, et al. Genome-wide screening of copy number alterations and LOH events in renal cell carcinomas and integration with gene expression profile. *Mol Cancer.* 2008;7:6.

Claxton S, Fruttiger M. Periodic Delta-like 4 expression in developing retinal arteries. *Gene Expr Patterns GEP.* nov 2004;5(1):123-7.

Cong R, Jiang X, Wilson CM, Hunter MP, Vasavada H, Bogue CW. Hhex is a direct repressor of endothelial cell-specific molecule 1 (ESM-1). *Biochem Biophys Res Commun.* 28 juill 2006;346(2):535-45.

Corada M, Orsenigo F, Morini MF, Pitulescu ME, Bhat G, Nyqvist D, et al. Sox17 is indispensable for acquisition and maintenance of arterial identity. *Nat Commun.* 2013;4:2609.

Cornelius A, Cortet-Rudelli C, Assaker R, Kerdraon O, Gevaert M-H, Prévot V, et al. Endothelial expression of endocan is strongly associated with tumor progression in pituitary adenoma. *Brain Pathol Zurich Switz.* nov 2012;22(6):757-64.

## **D**

Daly C, Pasnikowski E, Burova E, Wong V, Aldrich TH, Griffiths J, et al. Angiopoietin-2 functions as an autocrine protective factor in stressed endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 17 oct 2006;103(42):15491-6.

Daly C, Wong V, Burova E, Wei Y, Zabski S, Griffiths J, et al. Angiopoietin-1 modulates endothelial cell function and gene expression via the transcription factor FKHR (FOXO1). *Genes Dev.* 1 mai 2004;18(9):1060-71.

Depontieu F, Grigoriu B-D, Scherpereel A, Adam E, Delehedde M, Gosset P, et al. Loss of Endocan tumorigenic properties after alternative splicing of exon 2. *BMC Cancer.* 2008;8:14.

Djonov V, Schmid M, Tschanz SA, Burri PH. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res.* 18 févr 2000;86(3):286-92.

Duarte A, Hirashima M, Benedito R, Trindade A, Diniz P, Bekman E, et al. Dosage-sensitive requirement for mouse Dll4 in artery development. *Genes Dev.* 15 oct 2004;18(20):2474-8.

Dufraigne J, Funahashi Y, Kitajewski J. Notch signaling regulates tumor angiogenesis by diverse mechanisms. *Oncogene.* 1 sept 2008;27(38):5132-7.

Dumont DJ, Jussila L, Taipale J, Lymboussaki A, Mustonen T, Pajusola K, et al. Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3. *Science.* 30 oct 1998;282(5390):946-9.

Dziadek M. Role of laminin-nidogen complexes in basement membrane formation during embryonic development. *Experientia.* 29 sept 1995;51(9-10):901-13.

## **E**

Eklblom P, Eklblom M, Fecker L, Klein G, Zhang HY, Kadoya Y, et al. Role of mesenchymal nidogen for epithelial morphogenesis in vitro. *Dev Camb Engl.* juill 1994;120(7):2003-14.

El Behery MM, Saksaka MA, Ibrahiem MA, Saleh HS, El Alfay Y. Clinicopathological correlation of endocan expression and survival in epithelial ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet.* déc 2013;288(6):1371-6.

Ellis V, Behrendt N, Danø K. Plasminogen activation by receptor-bound urokinase. A kinetic study with both cell-associated and isolated receptor. *J Biol Chem.* 5 juill 1991;266(19):12752-8.

Falix FA, Aronson DC, Lamers WH, Gaemers IC. Possible roles of DLK1 in the Notch pathway during development and disease. *Biochim Biophys Acta.* juin 2012;1822(6):988-95.

Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, et al. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J Clin Invest.* 1 juin 2012;122(6):1991-2005.

Ferrara N. Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol.* déc 2002;29(6 Suppl 16):10-4.

Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med.* déc 1999;5(12):1359-64.

Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, et al. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med.* févr 2006;12(2):235-9.

Fischer A, Schumacher N, Maier M, Sendtner M, Gessler M. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes Dev.* 15 avr 2004;18(8):901-11.

Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* janv 1995;1(1):27-31.

Francois M, Koopman P, Beltrame M. SoxF genes: Key players in the development of the cardio-vascular system. *Int J Biochem Cell Biol.* mars 2010;42(3):445-8.

## **G**

Gale NW, Dominguez MG, Noguera I, Pan L, Hughes V, Valenzuela DM, et al. Haploinsufficiency of delta-like 4 ligand results in embryonic lethality due to major defects in arterial and vascular development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 nov 2004;101(45):15949-54.

Gerald D, Chintharlapalli S, Augustin HG, Benjamin LE. Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy. *Cancer Res.* 15 mars 2013;73(6):1649-57.

Gerber HP, Condorelli F, Park J, Ferrara N. Differential transcriptional regulation of the two vascular endothelial growth factor receptor genes. Flt-1, but not Flk-1/KDR, is up-regulated by hypoxia. *J Biol Chem.* 19 sept 1997;272(38):23659-67.

Geretti E, Shimizu A, Klagsbrun M. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis.* 2008;11(1):31-9.

Gerhardt H, Golding M, Fruttiger M, Ruhrberg C, Lundkvist A, Abramsson A, et al. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol.* 23 juin 2003;161(6):1163-77.

Gerhardt H, Ruhrberg C, Abramsson A, Fujisawa H, Shima D, Betsholtz C. Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* nov 2004;231(3):503-9.

Gerritsen ME, Tomlinson JE, Zlot C, Ziman M, Hwang S. Using gene expression profiling to identify the molecular basis of the synergistic actions of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Br J Pharmacol.* oct 2003;140(4):595-610.

Gitler AD, Lu MM, Epstein JA. PlexinD1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development. *Dev Cell.* juill 2004;7(1):107-16.

Glinkii AB, Smith BA, Jiang P, Li X-M, Yang M, Hoffman RM, et al. Viable circulating metastatic cells produced in orthotopic but not ectopic prostate cancer models. *Cancer Res.* 15

juill 2003;63(14):4239-43.

Gresham HD, Graham IL, Griffin GL, Hsieh JC, Dong LJ, Chung AE, et al. Domain-specific interactions between entactin and neutrophil integrins. G2 domain ligation of integrin alpha3beta1 and E domain ligation of the leukocyte response integrin signal for different responses. *J Biol Chem*. 29 nov 1996;271(48):30587-94.

Gridley T. Notch signaling in the vasculature. *Curr Top Dev Biol*. 2010;92:277-309.

Griffioen AW, Molema G. Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation. *Pharmacol Rev*. juin 2000;52(2):237-68.

Grigoriu BD, Depontieu F, Scherpereel A, Gourcerol D, Devos P, Ouatas T, et al. Endocan expression and relationship with survival in human non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 1 août 2006;12(15):4575-82.

Gu C, Yoshida Y, Livet J, Reimert DV, Mann F, Merte J, et al. Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science*. 14 janv 2005;307(5707):265-8.

Guo DQ, Wu LW, Dunbar JD, Ozes ON, Mayo LD, Kessler KM, et al. Tumor necrosis factor employs a protein-tyrosine phosphatase to inhibit activation of KDR and vascular endothelial cell growth factor-induced endothelial cell proliferation. *J Biol Chem*. 14 avr 2000;275(15):11216-21.

## **H**

Hainaud P, Contrerès J-O, Villemain A, Liu L-X, Plouët J, Tobelem G, et al. The role of the vascular endothelial growth factor-Delta-like 4 ligand/Notch4-ephrin B2 cascade in tumor vessel remodeling and endothelial cell functions. *Cancer Res*. 1 sept 2006;66(17):8501-10.

Hajjar KA. Cellular receptors in the regulation of plasmin generation. *Thromb Haemost*. juill 1995;74(1):294-301.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 9 août 1996;86(3):353-64.

Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. *Dev Camb Engl*. juin 1999;126(14):3047-55.

Hellström M, Phng L-K, Hofmann JJ, Wallgard E, Coultas L, Lindblom P, et al. Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*. 15 févr 2007;445(7129):776-80.

Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK. Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med*. févr 1997;3(2):177-82.

Hendrix MJC, Seftor EA, Hess AR, Seftor REB. Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene*. 19 mai 2003;22(20):3070-5.

Heymans S, Luttun A, Nuyens D, Theilmeier G, Creemers E, Moons L, et al. Inhibition of plasminogen activators or matrix metalloproteinases prevents cardiac rupture but impairs therapeutic angiogenesis and causes cardiac failure. *Nat Med*. oct 1999;5(10):1135-42.

He Z, Tessier-Lavigne M. Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell*. 22 août 1997;90(4):739-51.

Hillen F, Griffioen AW. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev*. déc 2007;26(3-4):489-502.

Hoch RV, Soriano P. Roles of PDGF in animal development. *Dev Camb Engl*. oct 2003;130(20):4769-84.

Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, et al. Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science*. 18 juin 1999;284(5422):1994-8.

Hong Y-K, Lange-Asschenfeldt B, Velasco P, Hirakawa S, Kunstfeld R, Brown LF, et al. VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. juill 2004;18(10):1111-3.

Huang G-W, Tao Y-M, Ding X. Endocan expression correlated with poor survival in human hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci*. févr 2009;54(2):389-94.

## **I**

Ishida A, Murray J, Saito Y, Kanthou C, Benzakour O, Shibuya M, et al. Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells. *J Cell Physiol*. sept 2001;188(3):359-68.

## **J**

Jakobsson L, Bentley K, Gerhardt H. VEGFRs and Notch: a dynamic collaboration in vascular patterning. *Biochem Soc Trans*. déc 2009;37(Pt 6):1233-6.

Janke J, Engeli S, Gorzelniak K, Feldpausch M, Heintze U, Böhnke J, et al. Adipose tissue and circulating endothelial cell specific molecule-1 in human obesity. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme*. janv 2006;38(1):28-33.

Jazin EE, Söderström S, Ebendal T, Larhammar D. Embryonic expression of the mRNA for the rat homologue of the fusin/CXCR-4 HIV-1 co-receptor. *J Neuroimmunol*. nov 1997;79(2):148-54.

Ji NY, Kim Y-H, Jang YJ, Kang YH, Lee CI, Kim JW, et al. Identification of endothelial cell-specific molecule-1 as a potential serum marker for colorectal cancer. *Cancer Sci*. oct 2010;101(10):2248-53.

## **K**

Kamachi Y, Kondoh H. Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Dev Camb Engl*. oct 2013;140(20):4129-44.

Kang YH, Ji NY, Lee CI, Lee HG, Kim JW, Yeom YI, et al. ESM-1 silencing decreased cell survival, migration, and invasion and modulated cell cycle progression in hepatocellular carcinoma. *Amino Acids*. mars 2011;40(3):1003-13.

Karkkainen MJ, Haiko P, Sainio K, Partanen J, Taipale J, Petrova TV, et al. Vascular endothelial growth factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins. *Nat Immunol*. janv 2004;5(1):74-80.

Kasai A, Shintani N, Kato H, Matsuda S, Gomi F, Haba R, et al. Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. oct 2008a;28(10):1717-22.

Kasai A, Shintani N, Kato H, Matsuda S, Gomi F, Haba R, et al. Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. oct 2008b;28(10):1717-22.

Kasai A, Shintani N, Oda M, Kakuda M, Hashimoto H, Matsuda T, et al. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 10 déc 2004;325(2):395-400.

Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y. Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of

VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.* 1 déc 1995;55(23):5687-92.

Kerbel RS. Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis.* mars 2000;21(3):505-15.

Kidoya H, Naito H, Takakura N. Apelin induces enlarged and nonleaky blood vessels for functional recovery from ischemia. *Blood.* 15 avr 2010;115(15):3166-74.

Kim I, Saunders TL, Morrison SJ. Sox17 dependence distinguishes the transcriptional regulation of fetal from adult hematopoietic stem cells. *Cell.* 10 août 2007;130(3):470-83.

Kim J, Oh W-J, Gaiano N, Yoshida Y, Gu C. Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling regulates VEGF function in developmental angiogenesis via a feedback mechanism. *Genes Dev.* 1 juill 2011;25(13):1399-411.

Kirwan RP, Leonard MO, Murphy M, Clark AF, O'Brien CJ. Transforming growth factor-beta-regulated gene transcription and protein expression in human GFAP-negative lamina cribrosa cells. *Glia.* déc 2005;52(4):309-24.

Kitsukawa T, Shimizu M, Sanbo M, Hirata T, Taniguchi M, Bekku Y, et al. Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron.* nov 1997;19(5):995-1005.

Kitsukawa T, Shimono A, Kawakami A, Kondoh H, Fujisawa H. Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Dev Camb Engl.* déc 1995;121(12):4309-18.

Klagsbrun M, Shimizu A. Semaphorin 3E, an exception to the rule. *J Clin Invest.* août 2010;120(8):2658-60.

Kojima Y, Quertermous T. Apelin-APJ signaling in retinal angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* oct 2008;28(10):1687-8.

Krebs LT, Shutter JR, Tanigaki K, Honjo T, Stark KL, Gridley T. Haploinsufficient lethality and formation of arteriovenous malformations in Notch pathway mutants. *Genes Dev.* 15 oct 2004;18(20):2469-73.

## **L**

Lacroix L, Lazar V, Michiels S, Ripoché H, Dessen P, Talbot M, et al. Follicular thyroid tumors with the PAX8-PPARGgamma1 rearrangement display characteristic genetic alterations. *Am J Pathol.* juill 2005;167(1):223-31.

Lassalle P, Molet S, Janin A, Heyden JV, Tavernier J, Fiers W, et al. ESM-1 is a novel human endothelial cell-specific molecule expressed in lung and regulated by cytokines. *J Biol Chem.* 23 août 1996;271(34):20458-64.

Lee S-H, Lee S, Yang H, Song S, Kim K, Saunders TL, et al. The Notch Pathway Targets Proangiogenic Regulator Sox17 to Restrict Angiogenesis. *Circ Res.* 22 avr 2014a;.

Lee S-H, Lee S, Yang H, Song S, Kim K, Saunders TL, et al. The Notch Pathway Targets Proangiogenic Regulator Sox17 to Restrict Angiogenesis. *Circ Res.* 22 avr 2014b;.

Lenburg ME, Liou LS, Gerry NP, Frampton GM, Cohen HT, Christman MF. Previously unidentified changes in renal cell carcinoma gene expression identified by parametric analysis of microarray data. *BMC Cancer.* 27 nov 2003;3:31.

Leonardo ED, Hinck L, Masu M, Keino-Masu K, Ackerman SL, Tessier-Lavigne M. Vertebrate homologues of *C. elegans* UNC-5 are candidate netrin receptors. *Nature.* 24 avr 1997;386(6627):833-8.

Leroy X, Aubert S, Zini L, Franquet H, Kervoaze G, Villers A, et al. Vascular endocan (ESM-1) is markedly overexpressed in clear cell renal cell carcinoma. *Histopathology.* janv 2010;56(2):180-7.

Leslie JD, Ariza-McNaughton L, Bermange AL, McAdow R, Johnson SL, Lewis J. Endothelial signalling by the Notch ligand Delta-like 4 restricts angiogenesis. *Dev Camb Engl. mars* 2007;134(5):839-44.

Levéen P, Pekny M, Gebre-Medhin S, Swolin B, Larsson E, Betsholtz C. Mice deficient for PDGF B show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities. *Genes Dev.* 15 août 1994;8(16):1875-87.

Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science.* 11 juill 1997;277(5323):242-5.

Li S, Wang L, Wang C, Wang Q, Yang H, Liang P, et al. Detection on dynamic changes of endothelial cell specific molecule-1 in acute rejection after renal transplantation. *Urology.* sept 2012;80(3):738.e1-8.

Liu N, Zhang L, Du H, Hu Y, Zhang G, Wang X, et al. Overexpression of endothelial cell specific molecule-1 (ESM-1) in gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* oct 2010;17(10):2628-39.

Liu Z-J, Shirakawa T, Li Y, Soma A, Oka M, Dotto GP, et al. Regulation of Notch1 and Dll4 by vascular endothelial growth factor in arterial endothelial cells: implications for modulating arteriogenesis and angiogenesis. *Mol Cell Biol.* janv 2003;23(1):14-25.

Llambi F, Causeret F, Bloch-Gallego E, Mehlen P. Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC. *EMBO J.* 1 juin 2001;20(11):2715-22.

Lobov IB, Renard RA, Papadopoulos N, Gale NW, Thurston G, Yancopoulos GD, et al. Delta-like ligand 4 (Dll4) is induced by VEGF as a negative regulator of angiogenic sprouting. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 févr 2007;104(9):3219-24.

Lu X, Le Noble F, Yuan L, Jiang Q, De Lafarge B, Sugiyama D, et al. The netrin receptor UNC5B mediates guidance events controlling morphogenesis of the vascular system. *Nature.* 11 nov 2004;432(7014):179-86.

## **M**

Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science.* 4 juill 1997;277(5322):55-60.

Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, et al. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* sept 1999;155(3):739-52.

Maurage C-A, Adam E, Minéo J-F, Sarrazin S, Debunne M, Siminski R-M, et al. Endocan expression and localization in human glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* juin 2009;68(6):633-41.

Mayer U, Zimmermann K, Mann K, Reinhardt D, Timpl R, Nischt R. Binding properties and protease stability of recombinant human nidogen. *Eur J Biochem FEBS.* 1 févr 1995;227(3):681-6.

Mehlen P, Furne C. Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis. *Cell Mol Life Sci CMLS.* nov 2005;62(22):2599-616.

Mikkelsen ME, Shah CV, Scherpereel A, Lanken PN, Lassalle P, Bellamy SL, et al. Lower serum endocan levels are associated with the development of acute lung injury after major trauma. *J Crit Care.* oct 2012;27(5):522.e11-7.

Moepps B, Frodl R, Rodewald HR, Baggiolini M, Gierschik P. Two murine homologues of the human chemokine receptor CXCR4 mediating stromal cell-derived factor 1alpha activation of Gi2 are differentially expressed in vivo. *Eur J Immunol.* août 1997;27(8):2102-12.

Mokkapati S, Baranowsky A, Mirancea N, Smyth N, Breitzkreutz D, Nischt R. Basement



membranes in skin are differently affected by lack of nidogen 1 and 2. *J Invest Dermatol.* sept 2008a;128(9):2259-67.

Mokkapatil S, Baranowsky A, Mirancea N, Smyth N, Breitkreutz D, Nischt R. Basement membranes in skin are differently affected by lack of nidogen 1 and 2. *J Invest Dermatol.* sept 2008b;128(9):2259-67.

Murga M, Fernandez-Capetillo O, Tosato G. Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2. *Blood.* 1 mars 2005;105(5):1992-9.

Murshed M, Smyth N, Miosge N, Karolat J, Krieg T, Paulsson M, et al. The absence of nidogen 1 does not affect murine basement membrane formation. *Mol Cell Biol.* sept 2000;20(18):7007-12.

## **N**

Nagy JA, Vasile E, Feng D, Sundberg C, Brown LF, Detmar MJ, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp Med.* 2 déc 2002;196(11):1497-506.

Navankasattusas S, Whitehead KJ, Suli A, Sorensen LK, Lim AH, Zhao J, et al. The netrin receptor UNC5B promotes angiogenesis in specific vascular beds. *Dev Camb Engl.* févr 2008;135(4):659-67.

Neufeld G, Kessler O. The semaphorins: versatile regulators of tumour progression and tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* août 2008;8(8):632-45.

Nico B, Crivellato E, Guidolin D, Annese T, Longo V, Finato N, et al. Intussusceptive microvascular growth in human glioma. *Clin Exp Med.* juin 2010;10(2):93-8.

Noguera-Troise I, Daly C, Papadopoulos NJ, Coetzee S, Boland P, Gale NW, et al. Blockade of Dll4 inhibits tumour growth by promoting non-productive angiogenesis. *Novartis Found Symp.* 2007;283:106-20; discussion 121-5, 238-41.

## **O**

Okada SS, Tomaszewski JE, Barnathan ES. Migrating vascular smooth muscle cells polarize cell surface urokinase receptors after injury in vitro. *Exp Cell Res.* mars 1995;217(1):180-7.

Olsson A-K, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mai 2006;7(5):359-71.

Oon CE, Harris AL. New pathways and mechanisms regulating and responding to Delta-like ligand 4-Notch signalling in tumour angiogenesis. *Biochem Soc Trans.* déc 2011;39(6):1612-8.

## **P**

Paleolog EM. The vasculature in rheumatoid arthritis: cause or consequence? *Int J Exp Pathol.* juin 2009;90(3):249-61.

Pan Q, Chantry Y, Liang W-C, Stawicki S, Mak J, Rathore N, et al. Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell.* janv 2007;11(1):53-67.

Patan S, Munn LL, Jain RK. Intussusceptive microvascular growth in a human colon adenocarcinoma xenograft: a novel mechanism of tumor angiogenesis. *Microvasc Res.* mars 1996;51(2):260-72.

Paulis YWJ, Soetekouw PMMB, Verheul HMW, Tjan-Heijnen VCG, Griffioen AW. Signalling pathways in vasculogenic mimicry. *Biochim Biophys Acta.* août 2010;1806(1):18-28.

Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, Zachary I. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J.* 15 avr 2008;411(2):211-26.

Pepper MS. Role of the matrix metalloproteinase and plasminogen activator-plasmin systems in angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* juill 2001;21(7):1104-17.

Pepper MS, Baetens D, Mandriota SJ, Di Sanza C, Oikemus S, Lane TF, et al. Regulation of VEGF and VEGF receptor expression in the rodent mammary gland during pregnancy, lactation, and involution. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat.* juill 2000;218(3):507-24.

Ploug M, Rønne E, Behrendt N, Jensen AL, Blasi F, Danø K. Cellular receptor for urokinase plasminogen activator. Carboxyl-terminal processing and membrane anchoring by glycosyl-phosphatidylinositol. *J Biol Chem.* 25 janv 1991;266(3):1926-33.

Poettler M, Unseld M, Mihaly-Bison J, Uhrin P, Koban F, Binder BR, et al. The urokinase receptor (CD87) represents a central mediator of growth factor-induced endothelial cell migration. *Thromb Haemost.* août 2012;108(2):357-66.

Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Mihaly J, Binder BR. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells. *Blood.* 1 févr 2004a;103(3):955-62.

Prager GW, Breuss JM, Steurer S, Olcaydu D, Mihaly J, Brunner PM, et al. Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor. *Circ Res.* 25 juin 2004b;94(12):1562-70.

Prud'homme GJ, Glinka Y. Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget.* sept 2012;3(9):921-39.

## **R**

Rafii S, Meeus S, Dias S, Hattori K, Heissig B, Shmelkov S, et al. Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin Cell Dev Biol.* févr 2002;13(1):61-7.

Recchia FM, Xu L, Penn JS, Boone B, Dexheimer PJ. Identification of genes and pathways involved in retinal neovascularization by microarray analysis of two animal models of retinal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* févr 2010;51(2):1098-105.

Rennel E, Mellberg S, Dimberg A, Petersson L, Botling J, Ameer A, et al. Endocan is a VEGF-A and PI3K regulated gene with increased expression in human renal cancer. *Exp Cell Res.* 15 avr 2007;313(7):1285-94.

Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Roccaro AM, Vacca A. The history of the angiogenic switch concept. *Leukemia.* janv 2007a;21(1):44-52.

Ribatti D, Nico B, Crivellato E, Vacca A. The structure of the vascular network of tumors. *Cancer Lett.* 8 avr 2007b;248(1):18-23.

Ribatti D, Ranieri G, Basile A, Azzariti A, Paradiso A, Vacca A. Tumor endothelial markers as a target in cancer. *Expert Opin Ther Targets.* 17 sept 2012;16(12):1215-25.

Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, et al. Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature.* 9 déc 2010;468(7325):824-8.

Ridgway J, Zhang G, Wu Y, Stawicki S, Liang W-C, Chantery Y, et al. Inhibition of Dll4 signalling inhibits tumour growth by deregulating angiogenesis. *Nature.* 21 déc 2006;444(7122):1083-7.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature.* 17 avr 1997;386(6626):671-4.

Roudnicky F, Poyet C, Wild P, Krampitz S, Negrini F, Huggenberger R, et al. Endocan is upregulated on tumor vessels in invasive bladder cancer where it mediates VEGF-A-induced angiogenesis. *Cancer Res.* 1 févr 2013;73(3):1097-106.

## S

- Sage J, Leblanc-Noblesse E, Nizard C, Sasaki T, Schnebert S, Perrier E, et al. Cleavage of nidogen-1 by cathepsin S impairs its binding to basement membrane partners. *PloS One*. 2012;7(8):e43494.
- Sainson RCA, Harris AL. Anti-Dll4 therapy: can we block tumour growth by increasing angiogenesis? *Trends Mol Med*. sept 2007;13(9):389-95.
- Sakurai A, Gavard J, Annas-Linhares Y, Basile JR, Amornphimoltham P, Palmby TR, et al. Semaphorin 3E initiates antiangiogenic signaling through plexin D1 by regulating Arf6 and R-Ras. *Mol Cell Biol*. juin 2010;30(12):3086-98.
- Sarrazin S, Adam E, Lyon M, Depontieu F, Motte V, Landolfi C, et al. 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*. janv 2006;1765(1):25-37.
- Satchi-Fainaro R, Ferber S, Segal E, Ma L, Dixit N, Ijaz A, et al. Prospective identification of glioblastoma cells generating dormant tumors. *PloS One*. 2012;7(9):e44395.
- Scehnet JS, Jiang W, Kumar SR, Krasnoperov V, Trindade A, Benedito R, et al. Inhibition of Dll4-mediated signaling induces proliferation of immature vessels and results in poor tissue perfusion. *Blood*. 1 juin 2007;109(11):4753-60.
- Scherpereel A, Gentina T, Grigoriu B, Sénéchal S, Janin A, Tscopoulos A, et al. Overexpression of endocan induces tumor formation. *Cancer Res*. 15 sept 2003;63(18):6084-9.
- Seftor EA, Meltzer PS, Schatteman GC, Gruman LM, Hess AR, Kirschmann DA, et al. Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol*. oct 2002;44(1):17-27.
- Seliger B, Lichtenfels R, Kellner R. Detection of renal cell carcinoma-associated markers via proteome- and other « omes »-based analyses. *Brief Funct Genomic Proteomic*. oct 2003;2(3):194-212.
- Senior RM, Gresham HD, Griffin GL, Brown EJ, Chung AE. Entactin stimulates neutrophil adhesion and chemotaxis through interactions between its Arg-Gly-Asp (RGD) domain and the leukocyte response integrin. *J Clin Invest*. déc 1992;90(6):2251-7.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, et al. Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 6 juill 1995;376(6535):62-6.
- Shin JW, Huggenberger R, Detmar M. Transcriptional profiling of VEGF-A and VEGF-C target genes in lymphatic endothelium reveals endothelial-specific molecule-1 as a novel mediator of lymphangiogenesis. *Blood*. 15 sept 2008;112(6):2318-26.
- Siekman AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*. 15 févr 2007a;445(7129):781-4.
- Siekman AF, Lawson ND. Notch signalling limits angiogenic cell behaviour in developing zebrafish arteries. *Nature*. 15 févr 2007b;445(7129):781-4.
- Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IMC, Griffioen AW, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis*. mars 2012;15(1):151-63.
- Smet FD, Segura I, Bock KD, Hohensinner PJ, Carmeliet P. Mechanisms of Vessel Branching Filopodia on Endothelial Tip Cells Lead the Way. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 5 janv 2009;29(5):639-49.
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M. Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 20 mars 1998;92(6):735-45.

Soriano P. Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. *Genes Dev.* 15 août 1994;8(16):1888-96.

De Spiegelaere W, Casteleyn C, Van den Broeck W, Plendl J, Bahramsoltani M, Simoens P, et al. Intussusceptive angiogenesis: a biologically relevant form of angiogenesis. *J Vasc Res.* 2012;49(5):390-404.

Stahl A, Connor KM, Sapiha P, Chen J, Dennison RJ, Krahn NM, et al. The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* juin 2010;51(6):2813-26.

Strasser GA, Kaminker JS, Tessier-Lavigne M. Microarray analysis of retinal endothelial tip cells identifies CXCR4 as a mediator of tip cell morphology and branching. *Blood.* 17 juin 2010;115(24):5102-10.

Suchting S, Freitas C, le Noble F, Benedito R, Bréant C, Duarte A, et al. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 27 févr 2007;104(9):3225-30.

Suri C, Jones PF, Patan S, Bartunkova S, Maisonpierre PC, Davis S, et al. Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis. *Cell.* 27 déc 1996;87(7):1171-80.

Su Y-H, Shu K-H, Hu C-P, Cheng C-H, Wu M-J, Yu T-M, et al. Serum endocan correlated with stage of chronic kidney disease and deterioration in renal transplant recipients. *Transplant Proc.* mars 2014;46(2):323-7.

Swift MR, Weinstein BM. Arterial-venous specification during development. *Circ Res.* 13 mars 2009;104(5):576-88.

## **T**

Takagi J, Yang Y, Liu J-H, Wang J-H, Springer TA. Complex between nidogen and laminin fragments reveals a paradigmatic beta-propeller interface. *Nature.* 21 août 2003;424(6951):969-74.

Takagi S, Hirata T, Agata K, Mochii M, Eguchi G, Fujisawa H. The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors. *Neuron.* août 1991;7(2):295-307.

Takahashi H, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci Lond Engl* 1979. sept 2005;109(3):227-41.

Tammela T, Zarkada G, Wallgard E, Murtomäki A, Suchting S, Wirzenius M, et al. Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature.* 31 juill 2008;454(7204):656-60.

Thomas M, Felcht M, Kruse K, Kretschmer S, Deppermann C, Biesdorf A, et al. Angiopoietin-2 stimulation of endothelial cells induces alpha5beta3 integrin internalization and degradation. *J Biol Chem.* 30 juill 2010;285(31):23842-9.

Tissier S, Lancel S, Marechal X, Mordon S, Depontieu F, Scherpereel A, et al. Calpain inhibitors improve myocardial dysfunction and inflammation induced by endotoxin in rats. *Shock Augusta Ga.* avr 2004;21(4):352-7.

Titz B, Dietrich S, Sadowski T, Beck C, Petersen A, Sedlacek R. Activity of MMP-19 inhibits capillary-like formation due to processing of nidogen-1. *Cell Mol Life Sci CMLS.* juill 2004;61(14):1826-33.

Del Toro R, Prahst C, Mathivet T, Siegfried G, Kaminker JS, Larrivee B, et al. Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood.* 11 nov 2010;116(19):4025-33.

Tsai JC, Zhang J, Minami T, Volland C, Zhao S, Yi X, et al. Cloning and characterization of

the human lung endothelial-cell-specific molecule-1 promoter. *J Vasc Res.* avr 2002;39(2):148-59.

Tschernatsch O, M M, Mlecnik B, Trajanoski Z, Zechner R, Zimmermann R. LPL-mediated lipolysis of VLDL induces an upregulation of AU-rich mRNAs and an activation of HuR in endothelial cells. *Atherosclerosis.* déc 2006;189(2):310-7.

## U

Unoki N, Murakami T, Nishijima K, Ogino K, van Rooijen N, Yoshimura N. SDF-1/CXCR4 contributes to the activation of tip cells and microglia in retinal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* juill 2010;51(7):3362-71.

Urbich C, Aicher A, Heeschen C, Dernbach E, Hofmann WK, Zeiher AM, et al. Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *J Mol Cell Cardiol.* nov 2005;39(5):733-42.

## V

Van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AAM, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 31 janv 2002;415(6871):530-6.

## W

Wang L, Zeng H, Wang P, Soker S, Mukhopadhyay D. Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J Biol Chem.* 5 déc 2003;278(49):48848-60.

Wang X, Brownstein MJ, Young WS. PG25, a pineal-specific cDNA, cloned by differential display PCR (DDPCR) and rapid amplification of cDNA ends (RACE). *J Neurosci Methods.* 16 mai 1997;73(2):187-91.

Wellner M, Herse F, Janke J, Gorzelnik K, Engeli S, Bechart D, et al. Endothelial cell specific molecule-1--a newly identified protein in adipocytes. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme.* avr 2003;35(4):217-21.

Whitaker GB, Limberg BJ, Rosenbaum JS. Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J Biol Chem.* 6 juill 2001;276(27):25520-31.

Wyler von Ballmoos M, Yang Z, Völzmann J, Baumgartner I, Kalka C, Di Santo S. Endothelial progenitor cells induce a phenotype shift in differentiated endothelial cells towards PDGF/PDGFR $\beta$  axis-mediated angiogenesis. *PloS One.* 2010;5(11):e14107.

## Y

Yang H, Lee S, Lee S, Kim K, Yang Y, Kim JH, et al. Sox17 promotes tumor angiogenesis and destabilizes tumor vessels in mice. *J Clin Invest.* 2 janv 2013;123(1):418-31.

Yu P-H, Chou S-F, Chen C-L, Hung H, Lai C-Y, Yang P-M, et al. Upregulation of endocan by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 and its clinical significance in nasopharyngeal carcinoma. *PloS One.* 2013;8(12):e82254.

Yurchenco PD, Patton BL. Developmental and pathogenic mechanisms of basement membrane assembly. *Curr Pharm Des.* 2009;15(12):1277-94.

## Z

Zhang J, Sud S, Mizutani K, Gyetko MR, Pienta KJ. Activation of urokinase plasminogen activator and its receptor axis is essential for macrophage infiltration in a prostate cancer mouse model. *Neoplasia N Y N.* janv 2011;13(1):23-30.

Ziol M, Sutton A, Calderaro J, Barget N, Aout M, Leroy V, et al. ESM-1 expression in stromal cells is predictive of recurrence after radiofrequency ablation in early hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* déc 2013;59(6):1264-70.

Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature.* 11 juin 1998;393(6685):595-9.