



**HAL**  
open science

# Régulations moléculaires des facteurs lymphangiogéniques dans les pathologies vasculaires

Florent Morfoisse

► **To cite this version:**

Florent Morfoisse. Régulations moléculaires des facteurs lymphangiogéniques dans les pathologies vasculaires. Anatomie, Histologie, Anatomopathologie [q-bio.TO]. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2015. Français. NNT : 2015TOU30302 . tel-01337521

**HAL Id: tel-01337521**

**<https://theses.hal.science/tel-01337521>**

Submitted on 27 Jun 2016

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

---

**Présentée et soutenue par :**

Florent MORFOISSE

le lundi 14 décembre 2015

**Titre :**

Régulations moléculaires des facteurs lymphangiogéniques  
dans les pathologies vasculaires

---

**École doctorale et discipline ou spécialité :**

ED BSB: Physiopathologie

**Unité de recherche :**

INSERM/UPS UMR 1048

**Directeur/trice(s) de Thèse :**

Docteur Barbara GARMY-SUSNI

**Jury :**

Agnès NOEL Rapporteur

Stéphane GERMAIN Rapporteur

Jean-Jacques DIAZ Examineur

Hervé PRATS Examineur

Barbara GARMY-SUSNI Directrice de Thèse

# Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier Barbara Garmy-susini ma directrice de thèse. Après cinq ans passés à travailler ensemble et malgré un temps certain passé à batailler l'un contre l'autre, je sais que sans son investissement dans chacun de mes projets et son implication de tous les instants dans ma thèse je n'aurais certainement pas pu mener à bien l'ensemble des travaux qui la constitue. Travailler avec elle durant toutes ces années m'a permis d'évoluer et d'apprendre énormément sur le plan scientifique et humain. Son énergie, sa passion et son niveau d'exigence m'ont régulièrement dépassé et m'ont obligé à dépasser mes limites me prouvant que j'étais capable d'augmenter mon rythme de travail et de faire preuve de persévérance. Sa confiance en moi et son intérêt pour mon avenir scientifique m'ont permis d'être soutenu dans tous les moments clés d'une thèse (concours pour la bourse de thèse, publication, écriture du manuscrit de thèse et recherche de financements de post-doctorat). N'étant pas très à l'aise pour trouver les mots lors des remerciements écrits, ceux-ci sont volontairement assez court. Je te prie de ne pas m'en tenir rigueur car je pense que tu sais ce que je pense de toi et combien je m'estime chanceux d'avoir ce parcours avec toi, nos nombreuses discussions lorsque tu jouais les taxis ont pu te le confirmer.

Je tiens également à remercier Anne-Catherine Prats de m'avoir ouvert les portes de son équipe lors de mon stage de M1. C'est en effet dans cette équipe que j'ai effectué mon premier stage sous la direction de Barbara et donc que tout a commencé. De plus, de par les connaissances scientifiques qu'elle a pu me transmettre, sa disponibilité et son humanité elle fait partie au même titre que Barbara de ces personnes qui ont toujours été là pour moi tout au long de cette thèse.

J'ai effectué la première moitié de ma thèse dans l'équipe 6 du CRCT et la seconde dans l'équipe 15 de l'I2MC. Dans la première je tiens à remercier particulièrement Stéphanie Cassant-Sourdy. Son humour, sa joie de vivre et sa capacité phénoménale à m'écouter râler m'ont beaucoup aidé dans les moments difficiles. De plus ses origines bretonnes et son amour inconditionnel du chouchen m'ont permis de combattre efficacement le mal du pays. Je remercie l'ensemble des membres de ma seconde équipe (à savoir Edith, Fransky, Charlotte, Florence, Benoit et

Françoise). Mention particulière à Françoise Pujol pour toutes les discussions politiques et sociales que nous avons eu et qui m'ont permis de sortir un peu de la science et de prendre du recul sur les bons (il y en a sisi) et les mauvais (il y en a aussi et plus on dirait bien) du système de recherche et du système en général (si on parlait de l'efficacité des diverses administrations avec lesquelles nous avons dû collaborer ?) français.

J'ai également eu l'occasion au cours de ma thèse de former un certain nombre d'étudiants qui m'ont appris autant sinon plus de choses que ce que j'ai pu réussir à leur transmettre. Clément tout d'abord qui mérite une mention spéciale pour avoir survécu à l'enfer de mon M2 malgré un traumatisme psychologique l'ayant conduit à quitter la science pour faire de la bio-informatique, merci à toi d'avoir été et de continuer à être présent. Merci également à Jérémy (du roller-derby mais qui fait ça ??), Angélique (médiuim à ses heures perdues), Sonia (quand est-ce que vous nous ramenez une coupe du monde ?), Marianne (qui finira probablement dévorée par un de ses gecko), Julie (qui prouve qu'il y a encore de la vie dans le centre de la France). J'attribue une autre mention spéciale à Monica avec qui j'ai particulièrement apprécié travailler, ton départ de l'équipe et ta volonté de quitter la recherche constitue encore aujourd'hui l'un des rares regrets de ces cinq années de labo.

Bien que la thèse aime à prendre le pas sur ce domaine, il existe encore une vie en dehors du labo. C'est pourquoi je tiens à remercier mes parents pour leur soutien sans failles durant toutes ces années et parce que, biologiquement parlant, ils sont effectivement à l'origine de tout ce manuscrit. Je tiens également à remercier mes amis en particulier Matthieu (indépendantiste breton repenté) et Julien (mélange intéressant entre Mario Bros et Captain America). Néanmoins ce ne sont ni eux ni mes parents qui ont eu à me supporter durant cette période du doctorat (et notamment à la fin de celle-ci) mais bien celle qui vit avec moi depuis maintenant 7 ans et qui m'a fait la joie de devenir mon épouse l'été dernier : ma femme Isabelle. Ton dévouement et ton amour pour moi m'ont fait tenir dans des moments où, seul, j'aurais certainement abandonné et c'est pourquoi cette thèse c'est aussi beaucoup à toi que je la dois.



## Résumé

Le système lymphatique a pour rôle principal de drainer les fluides tissulaires et de participer à la surveillance immunitaire. La lymphangiogenèse est principalement activée par deux facteurs : les vascular endothelial growth factors-C et -D (VEGF-C et VEGF-D). Ces facteurs participent à la progression métastatique à la fois en stimulant la prolifération des vaisseaux lymphatiques dans la tumeur et en périphérie et en provoquant la dilatation des vaisseaux collecteurs facilitant ainsi le passage des cellules tumorales de la tumeur primaire aux ganglions lymphatiques. Lors de son développement, une tumeur est soumise à de nombreux stress cellulaires tels que l'hypoxie, l'inflammation ou la déprivation en nutriments.

Ma thèse a donc été consacrée à l'analyse des régulations moléculaires permettant une surexpression des facteurs lymphangiogéniques en condition de stress cellulaire. Lors d'un premier projet de recherche j'ai démontré que l'hypoxie réduit la transcription de VEGF-C ainsi que sa traduction coiffe-dépendante mais activait une traduction médiée par un site interne d'entrée du ribosome (IRES). De plus, cette activation de la synthèse de VEGF-C en hypoxie est indépendante de HIF-1 $\alpha$  et stimule la lymphangiogenèse dans les tumeurs ainsi que dans les ganglions lymphatiques participant ainsi à la dissémination tumorale.

Dans un second temps, j'ai démontré que le VEGF-D possédait lui aussi un IRES activé par un choc thermique. L'activité de l'IRES du VEGF-D est régulée par la localisation subcellulaire d'un facteur trans-activateur de l'IRES (ITAF) : la nucléoline. Cette protéine est exportée du noyau vers le cytoplasme lors d'un choc thermique. Ce processus est inhibé par un traitement avec un anti-inflammatoire non stéroïdien ce qui supprime l'activation de la traduction IRES dépendante du VEGF-D.

Enfin lors d'un troisième projet, j'ai travaillé sur le lymphoedème secondaire, une pathologie caractérisée par une destruction du système lymphatique où la lymphangiogenèse doit être stimulée. J'ai évalué l'impact de l'hormonothérapie, principal traitement du cancer du sein, sur l'expression du VEGF-C et -D. J'ai démontré que l'estradiol stimulait l'expression de ces facteurs alors que l'hormonothérapie diminue leur synthèse et provoque une destruction de l'endothélium lymphatique. En conclusion, mes trois projets de thèse m'ont permis d'étudier les régulations moléculaires des deux facteurs lymphangiogéniques principaux dans des pathologies provoquées par une lymphangiogenèse excessive ou insuffisante.

## Abstract

Tumor lymphangiogenesis promotes lymph node metastasis using two mechanisms consisting of lymphatic vessels proliferation and dilatation to facilitate tumor spread. Lymphangiogenesis is mainly promoted by two growth factors: the vascular endothelial growth factor C and D. My PhD was focused on the molecular regulations inducing a tumoral over-expression of these two factors during stress. I demonstrated that hypoxia reduced VEGF-C transcription and cap-dependent translation while activating an Internal Ribosome Entry Site (IRES)-dependent mechanism of translation. This upregulation of VEGF-C in hypoxia is independent of HIF-1 $\alpha$ ; and stimulates lymphangiogenesis in tumors and lymph nodes and contribute to lymphatic metastasis.

Then, I have discovered that VEGF-D had an IRES selectively activated by heat shock. VEGF-D IRES is regulated by a subcellular relocalization of an ITAF, the nucleolin. This molecular process is reversed by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) that decrease VEGF-D IRES translation initiation by targeting the nucleolin.

Finally, I worked on secondary lymphedema, a pathology that is characterized by a disruption of the lymphatic network where lymphangiogenesis thus need to be restored. In this condition, I have evaluated the impact of hormone therapy, the main treatment for breast cancer, on the regulation of lymphangiogenic factors. I found that estradiol stimulates the expression of VEGF-C and-D contrary to the hormone therapy that inhibits VEGF-C and -D and thus mediates a disruption of the lymphatic endothelium.

Taken together, my PhD projects have allowed me to study the regulations of VEGF-C and -D in pathologies mediated either by an excessive or an insufficient lymphangiogenesis.

## Table des matières

Remerciements .....	1
Résumé .....	3
Abstract .....	4
LISTE DES ABBREVIATIONS .....	7
INTRODUCTION .....	8
I. Le système lymphatique .....	8
A. Historique .....	8
B. Les marqueurs endothéliaux lymphatiques .....	10
C. Développement du système lymphatique.....	13
D. Le système lymphatique chez l'adulte.....	18
E. Rôles du système lymphatique dans les processus pathologiques.....	26
II. Facteurs de croissance et voies de signalisation impliquées dans la lymphangiogenèse. ....	39
A. Le VEGF-C .....	39
B. Le VEGF-D .....	43
C. Le VEGF-A.....	45
D. Autres facteurs lymphangiogéniques.....	48
RESULTATS .....	49
I. L' hypoxie induit l'expression du VEGF-C dans les cellules tumorales métastatiques via un mécanisme de traduction indépendant de HIF-1 $\alpha$ . ....	49
A. Introduction .....	49
B. Résultats .....	51
C. Discussion.....	77
II. La dilatation des lymphatiques et la dissémination métastatique sont induites par une reprogrammation de la traduction du VEGF-D suite à un choc thermique.	
78	
A. Introduction .....	78

B.	Résultats .....	79
C.	Discussion.....	115
III.	L'hormonothérapie induit le développement du lymphœdème en inhibant l'effet bénéfique des estrogènes sur le système lymphatique. ....	116
	Présentation de l'étude .....	116
A.	Introduction .....	118
B.	Résultats .....	121
C.	Discussion.....	132
	DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	134
	BIBLIOGRAPHIE.....	140

## LISTE DES ABBREVIATIONS

CEL : Cellule Endothéliale Lymphatique

CES : Cellule Endothéliale Sanguine

CCL21 : Chemokine (C-C motif) ligand 21

CLEVER-1: Common Lymphatic Endothelial and Vascular Receptor-1

COUP-TF: Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factor

CSF-1: Colony stimulating factor-1

DARC: Duffy blood group Antigen Receptor for Chemokines

ERK: Extracellular signal-Regulated Kinases

FGF: Fibroblast Growth Factor

FIAF: Fasting-Induced Adipose Factor

FOXC2: Forkhead box protein C2

HEV: High Endothelial Venule

HGF: Hepatocyte Growth Factor

H/L MW-HA: High/Low Molecular Weight Hyaluronic Acid

ICAM1 : InterCellular Adhesion Molecule 1

IMC : Indice de Masse Corporelle

IRES : Internal Ribosome Entry Site

ITAF : IRES Trans-Acting Factor

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

NOS : Nitric Oxide Synthase

NT : Non Traduite

ORF : Open Reading Frame

PDGF- $\beta$  : Platelet-Derived Growth Factor

PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

# INTRODUCTION

## I. Le système lymphatique

### A. Historique

#### 1. Généralités

Les organismes multicellulaires nécessitent un système circulatoire pour assurer la distribution de l'oxygène, des nutriments, des hormones et de certaines cellules ainsi que pour drainer les déchets métaboliques à travers l'ensemble de l'organisme. Le système sanguin va assurer l'ensemble de ces fonctions, cependant la pression oncotique va provoquer un exsudat du plasma vers le tissu interstitiel. Du fait de leur taille et de la complexité de leur système cardiovasculaire, les organismes vertébrés tels que les poissons [1], les amphibiens [2], les reptiles [3] et les mammifères ont besoin d'un second système vasculaire indépendant afin d'assurer le retour des fluides dans la circulation pour maintenir l'homéostasie tissulaire : le **système lymphatique** prend alors en charge cette fonction. Les vaisseaux lymphatiques sont présents dans tous les tissus en parallèle du système sanguin à l'exception, en conditions physiologiques, de la cornée, de la moelle osseuse et du système nerveux central. Ce dernier point est actuellement remis en question par une étude récente ayant permis de détecter des vaisseaux lymphatiques au niveau des méninges [4].

#### 2. L'étude du système lymphatique

Les systèmes vasculaires sanguins et lymphatiques ont été identifiés dès l'Antiquité. Tandis que le système sanguin a été immédiatement étudié de manière approfondie, les connaissances sur le système lymphatique sont restées, jusqu'à récemment, relativement limitées.

La première mention d'un acteur du système lymphatique remonte au cinquième siècle avant Jésus Christ lorsqu'Hippocrate découvre les ganglions lymphatiques qu'il décrira comme « des glandes de tailles variables présentes sous l'aisselle ainsi que sur de nombreuses parties du corps » [5]. Ces travaux seront approfondis par Rufus d'Ephesus, médecin romain qui identifiera les ganglions lymphatiques axillaires, mésentériques et inguinaux ainsi que le thymus [6].

La première mention des vaisseaux lymphatiques est attribuée à Hierophilus, un anatomiste de l'Egypte antique, et date du troisième siècle avant Jésus Christ. Au cours de ses travaux il caractérisera l'organisation des vaisseaux sanguins hépatiques et notera que « la veine porte hépatique reçoit toutes les veines absorbantes de l'intestin » [7, 8] qui se révéleront être les vaisseaux lymphatiques de l'intestin.

Ces travaux tomberont dans l'oubli durant le moyen-âge et il faut attendre le XVI<sup>e</sup> siècle et les travaux de Bartolomaeus Eustachi pour que les découvertes reprennent. Ce dernier identifiera en 1563 le canal thoracique (le plus grand vaisseau lymphatique présent dans l'organisme) [9] puis Gaspard Aselli, en pratiquant des dissections sur des chiens nourris, découvrira en 1622, des vaisseaux blancs qu'il nommera « veines laiteuses »,] chargé d'un liquide « blanc ressemblant à du lait ou de la crème ». Les techniques de microscopies et d'analyses histologiques évoluant, l'étude des lymphatiques chez le chien reprendra activement dans les années soixante-dix et quatre-vingt où elles permettront notamment de décrire la morphologie bicuspidée des valves lymphatiques [10], ainsi que de caractériser la structure et l'organisation du système lymphatique rénal [11] et cardiaque [12]

Malgré cette connaissance relativement ancienne des vaisseaux lymphatiques et de la lymphe, l'état des connaissances sur les vaisseaux lymphatiques évoluera lentement du fait de l'absence de fonction physiologique clairement identifiée par les premières études anatomiques en raison du manque de marqueurs spécifiques du système lymphatique empêchant de le distinguer du système sanguin.

## **B. Les marqueurs endothéliaux lymphatiques**

Dans les années quatre-vingt-dix, une série de travaux va identifier des molécules spécifiques des vaisseaux lymphatiques qui permettront de résoudre l'obstacle de la différenciation entre les systèmes lymphatiques et sanguins.

### **1. Le facteur de transcription Prox1**

En 1993, le Prospero-related homeobox gene-1 (Prox1) est identifié [13]. Ce gène homéotique initialement cloné par homologie avec le gène *prospero* de *Drosophila melanogaster* [14] code pour un facteur de transcription de 737 acides aminés et d'un poids moléculaire de 83 kDa. Ce facteur est essentiel à la morphogenèse des vaisseaux lymphatiques lors du développement où il va initier l'expression des protéines essentielles à la fonction des cellules endothéliales lymphatiques telles que VEGFR-3, Lyve-1, CCL-21 [15]. L'invalidation de Prox 1 est létale au stade embryonnaire E14.5 du fait d'une absence complète de développement du système lymphatique. Prox 1 est également indispensable au maintien du phénotype lymphatique de la cellule endothéliale, son inhibition par siRNA entraînant une reprogrammation de la cellule endothéliale lymphatique (CEL) en cellule endothéliale sanguine (CES) [16]. Inversement, sa surexpression dans des cellules endothéliales sanguines inhibe l'expression de gènes spécifiques du système sanguin (ICAM-1, laminine, neuropillin-1) et stimule l'expression des gènes spécifiques de l'endothélium lymphatique (VEGFR-3, podoplanine, VEGF-C) [17, 18]. Outre ces différents rôles médiés par son activité de facteur de transcription, il régule également le cycle cellulaire en activant la cycline E1 (Ccne1) [19]. L'ensemble de ces propriétés fait de Prox1 le gène essentiel pour l'acquisition du phénotype lymphatique et un marqueur primordial des vaisseaux lymphatiques.

### **2. Le récepteur VEGFR-3**

Le Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3 (VEGFR-3) ou fms-like tyrosine kinase-4 (FLT-4) est identifié par clonage en 1992 [20]. Son gène est situé sur le



chromosome 5, il code pour deux ARNm de tailles différentes (4,5 et 5,8 kb) mais qui ne donneront, après traduction, qu'une seule et même protéine de 150kDa ne se différenciant que par la longueur de leur région 3' NT [21]. Le VEGFR-3 fait partie de la famille des récepteurs à activité tyrosine-kinase et est composé d'un domaine extracellulaire de 775 acides aminés organisés en sept domaines « immunoglobulin-like », d'un domaine transmembranaire de 23 acides aminés, et du domaine tyrosine-kinase intracellulaire comprenant 455 acides aminés. Ce domaine catalytique est sous-divisé en deux domaines distincts séparés par 65 acides aminés [22]. De façon intéressante il a tout d'abord été identifié comme un récepteur au CSF-1 (Colony stimulating factor-1) [22] avant que ses propriétés de liaison au VEGF-C et -D soient révélées. Son rôle de marqueur du système lymphatique est identifié en 1995 lorsqu'il est constaté que son expression est ubiquitaire dans l'endothélium dans les premiers stades du développement embryonnaire mais devient restreinte aux lymphatiques lorsque ceux-ci se mettent en place au stade E12.5 [23]. La délétion du VEGFR3 est létale chez la souris à E9.5. Cette létalité est due principalement à une malformation du lumen des vaisseaux aboutissant à une accumulation des fluides dans l'espace péricardique.

Néanmoins des études récentes ont montré que le VEGFR-3 était également présent sur les « cellules distales » des vaisseaux sanguins en cours de bourgeonnement et que sa présence était indispensable à la régulation de l'angiogenèse [24]. Il est donc nécessaire de prendre des précautions lors de l'utilisation de ce marqueur pour déterminer l'identité lymphatique d'un vaisseau.

### 3. Le récepteur Lyve-1

Le récepteur Lyve-1 a été découvert en 1999 [25]. Le gène du Lyve-1 est situé sur le chromosome 11 et code pour une protéine possédant un poids moléculaire de 35kDa. Le récepteur lyve-1 est le récepteur de l'acide hyaluronique est fortement exprimé à la membrane des cellules endothéliales des capillaires lymphatiques. L'acide hyaluronique (ou hyaluronane) est un glycosaminoglycane présent dans la matrice extracellulaire. Il exerce un rôle important lors des processus d'inflammation et de cicatrisation en participant au remodelage de la matrice extracellulaire [26, 27].

Néanmoins les molécules d'acide hyaluronique peuvent être de longueurs variables et leur taille affecte leurs caractéristiques biologiques. Les hyaluronanes de haut poids moléculaire (HMW-HA) ont des propriétés anti-angiogéniques et immunosuppressives contrairement aux hyaluronanes de bas poids moléculaires (LMW-HA) générés soit par une dégradation enzymatique ou par une hydrolyse des HMW-HA qui jouent un rôle actif dans l'angiogenèse ainsi que dans la croissance et la migration cellulaire [28-30]. Au niveau physiologique, le récepteur Lyve-1 se lie au hyaluronane et permet d'assurer son transport par les vaisseaux lymphatiques depuis les tissus riches en hyaluronane (peau, intestin...) vers les ganglions lymphatiques. Celui-ci sera ensuite dégradé permettant ainsi d'assurer un renouvellement permanent des stocks d'acide hyaluronique présent dans l'organisme [31, 32]. Cependant contrairement au VEGFR-3, sa délétion est viable chez la souris. Bien que très utilisé pour l'immunodétection du système lymphatique, Lyve-1 n'est pas un marqueur parfait : il est également exprimé à la surface des macrophages activés [33] ainsi que sur l'endothélium sanguin au niveau des HEV (High Endothelial Venule) dans les ganglions lymphatiques [34], ce qui impose l'utilisation d'un second marqueur afin de garantir la spécificité lymphatique.

#### 4. La Podoplanine

Situé sur le chromosome 1 chez l'Homme et 4 chez la souris, le gène de la podoplanine est identifié en 1999 [35]. Ce gène code pour une glycoprotéine membranaire de 38kDa initialement identifiée dans les angiosarcomes, tumeurs rares faisant partie de la famille des sarcomes des tissus mous. Ces tumeurs peuvent avoir pour origine à la fois des cellules endothéliales sanguines et lymphatiques. L'identification de la podoplanine en tant que nouveau marqueur du système lymphatique a donc permis de prouver l'origine lymphatique d'une partie des cellules des angiosarcomes ainsi que l'identification de sarcomes ayant pour origine uniquement des cellules endothéliales lymphatiques (sarcome de Kaposi) [35]. La podoplanine est une protéine particulièrement importante pour la formation des capillaires lymphatiques : elle se lie aux petites GTPases Rho A et Cdc42 et régule la migration et la tubulogenèse des cellules microvasculaires lymphatiques [36, 37]. Au

cours du développement elle va également permettre, via la protéine CCEL-2 et les kinases Syk et Src, une agrégation plaquettaire au niveau des cellules endothéliales lymphatiques permettant une compartimentation efficace des deux systèmes vasculaires et ainsi d'éviter le mélange du sang et de la lymphe [38]. Chez l'animal, l'invalidation de la podoplanine aboutit à une létalité à la naissance suite à la formation de lymphoœdèmes pulmonaires. De façon similaire au Lyve-1, la podoplanine n'est pas un marqueur parfait, et doit être utilisée en association avec un autre marqueur pour garantir une détection spécifique des vaisseaux lymphatiques notamment dans les études portant sur la lymphangiogenèse tumorale. En effet la podoplanine est également exprimée par certains fibroblastes associés au cancer [39] .

*L'émergence de ces marqueurs spécifiques de la vascularisation lymphatique a permis de relancer l'intérêt scientifique pour ce domaine et de mener des études plus approfondies aboutissant à une meilleure compréhension des mécanismes de mise en place du système lymphatique au cours du développement ainsi que d'analyser sa structure et sa fonction physiologique.*

### **C. Développement du système lymphatique**

Au cours du développement embryonnaire, le système sanguin se forme à partir de précurseurs endothéliaux provenant du mésoderme, ces vaisseaux vont ensuite croître et être stabilisés pour former un système fonctionnel dans l'embryon. La vascularisation lymphatique se met en place après la formation du système sanguin (début de l'émergence des lymphatiques à E9.5 alors que le système sanguin est en place dès E8.5) ce qui a suggéré une origine vasculaire des lymphatiques. Une origine mésenchymateuse des vaisseaux lymphatiques a néanmoins été également proposée.

## 1. Les travaux de Florence Sabin : origine vasculaire des lymphatiques

En 1902, Florence Sabin propose ce qui sera le modèle le plus largement accepté de développement de la vascularisation lymphatique. A l'aide d'un colorant injecté dans des embryons de porcs, elle émet l'hypothèse (le phénotype lymphatique des cellules étant difficile à prouver à cette époque du fait de l'absence des marqueurs spécifiques précédemment mentionnés) que les cellules endothéliales lymphatiques bourgeonnent à partir des veines pour former les sacs lymphatiques primaires. A partir de ces structures elles migrent vers les tissus périphériques et s'organisent en vaisseaux. Plus précisément, le docteur Sabin montre que, dans un premier temps, deux sacs lymphatiques se développent à la jonction des veines sous-claviaires et cardinales antérieures. Les vaisseaux lymphatiques formés dans ces sacs vont ensuite se développer dans la tête, le cou, le thorax et les membres antérieurs des animaux (**Figure1**).

Dans un second temps, d'autres sacs lymphatiques se développent à partir de la veine mesonephrique et des veines situées à la limite dorsomédiale du canal de Wolff et vont permettre la vascularisation lymphatique de l'abdomen et du diaphragme. Enfin les sacs lymphatiques postérieurs, issus de la jonction de la veine iliaque primitive et de la veine cardinale postérieure fournissent en lymphatiques la région pelvienne et les membres postérieurs [40, 41].

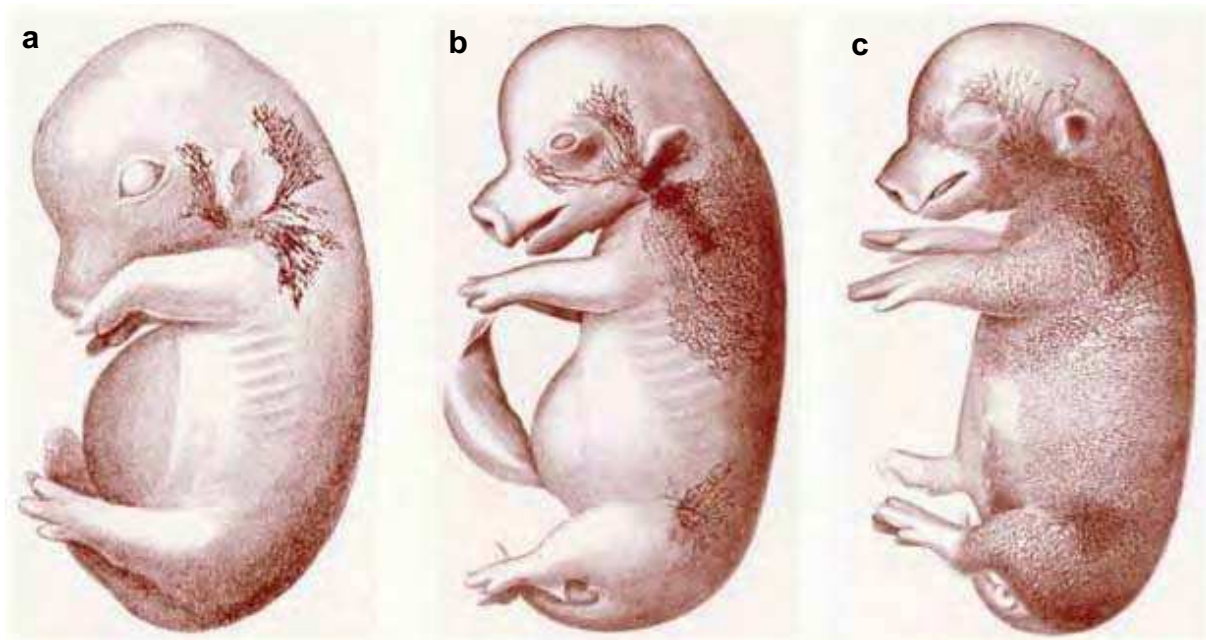


Fig1 : Le développement des vaisseaux lymphatiques selon le modèle de Sabin

Développement des vaisseaux lymphatiques dans des embryons de porcs visualisés après une injection d'encre de Chine.  
 a : Embryon de 3cm de long montrant les vaisseaux lymphatiques du cou se développant dans trois directions différentes : l'arrière de l'oreille puis de la tête, la région scapulaire et la région de la mâchoire. b : Embryon de 4,3cm montrant que les vaisseaux du plexus primaire se sont développés jusqu'à la ligne médiane dorsale. Les lymphatiques commencent à se développer également à partir de sacs lymphatiques situés dans la partie inférieure de l'embryon. c : Embryon de 5,5cm dans lequel les vaisseaux couvrent à présent la majeure partie du corps [14].

## 2. Le modèle Huntington-Mc Clure : origine mésenchymateuse des lymphatiques

En 1910, Huntington et Mc Clure proposent un modèle alternatif du développement lymphatique. Dans leur modèle, ils émettent l'hypothèse que les sacs lymphatiques primaires proviennent directement du mésenchyme indépendamment du système vasculaire et qu'ils établissent des connexions avec les veines leur formation [42]. Bien que moins admis par la communauté scientifique à l'époque de sa découverte, ce modèle est renforcé par des études plus récentes menées sur des volailles montrant que des sacs lymphatiques se formaient dans l'aile à partir de lymphangioblastes, précurseurs des cellules endothéliales lymphatiques présentes dans le mésenchyme [43]. Plus récemment encore, une étude menée par le même groupe suggère des différences dans le mécanisme de développement entre les réseaux lymphatiques superficiels (capillaires) et profonds (vaisseaux collecteurs) chez la souris [44]. Ces travaux relancent l'intérêt du modèle Huntington-Mc Clure qui bien que moins admis que le modèle de Sabin pourrait coexister avec lui pour expliquer le mécanisme de développement de la vascularisation lymphatique.

### 3. Mécanismes moléculaires du développement lymphatique

#### ❖ *Initiation du développement lymphatique*

Chez la souris, la différenciation des premières cellules endothéliales lymphatiques a lieu au stade embryonnaire E9.5 dans la veine cardinale antérieure lorsqu'une sous-population de cellules endothéliales veineuses commence à exprimer le facteur de transcription Prox-1 ainsi que le récepteur Lyve-1. Cette activation de l'expression de Prox-1 est permise à la fois par le facteur de transcription SOX-18 [45], et le récepteur nucléaire COUP-TFII [46, 47]. L'expression de Prox-1 va induire dans ces cellules une activation des gènes codant pour des protéines nécessaires au phénotype lymphatique de la cellule (telles que la neuropiline-2) et à contrario une inhibition des gènes responsable de l'identité veineuse des cellules. De façon intéressante, l'expression de Prox-1 dans les premières cellules lymphatiques va induire une suppression de l'expression de VEGFR-3 (récepteur du facteur lymphangiogénique majeur, le VEGF-C) dans les cellules voisines. Ce récepteur qui était jusque-là exprimé dans tout l'endothélium vasculaire va ainsi devenir uniquement exprimé par les cellules lymphatiques [23]. Cette spécificité d'expression du récepteur VEGFR-3 ainsi que du co-récepteur transmembranaire Neuropiline-2 va permettre aux premières cellules endothéliales lymphatiques de migrer en suivant un gradient de VEGF-C produit par les cellules du mésoderme latéral [48] (**Figure2**). A ce stade, elles migrent sous forme d'une file de cellules faiblement connectées entre elles ce qui permet de ne pas impacter la morphologie des vaisseaux sanguins déjà présents dans l'embryon qu'elles croisent lors de leur migration [49]. Une fois leur migration achevée, les cellules lymphatiques vont s'unir pour former deux vaisseaux lymphatiques primordiaux : Le vaisseau lymphatique dorsal périphérique longitudinal et le canal lymphatique ventral (désignés dans la littérature comme « sacs lymphatiques » jusqu'à récemment) [50]. Le canal lymphatique va ensuite établir une connexion avec la veine cardinale afin d'assurer le retour de la lymphe dans la circulation sanguine. L'intégrité de cette connexion entre les deux système vasculaire est protégée à la fois par une valve lymphoveineuse formée par une petite sous-population de progéniteurs de cellules endothéliales lymphatiques qui sont jusque-là restés dans les veines [51] et par une agrégation plaquettaire, assurée par leur interaction avec la podoplanine, sur les cellules endothéliales lymphatiques

formant la connexion [52, 53]. De nouveaux vaisseaux lymphatique vont ensuite bourgeonner à partir de ces deux vaisseaux lymphatiques majeurs de façon à former un plexus lymphatique dans un premier temps puis de vasculariser l'ensemble de l'embryon. Mis à part au niveau des connections entre vaisseaux sanguins et lymphatiques il est essentiel que les deux systèmes restent séparés l'un de l'autre durant ce bourgeonnement afin de protéger l'embryon d'un éventuel reflux de sang dans le système lymphatique. Cette séparation est assurée par la protéine SLP76 et la kinase SYK, exprimées par les cellules hématopoïétiques [54].

#### ❖ Maturation et spécialisation du système lymphatique

A partir du stade embryonnaire E15.5 les vaisseaux lymphatiques commencent à s'organiser en vaisseaux spécialisés : capillaires, pré-collecteurs et collecteurs lymphatiques. Chez la souris, une surexpression transitoire du facteur de transcription Foxc2 est le premier signe de la spécialisation en vaisseaux collecteurs [55]. En plus de Foxc2, la voie de signalisation EphrineB2-Eph, et plus particulièrement le site d'interaction PDZ situé sur l'extrémité C-terminale de l'ephrineB2, est également indispensable à la maturation des vaisseaux collecteurs [56]. Inversement l'expression de VEGFR-3, Lyve-1, Prox1 et Ccl21 diminuent dans ces vaisseaux et ne restera élevée que dans les capillaires lymphatiques. De plus l'interaction du récepteur Tie2 avec son ligand l'angiopoiétine 2 contrôle également la maturation lymphatique. Bien que les mécanismes de régulations précis soient encore inconnus les souris déficientes pour l'angiopoiétine 2 souffrent d'un défaut de maturation lymphatique [57, 58]. L'activation du récepteur Tie2 stimule l'activation de la voie PI3K-Akt et une mutation dans des gènes impliqués dans cette voie affecte le développement des vaisseaux lymphatiques suggérant que l'activation de Tie2 par l'angiopoiétine 2 participe à la maturation lymphatique via cette voie de signalisation [59, 60].

L'ensemble de ces mécanismes permet donc la mise en place d'un système lymphatique fonctionnel chez l'adulte.

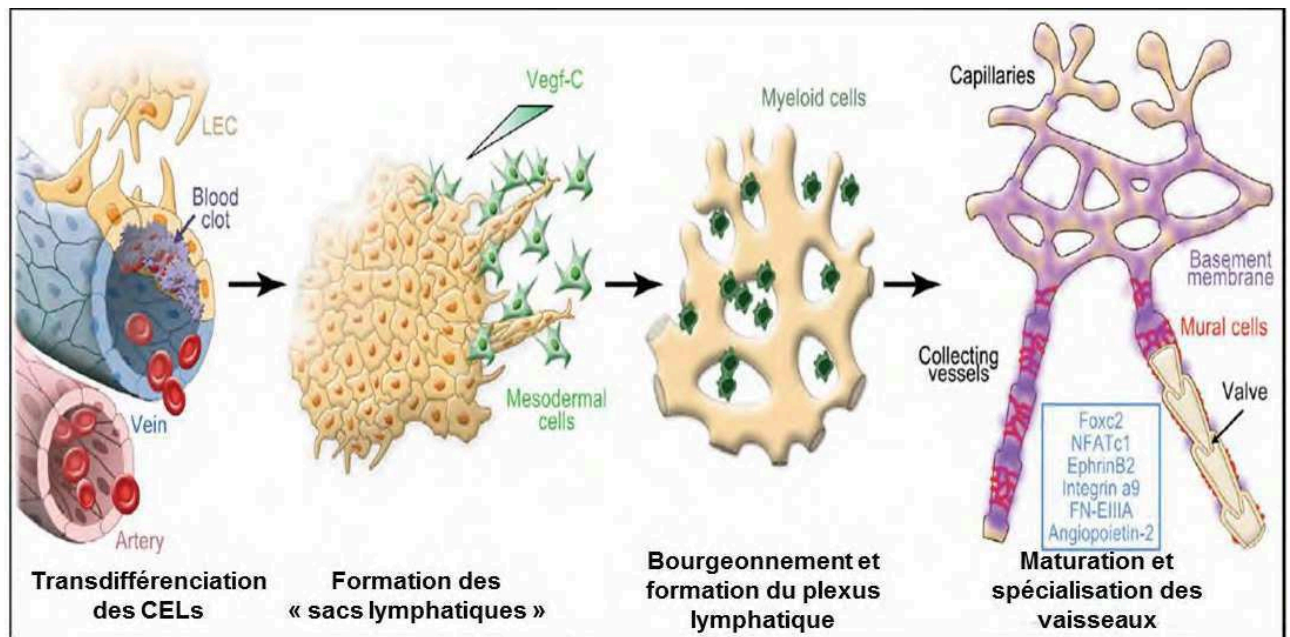


Fig2 : **Principales étapes du développement lymphatique chez la souris**

Les CELs se spécialisent et émergent des veines embryonnaires (en particulier veine cardinale antérieure) d'où elles migrent suivant un gradient de VEGF-C produit par des cellules du mésoderme et s'agrègent pour former les sacs lymphatiques primaires. Les cellules vont ensuite bourgeonner et former les plexus lymphatiques primaires composés de vaisseaux dont la morphologie se rapproche des capillaires. Enfin, les cellules myéloïdes vont produire des cytokines permettant de contrôler la morphogénèse lymphatique qui vont induire le remodelage du plexus lymphatiques en vaisseaux collecteurs, pré-collecteurs et capillaires.

Further sprouting produces the lymphatic primary plexus composed of capillary-like vessels.

Les vaisseaux pré-collecteurs et collecteurs possèdent des valves intraluminales et une membrane basale, les collecteurs étant également recouverts par des cellules musculaires lisses [178].

## D. Le système lymphatique chez l'adulte

### 1. Structure

#### ❖ Les capillaires lymphatiques

Les capillaires lymphatiques sont des vaisseaux relativement larges (30 à 80µm de diamètre) composés d'une seule couche de cellules endothéliales lymphatiques et, contrairement aux capillaires sanguins, ne sont pas stabilisés par des péricytes [61]. Il ne comporte pas non plus de membrane basale et sont reliés à la matrice extracellulaire par des filaments d'ancrage (Figure 3a). Principalement composés de fibrilline [62], glycoprotéine d'environ 350kDa, ces filaments mesurent entre 40 et 110 angström et peuvent s'organiser soit sous forme de filaments individuels soit sous forme d'agrégats pour se fixer aux fibres de collagène de la matrice extracellulaire et ainsi assurer l'interaction des capillaires lymphatique avec le tissu conjonctif [63]. Cette interaction maintient le capillaire ouvert et donc fonctionnel malgré la pression interstitielle qui s'exerce sur lui. Une autre particularité du capillaire lymphatique



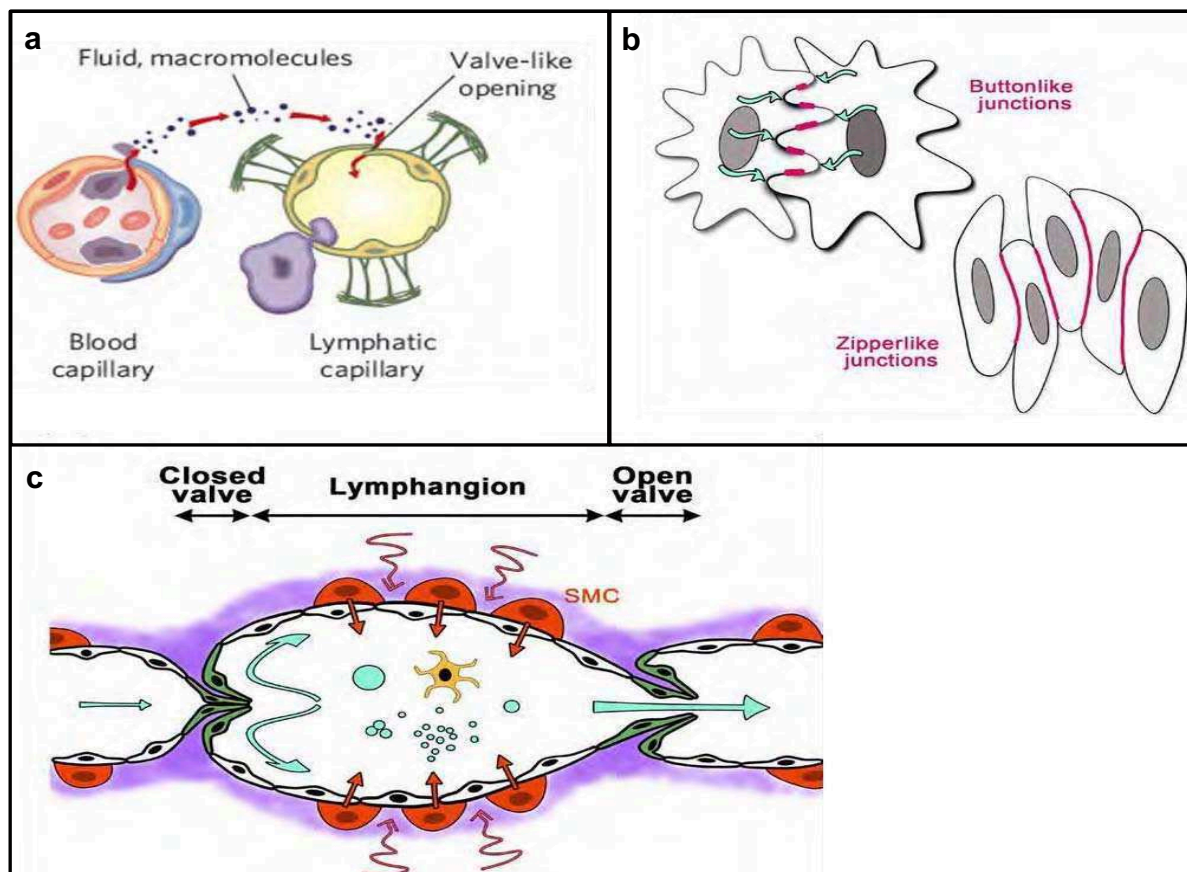
réside dans les jonctions entre les cellules endothéliales qui le constituent. Contrairement aux capillaires sanguins où les cellules endothéliales sont liées entre elles par des jonctions adhérentes (jonctions « zipper-like »), les cellules endothéliales des capillaires lymphatiques sont liées entre elles par des jonctions discontinues appelées jonctions « button-like ». Ces jonctions en « boutons » sont composées par des segments grossièrement parallèles de VE-cadhérine mesurant environ  $3\mu\text{m}$  de long et également espacés d'environ  $3\mu\text{m}$  [64]. Les extrémités de deux cellules endothéliales lymphatiques adjacentes liées par ces jonctions lâches constituent donc des points de passage à sens unique pour les fluides extracellulaires permettant leur entrée dans le capillaire suivant un gradient de pression (Figure 3b). Ce type de jonctions spécialisées est caractéristique de capillaires lymphatiques matures, en effet, il a été montré chez la souris que lors du développement des vaisseaux lymphatiques ceux-ci ne comportaient que des jonctions de type « zipper-like » et que les jonctions « button-like » n'étaient observées chez les animaux qu'à partir de 10 semaines [65]. Néanmoins le type de jonctions dans les capillaires lymphatiques reste plastique. En effet, lors d'une inflammation, les jonctions « button-like » sont remplacées au profit de jonctions « zipper-like » [65].

#### ❖ Les vaisseaux pré-collecteurs

Les vaisseaux pré-collecteurs servent d'intermédiaires entre le réseau de capillaires lymphatiques, assurant l'entrée des fluides, et les vaisseaux collecteurs prenant en charge le transport de la lymphe à travers l'organisme. Plus larges que les capillaires ( $100$  à  $200\mu\text{m}$  de diamètre), ces vaisseaux présentent la particularité de comporter à la fois des caractéristiques structurelles spécifiques aux capillaires et aux collecteurs lymphatiques. Ils possèdent en effet des filaments d'ancrage capillaires et sont également couverts, de façon éparse, par des cellules musculaires lisses et une membrane basale [66]. Les pré-collecteurs lymphatiques possèdent des valves intraluminales, de façon analogue aux collecteurs et expriment à la fois des marqueurs spécifiques des capillaires (Lyve-1) et des collecteurs (podoplanine) leur permettant ainsi de relier deux réseaux composés de différents types de vaisseaux et d'assurer ainsi la cohésion du système lymphatique.

## ❖ Les vaisseaux collecteurs

Contrairement aux capillaires, les vaisseaux collecteurs lymphatiques possèdent une membrane basale et sont stabilisés par des cellules musculaires lisses. De plus les cellules endothéliales qui les constituent ont une morphologie allongée (on parle de « phalanx cells ») et sont liées entre elles par des jonctions adhérentes de type « zipper-like ». Ces jonctions continues et stables associées à la membrane basale permettent d'assurer un transport de la lymphe sans risque de fuite dans les vaisseaux collecteurs. Une autre spécificité des vaisseaux collecteurs réside dans leur organisation : les collecteurs lymphatiques sont en effet organisés en plusieurs sous-unités fonctionnelles appelées lymphangions et séparées entre elles par des valves (Figure 3c). Ces valves intraluminales sont constituées par deux feuillets de cellules endothéliales spécialisées formées au stade embryonnaire E16. A ce stade l'expression des facteurs de transcription FOXC2 et PROX1 jusque-là uniforme dans l'endothélium lymphatique ne va rester à un niveau élevé que dans les cellules endothéliales lymphatiques sélectionnées pour former les valves [67]. PROX1 va ensuite activer l'expression d'un autre facteur de transcription, NFATC1, indispensable à la formation des valves [55]. Ces trois facteurs vont entraîner une réorientation des cellules perpendiculairement au flux pour finalement former un anneau dans le vaisseau [67-69]. Elles adopteront ensuite une morphologie allongée et formeront des protrusions membranaires, le tout sous le contrôle des protéines CELSR1 et VANGL2 [69]. Les deux feuillets des valves sont séparés par un réseau de matrice extracellulaire riche en fibronectine et laminine et l'ancrage des cellules endothéliales à cette matrice est assuré par une forte expression de l'intégrine  $\alpha 9$  qui se lie à la fibronectine E111A [70]. De façon intéressante, le nombre de valves par vaisseau collecteur varie en fonction du tissu et est plus important dans les organes possédant une forte pression hydrostatique. Outre ces caractéristiques structurelles, les collecteurs peuvent être aisément distingués des capillaires lymphatiques grâce à une expression plus importante de la podoplanine, et une absence d'expression du récepteur Lyve-1.



**Fig3 : Structure des vaisseaux lymphatiques**

a : Contrairement aux capillaires sanguins, les capillaires lymphatiques ne possèdent ni membrane basale ni péricytes. Les capillaires lymphatiques sont reliés à la matrice extracellulaire par des filaments d'ancrage, filaments fins (4-10nm) composés de fibrilline issus de leur membrane plasmique, et possèdent des jonctions cellulaires de type « button-like ». L'ensemble de ses spécificités structurales permettant une entrée optimale des fluides, macromolécules et cellules au sein des lymphatiques.

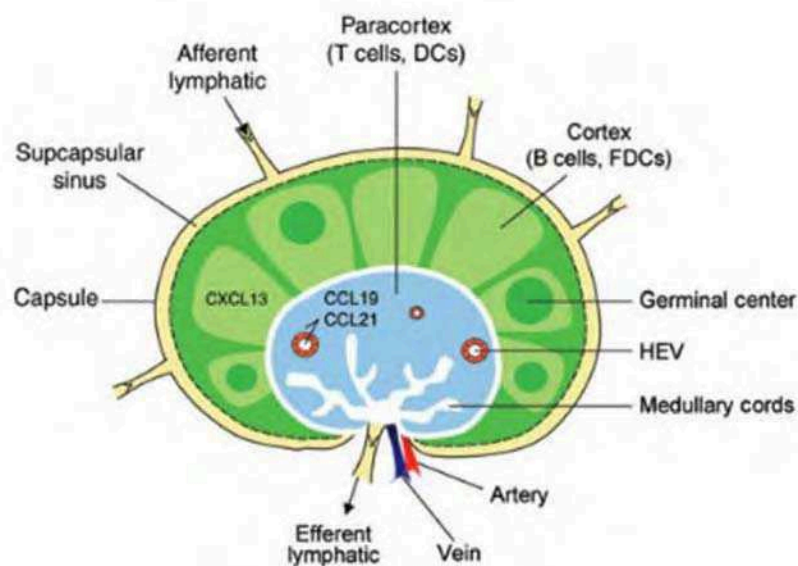
b : Organisation des jonctions des CELs dans les capillaires et collecteurs lymphatiques. La plupart des protéines impliquées dans les jonctions cellulaires sont communes aux jonctions de type « button-like » et « zipper-like » (VE-cadherin, zonula occludens-1, occludin, and claudin-5). La principale différence réside dans l'organisation des cellules impliquées dans la jonction.

c : Propulsion de la lymphe dans les vaisseaux collecteurs. Les collecteurs lymphatiques sont organisés en sous-unités fonctionnelles appelées lymphangions séparées entre elles par les valves intraluminales. L'ouverture et la fermeture cyclique des valves du lymphangion associé à la contraction des cellules musculaires lisses entourant chaque lymphangion permet le transport de la lymphe, lymphangion par lymphangion, à travers les collecteurs [178].

### ❖ Les ganglions lymphatiques

Les ganglions lymphatiques, ou nœuds lymphatiques sont le lieu de prolifération et de différenciation des cellules immunitaires . Chez l'Homme ils sont au nombre d'environ huit cent et mesurent moins d'un centimètre en conditions physiologiques. Ils sont situés tout au long du système lymphatique mais leur concentration est particulièrement importante au niveau de l'abdomen, du thorax et du cou pour les ganglions profonds et au niveau inguinal, axillaire, occipital et cervical pour les ganglions plus superficiels [71-73]. Les ganglions sont composés de plusieurs zones spécialisées comprenant (de la périphérie vers le centre) : le sinus capsulaire, qui permet l'arrivée des antigènes par les vaisseaux lymphatiques et sanguins afférents ;

le cortex du ganglion, lieu de prolifération et de différenciation des lymphocytes B (qui y sont regroupés en amas nommés follicules, responsables du grossissement des ganglions en cas de stimulation antigénique) ; le paracortex, qui abrite les lymphocytes T et les cellules dendritiques ; le hile, au niveau duquel il y a autant de lymphocytes B que de lymphocytes T, et par lequel sort le vaisseau lymphatique efférent (**Figure 4**). En parcourant le ganglion, la lymphe va donc permettre d'amener les antigènes (qu'ils soient libres ou sur des cellules présentatrices d'antigènes telles que les cellules dendritiques) jusqu'aux cellules effectrices de l'immunité [74]. De façon analogue aux vaisseaux, les ganglions lymphatiques se développent à partir des sacs lymphatiques. Au stade embryonnaire E12.5, le développement des ganglions est induit à partir du tissu conjonctif des sacs lymphatiques par des cellules inductrices appelées Lymphoïd Tissue Inducer Cells (LTIC) [75].



**Fig4 : Organisation structurelle d'un ganglion lymphatique**

Les cellules du ganglion lymphatique sont entourées par une capsule fibreuse et le sinus sous-capsulaire. Le ganglion lymphatique peut être divisé en trois grandes régions : cortex, paracortex et médulla.. Le cortex contient des nodules lymphoïdes composés essentiellement de lymphocytes B et de cellules dendritiques folliculaires (CDF) appelés « follicules primaires ». Après stimulation antigénique, les lymphocytes B prolifèrent massivement et vont donner naissance aux follicules secondaires qui seront appelés « centre germinal ». Au sein du cortex se trouve également le paracortex qui est composé de lymphocytes T et de cellules dendritiques (CDs). La médulla quant à elle est composée de lymphatiques appelés « cordons médullaires » séparés par des espaces remplis de lymphes dénommés « sinus médullaires ». La vascularisation du ganglion lymphatique inclut des vaisseaux sanguins (High Endothelial Venules ou HEVs) et lymphatiques. Les lymphocytes T et B entrent dans le ganglion dans les HEVs et en sortent dans les lymphatiques efférents. Les CDs entrent dans les ganglions via les vaisseaux lymphatiques afférents et présentent leurs antigènes au niveau du sinus sous-capsulaire [75].

## 2. Fonctions physiologiques du système lymphatique

### ❖ Homéostasie des fluides

Dans la partie artérielle du système sanguin, la pression sanguine excède la pression interstitielle des tissus environnants ce qui va entraîner un exsudat continu de fluides au niveau des capillaires. Bien qu'une partie de ces fluides soient réabsorbés au niveau des veines où la pression sanguine est plus faible, la fonction majeure du système lymphatique est de drainer ces fluides extracellulaires et de prévenir leur accumulation dans les tissus [76]. Chez un adulte, le système lymphatique transporte un à deux litres de fluides interstitiels, contenant entre vingt et trente grammes de protéines par litre, depuis les tissus vers la circulation sanguine [77, 78]. Les capillaires lymphatiques constituent le point d'entrée dans le système lymphatique des fluides, macromolécules et cellules immunitaires qui vont constituer ensemble la lymphe. Les jonctions spécialisées « button-like » permettent une entrée des fluides extracellulaires dans les vaisseaux par simple gradient de pression, de plus leurs filaments d'ancrage, liés aux fibres de collagène de la matrice extracellulaire, se tendent lors de l'accumulation de fluide ce qui va permettre d'ouvrir la lumière des capillaires, par conséquent de diminuer la pression intra-luminale, et ainsi d'accroître la captation des fluides par les capillaires. Les vaisseaux collecteurs lymphatiques, eux, se chargent du transport de la lymphe vers la circulation sanguine. Les jonctions « zipper-like » des cellules endothéliales ainsi que leur membrane basale et leur couverture par des cellules musculaires lisses empêchent la fuite de lymphe durant son transport. Contrairement au système sanguin, il n'existe pas pour le système lymphatique de pompe cardiaque qui se charge de créer une pression suffisante pour permettre un déplacement de fluides. Le transport de la lymphe dans les collecteurs est donc permis par la contraction cyclique des lymphangions qui va faire progresser la lymphe dans les collecteurs, les valves intraluminales empêchant le éventuel retour des fluides. La contraction des lymphangions est médiée à la fois par des forces extrinsèques (contraction des muscles des tissus environnants) et intrinsèques (contraction des cellules musculaires lisses). Parmi les facteurs contrôlant ce procédé, il a été montré que le NO, certaines hormones et prostanoïdes pouvaient réguler la fréquence de contraction des cellules musculaires lisses [79]. D'un point de vue macroscopique, le transport de la lymphe provenant du côté

gauche de l'organisme, de l'abdomen et des membres inférieurs s'achève dans le canal thoracique, le plus grand vaisseau lymphatique de l'organisme situé le long de l'aorte, puis dans la circulation sanguine via une connexion du canal thoracique avec la veine sous-claviaire gauche. La lymphe provenant du membre supérieur droit, du thorax et de la tête retourne quant à elle dans la circulation sanguine via une connexion entre le tronc lymphatique droit et la veine sous-claviaire droite [80]. Il est également important de noter qu'au cours de son transport, la lymphe traverse un nombre important de ganglions lymphatiques qui, en plus d'assurer une fonction de concentration de la lymphe (captation d'une partie de l'eau qu'elle contient par les vaisseaux sanguins du ganglion), permettent également au système lymphatique d'assurer la surveillance immune dans l'organisme.

#### ❖ Lymphatiques et immunité

Les vaisseaux lymphatiques constituent le moyen de transport principal des antigènes solubles ainsi que des cellules présentatrices d'antigènes pour circuler à travers l'organisme depuis les tissus périphériques vers les ganglions lymphatiques et les organes lymphoïdes secondaires (rate et thymus). Les cellules dendritiques ainsi que les lymphocytes T et B situées dans les tissus périphériques et qui expriment le récepteur CCR7 vont migrer vers les vaisseaux lymphatiques en suivant le gradient du ligand principal de CCR7 : la chimiokine CCL21 produite par les cellules endothéliales lymphatiques [81]. Le recrutement des lymphocytes T CCR10 positifs est quant à lui assuré par une sous-population de CELs exprimant à un niveau élevé le ligand CCL27 ainsi que les récepteurs DARC (Duffy blood group antigen receptor for chemokines) [82]. Une fois à l'intérieur des vaisseaux lymphatiques, le transport des différents leucocytes est principalement régulé par une série de molécules d'adhésion telles que CLEVER-1 (common lymphatic endothelial and vascular receptor-1) et le récepteur au mannose 1 [83]. La concentration importante d'acide hyaluronique dans les vaisseaux lymphatiques permet également de faciliter le transport des leucocytes via notamment son interaction avec le récepteur CD44 exprimé par les macrophages. Au niveau des ganglions lymphatiques, le recrutement des lymphocytes est permis par la sphingosine-1-phosphate (S1P), lipide bioactif synthétisé par des sphingosine kinases exprimées par les CELs. Les lymphocytes quant à eux, expriment le récepteur de la S1P, le récepteur couplé aux protéines G S1P1 et sortent des

ganglions lymphatiques en suivant le gradient de S1P [84-86]. De façon intéressante, la S1P exerce également une signalisation autocrine sur les cellules endothéliales lymphatiques en stimulant *in vitro* et *in vivo* la lymphangiogenèse [87]. En plus de transporter les cellules de l'immunité, le système lymphatique participe au transport direct de nombreux antigènes vers les ganglions lymphatiques permettant une élimination des bactéries au sein des ganglions.

#### ❖ Drainage des lipides et relations avec le tissu adipeux

Les vaisseaux lymphatiques sont essentiels à l'absorption des nutriments hydrophobes tels que les triglycérides, le cholestérol, les vitamines liposolubles ou les acides gras à partir du petit intestin. Les entérocytes qui tapissent les villosités de l'intestin regroupent ces molécules sous forme de particules hydrosolubles appelées chylomicrons et pouvant mesurer de 75 à 1200nm de diamètre. Le cas des acides gras est un peu particulier au vue de la variabilité importante de la taille de ces molécules : les acides gras à chaîne courte resteront sous forme libre et seront exportés de l'intestin via les vaisseaux sanguins tandis que les acides gras à chaîne longue seront estérifiés et incorporés dans les chylomicrons [88]. Ces chylomicrons seront ensuite pris en charge par un vaisseau lymphatique situé au centre de chaque villosité appelé lactéale lymphatique en raison de l'apparence laiteuse de la lymphe chargée en lipides. Ces lactéales vont ensuite se connecter aux vaisseaux collecteurs mésentériques qui assureront le transport des chylomicrons dans le système lymphatique. Outre cette fonction de transport de lipides il existe une association étroite entre le système lymphatique et le tissu adipeux. On peut dans un premier temps, constater que la localisation des deux systèmes dans l'organisme est proche : le tissu adipeux sous-cutané par exemple se forme à proximité des vaisseaux lymphatiques du derme tandis que le tissu adipeux viscéral entoure les vaisseaux collecteurs mésentériques, la citerne de Pecquet et le canal thoracique [89]. Cette association se retrouve au niveau des ganglions lymphatiques qui sont systématiquement entourés par un dépôt de tissu adipeux dont la lipolyse servira à fournir le ganglion lymphatique en énergie lors d'une réaction inflammatoire [89]. Il a été également montré qu'une stimulation chronique d'un ganglion lymphatique induisait une augmentation à la fois de la taille et du nombre des adipocytes qui lui

sont associés [90]. A l'inverse on a constaté dans un modèle de souris dépourvues de ganglions lymphatiques une absence de formation des tissus adipeux (ou coussinets adipocytaires) associés aux ganglions. De plus, la lymphe en elle-même stimule la différenciation des précurseurs adipocytaires en adipocytes matures [91] et une mutation du gène codant pour Prox1, en plus de provoquer un défaut dans la formation des vaisseaux lymphatiques qui entraîne une fuite de la lymphe dans les tissus interstitiels va favoriser l'obésité due à une accumulation d'adipocytes au niveau des tissus gorgés de lymphe [92]. Par ailleurs, les adipocytes peuvent aussi induire la lymphangiogenèse de façon directe (synthèse d'adiponectine [93] ainsi que de VEGF-C et -D ) ou indirecte (recrutement de macrophages notamment en conditions de stress via la production de TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , interleukine-6 [94-96]) et participent au développement du système lymphatique via la production du facteur Fiaf [97] ce qui démontre bien l'association étroite existant entre la vascularisation lymphatique et la composante adipocytaire de l'organisme.

*Au vu de l'ensemble de ses fonctions physiologiques, une régulation précise de la mise en place et de la fonctionnalité du système lymphatique est nécessaire. Tout défaut dans la mise en place des vaisseaux lymphatiques, de même que toute lymphangiogenèse excessive entraînera le développement de nombreuses pathologies.*

## **E. Rôles du système lymphatique dans les processus pathologiques.**

### **1. Le Lymphœdème**

Un lymphœdème est caractérisé par une diminution de la capacité des vaisseaux lymphatiques à transporter les fluides et les graisses tissulaires suite à un développement anormal, une obstruction ou une destruction locale du réseau lymphatique. Ceci va provoquer l'accumulation de lymphe dans les tissus causant l'apparition d'un œdème. De plus l'accumulation de fluide va provoquer une réaction inflammatoire chronique qui va aboutir à une accumulation de fibrose et de tissu



adipeux dans les tissus atteints. Généralement localisée au niveau des membres, cette pathologie impacte grandement la qualité de vie des patients en causant de fortes douleurs, des difficultés de mobilité et pour les cas les plus graves une amputation du membre touché. A l'heure actuelle, les traitements pour le lymphœdème sont basés sur de la physiothérapie, des bandes de compression et des massages permettant de stimuler mécaniquement le drainage afin de diminuer le volume de l'œdème. Cependant, aucun traitement n'agissant directement sur le réseau lymphatique n'est disponible à l'heure actuelle. Il existe deux types de lymphœdème : les lymphœdèmes primaires sont le résultat de mutations génétiques entraînant un développement anormal du réseau lymphatique tandis que les lymphœdèmes secondaires sont acquis suite à une obstruction ou une destruction du système lymphatique (**Figure5**) [98].

#### ❖ Le lymphœdème primaire : une maladie multigénique

La **maladie de Milroy** constitue une forme fréquente de lymphœdème primaire. Ce terme regroupe les lymphœdèmes primaires causés par des mutations hétérozygotes inactivant les domaines tyrosine kinase du VEGFR3. Cette pathologie se développe dès la naissance et est caractérisée par une hypoplasie des capillaires lymphatiques entraînant un lymphœdème [99].

Une mutation dans le gène codant pour le facteur de transcription FOXC2 a elle été liée au syndrome du **lymphœdème-distichiasis**, syndrome caractérisée par un lymphœdème se développant majoritairement au moment de la puberté associé à l'apparition d'une rangée de cils surnuméraires au niveau des orifices des glandes de Meibomius et de varices au niveau des veines des membres inférieurs [100, 101]. Il a été démontré que dans ce syndrome, le lymphœdème était due à une couverture des capillaires lymphatiques par des cellules musculaires lisses diminuant leur capacité d'absorption des fluides associée à une inhibition de la formation des valves dans les collecteurs lymphatiques empêchant le transport de la lymphe [102].

Des mutations sur le gène ITGA9 codant pour l'intégrine  $\alpha 9$  entraînent également des chylothorax congénitaux observés chez des fœtus humains et dans les modèles animaux [103, 104].

Des mutations sur le gène codant pour le facteur de transcription SOX18 sont associées au syndrome **Hypotrichose - lymphœdème – télangiectasie** caractérisé par une réduction voire une absence de cils et de sourcils et de cheveux, des lymphœdèmes au niveau des membres inférieurs ou des paupières et des anomalies des vaisseaux sanguins périphériques [105], le phénotype de cette pathologie humaine est reproduit chez des souris « Ragged » portant des mutations spontanées abolissant l'activation de SOX18 [106].

Le syndrome **Hennekam**, syndrome conjuguant lymphœdème, lymphangiectasie (dilatation des vaisseaux et ganglions lymphatiques) et retard mental a été associé notamment à des mutations sur le gène du facteur CCBE1. Le lymphœdème observé dans cette pathologie affecte les membres inférieurs et la face, se développe dès la naissance, de façon asymétrique et progresse au cours du temps renforcé par la lymphangiectasie qui touche majoritairement la peau et les intestins [107].

Enfin, des mutations dans une protéine régulatrice de l'activité du facteur NF-κB, la protéine NEMO sont associées à une pathologie complexe : le syndrome de **dysplasie-ectodermique-anhidrotique-immunodéficience-ostéopétrose-lymphœdème** qui associe le développement d'un lymphœdème à une immunodéficience sévère, une ostéopétrose (augmentation anormale de la densité de l'os) et une dysplasie ectodermique anhidrotique (dermatose d'une dysmorphie faciale, d'un retard staturo-pondéral et d'une blépharite sévère) [108].

Bien que ces pathologies soient rares et non létales, elles affectent de façon considérable la qualité de vie des personnes atteintes. Il est donc important de les prendre en compte afin de palier à l'actuelle absence de traitement.

#### ❖ Lymphœdème secondaire

Les lymphœdèmes primaires restent des maladies rares, l'ensemble de leurs différentes formes ne représentant qu'environ 1% du total des lymphœdèmes. La majorité des lymphœdèmes sont dits secondaires, c'est-à-dire acquis suite à une perturbation du réseau lymphatique chez un individu disposant d'un système lymphatique fonctionnel [109].

- Lymphœdème secondaire d'origine infectieuse

Dans les pays en voie de développement, ces lymphœdèmes sont majoritairement causés par une filariose lymphatique. La filariose lymphatique (également appelée elephantiasis) désigne une infection du réseau lymphatique par les parasites *Wuchereria bancrofti*, *Brugia malayi* ou *Brugia timori*, vers de la famille des nématodes communément appelés filaires. Quel que soit le parasite responsable, la filariose va conduire à une obstruction des vaisseaux lymphatiques par le parasite qui conduira à la formation de lymphœdèmes touchant en majorité les membres inférieurs ou les organes génitaux. L'installation du parasite dans les vaisseaux est provoqué par une réaction inflammatoire spécifique induite par le filaire stimulant la production de VEGF-A,-C et -D conduisant à une hyperplasie permanente des vaisseaux lymphatiques facilitant le développement intra-lymphatique du parasite [110]. Certains individus étant naturellement protégés contre les formes les plus sévères de la maladie du fait de mutations génétiques entraînant une réaction inflammatoire « filaire-spécifique » atténuée [111]. La filariose reste la première infection responsable de lymphœdèmes secondaires et la première cause de lymphœdèmes au niveau mondial affectant environ cent millions de personnes [110]) mais d'autres infections bactériennes peuvent elles aussi donner lieu à un lymphœdème : c'est le cas par exemple des érysipèles, infection de la peau due au streptocoque b-hémolytique, ou bien des lymphangites, infection directe des vaisseaux lymphatiques causée par des streptocoques ou plus rarement par des staphylocoques [109].

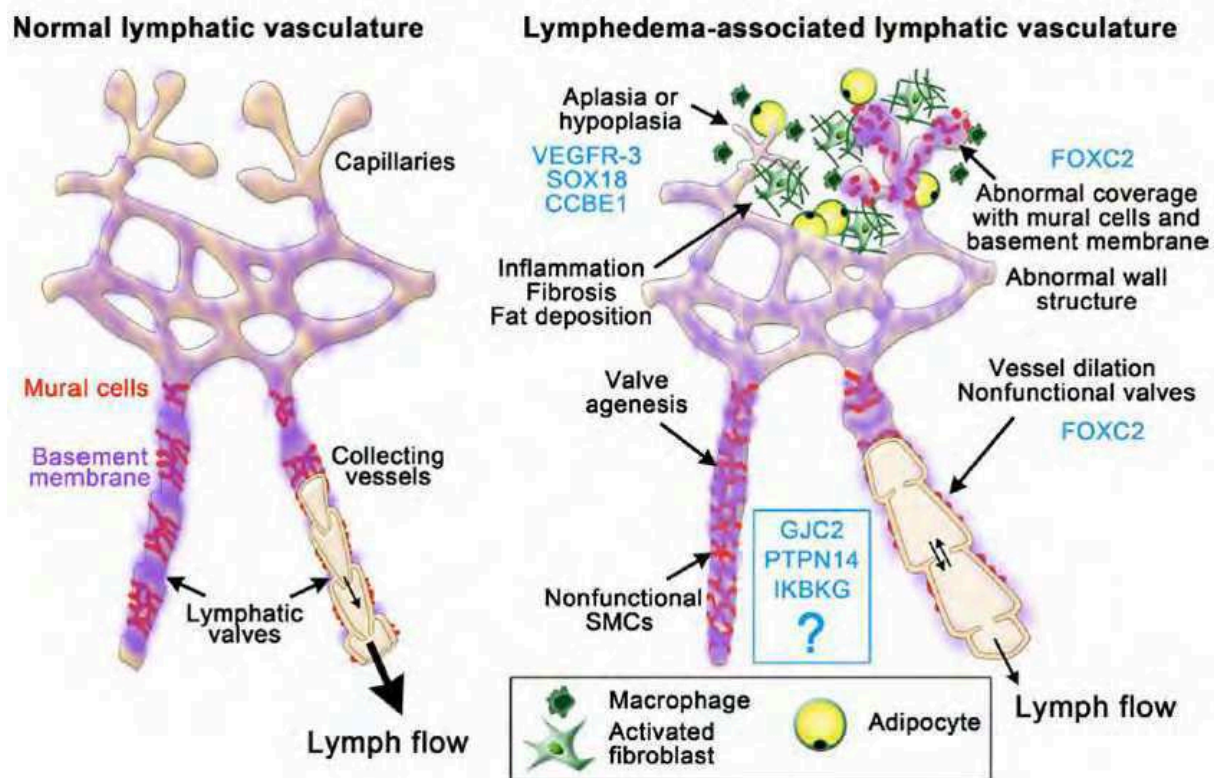
- Lymphœdème secondaire d'origine chirurgicale

La cause la plus fréquente de lymphœdème secondaire est associée à la chirurgie pratiquée dans les traitements anticancéreux. La chirurgie du cancer de sein est notamment la plus grande cause de lymphœdème dans les pays développés. Dans le cas du cancer du sein, les cellules tumorales disséminant à travers la glande mammaire puis dans les ganglions, une mastectomie associée à une ablation de la chaîne ganglionnaire axillaire est pratiquée, provoquant alors une destruction du réseau lymphatique locale et favorisant le développement d'un lymphœdème au niveau du membre supérieur [112]. Un lymphœdème touchant les membres inférieurs étant quant à lui observé chez les hommes ayant subis une ablation des

ganglions pelviens dans le cadre d'un cancer de la prostate tandis qu'un tiers des patients ayant subis une lymphadenectomie (du ganglion inguinal le plus souvent) dans le cadre d'un mélanome sera également touché par cette pathologie. La proportion de patients développant un lymphœdème après avoir subis une lymphadénectomie (ablation de ganglion lymphatique) est estimée entre 20 et 35% selon le type de cancer considéré [113], ce pourcentage étant constant malgré les efforts effectués pour développer de nouvelles techniques chirurgicales [114, 115]. La caractéristique la plus frappante de ce type de lymphœdème est l'hétérogénéité de son développement : pour une même chirurgie, il peut survenir quelques semaines, quelques mois ou quelques années après l'opération et peut avoir différents degrés de sévérité et une évolution plus ou moins rapide. De nombreuses études ont donc été entreprises pour tenter de détecter les patients susceptibles de développer un lymphœdème mais, bien que le développement de cette pathologie soit corrélé à l'IMC [116], aucun facteur de susceptibilité au développement d'un lymphœdème secondaire, qu'il soit environnemental ou génétique, n'a été validé à l'heure actuelle. Quelques critères intrinsèques au patient ont néanmoins été identifiés comme étant modifiés lors du développement de l'œdème et pouvant donc servir à placer une surveillance approfondie sur un certain types de patients : il s'agit de l'élasticité de la peau, du tonus musculaire local (qui en se contractant facilite le drainage des fluides par les lymphatiques) et la teneur en eau de la peau [112, 117, 118]. Ce dernier paramètre a également pu être utilisé pour détecter de façon précoce les lymphœdèmes avant l'apparition de symptôme [118].

De façon identique au lymphœdème primaire, seuls des traitements symptomatiques sont disponibles pour cette pathologie consistant en des massages et port de manchons de contention.

*Le défi thérapeutique posé par cette pathologie est donc de parvenir à rétablir un réseau lymphatique fonctionnel. Pour ce faire, il est nécessaire d'identifier quels sont les facteurs impliqués dans la lymphangiogenèse ainsi que leurs modes de régulation.*



**Fig5 : Principales causes du lymphœdème chez l'Homme.**

Le transport de la lymphe peut être interrompu du fait d'une hypoplasie des capillaires lymphatiques, d'une couverture anormale par une membrane basale ou des CMLs de ces mêmes capillaires ainsi que du fait d'une absence ou d'un dysfonctionnement des valves intraluminales des collecteurs lymphatiques. La circulation de la lymphe peut être également obstruée suite à une infection ou une destruction locale du réseau lymphatique. Un défaut du drainage lymphatique conduit à une fibrose du tissu touché, un dépôt excessif de tissu adipeux et une réponse inflammatoire chronique. Les gènes les plus fréquemment impliqués dans le lymphœdème sont mentionnés en bleu. [178]

## 2. La dissémination métastatique

L'agressivité et la létalité d'un cancer ne sont que rarement dues à la tumeur primaire mais bien plus souvent à sa capacité de former des métastases dans de nombreux organes distants du site de développement de la tumeur primaire. Bien que les tumeurs puissent également disséminer par simple migration cellulaire ou par la voie sanguine, les cellules tumorales forment majoritairement des métastases en passant par le système lymphatique. Les métastases dans les ganglions lymphatiques proches des tumeurs primaires (appelés ganglions sentinelles) représentent d'ailleurs la première étape du processus de dissémination pour de nombreux cancers tels que le carcinome du sein, du colon ou de la prostate [119, 120]. La présence de cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques est de ce fait

devenue, en clinique, un paramètre majeur pour établir le stade de développement d'un cancer et en adapter le traitement. Du fait de la perméabilité accrue des vaisseaux lymphatiques par rapport aux vaisseaux sanguins, les cellules tumorales peuvent en effet pénétrer facilement dans les vaisseaux présents sur le site du développement de la tumeur en particulier dans les vaisseaux lymphatiques situés en périphérie de la tumeur [121]. En effet, bien que des vaisseaux lymphatiques situés à l'intérieur des tumeurs aient pu être détectés, la fonctionnalité de ces vaisseaux reste incertaine, certaines études suggérant que du fait de la forte pression intra-tumorale ces vaisseaux seraient maintenus fermés et donc ne participeraient pas à la dissémination métastatique [122, 123].

Outre cette colonisation du réseau lymphatique préexistant, les cellules tumorales peuvent également induire la lymphangiogenèse en produisant un grand nombre de facteurs lymphangiogéniques tels que les VEGF-C, VEGF-D, VEGF-A FGF2, HGF, et PDGF-B [124-126]. Cette surexpression de VEGF-C et -D va réguler à la fois quantitativement et qualitativement la lymphangiogenèse tumorale en induisant à la fois le bourgeonnement et la formation de nouveaux vaisseaux mais également la dilatation des lymphatiques environnants permettant ainsi un transport optimal des cellules tumorales [127-130] (**Figure 6**). Ces deux facteurs sont également capables d'induire la dissémination métastatique, dans les ganglions lymphatiques puis dans les organes distants, dans des tumeurs qui naturellement ne métastasent pas [131]. Cette production de facteurs lymphangiogéniques par la tumeur peut également avoir lieu de façon indirecte grâce aux cellules du stroma tumoral : les macrophages associés aux tumeurs sont des sources connues de VEGF-C [132] tandis que les fibroblastes du microenvironnement vont produire de l'acide hyaluronique en grande quantité [133].

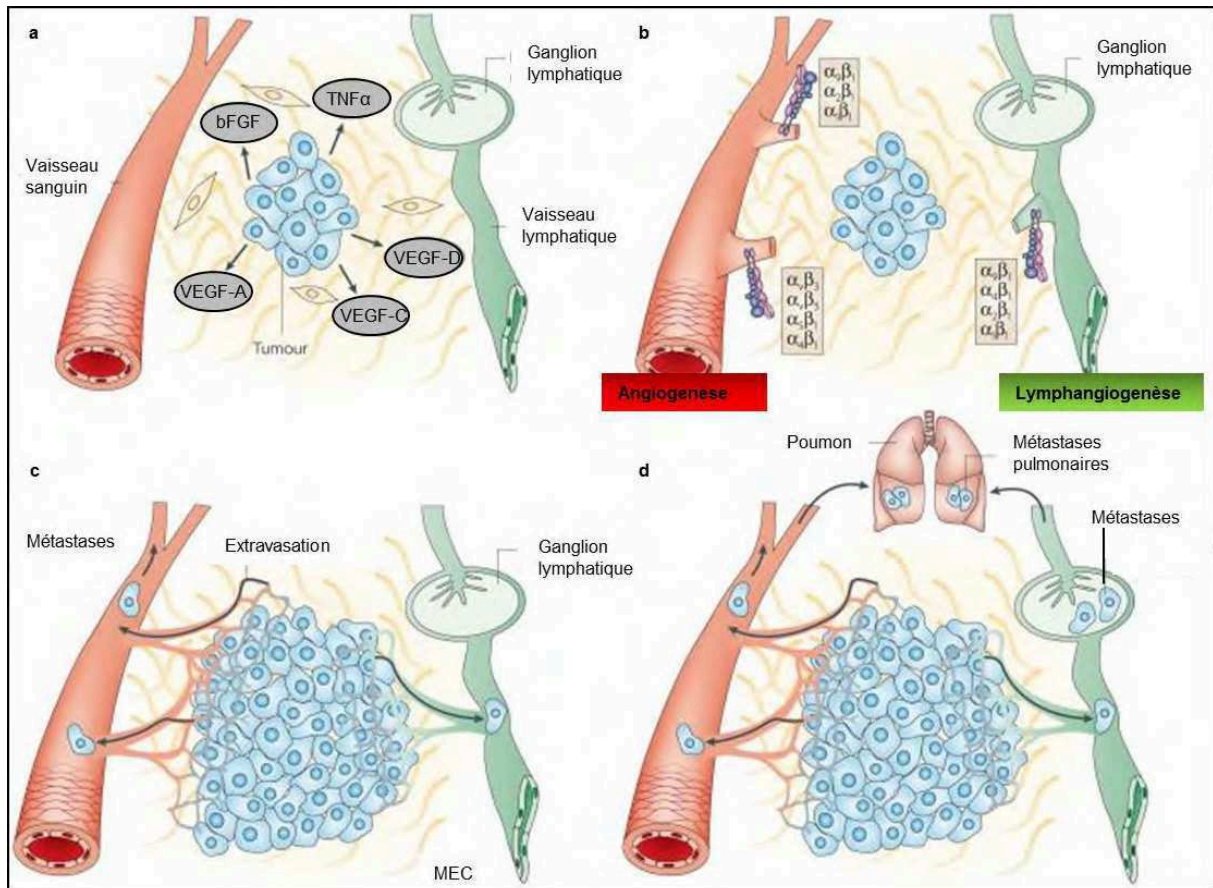
En plus de leur capacité à induire la lymphangiogenèse, les cellules tumorales sont capables de détourner à leur profit des mécanismes de signalisation physiologiquement utilisés par l'endothélium lymphatique pour assurer la surveillance immune afin d'accélérer leur migration vers les vaisseaux lymphatiques. Les cellules tumorales peuvent en effet exprimer le récepteur CCR7 de la chimiokine CCL21 produites par les CELs ainsi que le récepteur CXCR4 du facteur SDF1[134, 135].

Il apparaît également, qu'en plus de leur effet local, les facteurs lymphangiogéniques produits par la tumeur agissent à distance en induisant la lymphangiogenèse dans les ganglions lymphatiques sentinelles avant même leur colonisation par les cellules tumorales. Cette lymphangiogenèse semble favoriser la mise en place d'une niche métastatique, les cellules de la tumeur primaire préparant le microenvironnement du ganglion afin de le rendre plus hospitalier pour la survie et la croissance des cellules tumorales avant leur arrivée [136-139]. Il a également été suggéré que l'interaction entre les cellules tumorales et les ganglions lymphatiques favorisait la tolérance immune en activant la présentation croisée de certains antigènes tumoraux aux lymphocytes T CD8 positif qui conduisait à une destruction des lymphocytes T spécifiques de ces antigènes [140].

Plus qu'un simple réceptacle pour les cellules tumorales, il semble que les ganglions lymphatiques, une fois colonisés, constituent de véritables plateformes de lancement pour les cellules tumorales en augmentant leur potentiel métastatique et préparent ainsi la dissémination métastatique dans les organes distants de la tumeur primaire.

*Au vu de ces données, la lymphangiogenèse tumorale représente donc une cible thérapeutique majeure pour prévenir la dissémination thérapeutique. De plus, la capacité des tumeurs à induire la lymphangiogenèse est une des causes probables de l'échec relatif des traitements anti-angiogéniques dans un certain nombre de cancer : en réponse au blocage de la voie sanguine, les tumeurs peuvent augmenter leur production de facteurs lymphangiogéniques et disséminent par voie lymphatique. Afin de palier à ces phénomènes de compensation, les traitements futurs devront impérativement prendre en compte le système lymphatique comme un acteur important du processus tumoral et viser à bloquer les deux systèmes vasculaires de façon simultanée pour priver la tumeur de toute voie de dissémination.*





**Fig6 : La vascularisation sanguine et lymphatique : deux voies privilégiées de dissémination métastatique**

Les cellules tumorales sécrètent des facteurs de croissances et des chimiokines telles que le VEGF-A, FGF-2 et le TNF $\alpha$  qui vont aller stimuler la prolifération de l'endothélium vasculaire quiescent. La tumeur sécrète également des facteurs tels que le VEGF-C, VEGF-D et le HGF qui vont stimuler la croissance de nouveaux vaisseaux lymphatiques. Le VEGF-C produit par la tumeur va également induire une lymphangiogénèse dans les ganglions lymphatiques sentinelles. Les vaisseaux sanguins nouvellement formés vont promouvoir la croissance de la tumeur en l'approvisionnant en oxygène et nutriments tandis que les vaisseaux lymphatiques draineront les déchets métaboliques et les fluides extra tissulaires réduisant ainsi la pression osmotique. Les deux systèmes vasculaires vont en outre offrir une voie de dissémination métastatique à la tumeur [262].

### 3. Le sarcome de Kaposi

Cette tumeur de la famille des angiosarcomes est causé par l'herpès-virus humain de type 8 (HHV8) ou virus de l'herpès associé au sarcome de Kaposi (KSHV) ainsi que par le HIV. Pouvant adopter une forme cutanée, muqueuse ou viscérale ce sarcome d'origine endothéliale et caractérisé par une extravasation de globules rouges et un important infiltrat de cellules inflammatoires [141] démontre un cas unique de reprogrammation par un virus du programme de différenciation des cellules endothéliales. En effet, les cellules du sarcome de Kaposi expriment à la fois des marqueurs spécifiques du phénotype lymphatique (VEGFR-3, Lyve-1 et podoplanine) et sanguin (CD34, CXCR4) et l'infection de cellules endothéliales sanguines (CEs)



avec le HHV8 induit une reprogrammation du transcriptome vers un profil de CELs tandis qu'une infection de CELs avec ce virus induit cette fois une reprogrammation vers un phénotype proche de celui des CESs [142, 143].

*Etudier la sensibilité de ce sarcome aux facteurs lymphangiogéniques, et le cas échéant, les inhiber pourrait représenter un traitement permettant d'agir à la fois sur le développement de la tumeur primaire, l'infiltrat de cellules inflammatoires et la dissémination tumorale.*

#### 4. Hypertension

Il a été démontré que la quantité d'électrolytes présents dans l'organisme, et en particulier d'ions  $\text{Na}^+$  favorisait l'apparition de l'hypertension bien que les mécanismes liant les deux phénomènes soient encore mal connus [144]. Il a récemment été montré que, du fait de ses fonctions régulatrices pour l'homéostasie des fluides, le système lymphatique jouait également un rôle dans la prévention de l'hypertension. La prolifération des vaisseaux lymphatique est en effet augmentée suite à une augmentation de l'expression de VEGF-C en réponse à un régime alimentaire riche en sel [145]. Dans ce modèle, les monocytes vont détecter l'accumulation d'ions  $\text{Na}^+$  et  $\text{Cl}^-$  induite par l'hypertension ce qui va activer l'expression des protéines TonEBP (tonicity-responsive enhancer binding protein). Cette protéine va se lier sur le promoteur du gène du VEGF-C et activer sa transcription. Le VEGF-C ainsi secrété va permettre l'induction de la lymphangiogenèse cutanée ce qui augmentera l'efficacité du drainage des fluides et supprimera l'accumulation d'ions prévenant ainsi l'apparition de l'hypertension. De plus, dans ce modèle, le VEGF-C diminue la pression sanguine via un mécanisme médié par VEGFR2 et la NOS endothéliale, ce mécanisme étant supprimé par l'ajout d'un anticorps bloquant [146].

*Bien qu'il faille encore approfondir les connaissances dans ce domaine, stimuler la lymphangiogenèse peut donc représenter un moyen jusqu'alors insoupçonné de prévenir l'apparition de certains types d'hypertension.*

## 5. Lymphangioliomyomatose (LAM)

La LAM est une maladie rare touchant les poumons et affectant uniquement les femmes, généralement en âge de procréer. Elle est caractérisée par une prolifération des vaisseaux lymphatiques ainsi que de cellules de type muscle lisses immatures appelées cellules LAM et par la formation de kystes, l'ensemble de ces phénomènes entraînant une destruction progressive des poumons avec pour seule solution thérapeutique une transplantation pulmonaire [147]. La LAM est souvent associée au développement de tumeurs bénignes du rein : les angiomyolipomes (AML) [147]. L'origine des cellules de type muscle lisse caractéristiques de la LAM est encore inconnue mais il a été démontré qu'elles exprimaient les facteurs lymphangiogéniques VEGF-C et -D [148, 149] ce qui leur permet de disséminer rapidement à travers les lymphatiques. Cette dissémination de cellules LAM va entraîner un blocage des vaisseaux lymphatiques de la cavité abdominale et du thorax causant également une accumulation de lymphes et donc des œdèmes de la cavité abdominale appelés chylothorax. La cause principale de LAM identifiée à ce jour est une activation anormale de la kinase mTOR (mammalian target of rapamycine), les patients développant la maladie étant souvent porteurs d'une mutation sur les gènes TSC1 et 2 (repressors tuberous sclerosis complex-1 and -2), deux protéines responsables de l'inhibition de mTOR en conditions physiologiques [150, 151]. Grâce à ces avancées, des résultats encourageants ont été obtenus chez des patients atteints de LAM et traités aux inhibiteurs de mTOR [152].

## 6. La maladie de Gorham-Stout

La maladie de Gorham est une maladie rare, d'étiologie inconnue, et caractérisée par une ostéolyse massive associée à une prolifération locale de vaisseaux. Une des complications fréquentes de cette maladie est une dysfonction du système lymphatique entraînant des chylothorax et des épanchements d'ascites [153]. Les cellules endothéliales présentes au niveau des lésions osseuses sont d'origines lymphatiques : il a en effet été montré qu'elles exprimaient les marqueurs LYVE-1, podoplanine et également le récepteur VEGFR-3 [154]. Dans les lésions osseuses propres à la maladie de Gorham ces cellules sont associées à des cellules de type

ostéoclastes immatures sécrétant un grand nombre de cytokines, de facteurs de croissance tels que le VEGF-A et étant très invasive notamment via la voie lymphatique [155]. Cette pathologie montre donc un lien étonnant entre cellules endothéliales lymphatiques et ostéoclastes dont les implications n'ont pas encore été explorées.

## 7. L'inflammation

### ❖ Inflammation aigue

Outre le transport des cellules de l'immunité, les lymphatiques participent à la surveillance immune en transportant certains médiateurs de l'inflammation. Le TNF- $\alpha$ , par exemple, est relargué lors d'une inflammation par les granulocytes sous forme de particules composées d'héparine. Ces complexes vont être pris en charge par les lymphatiques et acheminés vers les ganglions lymphatiques permettant un transport rapide de molécules pro-inflammatoires [156].

La lymphangiogenèse est également induite dans les ganglions lymphatiques lors d'une inflammation par une surexpression de VEGF produit par les cellules B folliculaires des ganglions [157]. Cette association entre vaisseaux lymphatiques et cellules de l'immunité est également retrouvée au niveau des tissus inflammés. Les macrophages et les granulocytes produisant en effet de grandes quantités de VEGF-C et VEGF-D lors d'une inflammation et cette synthèse de facteurs lymphangiogéniques étant elle-même activée en réponse à une stimulation de ces cellules par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$  [158]. De plus, certaines cellules endothéliales lymphatiques expriment de façon constitutive NF- $\kappa$ B, le principal facteur de transcription impliqué dans les voies de signalisation de l'inflammation et des réponses immunes [159]. L'activation de NF- $\kappa$ B dans ces cellules augmente l'expression de Prox1 et VEGFR3 les rendant encore plus sensibles aux VEGF-C et -D produit par les leucocytes [160]. En plus d'être des acteurs essentiels de la réaction inflammatoire, les vaisseaux lymphatiques participent également à la résolution de l'inflammation en contribuant à drainer les leucocytes hors des tissus inflammés, à diminuer le gonflement local induit par l'inflammation et permettent également d'induire la mobilisation des macrophages CD11b positifs important pour la résolution de l'inflammation [161].

### ❖ Inflammation chronique

Du fait de ses fonctions dans la surveillance immune et dans les différentes phases de la réaction inflammatoire, le système lymphatique est également impliqué dans de nombreuses pathologies caractérisées par une inflammation chronique non résolue. Une hyperplasie des vaisseaux lymphatiques ou une lymphangiogenèse accrue a, en effet, été observée dans la peau dans le cadre du psoriasis [162], dans la muqueuse intestinale de patients atteints de colite ulcéreuse ou de maladie de Crohn [163] ainsi que dans les articulations touchées par la polyarthrite rhumatoïde [164]. En plus du rôle évident des macrophages recrutés sur le site de l'inflammation qui approvisionnent les vaisseaux lymphatiques en VEGF-C et -D [158], le VEGF-A semble être un acteur crucial de la lymphangiogenèse associée à l'inflammation chronique. Son expression est notamment augmentée dans le psoriasis chez l'Homme [165] et une surexpression de ce facteur chez la souris induit une inflammation prolongée après une lésion cutanée tandis que son inhibition par un anticorps bloquant inhibe la lymphangiogenèse associée à cette inflammation [166].

Inversement, la lymphangiogenèse induite par le VEGF-C semble avoir un rôle protecteur dans les pathologies associées à une inflammation chronique. Son expression est augmentée dans la membrane synoviale des articulations de souris ou de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde [167] mais il semble induire une lymphangiogenèse participant activant au drainage des leucocytes situés dans ces tissus et donc à une résolution plus efficace de l'inflammation [168].

### ❖ Rejet de greffe

Les vaisseaux lymphatiques, en tant que principaux transporteurs des cellules de l'immunité, sont également impliqués dans le rejet de greffe. Dans le cadre de la transplantation rénale, il a été montré que les vaisseaux lymphatiques de l'hôte se développant dans le greffon sur-exprimaient la chimiokine CCL21 attirant les cellules dendritiques porteuses du récepteur CCR7 induisant ainsi une reconnaissance du greffon en tant qu'antigène par le système immunitaire de l'hôte [169]. A l'inverse, inhiber la lymphangiogenèse permet de réduire l'expression de

CCL21 et de diminuer le rejet de greffe dans un modèle de transplantation cardiaque chez le rat [170].

Le rôle des lymphatiques est également primordial dans le rejet de greffe de cornée. La cornée est dépourvue de lymphatiques en conditions physiologiques mais en cas d'inflammation ou d'un rejet de transplantation on assiste à un envahissement de cet organe par les vaisseaux lymphatiques [171]. La transplantation de cornée a habituellement un taux élevé de succès mais celui-ci chute drastiquement dès lors que la lymphangiogenèse débute [172]. Les vaisseaux lymphatiques vont en effet être le point d'entrée à la fois des cellules présentatrices d'antigène et des lymphocytes vers le greffon et vont donc participer à sa destruction par le système immunitaire [171, 173]. De nouvelles thérapies visant soit à enlever les ganglions reliés aux lymphatiques de la cornée pour stopper l'afflux de cellules immunitaires [174] soit à inhiber directement la lymphangiogenèse sont actuellement en cours de développement chez l'animal afin d'augmenter le taux de survie des greffons [175].

## **II. Facteurs de croissance et voies de signalisation impliquées dans la lymphangiogenèse.**

### **A. Le VEGF-C**

La voie VEGF-C/VEGFR3 est la voie de signalisation majeure impliquée dans la lymphangiogenèse. Identifié par clonage en 1996 [176], le gène du VEGF-C (108kb) est situé sur le chromosome huit chez la souris, et sur le chromosome 4 chez l'Homme [177]. Il est constitué de sept exons générant un ARNm de 2,4kb. Le pourcentage d'homologie de l'ARNm du VEGF-C est de 80% entre l'Homme et la souris mais il existe un variant d'épissage (absence de l'exon 4) présent dans certains tissus chez l'Homme et non observé chez la souris [177]. Le promoteur du gène du VEGF-C présente la particularité de ne pas comporter de TATA box.

Les étapes de sa maturation protéique ont été bien caractérisées. Le VEGF-C est synthétisé sous forme d'une préproprotéine de 58kDa. Il est ensuite clivé par des

proprotéines convertases intracellulaires en deux formes de 29 et 31kDa qui vont se dimériser en formant des ponts disulfures avant d'être sécrétées [120, 178, 179]. Sous cette forme le VEGF-C ne peut se lier qu'au VEGFR3. Après sécrétion, le VEGF-C est de nouveau clivé par des protéases telles que la plasmine pour former une protéine homodimérique de 21kDa pouvant se lier avec une forte affinité à la fois aux récepteurs VEGFR2 et VEGFR3 [48].

Le VEGF-C est essentiel à la prolifération, la migration et la survie des CELs ainsi que durant la lymphangiogenèse embryonnaire [180]. Sa délétion est létale chez la souris à E15. Sa liaison au récepteur VEGFR-3 active trois principales cascades de signalisation essentielles aux CELs. La petite GTPase Ras outre ces effets directs sur l'endothélium lymphatique in vivo [180, 181] va sur-activer les voies MAPK/ERK et PI3K/Akt. La voie MAPK/ERK est essentielle à la prolifération des CELs et même au maintien du phénotype lymphatique, une forte expression de MAPK dans des BECs pouvant conduire à l'apparition de marqueurs lymphatiques dans ces cellules notamment Prox1 et Sox18 [180]. La voie PI3K/Akt, et plus particulièrement l'isoforme p110 $\alpha$  majoritairement exprimée par les CELs [108], va activer la synthèse protéique en activant mTOR et est à ce titre essentiel au métabolisme, à la survie et à la migration de ces cellules [182].

En tant que facteur clé de la lymphangiogenèse, le VEGF-C est bien évidemment impliqués dans toutes les pathologies liées à une perturbation de la fonction du système lymphatique. Néanmoins il a été montré que le VEGF-C possédait des fonctions pro-tumorales indépendantes de ses propriétés lymphangiogéniques : il augmente en effet l'expression de protéines pro-tumorales dans les cancers de l'œsophage et du col de l'utérus [183, 184] et est impliqué dans la résistance des tumeurs au stress oxydant [185]. Récemment son implication dans l'endométriose a également été démontrée [186].

### 1. Régulations transcriptionnelles

Le promoteur du VEGF-C contient de nombreux sites de fixation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B permettant l'induction de sa transcription lors de l'inflammation

[187]. Outre NF- $\kappa$ B, le facteur de transcription C/EBP- $\delta$  (CCAAT/enhancer-binding protein- $\delta$ ) active la transcription du VEGF-C. Ce facteur, surexprimé dans les cancers, est un élément permettant d'expliquer la capacité des tumeurs à induire la lymphangiogenèse[188]. De plus, certains stress environnementaux sont également capables d'augmenter la transcription du VEGF-C : ainsi une hyperthermie ou un stress oxydatif permettent, via la fixation de la protéine LEDGF/p75 (lens epithelium-derived growth factor) sur un élément de réponse au stress (STRE) présent sur le promoteur du gène du VEGF-C, d'activer la transcription de ce facteur [189]. Bien que de nombreuses études lient l'expression du VEGF-C à l'hypoxie notamment dans le cadre du développement tumoral [190, 191], aucune régulation transcriptionnelle induite par l'hypoxie n'a pu être identifiée à l'heure actuelle pour le VEGF-C.

## 2. Régulations traductionnelles

Au cours de ma thèse, je me suis intéressé aux régulations traductionnelles du VEGF-C. Nous avons identifié une régulation originale basée sur des éléments appelés sites d'entrées interne du ribosome ou IRES et que je décrirai ultérieurement **(Résultats point I)**

### ❖ Les IRES

Lorsque les cellules sont exposées à un stress elles diminuent leur synthèse protéique afin d'économiser de l'énergie [192-195].

La traduction des ARNm cellulaires en protéines s'effectue majoritairement selon un mécanisme dépendant de la coiffe des ARNm. L'initiation de la traduction est permise par la fixation du facteur eIF4F (composé d'eIF4E, 4 G et 4A) sur la coiffe de l'ARNm. Ce facteur va ensuite permettre le recrutement de la sous-unité 40S qui va scanner l'ARNm jusqu'au codon AUG initiateur. La sous-unité 60S sera ensuite recrutée et la traduction de la région codante de l'ARNm débutera. En condition de stress, la cellule va inhiber ce mécanisme de traduction en affectant l'activité des kinases mTOR et PERK [196, 197]. L'inactivation de mTOR provoque une hypophosphorylation de la protéine de liaison à eIF4E (4E-BP1) qui va séquestrer le

facteur eIF4E empêchant ainsi la formation du complexe eIF4F sur la coiffe et donc l'initiation de la traduction [198, 199]. Un stress cellulaire provoquera également un stress du réticulum endoplasmique dû à un mauvais repliement des protéines en absence d'oxygène. Ce stress va ensuite activer la kinase PERK qui va phosphoryler le facteur eIF2 $\alpha$  et ainsi bloquer le transport de l'ARNt méthionine jusqu'au ribosome bloquant là encore l'initiation de la traduction [200].

L'étude des virus de la famille des picornavirus a permis de résoudre l'énigme posée par les protéines dont l'expression augmentait en condition de stress malgré un blocage de la traduction. Elles ont mis en évidence un mécanisme d'initiation de la traduction indépendant de la coiffe (les ARN viraux n'étant pas coiffés). Ce mécanisme se base sur des structures secondaires tridimensionnelles appelées (IRES) et qui permettent un recrutement direct de la sous-unité 40S du ribosome sans intervention de la coiffe [201]. Outre les virus, il a été montré qu'un petit nombre d'ARNm cellulaire comportait également des IRES leur permettant ainsi d'être traduits en conditions de stress [202]. Ces IRES sont plus fréquemment présents dans les ARNm ayant des longues régions 5' NT et la majorité des IRES identifiés se trouvent sur des ARNm de protéines associées au contrôle de la survie et de la mort cellulaire, de facteurs de croissance et de facteurs de transcription (c-myc) : ils permettent donc une régulation plus fines de molécules cruciales dont l'expression doit être contrôlée de façon stricte dans la cellule même en cas de stress [203, 204]. La fonctionnalité des IRES, c'est-à-dire leur capacité à recruter la sous-unité 40S du ribosome, est majoritairement déterminée par la structure qu'ils adoptent plutôt que par la séquence nucléotidique qui les compose. L'activité des IRES est ainsi régulée par un certain nombre de protéines appelées ITAFs (IRES trans-acting factors) et capable de stabiliser leur conformation pour permettre un recrutement efficace du ribosome.

L'IRES présent dans la région 5'NT de l'ARNm du VEGF-C est activé par l'hypoxie à la fois *in vitro* et *in vivo* dans plusieurs lignées tumorales. Il permet à la tumeur de maintenir son expression de VEGF-C même en conditions de stress cellulaire et ainsi de promouvoir une lymphangiogenèse tumorale facilitant la dissémination métastatique (**Résultats point I**). Malgré cette découverte, la traduction des VEGF



spécifiquement impliqués dans la lymphangiogenèse est un domaine très peu étudié et ce mécanisme de traduction est à ce jour le seul connu pour le VEGF-C.

## **B. Le VEGF-D**

Le VEGF-D a été identifié par clonage en 1996 [205]. Son gène mesure 40kb chez l'Homme et 30 chez la souris et est situé sur le bras court du chromosome X chez les deux espèces. Sa région codante est composée de sept exons séparés par six introns transcrits en un unique ARNm de 2,5kb [206]. De façon analogue au VEGF-C le promoteur du gène du VEGF-D ne possède pas de TATAA box mais dispose de domaine de fixation du facteur AP-1 permettant à ce facteur de réguler sa transcription [207].

De façon analogue au VEGF-C, le VEGF-D est synthétisé sous la forme d'un précurseur protéique de 53kDa [208]. Une fois sécrété, il est ensuite clivé au niveau des régions N et C terminales pour former une protéine mature de 29 ou 31kDa dont l'affinité pour les récepteurs VEGFR2 et VEGFR3 est augmentée le rendant ainsi plus efficace pour induire la lymphangiogenèse [209]. Cependant, la délétion du VEGF-D n'est pas létale chez la souris et son impact sur le réseau lymphatique se limite à une diminution de la densité vasculaire lymphatique dans les bronchioles [210]. Administré à des animaux possédant un réseau lymphatique déficient, le VEGF-D permet en revanche de rétablir la lymphangiogenèse [211], la relative innocuité de sa délétion embryonnaire s'explique donc certainement par une surexpression des autres facteurs lymphangiogéniques, VEGF-C en particulier qui compense l'absence de VEGF-D.

De la même manière que celle du VEGF-C, la fixation du VEGF-D sur le récepteur VEGFR-3 va induire l'activation de Ras et des voies de signalisation MAPK/ERK et PI3K/Akt permettant la survie, la prolifération et la migration des LECs.

Son implication dans les pathologies liées à une lymphangiogenèse excessive (dissémination métastatique, psoriasis [212]), à l'exception de la polyarthrite rhumatoïde [167], a été clairement établie. Le VEGF-D intervient également, avec le VEGF-C, dans la lymphangiogenèse observée dans les lésions athérosclérotiques

même si l'impact de cette lymphangiogenèse sur le devenir des plaques d'athérome reste encore à déterminer [213]. Une augmentation de l'expression de ce facteur a également été constatée chez les patients souffrants de pneumopathies d'hypersensibilité [214] renforçant le lien entre VEGF-D et tissu pulmonaire déjà observé au cours du développement embryonnaire [209].

### 1. Régulations transcriptionnelles

Les régulations de l'expression du VEGF-D, au niveau transcriptionnel aussi bien que traductionnel, ont été peu étudiées car, du fait d'un impact moins important sur le développement du système lymphatique, ce facteur a longtemps été considéré comme secondaire par rapport au VEGF-C. Néanmoins son implication dans la lymphangiogenèse tumorale est plus évidente et sa surexpression entraîne une augmentation de la dissémination métastatique par voie lymphatique. Dans le cadre du cancer des études ont montré que sa transcription était activée par STAT-3, HNF-4 $\alpha$  et COUP-TF1/2 [215, 216].

### 2. Régulations traductionnelles

De façon analogue au VEGF-C, j'ai étudié les régulations traductionnelles du VEGF-D. Ces travaux ont mis en évidence que l'ARNm du VEGF-D comportait un IRES dans sa région 5'NT. Contrairement au VEGF-C, cet IRES n'est activé spécifiquement que dans des cellules tumorales mammaires et nécessite un choc thermique, et non une hypoxie, pour être activé (**Résultats point II**).

#### ❖ Le choc thermique

Le choc thermique (également désigné sous le nom de stress thermique ou hyperthermie) est un des stress cellulaires les plus étudiés, les premières analyses remontant au début du 20<sup>e</sup> siècle où des mutations induites par la chaleur ont été

identifiées chez la drosophile [217]. L'augmentation de la température extracellulaire est détectée par la membrane plasmique qui se fluidifie. Cette fluidification de la membrane, induite par une augmentation de la saturation des acides gras qui la composent [218] va ensuite induire la réponse cellulaire. Très conservée entre les espèces [219] cette réponse se base sur l'induction d'un ensemble de protéines appelées Heat Shock Proteins (HSP) et qui vont assurer un ensemble de fonctions telles que le transport, le repliement ou la dégradation des protéines de la cellule, la réparation des ARN et l'inhibition de l'apoptose permettant à la cellule de s'adapter et de survivre à cette hyperthermie

Nous avons également montré que la nucléoline, protéine déjà connue pour être un ITAF d'IRES viraux [220] et impliquée dans la régulation de la stabilité d'ARN d'oncogènes [221], était un ITAF essentiel à l'activation de cet IRES (**Résultats point II**). Outre cet IRES, une étude a également montré que la traduction du VEGF-D était régulée par l'interleukine7 [222].

### **C. Le VEGF-A**

Le VEGF-A (ou VEGF), également appelé facteur de perméabilité vasculaire [223], est une glycoprotéine homodimérique ayant un poids moléculaire d'environ 45kDa. Le gène du VEGF-A humain, d'une longueur de 14kb [224], est localisé sur le chromosome 6 et comporte huit exons et sept introns [225]. A ce jour, neuf isoformes de VEGF-A ont été identifiées suite à un épissage alternatif [226]. Nommées en fonction de leur nombre d'acides aminés, des isoformes de 111, 121, 145, 148, 162, 165, 183, 189 et/ou 206 acides aminés peuvent être générées par un épissage alternatif. Trois isoformes sont cependant majoritaires : les VEGF-A121, VEGF-A165, et VEGF-A189A [224]. Bien que ce facteur possède des propriétés lymphangiogéniques [227-229] il est principalement connu pour son rôle dans l'angiogenèse aussi bien physiologique que pathologique [230]. Sa liaison au récepteur VEGFR2, récepteur à activité tyrosine kinase fortement exprimé par les lymphatiques va induire la phosphorylation des Tyr 951, Tyr 1054, Tyr 1059, Tyr 1175 et Tyr 1214 entraînant une activation des voies de signalisation PI3K et ERK1/2 permettant la migration et la prolifération des CELs [231]. De plus, le

récepteur VEGFR2 peut former un hétérodimère avec le VEGFR3, principal activateur des voies de signalisations propres à la lymphangiogenèse, renforçant ainsi la capacité du VEGF-A à agir sur les CELs. Le VEGF-A peut également induire la lymphangiogenèse de façon indirecte en se liant au récepteur VEGFR1 à la surface des macrophages afin d'induire la synthèse de VEGF-C et-D [232].

### 1. Régulations transcriptionnelles

La transcription du VEGF-A est majoritairement régulée par l'hypoxie.

L'hypoxie désigne une situation où l'approvisionnement en oxygène d'une cellule, normalement assuré par les systèmes pulmonaires et cardiovasculaires, ne suffit plus à combler ses besoins métaboliques. **L'une des premières protéines dont l'expression est activée par l'hypoxie est le facteur de transcription HIF1 (Hypoxia inducible factor).** HIF1 est constitué par un hétérodimère formé d'une sous-unité  $\alpha$  et d'une sous-unité  $\beta$ , la première étant rapidement dégradée en présence d'oxygène tandis que la seconde est exprimée de façon constitutive [233]. De façon plus précise, en normoxie, les protéines PHD 1-3 (Prolyl hydroxylase domain proteins) vont assurer l'hydroxylation des prolines 402 et 564 contenues dans le domaine ODD (oxygen dependent degradation domain) de HIF $\alpha$ . Ces hydroxylations vont permettre le recrutement de la protéine Pvh1 (Von Hippel Lindau) et induire une dégradation rapide de HIF1 $\alpha$  par le protéasome. L'oxygène étant un cofacteur nécessaire à l'activité des PHD, l'hypoxie empêche l'hydroxylation de HIF1 $\alpha$  et donc sa dégradation. La protéine HIF1- $\alpha$  est ensuite transportée vers le noyau où elle s'associera avec la sous-unité  $\beta$  pour former le facteur HIF1 complet.

[234]. Ce dernier va alors pouvoir se fixer sur des séquences canoniques HRE (Hypoxia Response Element) situées dans les promoteurs ou dans des séquences enhancers de gènes dont il activera la transcription en hypoxie. A ce stade, la protéine FIH (Factor I nhibiting HIF-1) sensible à la pression en oxygène inhibe en normoxie la transcription induite par un complexe HIF qui

**aurait pu se former malgré la dégradation rapide de sa sous-unité  $\alpha$  conférant un caractère spécifique à l'hypoxie de la transcription induite par HIF1.**

Un HRE a été identifié dans le promoteur du VEGF-A [235]. Cette séquence longue de quarante-sept paires de bases a été identifiée entre les bases 939 et 985 situées en 5' du site d'initiation de la transcription du VEGF-A et permet l'augmentation de l'expression du VEGF-A en hypoxie (culture des cellules à 1% d'oxygène ou traitement au CoCl<sub>2</sub>) [235]. Outre HIF1 $\alpha$ , ce HRE est également une cible de HIF-2 [236]. De façon intéressante, ce HRE collabore avec des éléments enhancers situés entre les bases -2274 et +379 puisque des délétions de nucléotides situés entre dans cette région entraînent une altération de l'induction de la transcription du VEGF-A par l'hypoxie. L'hypoxie augmente également la stabilité de l'ARNm du VEGF-A. En normoxie, l'ARNm du VEGF-A est hautement labile avec une demi-vie moyenne de 15 à 40min *in vitro* [237-239]. En hypoxie, une stabilisation de l'ARNm est médiée par des séquences riches en AU situées dans la région 3' NT de l'ARNm et par la protéine de liaison à l'ARN MDM2. Celle-ci n'est transportée du noyau vers le cytoplasme qu'en absence d'oxygène et permet d'augmenter la stabilité de l'ARNm en interagissant avec les séquences AU [240]. La protéine DRBP76/NF90 quant à elle permet, en hypoxie, de faciliter l'adressage de l'ARNm du VEGF-A aux polysomes et donc d'augmenter l'expression de VEGF-A [241, 242].

## 2. Régulations traductionnelles

Bien que ce facteur possède des propriétés lymphangiogéniques [227,229] il est principalement connu pour son rôle essentiel dans l'angiogenèse aussi bien physiologique que pathologique [230] et à ce titre, et du fait d'une identification plus précoce que celle des VEGF-C et -D, ses mécanismes de régulation ont été nettement plus étudiés. C'est en effet le premier membre de la famille des VEGFs à avoir été identifié comme régulé traductionnellement par une structure IRES.

### ❖ Les IRES du VEGF-A

L'ARNm du VEGF-A possède, dans sa région 5'NT, deux IRES différents localisés en amont des codons d'initiation alternative CUG et AUG (responsables de la

synthèse de deux isoformes alternatives du VEGF-A) [243] et fortement activés par l'hypoxie [244]. En effet, des ITAFs des deux IRES du VEGF-A sont surexprimés en hypoxie (la kinase MAPK3 par exemple). De plus, des régulateurs négatifs de ces deux IRES actifs en présence d'oxygène sont inhibés lorsque le niveau d'oxygène chute : le miRNA miR-16 se fixe sur l'extrémité 3' NT de l'ARNm du VEGF-A et diminue l'activité des IRES [245, 246]. De même la synthèse de l'hélicase DEAD-box, régulateur négatif des deux IRES du VEGF-A, est inhibée par l'hypoxie [247]. L'activation transcriptionnelle et traductionnelle de l'expression du VEGF-A fait donc de lui l'un des facteurs lymphangiogéniques le plus induit par l'hypoxie.

#### **D. Autres facteurs lymphangiogéniques**

Mes travaux de thèses étant focalisés sur les VEGF-C et -D, j'ai choisi de concentrer cette introduction sur la famille des VEGFs. Néanmoins de nombreux autres facteurs peuvent être impliqués dans la lymphangiogenèse physiologique ou pathologique. Sans prétendre à l'exhaustivité, on peut citer le FGF-2 [248] qui comporte également un IRES [249], le facteur de croissance des hépatocytes (HGF) [250], les facteurs de croissance apparentés à l'insuline (IGF1 et 2) [251], l'endothéline 1 (ET-1) [252], le PDGF $\beta$  [124] ainsi que l'angiopoïétine-2 (Ang2) [253] même si pour plusieurs de ces facteurs une collaboration avec l'axe VEGF-C/VEGF-D-VEGFR-3 semble être nécessaire à leur activité lymphangiogénique.

**Au cours de ma thèse, je me suis consacré à identifier les éléments IRESs présents sur les ARNm des deux facteurs majeurs de la lymphangiogenèse, les VEGF-C et VEGF-D, les stress responsables de leur activation in vivo et in vitro ainsi que leurs mécanismes de régulation. L'identification de nouveaux modes d'expression pour ces facteurs nous a conduit à envisager une nouvelle thérapie pour une pathologie caractérisée par une perte de fonction du système lymphatique : le lymphoedème. C'est pourquoi, dans un troisième projet, je me suis intéressé au lymphoedème secondaire développé après lymphadenectomie suivant un cancer du sein afin de mieux comprendre les caractéristiques de cette pathologie ainsi que l'influence des**

hormonothérapies utilisées dans le cadre du carcinome mammaire sur son développement.

## RESULTATS

### I. L' hypoxie induit l'expression du VEGF-C dans les cellules tumorales métastatiques via un mécanisme de traduction indépendant de HIF-1 $\alpha$ .

#### A. Introduction

La majorité des cellules tumorales composant une tumeur solide sont confrontées à de nombreux stress cellulaire. Le stress hypoxique en particulier affectera les cellules du centre de la tumeur trop éloignées des vaisseaux sanguins situés en périphérie de la tumeur et donc non approvisionnées en oxygène. Alors que les relations entre hypoxie et angiogenèse tumorale sont bien connues, peu de données sont actuellement disponibles sur les régulations de la lymphangiogenèse induite par l'hypoxie.

Bien que des études corrélatives aient montré un lien entre l'hypoxie et l'expression de VEGF-C notamment dans le cadre du cancer [190, 191], aucune régulation induite par l'hypoxie n'a pu jusque-là être identifiée pour ce facteur. Par ailleurs, le gène du VEGF-C ne comporte pas d'élément HRE ce qui élimine l'hypothèse d'une régulation transcriptionnelle classique activée par le facteur HIF1- $\alpha$ .

Etant donné l'importance de la lymphangiogenèse tumorale pour la dissémination métastatique et donc son impact sur le pronostic de survie des patients il est nécessaire de résoudre l'énigme d'une induction du VEGF-C par l'hypoxie et donc d'identifier les mécanismes permettant une traduction des ARNm malgré le blocage de la traduction coiffe-dépendante provoqué par l'hypoxie.

Des éléments IRES ayant d'ores et déjà été identifiés sur l'ARNm d'un autre membre de la famille des VEGFs, le VEGF-A, cette étude a pour but de décrire les relations existantes entre éléments IRES, régulation de l'expression du VEGF-C et hypoxie dans plusieurs modèles tumoraux murins. Ces analyses porteront à la fois sur la

tumeur primaire et sur les cellules tumorales métastatiques et détailleront également le rôle de HIF-1 $\alpha$  dans la régulation de l'expression du VEGF-C.



## B. Résultats

Cell Reports  
Article

Cell  
PRESS  
Open  
ACCESS

# Hypoxia Induces VEGF-C Expression in Metastatic Tumor Cells via a HIF-1 $\alpha$ -Independent Translation-Mediated Mechanism

Florent Morfoisse,<sup>1,2</sup> Anna Kuchnio,<sup>3</sup> Clement Frainay,<sup>1,2</sup> Anne Gomez-Brouchet,<sup>1,2</sup> Marie-Bernadette Delisle,<sup>1,2</sup> Stefano Marzi,<sup>4</sup> Anne-Catherine Helfer,<sup>4</sup> Fransky Hantelys,<sup>5</sup> Francoise Pujol,<sup>5</sup> Julie Guillermet-Guibert,<sup>1,2</sup> Corinne Bousquet,<sup>1,2</sup> Mieke Dewerchin,<sup>3</sup> Stephane Pyronnet,<sup>1,2</sup> Anne-Catherine Prats,<sup>5,6</sup> Peter Carmeliet,<sup>3,6</sup> and Barbara Garmy-Susini<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm, U1037, 31432 Toulouse, France

<sup>2</sup>Université de Toulouse, UPS, Cancer Research Center of Toulouse, Equipe Labelisée Ligue Contre le Cancer and Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer, 31432 Toulouse, France

<sup>3</sup>Vesalius Research Center, VIB, University of Leuven, 3000 Leuven, Belgium

<sup>4</sup>UPR 9002 CNRS-ARN, Université De Strasbourg, IBMC, 67084 Strasbourg, France

<sup>5</sup>Université de Toulouse, UPS, TRADGENE, EA4554, 31432 Toulouse, France

<sup>6</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: barbara.garmy-susini@inserm.fr  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.011>

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-No Derivative Works License, which permits non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## SUMMARY

Various tumors metastasize via lymph vessels and lymph nodes to distant organs. Even though tumors are hypoxic, the mechanisms of how hypoxia regulates lymphangiogenesis remain poorly characterized. Here, we show that hypoxia reduced vascular endothelial growth factor C (VEGF-C) transcription and cap-dependent translation via the upregulation of hypophosphorylated 4E-binding protein 1 (4E-BP1). However, initiation of VEGF-C translation was induced by hypoxia through an internal ribosome entry site (IRES)-dependent mechanism. IRES-dependent VEGF-C translation was independent of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) signaling. Notably, the VEGF-C IRES activity was higher in metastasizing tumor cells in lymph nodes than in primary tumors, most likely because lymph vessels in these lymph nodes were severely hypoxic. Overall, this transcription-independent but translation-dependent upregulation of VEGF-C in hypoxia stimulates lymphangiogenesis in tumors and lymph nodes and may contribute to lymphatic metastasis.

## INTRODUCTION

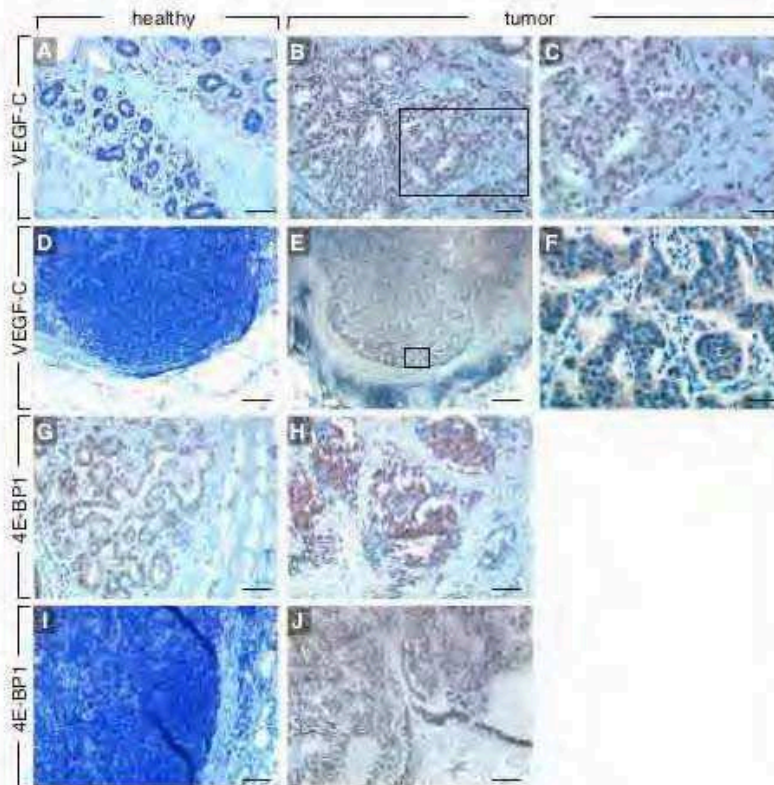
The lymphatic vasculature consists of a network of lymph vessels that drain interstitial fluid from tissues and return it to the blood. It is also essential for immune surveillance. However, increased lymphangiogenesis also contributes to tumor metastasis and various inflammatory diseases, while insufficient lymph

vessel growth or dysfunction causes lymphedema (Albrecht and Christofori, 2011; Altalo, 2011; Bonnel et al., 2009; Christiansen and Detmar, 2011; Martinaz-Corral and Makinen, 2013). Blocking lymphangiogenesis may offer therapeutic benefit to limit tumor spread.

Hypoxia promotes the growth of blood vessels (angiogenesis), but only limited data are available on whether and how hypoxia regulates lymphangiogenesis. Nevertheless, lymph vessels are often located in remote areas away from oxygen-carrying blood vessels and do not contain oxygen-carrying red blood cells, they are thus exposed to a milieu with very low oxygen levels (Guzy et al., 2008; Ivanovic, 2008). Some correlative studies suggest a link among tumor hypoxia, the hypoxia-inducible transcription factor HIF-1 $\alpha$ , and lymphangiogenesis (Schoppmann et al., 2005; Tao et al., 2005). Another study reported that HIF-1 $\alpha$  promotes lymphatic metastasis by transcriptional activation of the lymphangiogenic factor platelet derived growth factor B (Schito et al., 2012). HIF-1 $\alpha$  also stimulates transcription of Prox-1, another lymph-angiogenic factor (Zhou et al., 2013). However, whether hypoxia signaling (and in particular HIF-1 $\alpha$ ) regulates the expression of vascular endothelial growth factor C (VEGF-C), one of the key lymphangiogenic factors (Altalo and Detmar, 2012), remains unknown. Only a single report documented an associative correlation between HIF-1 $\alpha$  and VEGF-C in cancer (Liang et al., 2008). It is also unknown whether VEGF-C expression in hypoxic conditions relies on transcriptional or translational mechanisms.

When cells are exposed to low oxygen levels, they suppress general protein synthesis in order to save energy (Keelin and Ratcliffe, 2008; Majumdar et al., 2010; Maxwell, 2005; Semenza, 2012). Hypoxia inhibits mRNA translation by affecting the activity of two kinases, mTOR and PERK (Larsson et al., 2013; Silyers and Schneider, 2009). Inactivation





**Figure 1. Expression Levels of VEGF-C and 4E-BP1 in Breast Tumor Specimens**

(A–F) Immunostaining of VEGF-C in human specimens of healthy breast tissue (A), invasive breast cancer (B and C), and in healthy (D) and metastasized (E and F) lymph nodes. (C) and (F) show larger magnification of the framed area of (B) and (E), respectively.

(G–J) Immunostaining of 4E-BP1 in human healthy breast epithelium (G), invasive breast cancer (H), and normal (I) and metastasized (J) lymph nodes. Scale bar represents 50  $\mu\text{m}$  (A, B, G, and H), 25  $\mu\text{m}$  (C and F), and 250  $\mu\text{m}$  (D, E, I, and J).

## RESULTS

### Coexpression of VEGF-C and 4E-BP1 in Tumor Cells

We examined by immunohistochemistry (IHC) the expression levels of VEGF-C in human healthy breast specimens, tumor biopsies of invasive ductal carcinomas, and draining metastatic lymph nodes. Fifteen tumor biopsy specimens and their sentinel nodes were analyzed. Immunoreactive VEGF-C levels were moderate in healthy tissues but elevated in tumor samples (Figures 1A–1C). VEGF-C was undetectable in healthy lymph nodes but upregulated in metastatic tumor cells in lymph nodes (Figures 1D–1F).

Notably, 4E-BP1, a negative regulator of cap-dependent mRNA translation, was overexpressed in tumors and metastatic lymph nodes as compared to healthy epithelium and noninvaded lymph nodes (Figures 1G–1J). Since overexpression of 4E-BP1 inhibits cap-dependent translation induced by hypoxia in tumors (Braunstein et al., 2007), these findings raised the question whether VEGF-C translation in tumors and metastatic lymph nodes relied on a cap-independent regulation of VEGF-C translation.

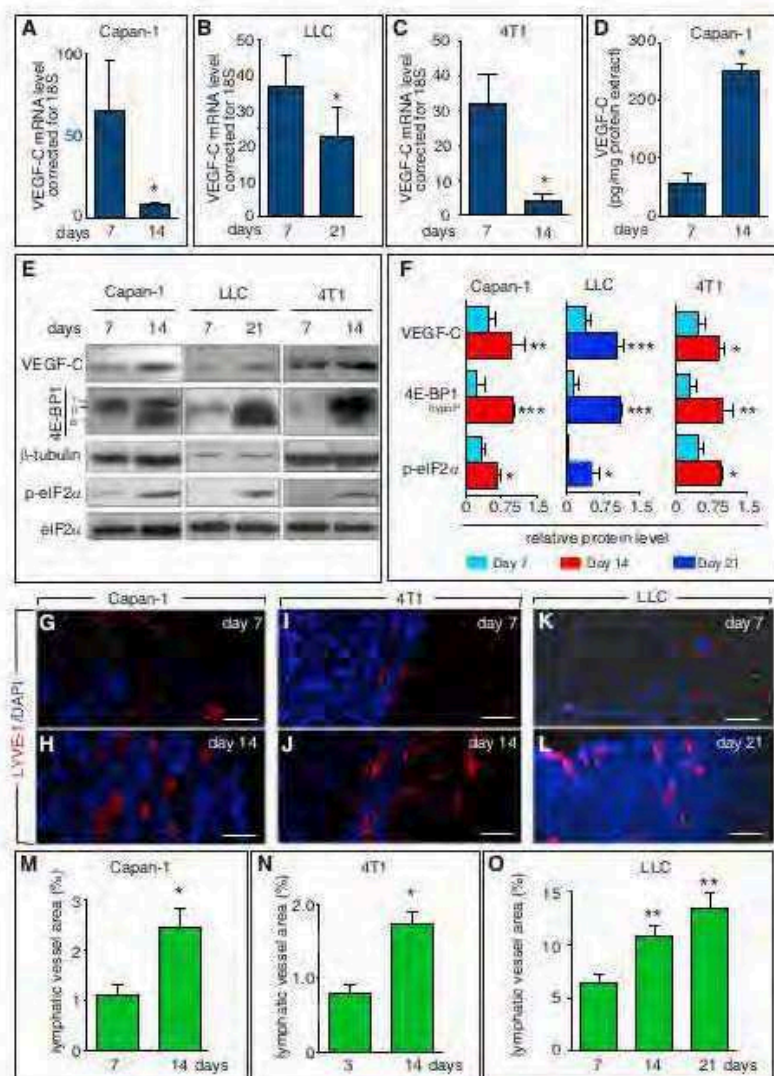
### VEGF-C mRNA Is Reduced while VEGF-C Protein Is Increased in Tumors

We used three different mouse tumor models known to induce lymphangiogenesis and to metastasize via lymph vessels: Capan-1, a xenograft of human pancreatic adenocarcinoma; 4T1, an orthotopic syngeneic mouse model of metastatic breast cancer; and a syngeneic subcutaneous model of Lewis lung carcinoma (LLC) (Deer et al., 2010; Garmy-Susini et al., 2010; Pulaski and Ostrand-Rosenberg, 2001). When studying the expression of VEGF-C in primary tumor extracts during tumor progression, we found that VEGF-C mRNA levels were decreased (Figures 2A–2C), while human VEGF-C protein levels were increased in the three tumor cell types, as observed by a human VEGF-C-specific ELISA (Figure 2D) and by immunoblotting (Figures 2E and 2F). These data suggested that induction of VEGF-C expression occurred via a posttranscriptional

of mTOR results in hypophosphorylation of eIF4E-binding proteins (4E-BP), which promotes the sequestering of eIF4E, a factor necessary for cap-dependent translation (Martineau et al., 2013; Richter and Sonenberg, 2005). Hypoxic activation of PERK is mediated by the unfolded protein response and inhibits translation by phosphorylating the translation initiation factor eIF2- $\alpha$  (Koumenis and Wouters, 2006).

Other mRNAs are translated in hypoxic conditions by an alternative mechanism, mediated by internal ribosome entry sites (IRESs) located in their 5' UTRs, which allows the ribosome to be recruited to a site that is at a considerable distance from the cap structure, most frequently in the presence of trans-acting factors (Spriggs et al., 2008; Vagner et al., 2001). Many cellular mRNAs have now been documented to contain IRESs. The majority of identified IRESs are found in mRNAs of proteins that are associated with the control of cell growth and death, including growth factors, proto-oncogenes and proteins required for apoptosis (Bushnell et al., 2004). IRES elements have also been identified in VEGF-A and fibroblast growth factor 2 mRNA sequences and are activated by hypoxia to stimulate angiogenesis (Borges et al., 2007). However, since it is unknown if IRES-dependent expression of VEGF-C in hypoxic conditions regulates lymphangiogenesis, we characterized IRES-dependent induction of VEGF-C in hypoxic tumors and lymph nodes.





**Figure 2. Tumor Lymphangiogenesis Correlates with Posttranscriptional Induction of VEGF-C In Vivo**

(A–C) Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) of VEGF-C mRNA in Capan-1 pancreatic (A), LLC (B), and 4T1 breast (C) tumors shows a decrease of VEGF-C transcript levels during tumor growth (mean ± SEM; n = 8–10; \*p < 0.001).

(D) ELISA analysis showing increased VEGF-C protein levels during Capan-1 tumor growth (mean ± SEM; n = 5; \*p < 0.001).

(E and F) Immunoblot of VEGF-C, 4E-BP1, and eIF2α and phosphorylated eIF2α (p-eIF2α) in Capan-1 pancreatic, LLC, and 4T1 breast tumors, showing an increase in VEGF-C protein levels, associated with increased expression and dephosphorylation of 4E-BP1 and with increased phosphorylation of eIF2α when comparing day 14 (Capan-1, 4T1) or day 21 (LLC) with day 7 tumor protein extracts. Quantification by densitometry is shown in (F). Relative levels are normalized to β-tubulin (VEGF-C, hypophosphorylated 4E-BP1) or to eIF2α (p-eIF2α) (mean ± SEM; n = 8–10; \*p < 0.05 \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001).

(G–L) Immunostaining for LYVE-1 (red) demonstrating increased lymphangiogenesis during Capan-1 pancreatic (G and H), 4T1 breast (I and J), and LLC (K and L) growth. Nuclei are visualized by DAPI staining (blue).

(M–O) Morphometric quantification of tumor lymphatic vessel area (% of tumor area) in Capan-1 (M), 4T1 (N), and LLC (O) tumors (mean ± SEM; n = 8–10; \*p < 0.01).

Scale bar represents 50 μm (G–L). See also Figure S1.

total 4E-BP1 protein levels increased and 4E-BP1 became increasingly hypophosphorylated, as evidenced by the shift to a lower molecular weight (Figures 2E and 2F). We also analyzed eIF2α phosphorylation using antibodies recognizing phosphorylated and total eIF2α, as eIF2α phosphorylation downregulates protein synthesis in various stress conditions, including hypoxia (Koumantis and

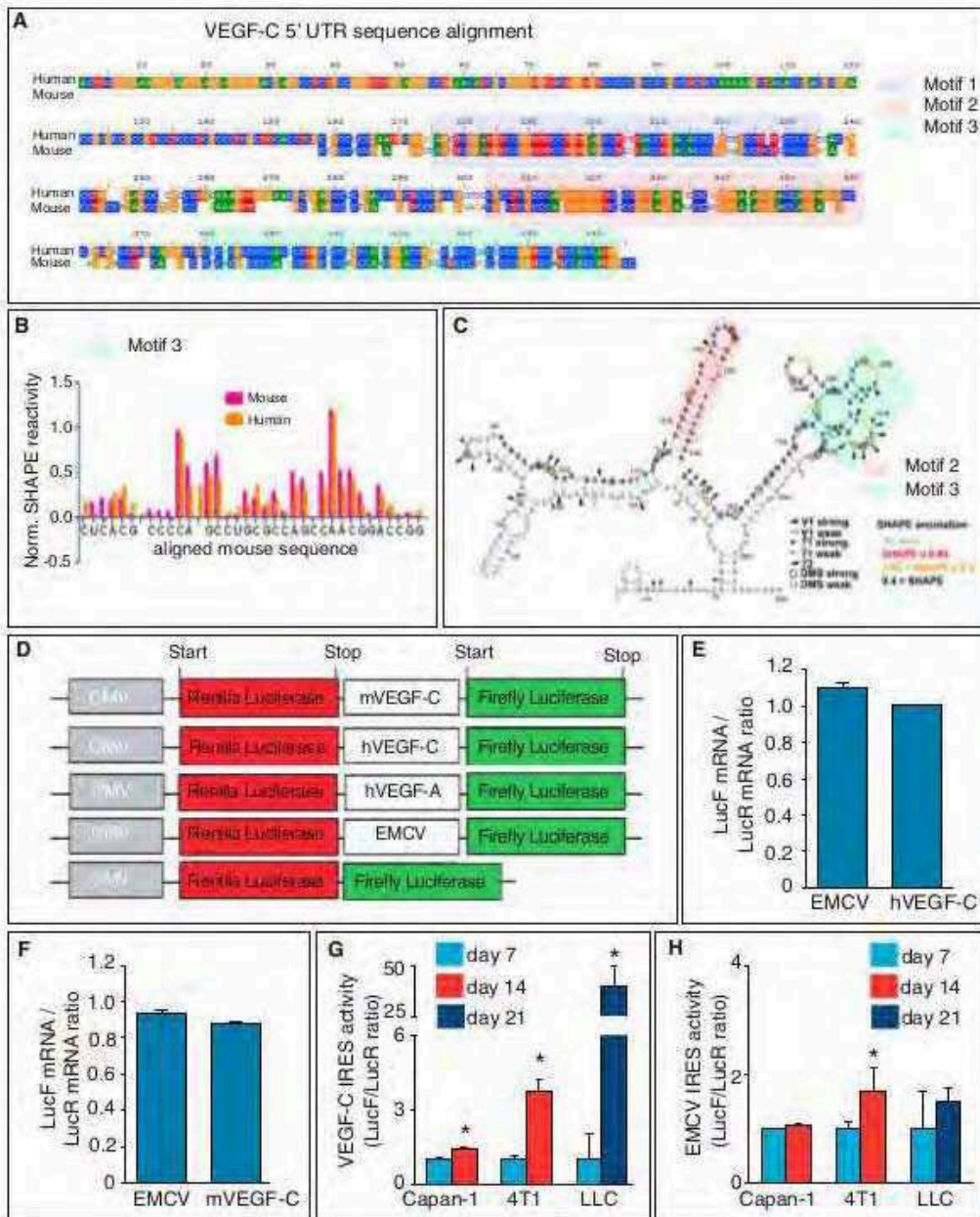
Wouters, 2006). Notably, phosphorylated eIF2α (p-eIF2α) levels increased during tumor progression (Figures 2E and 2F). Thus, decreased VEGF-C mRNA and increased VEGF-C protein levels, together with the decrease of global translation initiation in tumors mediated by 4E-BP and eIF2α, suggested a stress-specific mechanism of regulation of VEGF-C translation, such as an IRES-dependent translation process.

**Structure Probing of the 5' UTR mRNA of VEGF-C**  
We therefore explored if VEGF-C might be translated via IRES-dependent regulation. In order to analyze if the 5' UTRs of the human and murine VEGF-C contained conserved structural features, the secondary structures of both RNAs were studied by using "selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension" (SHAPE) analysis to obtain information on the RNA

mechanism. Use of murine VEGF-C-specific primers in the human Capan-1 tumor model revealed that stromal cells did not compensate for the reduced human VEGF-C mRNA levels by upregulating murine VEGF-C transcript levels (Figure S1). Staining for the lymphatic endothelial cell marker LYVE-1 complemented with quantification of lymph vessel area showed that lymphangiogenesis increased during tumor progression (Figures 2G–2O), in agreement with the enhanced VEGF-C protein levels.

We studied the phosphorylation status of 4E-BP1 by immunoblotting. 4E-BP1 can be hypophosphorylated (designated α-form) or hyperphosphorylated (designated β and γ forms). In its hypophosphorylated state, 4E-BP1 inhibits cap-dependent translation initiation by sequestering eIF-4E (Martineau et al., 2013; Richter and Sonenberg, 2005). During tumor progression,





**Figure 3. VEGF-C mRNA Contains an IRES Element Activated during Tumor Growth**

(A) Sequence alignment of the murine and human VEGF-C 5' UTR sequences. A color code is used for each nucleotide: guanine (orange), adenine (green), uridine (red), and cytosine (blue). Three stretches of nucleotides are highly conserved between the two RNA sequences: motif 1 (light blue), motif 2 (light orange), and motif 3 (light green).

(B) Quantification of the SHAPE analysis (see the *Experimental Procedures*) is shown for the conserved nucleotides of motif 3 of the human (orange) and murine (red) 5' UTRs, showing very similar reactivity patterns.

(C) Putative secondary structure of the murine 5' UTR of VEGF-C mRNA, as predicted on the basis of the ribose reactivities toward SHAPE and the reactivities of adenines at N1 and cytosines at N3 toward DMS. For each nucleotide, the level of reactivity toward SHAPE is indicated in red, yellow, or black font character for strong, medium, or weak reactivity, respectively. The cleavage sites induced by ribonucleases V1, T1, or T2 are indicated by arrows. Motifs 2 and 3 are color-coded as in (A).

(legend continued on next page)



secondary structure at single nucleotide resolution. SHAPE takes advantage of the fact that only flexible nucleotides are reactive toward hydroxyl-selective electrophiles, whereas constrained nucleotides are unreactive. We used as chemical probing reagents benzoyl cyanide in order to provide information on the flexibility of each ribose (Mortimer and Weeks, 2009) and dimethyl sulfate (DMS), which methylates single-stranded cytosines at N3 and adenines at N1 (Figure S2A). To footprint and probe the RNA structure, we also took advantage of the enzymatic cleavage by RNase T1 (which cleaves single-stranded RNA after unpaired guanines residues), RNase T2 (cleaving single-stranded RNA after unpaired nucleotides with a preference for adenines), and RNase V1 (cleaving base-paired nucleotide residues in a non-sequence-specific manner) (Figure S2A).

This analysis revealed that the 5' UTRs were highly structured because of a high GC content (Figures 3A and 3B; Figures S2A and S2B). However, the concomitant presence of RNase V1 cleavages and of single-strand specific cuts, together with the sensitivity to modifications by DMS in the SHAPE analysis, suggested that these RNAs do not fold into a unique fixed structure but are able to adopt alternative conformations at equilibrium. Nevertheless, based on the quantification of the DMS and SHAPE reactivities, the most representative of the putative secondary structures of the murine 5' UTR is shown in Figure 3C. Using sequence alignment, we observed three highly conserved regions between the human and murine 5' UTRs (Figure 3A). Interestingly, SHAPE analysis revealed that two of these motifs adopted the same structure, since the reactivity pattern of the conserved residues was nearly identical (Figure 3B; Figure S2B). These motifs, located at the same distance from the initiation codon in human and murine RNAs, might be appropriate for binding of *trans*-acting factor(s) necessary to activate IRES-dependent translation.

#### The 5' UTR of VEGF-C Exhibits IRES Activity

We then explored if the putative IRES sequences in the human and murine 5' UTR of the VEGF-C mRNAs were translationally active and cloned these sequences in a double luciferase bicistronic vector (Figure 3D) (Créancier et al., 2000). In this vector, the first *Renilla* luciferase (LucR) cistron is translated by a cap-dependent mechanism, while the second firefly luciferase (LucF) cistron can be translated only if an IRES is present between the two cistrons. We used bicistronic vectors containing the encephalomyocarditis virus (EMCV) IRES sequence since it is not or only minimally regulated in mammalian cells, and we also used the VEGF-A IRES since it is activated by hypoxia (Barnes et al., 2007) (the VEGF-A data are discussed below). An empty control bicistronic vector, containing a sequence without IRES activity between the two cistrons, was inactive (Fig-

ure 3D; Figure S2C). Control RT-PCR analysis showed that both proteins were translated from a single mRNA transcript, since comparable amounts of LucR and LucF mRNA were measured (Figures 3E and 3F), indicating that a cryptic promoter or splicing event did not influence the results (Martineau et al., 2004).

To quantify the IRES activity in human and murine VEGF-C 5' UTR sequences *in vivo*, Capan-1, 4T1, and LLC tumor cells were transduced with the bicistronic lentiviral vectors and injected subcutaneously (Capan-1, LLC) or orthotopically in the mammary fat pad (4T1). We used the human VEGF-C 5' UTR for the human cell line (Capan-1) and the murine VEGF-C 5' UTR for the murine cell lines (4T1, LLC). Transduction of the bicistronic vector did not affect tumor growth (Figures S2D and S2E). The VEGF-C IRES activity was quantified by measuring the LucF/LucR ratio as a parameter of the relative contribution of IRES-dependent versus cap-dependent translation after 7, 14, and 21 days. The IRES activity levels at day 14 and 21 were expressed relative to the IRES activity at day 7. These experiments revealed an IRES activity for both human and murine VEGF-C 5' UTRs (Figures 3G and 3H). Furthermore, this IRES activity increased during tumor progression, especially in breast and lung tumors, while the EMCV IRES activity changed only minimally in 4T1 tumors (1.68-fold), e.g., less than the VEGF-C IRES activity in these tumors (3.75-fold).

#### The VEGF-C IRES Activity Is Higher in Metastatic Lymph Nodes

Analysis of the LYVE-1-positive lymphatic area in Capan-1, 4T1, and LLC tumors showed that lymphangiogenesis in lymph nodes was minimal at 3 days after inoculation but progressively increased from 7 days onward (Figures 4A–4J). This raised the question whether VEGF-C protein synthesis was increased in metastatic lymph nodes. However, substantial numbers of metastatic cyokeratin-positive tumor cells were detected in draining lymph nodes of Capan-1 and 4T1 tumors only from 14 days onward and of LLC tumors only from 21 days onward, i.e., later than the first signs of increased lymphangiogenesis in metastatic lymph nodes (Figures 4K–4N). Previous reports already documented that lymph node lymphangiogenesis precedes lymph node metastasis, presumably because primary tumors release VEGF-C in the lymph fluid of efferent lymphatics (Hirakawa, 2009).

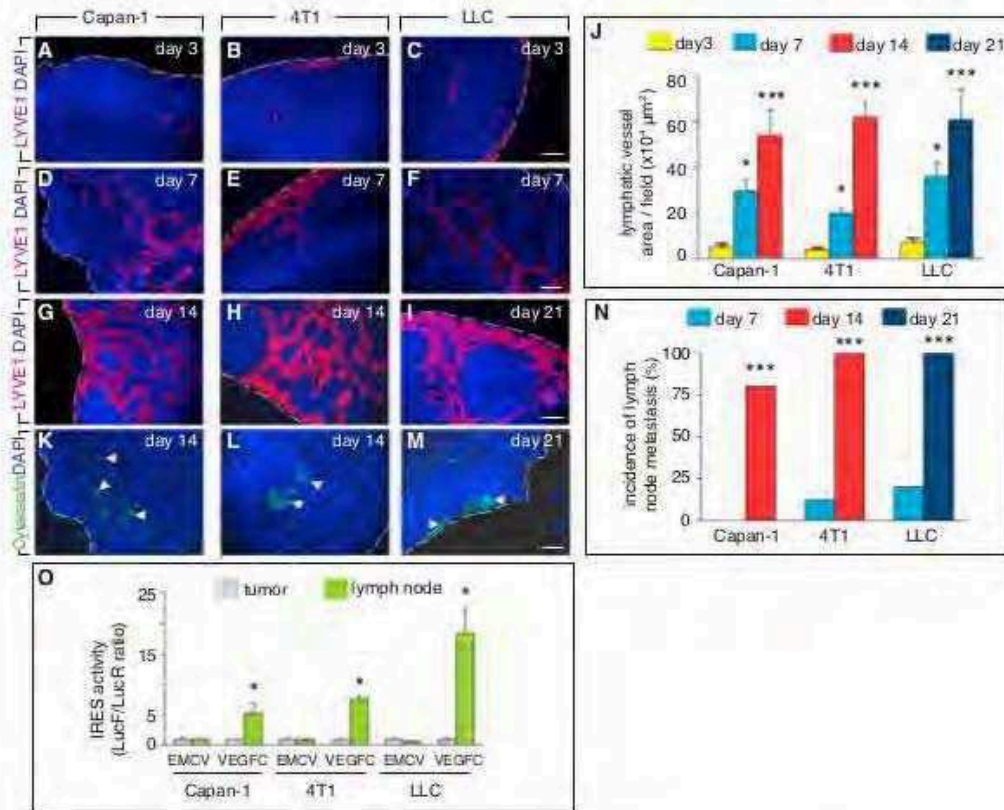
We also explored whether tumor cells might upregulate VEGF-C production to higher levels, once they had intravasated and traveled through lymph vessels to the lymph node, and therefore analyzed the VEGF-C IRES activity in draining lymph nodes to which tumor cells metastasized. In order to compare the IRES activity in tumors and metastatic lymph nodes, the firefly/*Renilla* luciferase ratio in each tumor type was normalized

(D) Schematic representation of the bicistronic expression cassettes subcloned in lentivectors, encoding two luciferase reporters that are translated by cap-dependent translation (*Renilla* luciferase) or by IRES-dependent translation (firefly luciferase). IRESs used are the murine and human VEGF-C 5' UTR, the human VEGF-A IRES, as well as the viral EMCV IRES (EMCV) and a short sequence devoid of IRES as positive and negative controls, respectively.

(E and F) mRNA expression analysis of firefly luciferase (LucF) and *Renilla* luciferase (LucR) by qRT-PCR on cells transduced with the bicistronic lentivector containing human (E) or murine (F) VEGF-C 5' UTR, revealing comparable expression of LucR and LucF mRNA, suggesting transcription of a single mRNA (mean  $\pm$  SEM;  $n = 6$ ;  $p = NS$ ).

(G and H) *In vivo* VEGF-C (G) and EMCV (H) IRES activity in Capan-1, 4T1, and LLC tumors (values are relative to day 7; mean  $\pm$  SEM;  $n = 8-10$ ; \* $p < 0.01$ ). See also Figure S2.





**Figure 4. VEGF-C IRES Activity is Higher in Metastatic Tumor Cells in the Lymph Node**

(A–I) Staining for LYVE-1 (red) and nuclei (DAPI, blue) at day 3 (A–C), 7 (D–F) and 14 (G and H) or 21 (I) revealed that lymphangiogenesis progressively increased in tumor-draining lymph nodes in Capan-1, 4T1, and LLC tumors. Dashed lines denote the border of the tissue.

(J) Quantification of lymphatic vessel area in lymph node (mean ± SEM; n = 8–10; \*p < 0.05, \*\*\*p < 0.001).

(K–M) Staining for cytokeratin (green, see arrowheads) and nuclei (DAPI, blue) revealed metastatic dissemination to lymph node of Capan-1, 4T1 and LLC tumors. Dashed lines denote the border of the tissue.

(N) Quantification of metastasis positive lymph nodes (mean ± SEM; n = 8–10; \*\*\*p < 0.001).

(O) In vivo VEGF-C- and EMCV-IRES activity in metastatic lymph nodes of Capan-1, 4T1, and LLC tumors at 14, 14, and 21 days, respectively (values are expressed relative to the respective value in the tumor; mean ± SEM; n = 8–10; \*p < 0.01).

Scale bar represents 50 μm (all).

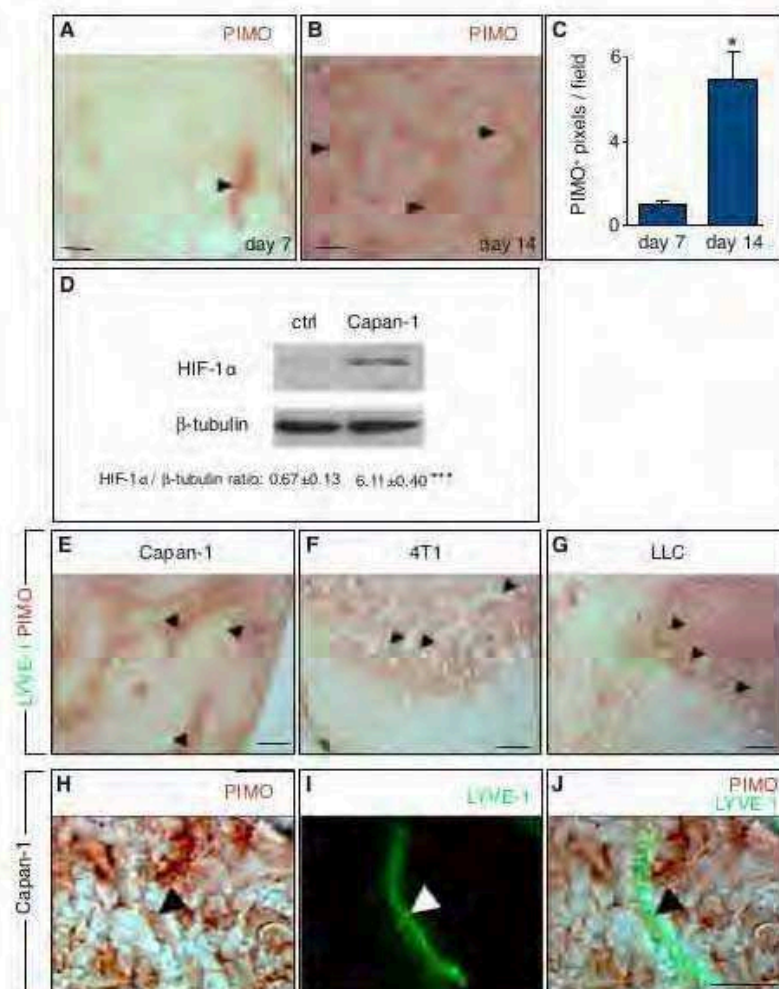
to the value of 1, both for the EMCV and VEGF-C IRES, and the IRES activities in the lymph nodes were expressed as a fold induction over the IRES activity in the tumor. This analysis revealed that compared to primary tumors, the VEGF-C IRES activity in metastatic lymph nodes was 5-, 7-, and 18-fold higher in the Capan-1, 4T1, and LLC tumor models at 14, 14, and 21 days after tumor inoculation, respectively, while the EMCV IRES activity was not affected (Figure 4O). These findings suggested that the lymphatic milieu influenced VEGF-C translation in tumor cells.

#### Lymph Vessels Are Hypoxic and Develop Nearby Hypoxic Tumor Cells

We then sought to determine why the lymphatic milieu enhanced the VEGF-C IRES activity in metastatic tumor cells. Since lymphatics are known to be hypoxic (Guzy et al., 2008; Ivanovic,

2009) and IRES elements are activated in cellular stress conditions such as hypoxia (Braunstein et al., 2007; Komar and Hatzoglou, 2011; Pestova et al., 2001; Sachs, 2000; Silvera and Schneider, 2009; Spriggs et al., 2010; Vagner et al., 2001), we explored whether hypoxia affected IRES-dependent initiation of translation of VEGF-C. We first explored a possible link between hypoxia and lymphatic development and therefore double stained tumors for the hypoxypromoter pimonidazole and the lymphatic markers LYVE-1 or podoplanin. Already at an early stage of tumor development (in <5 mm<sup>3</sup> tumors), the pancreas, breast, and lung cancer models contained hypoxic regions, which became more widespread and stained more strongly after 2 weeks (Figures 5A–5C). Immunoblotting for HIF-1α confirmed activation of this hypoxia-inducible transcription factor (Figure 5D). In all cancer models, lymph vessels developed in proximity of hypoxic tumor cell clusters (Figures 5E–5G). Unlike blood





**Figure 5. Tumor VEGF-C Levels Are Increased in Hypoxic Zones**

(A–C) Immunodetection of hypoxic areas (hypoxyprobe, brown) in Capan-1 tumors revealed few small hypoxic areas at early time points (A, day 7), which became more abundant by 14 days after injection (B). Arrowheads indicate pimonidazole adduct (PIMO)-positive hypoxic areas. Quantification of PIMO<sup>+</sup> area is shown in (C) (mean ± SEM; n = 10; \*p < 0.001).

(D) Immunoblot for HIF-1α in Capan-1 tumors showing stabilization of the protein in vivo. Normal healthy skin was used as control. Densitometric quantification is shown (mean ± SEM; n = 6; \*\*\*p < 0.001). ctrl, control.

(E–G) Staining for LYVE-1 (green, see arrowheads) revealing the presence of lymphatic vessels close to hypoxic areas (hypoxyprobe [PIMO], brown) in Capan-1 (E), 4T1 (F), and LLC (G) tumors.

(H–J) Staining of Capan-1 tumor for LYVE-1 (green, arrowhead) and hypoxyprobe (PIMO, brown) revealed hypoxic lymph vessels. Merged image is shown in (J).

Scale bar represents 50 μm (A and B), 50 μm (E–G), 25 μm (H–J). See also Figure S3.

endothelial cells, lymphatic endothelial cells also stained positively for pimonidazole, indicating that lymph vessels are hypoxic (Figures 5H–5J; Figures S3A–S3F).

#### Hypoxia Induces VEGF-C Expression by a Nontranscriptional Mechanism

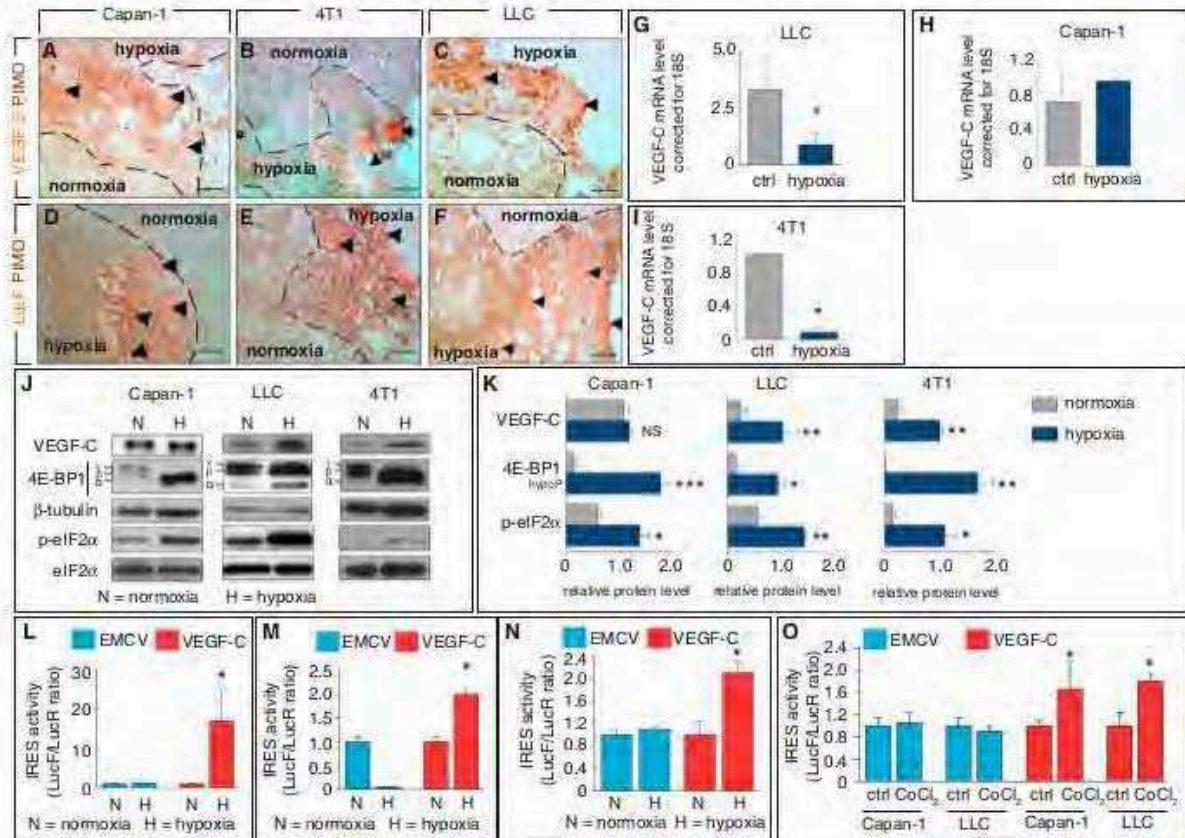
We then studied the regulation of IRES-dependent VEGF-C translation by hypoxia. Immunostaining revealed that VEGF-C and LucF were expressed predominantly in pimonidazole-positive hypoxic tumor areas in vivo (Figures 6A–6F). To study the effect of hypoxia on VEGF-C expression in vitro, we exposed LLC, Capan-1, or 4T1 tumor cells to 1% oxygen or to cobalt chloride (CoCl<sub>2</sub>), known to activate hypoxia signaling. Hypoxia reduced VEGF-C mRNA levels in LLC and 4T1 cells while not affecting its levels in Capan-1 cells (Figures 6G–6I). In LLC and 4T1 cells, hypoxia increased the protein levels of VEGF-C and of hypophosphorylated 4E-BP1, suggesting increased VEGF-C production despite a decrease in cap-dependent initiation of

translation (Figures 6J and 6K). In Capan-1 cells, VEGF-C protein levels were comparable in hypoxic conditions, though 4E-BP1 dephosphorylation was increased, suggesting that the reduced cap-dependent initiation of VEGF-C translation was balanced off by an increase in IRES-dependent initiation of VEGF-C translation (Figures 6J and 6K). In each cell line, eIF2α phosphorylation was increased by hypoxia, suggesting that hypoxia downregulated global mRNA translation (Figures 6J and 6K). Since hypoxia increased the VEGF-C IRES activity in all human and murine tumor lines (also in the Capan-1 cells, in which VEGF-C levels did not increase) (Figures 6L–6N), hypoxia thus induced a switch from cap-dependent to IRES-dependent initiation of VEGF-C translation. Similar results were obtained when we used CoCl<sub>2</sub> (Figure 6O). Phosphorylation of eIF2α inhibits the EMCV IRES activity (Sanz et al., 2013) and the increased eIF2α phosphorylation levels might thus be responsible for the inhibition of the EMCV IRES activity in hypoxia, while the variable EMCV IRES activity in hypoxia in distinct tumor cell lines likely reflects cell-type-dependent regulation of this IRES activity, which has been recognized previously (Pilipenko et al., 2000).

#### The VEGF-C IRES Activity Is Reduced in More Oxygenated Tumors

We then explored whether tumor oxygen levels in vivo influenced the switch between cap-dependent VEGF-C translation (in oxygenated conditions) versus IRES-dependent VEGF-C translation (in hypoxic conditions). We therefore used polyI





**Figure 6. Hypoxia Induces VEGF-C-IRES Activity In Vitro**

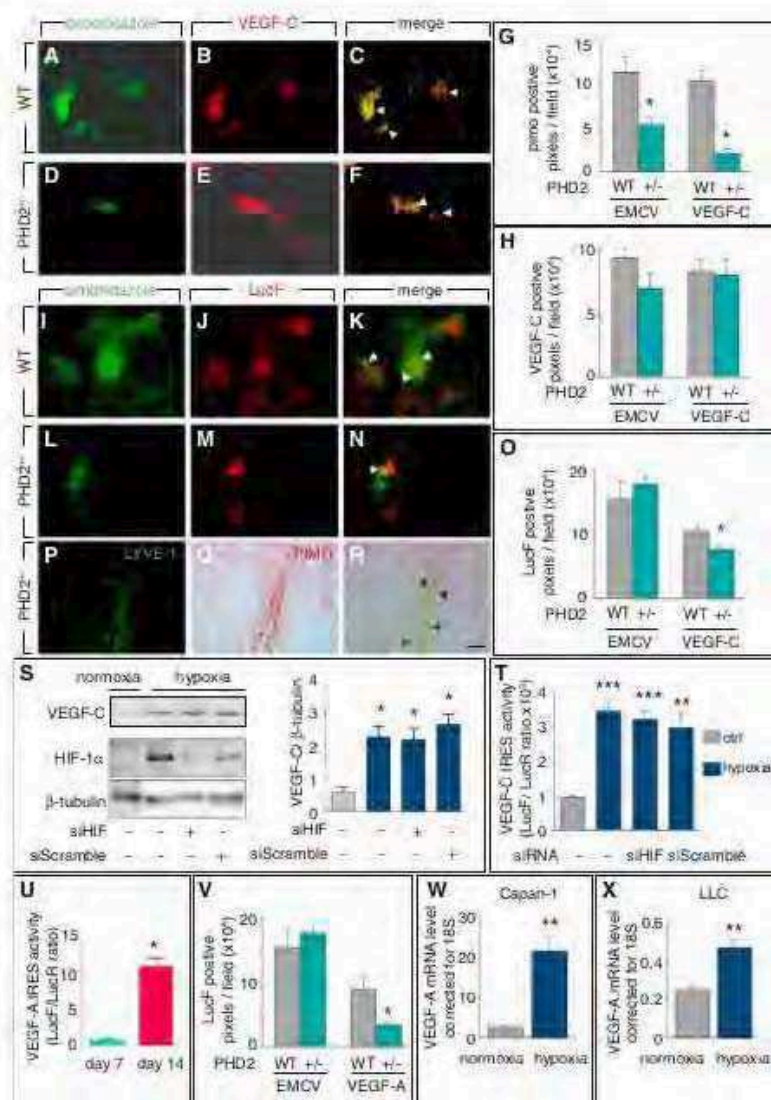
(A–C) Staining for VEGF-C (red) and hypoxyprobe (PIMO, brown) revealed VEGF-C colocalization (arrows) in hypoxic areas in Capan-1 (A), 4T1 (B), and LLC (C) tumors. Dashed lines denote more hypoxic from more normoxic zones.  
 (D–F) Staining for firefly luciferase (LucF, red) and hypoxyprobe (PIMO, brown) revealed IRES-dependent luciferase translation (arrows) primarily in hypoxic areas in Capan-1 (D), 4T1 (E), and LLC (F) tumors. Dashed lines denote more hypoxic from more normoxic zones.  
 (G–I) qRT-PCR for VEGF-C showing reduced mRNA levels in hypoxic conditions in LLC (G) and 4T1 (I) tumor cells, but not in Capan-1 tumor cells (H) (mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ ; \* $p < 0.001$  in I; # $p = 0.059$  in G;  $p = NS$  in H).  
 (J and K) Immunoblot of VEGF-C, 4E-BP1, eIF2 $\alpha$ , and phosphorylated eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) in Capan-1, LLC, or 4T1 tumor cells, cultured in normoxia or hypoxia (1% O $_2$ ). Quantification by densitometry is shown in (K). Relative levels are normalized to  $\beta$ -tubulin (VEGF-C, hypophosphorylated 4E-BP1) or to eIF2 $\alpha$  (p-eIF2 $\alpha$ ) (mean  $\pm$  SEM;  $n = 3$ –6; \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ).  
 (L–N) VEGF-C- and EMCV IRES activity under normoxic and hypoxic conditions (1% O $_2$ ) in Capan-1 (L), 4T1 (M), and LLC (N) tumor cells in vitro (values are expressed relative to the respective normoxia condition; mean  $\pm$  SEM;  $n = 6$ ; \* $p < 0.01$  versus normoxia).  
 (O) VEGF-C- and EMCV IRES activity in control and CoCl $_2$  conditions in Capan-1 and LLC cells in vitro (values are expressed relative to the respective controls; mean  $\pm$  SEM;  $n = 5$ ; \* $p < 0.01$ ).  
 Scale bar represents 50  $\mu m$  (A–F). ctrl, control.

hydroxylase domain protein-2 (PHD2)<sup>+/−</sup> mice, in which tumor hypoxia is reduced because of normalization of tumor blood vessels and improved tumor vessel perfusion (Mazzzone et al., 2009), hypothesizing that the VEGF-C IRES activity would be reduced in these mice. We thus implanted bicistronic luciferase vector-transduced LLC tumor cells in wild-type (WT) and PHD2<sup>+/−</sup> mice. Tumor growth of cancer cells, transduced with VEGF-C- or EMCV-IRES vectors, was comparable in WT and PHD2<sup>+/−</sup> mice (Figure S4A), consistent with reports that PHD2 haploinsufficiency did not affect tumor growth (Mazzzone

et al., 2009). Also, staining for the hypoxia marker pimonidazole demonstrated that hypoxia levels were lower in EMCV IRES- and VEGF-C IRES-expressing tumors in PHD2<sup>+/−</sup> mice than in WT mice (Figures 7A, 7D, and 7G).

Compared to tumors in WT mice, tumors in PHD2<sup>+/−</sup> mice had similar VEGF-C immunoreactive protein levels, which colocalized in part with the pimonidazole-positive hypoxic regions, showing that both normoxic and hypoxic tumor cells produced VEGF-C (Figures 7B, 7C, 7E, 7F, and 7H). Immunoblotting confirmed these findings (Figure S4B). However, a reduced fraction of





**Figure 7. VEGF-C Induction by Hypoxia Is Translationally Regulated but HIF-1 $\alpha$  Independent**

(A–F) Immunostaining for hypoxyprobe (pimonidazole, green) and VEGF-C (red) in LLC tumors in wild-type (WT) (A–C) and PHD2<sup>-/-</sup> mice (D–F).

(G) Quantification of pimonidazole-positive pixel density in tumors transduced with EMCV- or VEGF-C IRES luciferase constructs showed a decrease in hypoxia in PHD2<sup>-/-</sup> mice (mean  $\pm$  SEM; n = 8; \*p < 0.05).

(H) Quantification of VEGF-C-positive pixel density in tumors transduced with EMCV- or VEGF-C IRES luciferase lentiviral constructs revealing no differences (mean  $\pm$  SEM; n = 8–10; p = NS).

(I–O) Staining for firefly luciferase (LucF, red) and hypoxyprobe (pimonidazole, green) revealed reduced VEGF-C IRES-dependent translation in LLC-bearing PHD2<sup>-/-</sup> mice (L–N) as compared to WT mice (I–K). Quantification of LucF-positive pixel density is shown in (O) confirming the decrease in luciferase signal for VEGF-C-IRES, which was not seen with the EMCV control IRES (mean  $\pm$  SEM; n = 8–10; \*p < 0.01).

(P–R) Micrographs of LLC tumor sections in PHD2<sup>-/-</sup> mice, stained for LYVE-1 (green) and hypoxyprobe (PIMO, brown), revealing that lymph vessels were hypoxic in this model.

(S) Immunoblot of VEGF-C or HIF-1 $\alpha$  in lysates of Capan-1 cells incubated in normoxia or hypoxia and treated with or without siRNA against HIF-1 $\alpha$  (siHIF) or a scrambled siRNA control (siScramble). Densitometric quantification is shown in the graph (right) (mean  $\pm$  SEM; n = 4; \*p < 0.01).

(T) VEGF-C IRES activity in Capan-1 cell lines in vitro incubated under normoxia or hypoxia and treated with or without siRNA against HIF-1 $\alpha$  or a scrambled siRNA control (mean  $\pm$  SEM; n = 5; \*\*\*p < 0.001).

(U) VEGF-A IRES activity in Capan-1 tumors in vivo revealing increased IRES activity with tumor progression (mean  $\pm$  SEM; n = 8–10; \*p < 0.005).

(V) Quantification of staining for firefly luciferase (LucF) revealed that VEGF-A IRES activity was lower in LLC tumors in PHD2<sup>-/-</sup> mice than in WT mice. The activity of EMCV IRES was not affected (mean  $\pm$  SEM; n = 8; \*p < 0.01). Note: since the data shown in Figure 7V and Figure 7O were generated in the same experiments, the EMCV control data are the same.

(W and X) qRT-PCR for VEGF-A showing increased mRNA levels in hypoxic conditions in Capan-1 (C) and LLC (D) tumor cells in vitro (mean  $\pm$  SEM; n = 6; \*p < 0.05).

Scale bar represents 50  $\mu$ m (all). See also Figure S4.

VEGF-C was translated via IRES-dependent mechanisms in the more oxygenated tumors of PHD2<sup>-/-</sup> mice. Indeed, when double staining for pimonidazole and firefly luciferase (LucF), VEGF-C IRES-expressing tumors in PHD2<sup>-/-</sup> mice had reduced LucF but increased LucR levels (Figures 7I–7O; Figures S4C and S4D), indicating that the VEGF-C IRES activity was reduced while cap-dependent translation initiation was increased. VEGF-C IRES-dependent translation of LucF was only detected in the residual hypoxic tumor zones in PHD2<sup>-/-</sup> mice (Figures 7L–7N). Interestingly, even though overall tumor oxygenation in PHD2<sup>-/-</sup> mice was improved because of blood vessel normaliza-

tion, lymph vessels remained immunoreactive for the hypoxyprobe pimonidazole in tumors of PHD2<sup>-/-</sup> mice (Figures 7P–7R). Thus, IRES-dependent VEGF-C translation was reduced in more oxygenated tumors of PHD2<sup>-/-</sup> mice, confirming the regulation of the translational switch (cap versus IRES dependence) by oxygen levels in vivo. That VEGF-C protein levels were not lower in tumors of PHD2<sup>-/-</sup> mice than in WT mice, despite overall improved oxygenation, may be due to the fact that the oxygenation conditions in tumors of PHD2<sup>-/-</sup> mice were still not sufficiently improved to completely abrogate IRES-dependent VEGF-C translation. In addition, even though HIF-1 $\alpha$  levels are



reduced in more oxygenated tumors of PHD2<sup>-/-</sup> mice (Mazzzone et al., 2009), the residual HIF-1 $\alpha$  levels may still promote cap-dependent translation, since HIF-1 $\alpha$  induces the transcription of the cap-binding factor eIF-4E (Yi et al., 2013).

#### HIF-1 $\alpha$ -Independent Hypoxic Induction of VEGF-C Synthesis

To explore if VEGF-C protein production in hypoxic conditions was HIF dependent, we used a small interfering RNA (siRNA) against human HIF-1 $\alpha$  (siHIF) to silence HIF-1 $\alpha$  expression, which reduced HIF-1 $\alpha$  protein levels to nearly undetectable levels in hypoxic Capan-1 tumor cells (Figure 7S). Silencing of HIF-1 $\alpha$  also reduced the expression levels of VEGF-A, phosphoglycerate kinase (PGK), hexokinase-2, and the glucose transporter GLUT-1, all known HIF-1 $\alpha$  target genes (Figure S4E). Despite the strong decrease of the HIF-1 $\alpha$  levels in hypoxic Capan-1 tumor cells transfected with siHIF (Figure 7S), VEGF-C protein levels were maintained in hypoxic conditions (Figure 7S), whereas the VEGF-C IRES activity was not affected by HIF-1 $\alpha$  silencing (Figure 7T). Thus, these data suggest that the posttranscriptional induction of VEGF-C via IRES was independent of HIF-1 $\alpha$ .

#### Regulation of VEGF-A Expression by Hypoxia

For reasons of comparison, we also studied the relative importance of the cap-dependent versus IRES-dependent translation of VEGF-A in hypoxia. Previous *in vitro* studies documented that VEGF-A translation relies on cap-dependent mechanisms in normoxia and on IRES-dependent mechanisms in hypoxia (Barnes et al., 2004). Transgenic mouse lines, expressing reporter genes under the control of IRESs, also revealed that VEGF-A translation in ischemic muscle partly depends on the IRES activity (Barnes et al., 2007). However, it is unknown whether IRES-dependent translation of VEGF-A can also occur in tumors or metastatic lymph nodes. When tumor cells, stably transduced with a bicistronic lentiviral vector containing the VEGF-A IRES sequence, were injected *in vivo*, the VEGF-A IRES activity levels were detectable and increased during tumor progression (Figure 7U). The VEGF-A IRES activity was sensitive to oxygen levels in tumors *in vivo*, since tumors (transduced with lentiviral bicistronic vectors containing VEGF-A IRES) had lower VEGF-A IRES activity levels in PHD2<sup>-/-</sup> mice, as revealed by staining for firefly luciferase (Figure 7V). This was not influenced by the tumor size, since tumor growth was not affected by the PHD2 genotype or type of bicistronic vector (VEGF-A- or EMCV-IRES) (Figure S4F).

However, different from VEGF-C, regulation of VEGF-A expression also relied on transcriptional upregulation in hypoxic conditions. Indeed, VEGF-A mRNA levels were increased in tumor cells in hypoxia (Figures 7W and 7X) and also increased during tumor progression *in vivo*, both at the protein and mRNA levels (Figures S4G–S4J). Thus, unlike VEGF-A, the expression of which is upregulated in hypoxia at the transcriptional and translational level, the expression of VEGF-C in hypoxia is regulated by translational, but not by transcriptional, mechanisms.

#### DISCUSSION

We identified a translational regulation of VEGF-C production in hypoxic conditions, both in primary tumors and in (pre)-metasta-

tic lymph nodes, that is distinct from previously identified mechanisms of how hypoxia stimulates lymphangiogenesis.

#### Tumor Cells Metastasizing via Hypoxic Lymphatics Induce VEGF-C

For tumor cells to spread to distant organs via lymphatics, they induce lymphangiogenesis. However, since tumors are often deprived of oxygen and lymphatics are extremely hypoxic (Guzy et al., 2008; Ivanovic, 2009), tumor cells must have mechanisms to stimulate lymph vessel growth in hypoxic conditions. Our findings demonstrate that tumor cells can upregulate VEGF-C protein levels in hypoxic conditions *in vitro* and *in vivo* and that lymph vessels grew in and around hypoxic tumor areas, where VEGF-C was produced. While hypoxia often upregulates protein levels via HIF-1 $\alpha$ -dependent gene transcription, this study shows that hypoxia augments VEGF-C protein levels via a HIF-1 $\alpha$ -independent effect on VEGF-C IRES-dependent initiation of translation.

#### Hypoxia Regulates VEGF-C Protein Levels via an IRES-Dependent Activity

We demonstrate that murine and human VEGF-C mRNAs are translated by IRES-dependent initiation of translation in hypoxic tumor areas during tumor development *in vivo*. Sequence alignment revealed that murine and human VEGF-C 5' UTRs share three highly conserved motifs. Interestingly, probing the RNA secondary structures by SHAPE analysis showed that two of these motifs adopt the same two-dimensional structure, since the reactivity pattern of the conserved residues was nearly identical. These motifs, located at the same distance from the initiation codon, might be appropriate for binding of specific *trans*-acting factor(s), necessary to activate IRES-dependent translation. Use of a bicistronic vector provided functional evidence that the 5' UTR of murine and human VEGF-C mRNA indeed functioned as IRES sequences to initiate cap-independent translation of the VEGF-C mRNA. Thus, translation of the VEGF-C mRNA in normoxia occurs via cap- and/or IRES-dependent mechanisms. In hypoxia, when global translation is suppressed through dephosphorylation of 4E-BP1 and increased phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , IRES-mediated mRNA translation is activated, leading to an overall increase in VEGF-C protein levels.

#### VEGF-C IRES Activity Is Higher in Lymph Nodes

Previous studies reported that expression of VEGF-C by cancer cells promotes tumor and lymph node lymphangiogenesis as well as metastasis (Hirakawa et al., 2005, 2007). Even before metastatic tumor cells reach the sentinel lymph nodes, VEGF-C, released by malignant cells of the primary tumor into the lymphatic circulation, stimulates lymphangiogenesis in lymph nodes at a distance (Hirakawa et al., 2005, 2007). Using luciferase reporters of posttranscriptional VEGF-C regulation, we observed that the VEGF-C IRES firefly luciferase activity was increased in lymph nodes at the time when they were colonized by metastatic tumor cells. Notably, however, the induction of the VEGF-C IRES activity was higher in tumor cells that had metastasized to the lymph nodes than in tumor cells that were present in the primary tumors. Lymphangiogenesis was also



more extensive in metastatic lymph nodes than in primary tumors. These data indicate that the lymph node milieu stimulates VEGF-C expression. Since lymphatics are highly hypoxic, the hypoxic milieu seems to be of key importance to activate IRES-dependent VEGF-C translation.

### HIF-1 $\alpha$ -Independent Regulation of VEGF-C Translation in Hypoxia

Hypoxia signaling is well known to stimulate angiogenesis, in part by promoting HIF-1 $\alpha$  dependent transcription of VEGF-A as well as by stimulating IRES-dependent VEGF-A translation (Barnes et al., 2007; Huzar et al., 2001). In contrast, VEGF-C transcript levels were reduced, yet VEGF-C protein levels were increased, in hypoxia by switching from cap-dependent to IRES-dependent VEGF-C translation. Notably, this regulation seemed to be independent of HIF-1 $\alpha$ , since near-complete silencing of HIF-1 $\alpha$  to levels sufficient to lower HIF-1 $\alpha$  target gene transcription did not abrogate the hypoxia-induced post-transcriptional IRES-activated translation of VEGF-C mRNA and production of VEGF-C protein. Different molecular mechanisms thus evolved to ensure production of VEGF-A and VEGF-C, two closely related and homologous members of the VEGF family.

### Hypoxic Lymph Vessels Ensure Lymphangiogenesis in Cancer

Our findings may also be relevant to understand how tumor cells have developed mechanisms to ensure spreading via lymphatics in oxygen-deprived conditions. Lymph vessels are severely hypoxic, not only because they lack oxygen-carrying red blood cells, but also because they reside in very hypoxic regions in tissues and tumors (Guzy et al., 2008; Ivanovic, 2009). Such a hypoxic milieu suppresses cap-dependent mRNA translation of VEGF-C in tumor cells, traveling inside lymphatics to the lymph nodes. However, by switching to IRES-dependent initiation of translation of VEGF-C, tumor cells can upregulate the production of this key lymphangiogenic factor in hypoxia and thereby ensure increased growth of lymph vessels via which they metastasize. Hence, tumor cells have adopted mechanisms to stimulate lymphangiogenesis when metastasizing through hypoxic lymph vessels and lymph nodes.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

All human tissue was used under approval from the Human Subjects Institutional Review Board of the University of Toulouse III. More detailed procedures are described in Supplemental Experimental Procedures.

### Tissue Specimens

In total, 15 primary human breast cancer specimens and their associated lymph nodes were collected from pretreatment surgical resections (Rangueil Hospital, Toulouse, France). Sample collection was approved by the INSERM Institutional Review Board (DC-2008-463) and Research State Department (Ministère de la Recherche, ARS, CPP2; authorization AC-2008-820).

### Cell Culture

Cell culture of Capan-1 pancreatic carcinoma cells, 4T1 breast carcinoma, and LLC cells under normoxia or hypoxia (1% O<sub>2</sub> or 300  $\mu$ M CoCl<sub>2</sub>) was as described in the Supplemental Experimental Procedures.

### Tumor Studies and Immunohistochemical Phenotyping

Animal experiments were conducted in accordance with recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimentation and according to the INSERM IACUC (France) and the KU Leuven (Belgium) guidelines for laboratory animal husbandry. All animal experiments were approved by the local branch Inserm Ranguel-Purpan of the Midi-Pyrénées ethics committee, France (protocol 091037615), or by the Institutional Animal Care and Research Advisory Committee of the KU Leuven, Leuven, Belgium (protocol P166/2011). The LLC syngenic tumor model in C57Bl6 mice, Capan-1 xenograft model in NMR1 nude mice, syngenic orthotopic 4T1 breast carcinoma model in Balb/c mice, and the collection and immunohistological analysis of tumor and lymph nodes was performed as detailed in the Supplemental Experimental Procedures.

### RNA and Protein Analysis

#### SHAPE Analysis

In-vitro-transcribed RNA was prepared and subjected to SHAPE analysis as previously described (Heller et al., 2013) (Mortimer and Weeks, 2009) and further detailed in the Supplemental Experimental Procedures.

#### RNA Analysis

Expression of human and murine VEGF-C, VEGF-A, hexokinase II, Glut1, PGK, LucR, and LucF was by SYBR green quantitative RT-PCR (Table S1) as described in the Supplemental Experimental Procedures.

#### Protein Analysis

VEGF-C protein levels in Capan-1 tumor extracts were measured by ELISA (R&D Systems).

### Lentivector Construction and Luciferase Reporter Gene Assay

Cloning of the cDNAs coding human and murine VEGF-C 5' UTR, VEGF-A 5' UTR, and EMCV 5' UTR into the bicistronic lentivectors expressing *Renilla* luciferase under the cytomegalovirus promoter and firefly luciferase under the control of the respective 5' UTR IRES, and cell transduction was as described in the Supplemental Experimental Procedures. In vitro or ex vivo luciferase assays on cell or tissue lysates were performed using the Dual-Luciferase Assay System kit (Promega).

### siRNA and Cell Transfection

siRNA-mediated silencing of human HIF1 $\alpha$  was done using a pool of siRNAs as listed in the Supplemental Experimental Procedures. Transfection of Capan-1 cells and verification of silencing by immunoblotting was as described in the Supplemental Experimental Procedures.

### Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with a two-tailed Student's *t* test or one-way ANOVA. All experiments were performed three times, with one exception, where the incidence of metastasis is reported as the average  $\pm$  SEM of three separate animal experiments. All other data presented are of one representative experiment.

## SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes Supplemental Experimental Procedures, four figures, and one table and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.011>.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Ligue Régionale Contre le Cancer, Fondation pour la Recherche Médicale and Association Française contre les Myopathies, Association pour la Recherche sur le Cancer, and Conseil Régional Midi-Pyrénées (France). We thank the Biological Resources Center and G. Escourrou and I. Rouquette from the Pathology and Histology Department of Rangueil Hospital in Toulouse for providing human tissue samples. We thank J.J. Mauret (GeT Genotoul Platform), Y. Barrera (ANEXPLo Genotoul Platform), A. Dalluc-Clavières, and L. Van den Berghie for technical assistance and F. Lanfant, H. Prats, and P. Romby for scientific support. A.K. is funded



by a fellowship of the Belgian Science Fund—Flanders; F.H. is funded by the Conseil Régional Midi-Pyrénées (France). The work of P.C. is funded by Long-term Structural Funding Methusalem by the Flemish Government, the Interuniversity Attraction Poles (P7/03), the Belgian Government, and Leducq Transatlantic Network—Artemis.

Received: May 24, 2013  
Revised: October 28, 2013  
Accepted: December 6, 2013  
Published: January 2, 2014

## REFERENCES

- Albricht, J., and Christofori, G. (2011). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 483–494.
- Alitalo, K. (2011). The lymphatic vasculature in disease. *Nat. Med.* 17, 1371–1380.
- Alitalo, A., and Detmar, M. (2012). Interaction of tumor cells and lymphatic vessels in cancer progression. *Oncogene* 31, 4499–4508.
- Bonnal, S., Schaeffer, C., Créancier, L., Clamens, S., Moine, H., Prats, A.C., and Vagner, S. (2003). A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons. *J. Biol. Chem.* 278, 39330–39336.
- Bornes, S., Bouliard, M., Heblot, C., Zanibellato, C., Iacovoni, J.S., Prats, H., and Tournai, C. (2004). Control of the vascular endothelial growth factor internal ribosome entry site (IRES) activity and translation initiation by alternatively spliced coding sequences. *J. Biol. Chem.* 279, 18717–18726.
- Bornes, S., Prado-Lorenzo, L., Bastide, A., Zanibellato, C., Iacovoni, J.S., Lacazette, E., Prats, A.C., Tournai, C., and Prats, H. (2007). Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ. Res.* 100, 305–308.
- Braunstein, S., Karpisheva, K., Pola, C., Goldberg, J., Hochman, T., Yes, H., Cangiarola, J., Anju, R., Formenti, S.C., and Schneider, R.J. (2007). A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol. Cell* 28, 501–512.
- Bushell, M., Storey, M., Samow, P., and Willis, A.E. (2004). Translation inhibition during the induction of apoptosis: RNA or protein degradation? *Biochem. Soc. Trans.* 32, 606–610.
- Christiansen, A., and Detmar, M. (2011). Lymphangiogenesis and cancer. *Genes Cancer* 2, 1146–1158.
- Créancier, L., Morello, D., Mercier, P., and Prats, A.C. (2000). Fibroblast growth factor 2 internal ribosome entry site (IRES) activity *ex vivo* and in transgenic mice reveals a stringent tissue-specific regulation. *J. Cell Biol.* 150, 275–281.
- Deer, E.L., González-Hernández, J., Coursen, J.D., Shea, J.E., Ngatia, J., Scalfi, C.L., Firpo, M.A., and Mulvihill, S.J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* 39, 425–435.
- Garmy-Susini, B., Avraamides, C.J., Schmid, M.C., Foubert, P., Elies, L.G., Barnes, L., Feral, C., Papayannopoulou, T., Lowy, A., Blair, S.L., et al. (2010). Integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis. *Cancer Res.* 70, 3042–3051.
- Guzy, R.D., Sharma, B., Bell, E., Chandel, N.S., and Schumacker, P.T. (2008). Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol. Cell Biol.* 28, 718–731.
- Heffer, A.C., Romilly, C., Chevalier, C., Likiou, E., Marzi, S., and Romby, P. (2013). Probing RNA Structure. *In Vitro with Enzymes and Chemicals, Volume 2*. Second Edition (Weinheim: Wiley-VCH Verlag).
- Hirakawa, S. (2009). From tumor lymphangiogenesis to lymphovascular niche. *Cancer Sci.* 100, 983–989.
- Hirakawa, S., Kodama, S., Kunstfeld, R., Kajiya, K., Brown, L.F., and Detmar, M. (2005). VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis. *J. Exp. Med.* 201, 1089–1099.
- Hirakawa, S., Brown, L.F., Kodama, S., Paavonen, K., Alitalo, K., and Detmar, M. (2007). VEGF-C-induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites. *Blood* 109, 1010–1017.
- Huez, I., Bornes, S., Bresson, D., Créancier, L., and Prats, H. (2001). New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol. Endocrinol.* 15, 2197–2210.
- Ivanovic, Z. (2009). Physiological, *ex vivo* cell oxygenation is necessary for a true insight into cytokine biology. *Eur. Cytokine Netw.* 20, 7–9.
- Kaelin, W.G., Jr., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* 20, 393–402.
- Komar, A.A., and Hatzoglou, M. (2011). Cellular IRES-mediated translation: the war of ITAFs in pathophysiological states. *Cell Cycle* 10, 229–240.
- Koumeris, C., and Wouters, B.G. (2006). "Translating" tumor hypoxia: unfolded protein response (UPR)-dependent and UPR-independent pathways. *Mol. Cancer Res.* 4, 423–436.
- Larsson, O., Tian, B., and Sonenberg, N. (2013). Toward a genome-wide landscape of translational control. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5, a012302.
- Liang, X., Yang, D., Hu, J., Hao, X., Gao, J., and Mao, Z. (2008). Hypoxia-inducible factor- $\alpha$  expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 28 (3A), 1659–1666.
- Majumdar, A.J., Wong, W.J., and Simon, M.C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol. Cell* 40, 294–309.
- Martineau, Y., Le Béc, C., Moribrun, L., Allo, V., Chiu, I.M., Danos, O., Moine, H., Prats, H., and Prats, A.C. (2004). Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Mol. Cell Biol.* 24, 7622–7635.
- Martineau, Y., Azar, R., Bousquet, C., and Pironnet, S. (2013). Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins. *Oncogene* 32, 671–677.
- Martinez-Corral, I., and Makinen, T. (2013). Regulation of lymphatic vascular morphogenesis: Implications for pathological (tumor) lymphangiogenesis. *Exp. Cell Res.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.01.016>
- Maxwell, P.H. (2005). The HIF pathway in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* 16, 523–530.
- Mazzoni, M., Dettori, D., Leite de Oliveira, R., Loges, S., Schmidt, T., Jonckx, B., Tian, Y.M., Lanahan, A.A., Pollard, P., Ruiz de Almodovar, C., et al. (2008). Heterozygous deficiency of PHD2 restores tumor oxygenation and inhibits metastasis via endothelial normalization. *Cell* 136, 839–851.
- Mortimer, S.A., and Weeks, K.M. (2009). Time-resolved RNA SHAPE chemistry: quantitative RNA structure analysis in one-second snapshots and at single-nucleotide resolution. *Nat. Protoc.* 4, 1413–1421.
- Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Filipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I., and Heinen, C.U. (2001). Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7029–7036.
- Pilipenko, E.V., Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Khitrina, E.V., Poperechnaya, A.N., Agol, V.I., and Heinen, C.U. (2000). A cell cycle-dependent protein serves as a template-specific translation initiation factor. *Genes Dev.* 14, 2028–2045.
- Pulaski, B.A., and Ostrand-Rosenberg, S. (2001). Mouse 4T1 breast tumor model. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 20*, Unit 20.2.
- Richter, J.D., and Sonenberg, N. (2005). Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* 433, 477–480.
- Sachs, A.B. (2000). Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail. *Cell* 101, 243–245.
- Sanz, M.A., Redondo, N., Garcia-Moreno, M., and Carrasco, L. (2013). Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is responsible for the failure of the picornavirus internal ribosome entry site to direct translation from Sindbis virus replicons. *J. Gen. Virol.* 94, 796–806. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  is responsible for the failure of the picornavirus internal ribosome entry site to direct translation from Sindbis virus replicons.
- Schito, L., Rey, S., Tafani, M., Zhang, H., Wong, C.C., Russo, A., Russo, M.A., and Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-inducible factor 1-dependent expression

- of platelet-derived growth factor B promotes lymphatic metastasis of hypoxic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, E2707–E2716.
- Schoppmann, S.F., Fenzl, A., Schindl, M., Bachleitner-Holmann, T., Nagy, K., Gnani, M., Horvat, R., Jakesz, R., and Bimer, P. (2006). Hypoxia inducible factor-1alpha correlates with VEGF-C expression and lymphangiogenesis in breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 99, 135–141.
- Semenza, G.L. (2012). Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148, 399–408.
- Silveira, D., and Schneider, R.J. (2009). Inflammatory breast cancer cells are constitutively adapted to hypoxia. *Cell Cycle* 8, 3091–3096.
- Spriggs, K.A., Stoneley, M., Bushell, M., and Willis, A.E. (2008). Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate. *Biol. Cell* 100, 27–38.
- Spriggs, K.A., Bushell, M., and Willis, A.E. (2010). Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol. Cell* 40, 228–237.
- Tap, J., Li, T., Li, K., Xiong, J., Yang, Z., Wu, H., and Wang, C. (2006). Effect of HIF-1alpha on VEGF-C induced lymphangiogenesis and lymph nodes metastases of pancreatic cancer. *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. Med. Sci.* 26, 562–564.
- Vagner, S., Galy, B., and Pironnet, S. (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep.* 2, 893–898.
- Yi, T., Papadopoulos, E., Hagner, P.R., and Wagner, G. (2013). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) promotes cap-dependent translation of selective mRNAs through up-regulating initiation factor eIF4E1 in breast cancer cells under hypoxia conditions. *J. Biol. Chem.* 288, 18732–18742.
- Zhou, B., Si, W., Su, Z., Deng, W., Tu, X., and Wang, Q. (2013). Transcriptional activation of the Prox1 gene by HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  in response to hypoxia. *FEBS Lett.* 587, 724–731.



**SUPPLEMENTAL INFORMATION FOR:**

**HYPOXIA INDUCES VEGF-C EXPRESSION  
IN METASTATIC TUMOR CELLS VIA A  
HIF-1 $\alpha$ -INDEPENDENT TRANSLATION-MEDIATED MECHANISM**

*Florent Morfoisse<sup>1,2</sup>, Anna Kuchnio<sup>3,4</sup>, Clement Frainay<sup>1,2</sup>, Anne Gomez-Brouchet<sup>1,2</sup>,  
Marie-Bernadette Delisle<sup>1,2</sup>, Stefano Marzi<sup>5</sup>, Anne-Catherine Helfer<sup>5</sup>, Fransky Hantelys<sup>6</sup>,  
Francoise Pujol<sup>6</sup>, Julie Guillermet-Guibert<sup>1,2</sup>, Corinne Bousquet<sup>1,2</sup>,  
Mieke Dewerchin<sup>3,4</sup>, Stephane Pyronnet<sup>1,2</sup>, Anne-Catherine Prats<sup>6\*</sup>,  
Peter Carmeliet<sup>3,4\*</sup> & Barbara Garmy-Susini<sup>1,2</sup>*

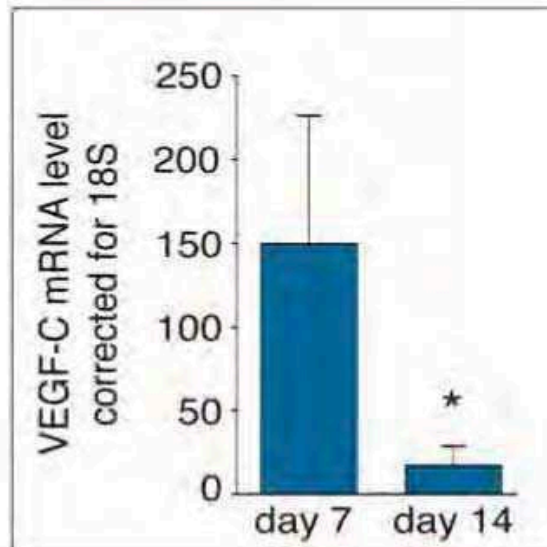
<sup>1</sup> Inserm; U1037; F-31432 Toulouse, France; <sup>2</sup> Université de Toulouse; UPS; Cancer Research Center of Toulouse; Equipe labellisée Ligue Contre le Cancer and Laboratoire d'Excellence Toulouse Cancer, F-31432 Toulouse, France; <sup>3</sup> Vesalius Research Center, VIB, University of Leuven, B-3000 Leuven, Belgium; <sup>4</sup> Vesalius Research Center, VIB, B-3000 Leuven, Belgium; <sup>5</sup> UPR 9002 CNRS-ARN, Université De Strasbourg ; IBMC ; 67084 Strasbourg-France; <sup>6</sup> Université de Toulouse; UPS; TRADGENE; EA4554; F-31432 Toulouse, France.

\*: equal contribution

Corresponding author: Barbara Garmy-Susini, e-mail: barbara.garmy-susini@inserm.fr

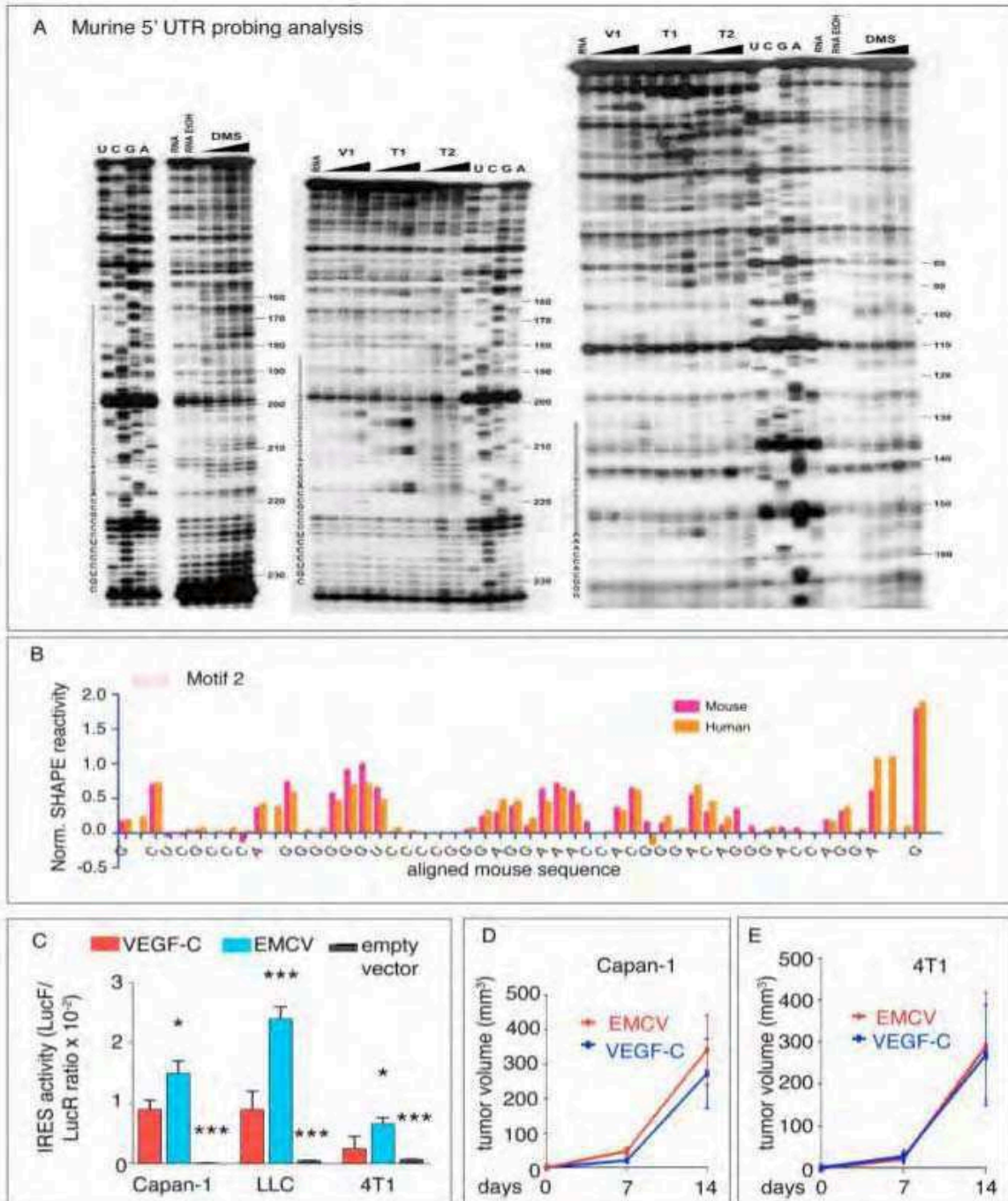
Running title: Hypoxic regulation of VEGF-C translation

## SUPPLEMENTAL FIGURES AND LEGENDS



**FIGURE S1:** TUMOR LYMPHANGIOGENESIS CORRELATES WITH POST-TRANSCRIPTIONAL INDUCTION OF VEGF-C *IN VIVO* (RELATED TO FIGURE 2)

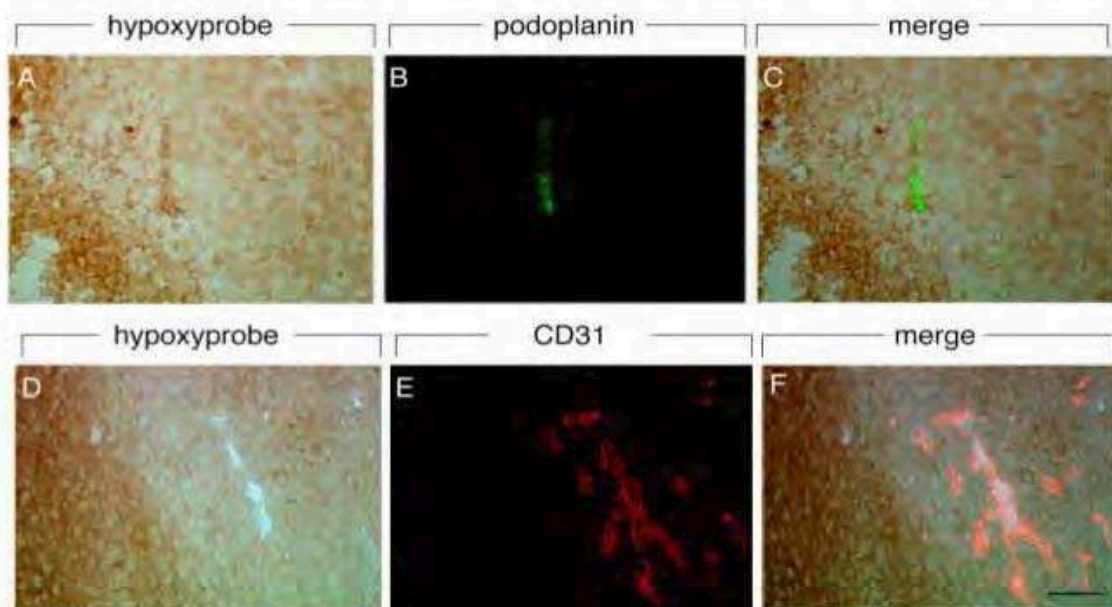
RT-PCR analysis of murine VEGF-C transcript level in Capan-1 tumors reveals that stromal cells did not compensate for the reduced human VEGF-C mRNA (mean±SEM; N=10; \*P<0.05).





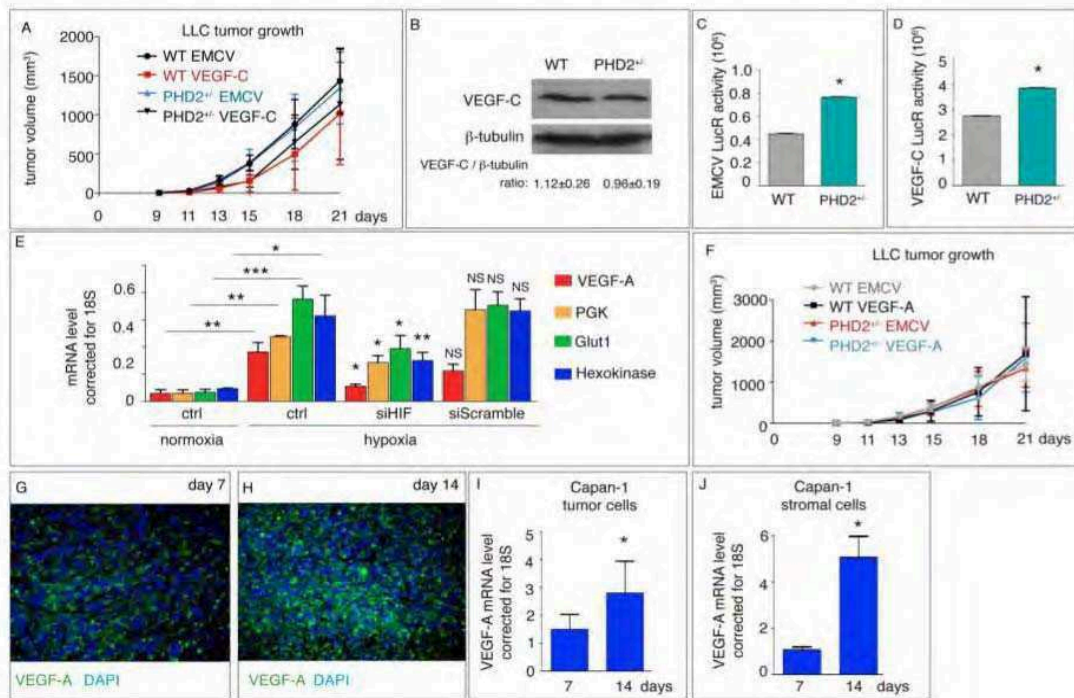
**FIGURE S2:** STRUCTURE ANALYSIS OF THE 5' UTRs OF HUMAN AND MURINE VEGF-C mRNAs  
(RELATED TO FIGURE 3)

**A,** Chemical and enzymatic probing of the murine VEGF-C 5' UTR sequence. Autoradiograms of RNA probing experiments followed by primer extension analyzed on 8% polyacrylamide sequence gels containing 8 M urea, showing the localization of the chemical modifications performed with dimethylsulfate (DMS) and the enzymatic cleavages obtained with RNase V1 (V1), RNase T1 (T1), and RNase T2 (T2). DMS, T1 and T2 RNase treatments detect unpaired nucleotides, whereas V1 RNase treatment detects paired or stacked nucleotides. The lanes represent the following conditions: (i) RNA: control RNA without DMS or enzymes; (ii) RNA EtOH: incubation control where DMS was replaced by ethanol (EtOH); (iii) RNA sequencing ladders were run in parallel (U,G,C,A lanes on each gel). The left gel shows the DMS analysis, the middle and right gels show the enzymatic analysis for the murine 5'UTR downstream and upstream of nucleotides 160, respectively. **B,** Quantification of the SHAPE analysis is shown for the conserved nucleotides of motif 2 of the human (orange) and murine (red) 5'UTRs, showing very similar reactivity patterns. **C,** Levels of LucR/LucF ratio in Capan-1, LLC and 4T1 cells, showing negligible IRES activity of the empty bicistronic vector in comparison to the ECMV- and VEGF-C IRES activity (mean±SEM; N=3; \*\*p<0.05, \*\*\*p<0.001). **D,E,** Tumor growth of Capan-1 (C) and 4T1 (D) cells transduced with EMCV or VEGF-C bicistronic lentiviral vectors injected subcutaneously (Capan-1) or orthotopically in the mammary fat pad (4T1) revealed no differences (mean±SEM; N=8-10 p=NS).



**FIGURE S3:** LYMPHATICS DEVELOP IN CLOSE PROXIMITY TO HYPOXIC ZONES (RELATED TO FIGURE 5)

**A-F,** Immunostaining of Capan-1 tumors for hypoxyporbe (brown) (A,D), podoplanin (green) (B) and CD31 (red, E) revealing that lymphatics develop in proximity to hypoxic areas (merged micrographs of hypoxyporbe and podoplanin, C) in contrast to blood vessels (merged micrographs of hypoxyporbe and CD31, F). Scale bar: 50  $\mu$ m.



**FIGURE S4:** VEGF-C INDUCTION BY HYPOXIA IS TRANSLATIONALLY REGULATED BUT HIF-1 $\alpha$  INDEPENDENT (RELATED TO FIGURE 7)

**A**, Similar LLC tumor growth of tumor cells transduced with EMCV or VEGF-C bicistronic lentiviral vectors inoculated in WT or PHD2<sup>-/-</sup> mice (mean $\pm$ SEM; N=8; p=NS). **B**, Immunoblot for VEGF-C in extracts of LLC tumors grown in wild type or PHD2<sup>-/-</sup> mice, revealing no difference between genotypes. Densitometric quantification is shown (mean $\pm$ SEM; N=6; p=NS). **C,D**, LucR activity in LLC tumors generated with cells transduced with the EMCV (C) or VEGF-C (D) IRES bicistronic lentivectors, revealing increased LucR levels (cap-dependent translation) when tumors were grown in PHD2<sup>-/-</sup> mice (mean $\pm$ SEM; N=8; \*p<0.001). **E**, qRT-PCR analysis of VEGF-A, phosphoglycerokinase (PGK), glucose transporter (Glut1) or hexokinase in Capan-1 cells cultured in normoxia or hypoxia (1% oxygen) with or without transfection with a siRNA against human HIF-1 $\alpha$  (siHIF) or control siRNA (siScramble), showing inhibition of hypoxia-induced gene expression upon HIF-1 $\alpha$  silencing. Mean $\pm$ SEM; N=3; \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.01 versus normoxia (indicated by the lines) or versus hypoxia control (asterisks above the bars). **F**, LLC tumor growth of tumor cells transduced with EMCV or VEGF-A bicistronic lentiviral vectors inoculated into WT or PHD2<sup>-/-</sup> mice revealed no differences (mean $\pm$ SEM; N=8; p=NS). **G,H**, Immunostaining for VEGF-A (green) of Capan-1 tumor 7 (G) or 14 (H) days after inoculation revealing increased VEGF-A protein level. Nuclei were counterstained with DAPI. **I,J**, RT-PCR analysis of human Capan-1 pancreatic tumors revealing increased VEGF-A transcript level both in tumor (I) and stromal (J) cells (mean $\pm$ SEM; N=5; \*p<0.01). Scale bar: 50  $\mu$ m (G,H).



## SUPPLEMENTAL TABLES

**TABLE S1:** PRIMER SEQUENCES USED FOR qRT-PCR (RELATED TO EXPERIMENTAL METHODS)

		Sequence (5'→3')
hVEGFC	Forward primer	TGTTCTCTGCTCGCCGCTGC
hVEGFC	Reverse primer	TGCATAAGCCGTGGCCTCGC
mVEGFC	Forward primer	TGATCCCCAGTCCGCGCGAG
mVEGFC	Reverse primer	CGGGCTCCGCTCCGAGAAG
Luciferase firefly	Forward primer	ATGGGCAAATCAGGCAA
Luciferase firefly	Reverse primer	CGCAATATCTTCTCAATATCAGG
Luciferase <i>Renilla</i>	Forward primer	TCCTATGATTATGTCCGTTATGAAA
Luciferase <i>Renilla</i>	Reverse primer	TGTAGCCATCCATCCTTGCAA
hVEGF-A	Forward primer	GAGAGAGGCCGAAGTCCTTT
VEGF-A	Reverse primer	TTGGAACCGGCATCTTTATC
mVEGF-A	Forward primer	ATGAACTTTCTGCTGTCTTGG
mVEGF-A	Reverse primer	ACCACTTCGTGATGATTCTGA
mHexokinase II	Forward primer	ATGAGGGGCGGATGTGTATCA
mHexokinase II	Reverse primer	GGTTCAGTGAGCCCATGTCAA
mGlut1	Forward primer	CTTCTCTGTGGGCCTTTTCGT
mGlut1	Reverse primer	CAAAGGACTTGCCCAGTTTCG
mPGK	Forward primer	CGCTTTCATGTGGAGGAAGAA
mPGK	Reverse primer	TGGCTCGGCTTAACCTTGT

## **SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES**

### **TISSUE SPECIMENS**

In total, 15 primary human breast cancer specimens and their associated lymph nodes were collected. Samples were obtained from archival paraffin blocks of breast cancer from patients treated at the Rangueil hospital, Toulouse, France between 2002 and 2008. Samples were selected as coded specimens under a protocol approved by the INSERM Institutional Review Board (DC-2008-463) and Research State Department (Ministère de la recherche, ARS, CPP2, authorization AC-2008-820) and included tumor specimens identified as invasive ductal carcinoma. All tumor and sentinel lymph node specimens were obtained from pre-treatment surgical resections. Final breast cancer diagnosis was confirmed by pathologic evaluation of specimens stained with hematoxylin and eosin (H&E). Each series included as controls normal breast tissue and selected common specimens to ensure consistent interpretation, as well as packed, sectioned cell lines engineered to over- or under-express specific factors.

### **CELL CULTURE**

Capan-1 pancreatic carcinoma cells, 4T1 breast carcinoma and Lewis Lung Carcinoma (LLC) cell were cultured in DMEM medium containing 10% fetal bovine serum and were maintained at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> : 20% O<sub>2</sub> atmosphere. Culture under hypoxia was done at 5% CO<sub>2</sub> : 1% O<sub>2</sub> or in regular atmosphere in the presence of 300 μM CoCl<sub>2</sub>.

### **TUMOR STUDIES**

Animal experiments were conducted in accordance with recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimentation and according to the INSERM IACUC (France) and the KU Leuven (Belgium) guidelines for laboratory animal husbandry. All animal experiments were approved by the local branch Inserm Rangueil-Purpan of the Midi-Pyrénées ethics committee, France (protocol n° 091037615) or by the Institutional Animal Care and Research Advisory Committee of

the KU Leuven, Leuven, Belgium (protocol n° P166/2011).  $5 \times 10^5$  LLC cells were injected subcutaneously into wild type (WT, n=8-10) or PHD2<sup>+/-</sup> (n=4-6) mice (Mazzone et al., 2009) on a C57Bl6 background. Animals were sacrificed 1 or 3 weeks later. Tumor and inguinal lymph nodes were excised and embedded into OCT compound (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA). To study the xenograft of pancreatic carcinomas,  $1 \times 10^6$  Capan-1 cells were injected subcutaneously into NMRI nude mice (Janvier, Le Genest, France). Tumors and hilar lymph nodes were excised at either 7 or 14 days. To study the orthotopic model of breast carcinoma,  $5 \times 10^4$  4T1 cells were injected into Balb/c fourth mammary fat pad (n=8-10). Animals were sacrificed 1 or 2 weeks later, the tumor and inguinal lymph nodes were excised and embedded into OCT compound. For biochemical assessments, Capan-1, LLC, and 4T1 tumors or lymph nodes were harvested and lysed by a grinding step in 300  $\mu$ l (day 7) or 500  $\mu$ l (day 14, day 21) of Luciferase Assay Buffer II (Promega, USA). Samples were then centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes at 4°C. The supernatants were then collected and protein concentration was measured using the BCA assay (Interchim, Montlucon, France) before luciferase assay or Western blot analysis.

#### **RNA STRUCTURE DETERMINATION BY IN SOLUTION CHEMICAL AND ENZYMATIC PROBING**

**RNA PREPARATION:** RNAs were transcribed *in vitro* using T7 RNA polymerase as previously described (Helfer et al., 2013). Before use, RNAs were renatured by incubation for 1 min at 90°C in RNase-free water, 1 min at 4°C, followed by an incubation step for 15 min at 20°C in native buffer (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 150 mM KCl). **RNA STRUCTURE PROBING:** RNase cleavage reactions, DMS (dimethyl sulfate) and benzoyl cyanide (Mortimer and Weeks, 2009) modifications were performed on renatured RNA (1 pmole) essentially as described (Helfer et al., 2013). **RNA PRIMER EXTENSION ANALYSIS:** The positions of cleavages, DMS and Benzoyl cyanide modifications along the RNA sequences were assigned by primer extension. For VEGF-C 5'UTR IRES analysis of human RNA, primer extension was performed using primers complementary to the RNA middle part and the 3' end: mid reverse-human IRES oligonucleotide : 5'-CGGGTGTCAGGTAAGCC-3' and 3' located reverse-human IRES oligonucleotide : 5'-GGTGGAAGGACCGGGGTG-3',



respectively. For analysis of mouse VEGF-C 5'UTR IRES (shorter), we used one primer complementary to the 3' end: 3' reverse-murine IRES oligonucleotide: 5'-CATGGTGGATGGACCGGG-3'.

#### **LENTIVECTOR CONSTRUCTION AND TRANSDUCTION**

Bicistronic cassettes containing the cDNAs encoding human and murine VEGF-C 5'UTR, VEGF-A 5'UTR and EMCV 5'UTR cloned between the reporter LucR and Luc2CP genes (called LucF in the text), were introduced into the lentivector pTRIP-DU3-CMV-MCS described previously (Prats et al., 2013). This generated the bicistronic lentivectors pTRIP-mVEGF-C, pTRIP-hVEGF-C, pTRIP-VEGF-A and pTRIP-EMCV, respectively. The four bicistronic lentivectors were produced using the tri-transfection procedure using the plasmids pLvPack and pLVSVg (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), and were evaluated for their ability to transduce the Capan-1, 4T1 and LLC cell lines (not shown). The efficiency of cell transduction *in vitro* was checked in parallel by FACS analysis using the pTRIP-GFP lentivector (Prats et al., 2013). This efficiency was at least 90% for all the cell types. In total, 6x10<sup>5</sup> cells were plated into each well of a 6-well plate and transduced overnight in 1 mL of transduction medium (OptiMEM, Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) containing 6 µg/mL protamine sulfate in the presence of purified lentiviral vector (MOI 0.8). The medium was changed and cells were collected 48 hours after transduction. EGFP-positive cells (for transduction with pTRIP-GFP lentivector only) were quantified by flow cytometry analysis on a FACScalibur (Becton Dickinson SAS, Le Pont de Claix, France). For the other lentivectors, luciferase activities or RNA purification was performed using cell lysates, as previously described (Bomes et al., 2007).

#### **REPORTER GENE ASSAY**

*In vitro* or *ex vivo* luciferase assays were performed on lysed cells or tissues using Luciferase Assay Buffer II (Promega, USA) from the Dual-Luciferase Assay System kit (Promega, USA). Luciferase activity was expressed in relative light unit (RLU) per mg of protein. Lysates from non-lentiviral transduced cells and tumor were used as background

controls.

## **REAGENTS**

Sheep anti-human VEGF-C (AF2179) was from R&D Systems (Lille, France). Rabbit-anti human 4E-BP1 (9644) was from Ozyme (St Quentin en Yvelines, France). Rabbit anti-mouse lyve-1 antibody (RDI-103PA50) was from Research Diagnostics Incorporated (Concord, MA). Rat anti-mouse CD31 (MEC 13.3) was from BD Bioscience (San Diego, CA). Goat anti-PAN cytokeratin, mouse anti-HA, donkey anti-rabbit and rat IgGs conjugated with Dylights Fluors 488, 568 were from TebuBio (TebuBio, Le Perray en Yvelines, France). Anti-podoplanin and anti-VEGF-C were from Santa Cruz (Tebu bio, Le-Perray-en-Yvelines, France) and R&D systems (Minneapolis, MN). Anti-luciferase Firefly was from Promega (Madison, WI), hypoxyprom from Euromedex (Souffelweyersheim, France), anti-4E-BP1 from Cell signaling (Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France), and anti- $\beta$ -tubuline from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

## **IMMUNOHISTOCHEMISTRY**

Tumors, hilar and inguinal lymph nodes were embedded into OCT compound and 5  $\mu$ m tissue sections were immunostained with specific antibodies. Tumor and lymph node and lymphangiogenesis (LYVE-1 staining) was quantified in 5–10 microscopic fields per cryosection by automated pixel density determination of the LYVE-1<sup>+</sup> area and is expressed in  $\mu$ m<sup>2</sup> area per field or in % of the total tissue area analysed. The mean number of mice with metastases in draining lymph nodes was determined by immunostaining cryosections with anti-pancytokeratin (10  $\mu$ g/mL) (TebuBio, Le Perray en Yvelines, France). Immunostaining was quantified in 5–10 microscopic fields per cryosection using automated pixel density determination as the mean number of pixels  $\pm$ SEM for each group.



### **QUANTITATIVE REAL-TIME RT-PCR**

Total cellular RNA was isolated from mouse Capan-1 and LLC tumors using a TissueLyser (Ultrathurax, IKA, Staufen, Germany) in Trizol solution according to the manufacturer's instructions. A total of 1 µg RNA was used to synthesize cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Villebon s/ Yvette, France). The expression of human and murine VEGF-C, VEGF-A, LucR and LucF was investigated by SYBR Green real-time reverse transcribed polymerase chain reaction using the AB 7900 HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Villebon s/ Yvette, France). Each reaction was run with 18S as a reference gene and all data were normalized based on the expression levels of 18S. Primer sequences are provided in Supplementary Table S1.

### **VEGF-C ELISA**

Capan-1 tumor samples were harvested and VEGF-C was quantified using an ELISA assay specific for human VEGF-C (<0.5% cross-reactivity with mouse VEGF-C according to the manufacturer's data sheet), according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN).

### **SMALL INTERFERING RNA (siRNA) AND CELL TRANSFECTION**

A pool of siRNAs against human HIF1α synthesized by Dharmacon (Lafayette, CO) with the following sequences: siRNA-1: 5'-GGACACAGAUUUAGACUUG-3', siRNA-2: 5'-GAUGGAAG CACUAGACAAA-3', siRNA-3: 5'-CGUGUUAUCUGUCGCUUUG-3', siRNA-4: 5'-GAUGAAAGAAUUACCGAAU-3' was used. Non-targeting siRNA (siGENOME Non-Targeting Smartpool; Dharmacon) was used as control. To examine the effect of the siRNAs on HIF1α protein expression, Capan-1 cells were plated onto 6-well plates in antibiotic-free RPMI-1640 medium supplemented with fetal bovine serum (10%) before being transfected with 20 nM siRNA diluted in SiPORT NeoFX Transfection Agent (Life Technologies) and OptiMEM medium (Life Technologies) following the manufacturer's instructions. Vehicle control and non-targeting siRNA were applied to replicate cell

cultures. Cells were incubated for 1 day before changing the culture medium and incubating the cells with 300  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2$  for 4 and 24 hours. Efficacy of downregulation was analyzed by immunoblotting.

#### SUPPLEMENTAL REFERENCES

Bornes, S., Prado-Lourenco, L., Bastide, A., Zanibellato, C., Iacovoni, J.S., Lacazette, E., Prats, A.C., Touriol, C., and Prats, H. (2007). Translational induction of VEGF internal ribosome entry site elements during the early response to ischemic stress. *Circ Res* 100, 305-308.

Helper, A.C., Romilly, C., Chevalier, C., Lioliou, E., Marzi, S., and Romby, P. (2013). Probing RNA structure in vitro with enzymes and chemicals. , Vol 2 volume set, 2nd edition edn (Wiley-VCH Verlag GmbH & C<sup>o</sup>).

Prats, A.C., Van den Berghe, L., Rayssac, A., Ainaoui, N., Morfoisse, F., Pujol, F., Legonidec, S., Bikfalvi, A., Prats, H., Pyronnet, S., *et al.* (2013). CXCL4L1-fibstatin cooperation inhibits tumor angiogenesis, lymphangiogenesis and metastasis. *Microvasc Res* 89, 25-33.

### **C. Discussion**

Ces travaux ont permis de montrer que les ARNm des VEGF-C humains et murins possédaient un IRES dans leurs régions 5'NT activé par l'hypoxie. De façon intéressante, les ARNm humains et murins possèdent deux motifs dont la structure est hautement conservée permettant d'émettre l'hypothèse d'éléments trans-activateurs communs à l'Homme et la souris pour l'IRES du VEGF-C. Contrairement à de nombreux IRES dont l'activation n'a été étudié qu'*in vitro*, nous avons également pu mettre en évidence un stress cellulaire capable d'activer l'IRES du VEGF-C à la fois *in vitro* et *in vivo*. Cette étude ouvre donc un nouveau champ d'investigation pour la recherche de molécules inhibitrices des ITAFs en tant que nouvelles cibles thérapeutiques de la lymphangiogenèse tumorale.

La découverte de ces éléments IRES nous a permis d'identifier un mécanisme de traduction complexe du VEGF-C au cours du processus tumoral : la tumeur étant capable à la fois de traduire le VEGF-C de façon coiffe-dépendante en réduisant l'activité IRES en normoxie et de s'adapter au blocage de la traduction coiffe-dépendante induite par l'hypoxie (déphosphorylation activatrice de 4E-BP1 et phosphorylation de eIF2 $\alpha$ ) en activant la traduction IRES-dépendante du VEGF-C. Ce mécanisme de régulation traductionnel induit par l'hypoxie est d'autant plus original qu'il est indépendant de HIF-1 $\alpha$ . L'identification de l'ITAF de l'IRES du VEGF-C reste donc indispensable afin de comprendre comment son activité peut être régulée par l'hypoxie tout en étant indépendante du principal facteur de réponse à l'hypoxie.

De plus, nous avons constaté que l'activité de l'IRES du VEGF-C était supérieure dans les cellules métastatiques ayant disséminé dans les ganglions lymphatiques que dans les cellules de la tumeur primaire probablement car les vaisseaux et les ganglions lymphatiques possèdent un environnement très hypoxique. Ce mécanisme transcription-indépendant mais traduction-dépendant d'activation de l'expression du VEGF-C en hypoxie permet donc non seulement de fournir une voie d'échappement aux cellules tumorales en stimulant la lymphangiogenèse dans les zones hypoxiques mais leur permet de survivre à un transport dans un système lymphatique hypoxique et d'établir des niches métastatiques dans les ganglions lymphatiques permettant d'augmenter leur agressivité avant d'aller disséminer dans les organes distants.

## **II. La dilatation des lymphatiques et la dissémination métastatique sont induites par une reprogrammation de la traduction du VEGF-D suite à un choc thermique.**

### **A. Introduction**

La majorité des tumeurs solides agit, au cours de son développement, sur le réseau lymphatique afin de promouvoir la dissémination métastatique selon deux mécanismes principaux : la synthèse de nouveaux vaisseaux qui vont aller drainer la tumeur et la dilatation des vaisseaux préexistants afin de faciliter l'intravasation des cellules. Une série d'étude récente a montré que le VEGF-D était particulièrement important pour faciliter l'entrée des cellules tumorales dans les lymphatiques : contrairement au VEGF-C qui induit majoritairement la prolifération et le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux au cours du développement de la tumeur, le VEGF-D, lui, va provoquer une vasodilatation des vaisseaux collecteurs drainant la tumeur et augmenter leur perméabilité facilitant ainsi le transport des cellules tumorales par les lymphatiques [254]. Cet effet vasodilatateur est en partie indirect, le VEGF-D inhibant les prostaglandines déshydrogénases endothéliales augmentant ainsi la réponse des CELs à la prostaglandine E2 qui induit la vasodilatation [255, 256]. Outre la voie inflammatoire, un lien a été établi entre l'expression du VEGF-D et l'hypoxie [257]. De façon analogue au VEGF-C il est essentiel de vérifier la présence d'IRES sur l'ARNm du VEGF-D ainsi que les stress responsables de leur activation. Dans cette étude, nous avons également voulu identifier les ITAFs responsables de l'activation de l'IRES du VEGF-D et, d'un point de vue thérapeutique, le moyen de les inhiber afin de réduire l'expression de ce facteur lymphangiogénique et donc de supprimer les possibilités de dissémination de la tumeur.

## B. Résultats

### LYMPHATIC DILATATION AND METASTASIS IS INDUCED BY HEAT SHOCK REPROGRAMMING OF VEGF-D mRNA TRANSLATION

Morfoisse F<sup>1</sup>, Tatin f.<sup>1</sup>, Adoue A.<sup>1</sup>, Helfer AC.<sup>2</sup>, Cassant-Sourdy S.<sup>3</sup>, Pujol F.<sup>4</sup>, Gomez-Brouchet A.<sup>5,6</sup>, Ligat L.<sup>7</sup>, Lopez F.<sup>7</sup>, Pyronnet S.<sup>3</sup>, Courty J.<sup>8</sup>, Guillermet-Guibert J.<sup>3</sup>, Marzi S.<sup>2</sup>, Schneider R.J.<sup>9</sup>, Prats A.C.<sup>4</sup>, Garmy-Susini B<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>UMR 1048-I2MC, Inserm, UPS, F-31432 Toulouse, France.

<sup>2</sup>IBMC-CNRS, Université de Strasbourg, F-67084 Strasbourg, France.

<sup>3</sup>UMR 1037-CRCT, Inserm, UPS, Toulouse, France

<sup>4</sup>TRADGENE, UPS (EA4554), CHU, F-31432 Toulouse, France.

<sup>5</sup>UMR 5089-IPBS, CNRS, UPS, Toulouse, France;

<sup>6</sup>Department of pathology. IUCT-Oncopole, Toulouse France;

<sup>7</sup>, Pôle Technologique du CRCT –INSERM-UMR1037, Toulouse, France;

<sup>8</sup>Laboratoire CRRET Laboratory, Université Paris EST Créteil, France ;

<sup>9</sup>NYU school of medecine, NYC, USA.

\* Corresponding author



VEGF-D promotes tumour metastases by inducing lymphangiogenesis and lymphatic vasculature dilatation. In this study, we found that VEGF-D overexpression correlates in human breast cancer with the upregulation of eIF4GI and 4E-BP1, which reprograms the translation initiation complex to increase translation of Internal Ribosome Entry Site (IRES)-containing mRNA. We identified a stress-induced translational regulation of VEGF-D expression mediated by an IRES-dependent mechanism under heat shock conditions. The shape analysis of the 5'UTR of VEGF-D has shown the presence of highly stable structures compatible with an IRES driven mechanism of translation. Using plasmon surface resonance on biotinylated VEGF-D mRNA coupled to mass spectrometry, we identified an IRES trans-acting factor (ITAF), the nucleolin, that allows VEGF-D translation initiation after cytoplasmic relocalization. We showed that VEGF-D IRES activity is dependent on prostaglandin pathway as non-steroidal anti-inflammatory drugs are able to abolish the VEGF-D IRES-dependent translation by targeting nucleolin synthesis. Our results bring new insights on the VEGF-D molecular regulations and provide therapeutic targets to limit tumour spread.

Lymphatic vessels grow around tumours but also in lymph nodes, and enhance metastasis by two major mechanisms: 1/ the capillary high permeability and 2/the collecting vessels dilatation<sup>1</sup>. These findings demonstrate the need to increase knowledge regarding the molecular events behind the invasion of cancer in the lymphatic system.

Translational control plays a crucial role in the regulation of gene expression during tumour development. Indeed, the majority of cellular stresses lead to a strong inhibition of mRNA translation in cells by the classical cap-dependent scanning mechanism<sup>2, 3</sup>. Translational repression mainly occurs through modulating the activity of mTOR resulting in hypophosphorylation of eIF4E-binding proteins (4E-BP), which increase their affinity for and thus sequestering of eIF4E<sup>4</sup> preventing its binding to eIF4G necessary to load the capped mRNA on the ribosome.

Several mRNAs, however, are translated by an eIF4E-independent mechanism, mediated by IRESs that are mRNA structures located in their 5' untranslated regions<sup>5,6</sup>. IRESs were described for VEGF-A and VEGF-C mRNA. Here, we found that VEGF-D mRNA is also translated *via* an IRES mechanism. The IRES-dependent translation initiation is controlled by IRES transacting factors (ITAFs), that participate in the recruitment of the small ribosome subunit<sup>7</sup>. ITAFs are most likely to stabilize IRES active conformation<sup>8</sup> and to allow efficient expression of key regulators in tumour growth and spread<sup>6</sup>.

In previous study, we identified equilibrium between two structures of VEGF-C IRES suggesting conformation adaptation depending of the cellular stress such as hypoxia<sup>2</sup>. VEGF-D is involved in lymphatic vessel plasticity. The balance between vasodilatation and vasoconstriction promotes many metabolic changes and is tightly correlated with the body temperature suggesting a role of temperature in regulating

growth factor-induced vasodilatation. In this study, we identified a direct correlation between VEGF-D translation initiation and lymphatic vessel dilatation restricted an increased temperature stress, but not other tumour-induced stresses such as hypoxia or reticulum stress.

VEGF-D was found to promote tumour lymphatic vessels dilatation through an inhibition of the prostaglandin dehydrogenase<sup>1</sup>. Such effect is abolished by non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), the most commonly prescribed class of drugs in the world. Inflammation is known to be a causal factor in tumourigenesis. Furthermore pathological inflammation and NSAID have been reported to have beneficial effects on reducing the risk of developing solid tumours, including the four most prevalent cancers worldwide: breast, colon, lung and prostate cancer<sup>9</sup>. In particular, inflammatory breast cancer is the most aggressive and metastatic form of breast cancer<sup>10</sup>. It is characterized by overexpression of the translation initiation factor eIF4GI (the major eIF4G factor) that reprograms cap-dependent translation to IRES-dependent translation<sup>11</sup>. Also, regular use of any NSAID has been associated with significantly reduced breast cancer risk<sup>12</sup>. NSAID directly influences vasodilator prostaglandin by modulating cyclooxygenase-2 (cox-2) activity. In this study, we demonstrated that cox-2 inhibitor effect on lymphatic dilatation was associated with a control of VEGF-D translation initiation by modulating VEGF-D IRES Tans Acting Factors (ITAF), the nucleolin.

This study reveals new translational regulation of VEGF-D under stress condition that directly interferes with lymphatic vessel dilatation. As lymphatic vessels play a crucial role in tumour metastasis, understanding the regulations of lymphatic vasodilatation is a crucial step toward an innovative anti-metastatic therapy.



**VEGF-D synthesis is modulated by a cap-independent initiation of mRNA translation.**

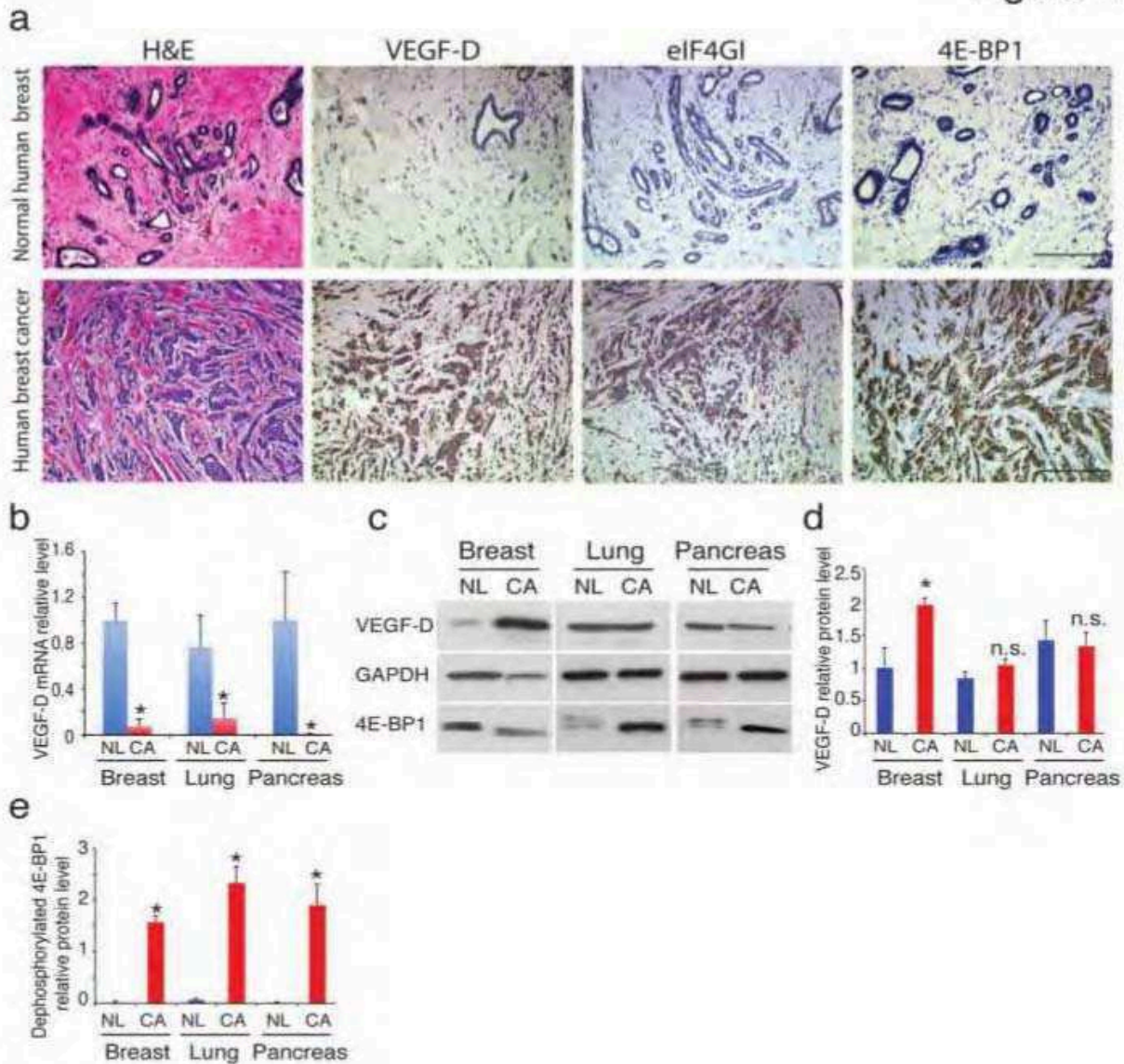
VEGF-D level was examined in invasive ductal breast carcinoma biopsies and compared to normal breast epithelium (Fig. 1a). VEGF-D is overexpressed in breast tumours and is associated with an upregulation of eIF4GI and 4E-BP1 expressions suggesting a cap-independent VEGF-D synthesis.

To study the expression of VEGF-D, we performed RT-qPCR and western blot analysis showing that VEGF-D is ubiquitously expressed in organs containing lymphatic vessels (lymph nodes, mammary gland, adipose tissue, spleen, thymus, liver, heart, lung), whereas no VEGF-D was found in organs containing no (brain) or low level (muscle) of lymphatic vessels (Fig. S1).

To study the effect of the microenvironment on lymphatic vessel development *in vivo*, we used mouse tumoural models, which we previously showed to early induce lymphangiogenesis: an orthotopic syngeneic mouse model of highly metastatic breast cancer (4T1); a syngeneic subcutaneous model of Lewis Lung Carcinoma (LLC) and a xenograft of pancreatic adenocarcinoma (Capan-1) (Fig. 1b). We studied the expression of VEGF-D and surprisingly found that VEGF-D mRNA levels strongly decreased in tumours compared to normal tissues (Fig.1b). Despite the decrease in VEGF-D mRNA amounts, VEGF-D protein level increased during breast tumour development, but not in lung and pancreas (Fig.1c,d) confirming a post-transcriptional regulation of VEGF-D expression.

In parallel, we analyzed regulation of translation initiation in mice tumours by studying the phosphorylation status of 4EBP1, which is known to inhibit cap-dependent translation by binding to eIF-4E in its hypophosphorylated state (Fig. 1c-e).

Figure 1



**Figure 1. VEGF-D overexpression correlates with the upregulation of eIF4G1 and 4E-BP1**

(a) Immunohistochemical staining of representative breast cancer tumours (n=15) and normal breast epithelium (n=15) for VEGF-D, eIF4G1, and 4E-BP1. Scale Bar 100µm. (b) Quantitative RT-PCR for breast, lung and pancreatic tumours (CA) shows a decrease of VEGF-D mRNA during tumour development compared to normal tissue (NL) (\*p<0.001). (c-e) Immunoblot analysis of VEGF-D and 4E-BP1 in mouse tumours showed an increase in VEGF-D synthesis associated with overexpression and dephosphorylation of 4E-BP1 *in vivo* in breast, but not in lung and pancreatic cancer.



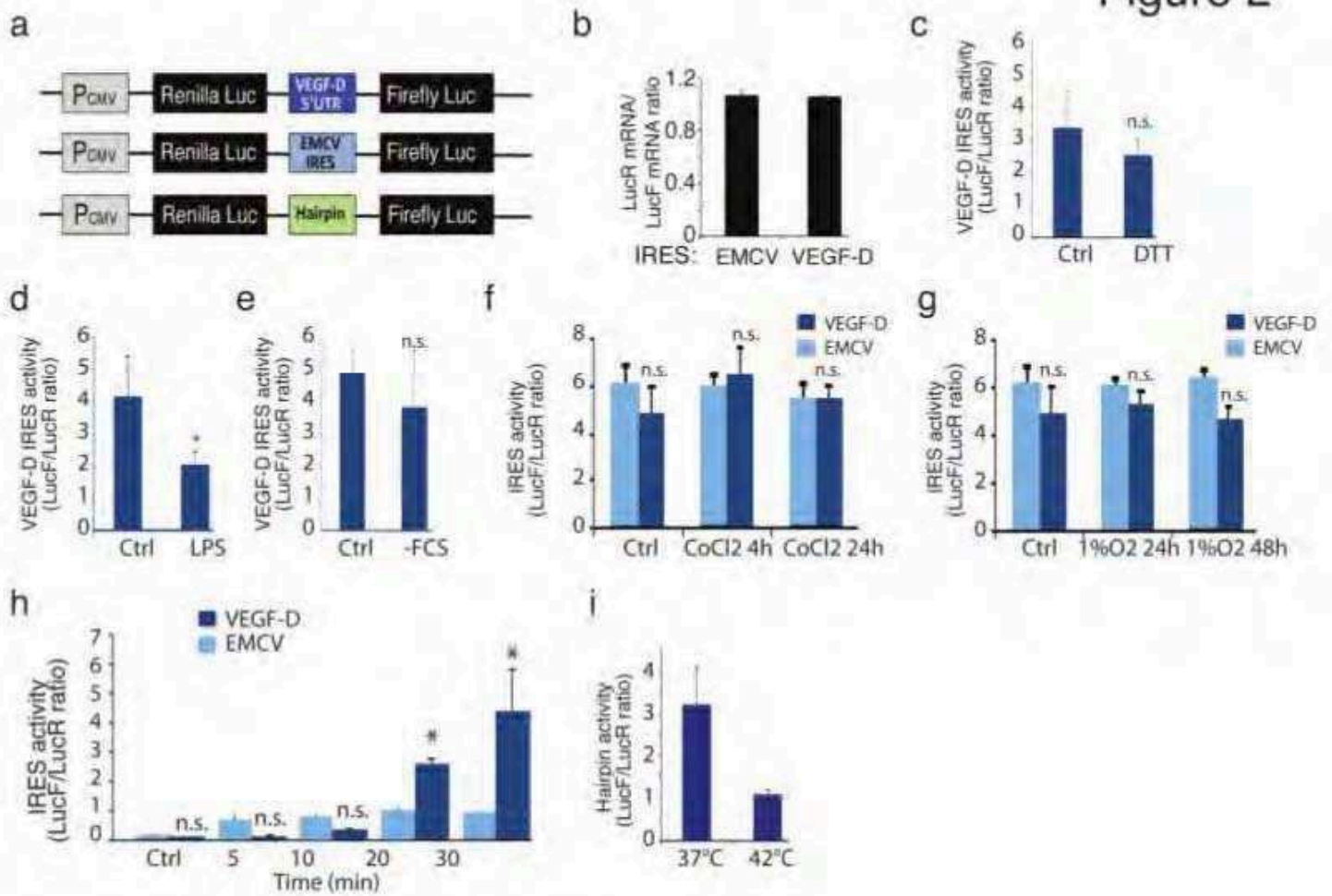
As expected, VEGF-D protein synthesis was not stimulated in lung and pancreatic tumours containing hypophosphorylated 4E-BP1 compared to normal tissue (Fig. 1c-e). In contrast, despite an accumulation of hypophosphorylated 4E-BP1 indicating a blockade of cap-dependent translation in breast cancer compared to normal breast, we observed an increase in VEGF-D expression in the tumours *in vivo* (Fig. 1c-e). These data suggest that VEGF-D expression is promoted by a post-transcriptional mechanism in breast cancer.

#### **VEGF-D 5'UTR contains an IRES activated by increased temperature**

To demonstrate the presence of an IRES activity in VEGF-D 5'UTR, we used the double luciferase bicistronic vector strategy validated in previous studies<sup>2</sup> (Fig. 2a). Considering that the EMCV IRES is not activated in the present tumour models<sup>2</sup>, we used bicistronic lentivectors with the encephalomyocarditis virus (EMCV) IRES and hairpin as a controls. 4T1 and 67NR cells were transduced with the bicistronic lentivectors (Fig. 2a). To verify the presence of a single mRNA that generates the two different proteins, the relative amounts of LucR and LucF mRNAs were measured by quantitative RT-PCR (Fig. 2b). Amplification values revealed an equal amount of LucF and LucR RNA sequences, indicating the absence of any cryptic promoter or splicing event that would have increased the presence of one of the cistrons compared to the other<sup>13</sup>.

IRES elements have been discovered in several viral and cellular RNA elements and are preferentially used to initiate translation of specific mRNAs during cellular stress when overall global translation is compromised<sup>14,15,16</sup>. Recent observations in tumour models show a VEGF-D driven lymphogenous spread by increasing lymph flow through vessel dilation<sup>17</sup>. Vessel dilatation is mainly observed during inflammation

Figure 2



**Figure 2. VEGF-D mRNA contains an IRES element**

(a) Schematics of the bicistronic expression cassettes subcloned into lentivectors. Bicistronic vectors code two luciferase reporters (LucR and LucF) the sequences of which are separated by the VEGF-D IRES, the viral EMCV IRES and hairpin. (b) Ratio of quantitative RT-PCR relative values for LucR versus LucF, separated by VEGF-D 5'UTR, revealing the transcription of a single mRNA. (c-g) *In vitro* VEGF-D IRES activity in 4T1 cell lines submitted to DTT-induced endoplasmic Reticulum stress (c), Lipopolysaccharide (LPS) inflammatory stress (d), nutrient deprivation (- FCS) stress (e), and hypoxic stresses (f,g). (h) *In vitro* VEGF-D and EMCV IRES activity in 4T1 cell lines submitted to heat shock stress (h). (i) *In vitro* Hairpin activity in 4T1 cell lines submitted to heat shock stress

and is promoted by an activation of the endothelial prostaglandin pathways<sup>18</sup>. Therefore, we submitted 4T1 transduced cell lines to physiological stresses associated with a local vasodilatation to identify which stimulus is associated with IRES activation (Fig. 2c-i). VEGF-D IRES activity was not affected by endoplasmic reticulum stress (Fig. 2c), lipopolysaccharides (Fig. 2d), serum deprivation (Fig. 2e) or hypoxia (Fig. 2f,g). In contrast, VEGF-D IRES activity was significantly activated *in vitro* after 20 minutes heat shock (Fig. 2h), whereas no activation was found for EMCV control IRES (Fig. 2h) or hairpin (Fig. 2i).

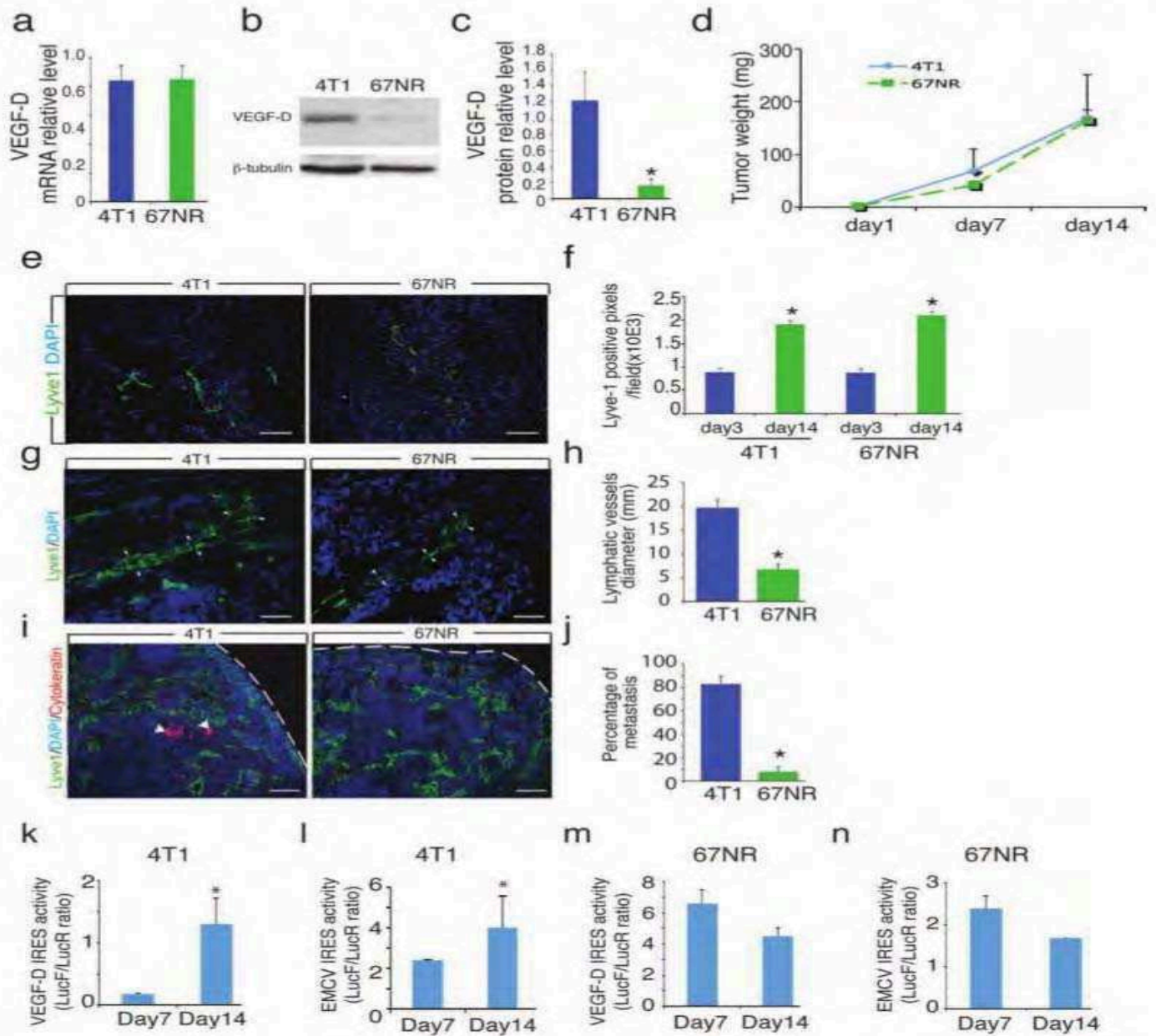
#### **VEGF-D synthesis promotes lymphatic vessel dilatation and metastasis**

The role of overexpressed VEGF-D was examined in mice breast tumour models. We compared lymphatic-mediated metastasis in 4T1 tumours to orthotopic syngeneic 67NR low metastatic breast tumours. Despite similar level of VEGF-D mRNA in 4T1 and 67NR cell lines (Fig. 3a) we found that 67NR poorly expressed VEGF-D compared to 4T1 (Fig. 3b,c). Surprisingly, this difference in VEGF-D expression had no effect on tumour growth (Fig. 3d). To investigate the role of VEGF-D in breast tumours lymphatic vessels, we performed immunostaining using antibodies directed against lymphatic vessel endothelial receptor (lyve-1)<sup>19</sup> and podoplanin<sup>20</sup> (Fig. 3e, Fig. S2).

In these models, VEGF-D expression has no effect on tumour lymphangiogenesis (Fig. 3e,f). In parallel, we found that tumour expressing a high level of VEGF-D (4T1) exhibited dilated tumour lymphatic vessels compared to tumour with low level of VEGF-D (67NR)(Fig. 3g,h). As expected, the lymphatic vessels dilatation is associated with an increase of tumour metastasis (Fig. 1i,j), but has no effect on draining lymph nodes lymphangiogenesis (Fig. S3).



Figure 3



**Figure 3: Tumor post-transcriptional induction of VEGF-D promotes lymphatic vessel dilatation**

(a) Quantitative RT-PCR in 4T1 and 67NR mice breast cancer cell lines showed no difference in VEGF-D mRNA relative levels. (b,c) Immunoblot analysis of VEGF-D showed an overexpression of VEGF-D in metastatic (4T1), compared to no metastatic (67NR) breast cancer cell lines. (c) Quantification of VEGF-D relative levels (\* $p < 0.001$ ). (d) 4T1 and 67NR tumour growth analysis. (e,f) Staining for lyve-1 (green) and dapi (blue) demonstrated VEGF-D independent lymphangiogenesis during breast carcinoma development (\* $p < 0.001$ ). (g,h) Staining for lyve-1 (green) and dapi (blue) demonstrated a significant decreased of lymphatic vessels dilatation in tumour lacking VEGF-D (\* $p < 0.001$ ). (i,j) Staining for lyve-1 (green), cytokeratin (red) and dapi (blue) demonstrated a significant decrease in lymph node metastasis (\* $p < 0.001$ ). (k-n) *In vivo* VEGF-D IRES activity exhibits significant increased in 4T1 (k) compared to EMCV (l), whereas no activity was promoted in 67NR for both IRESs (m,n).

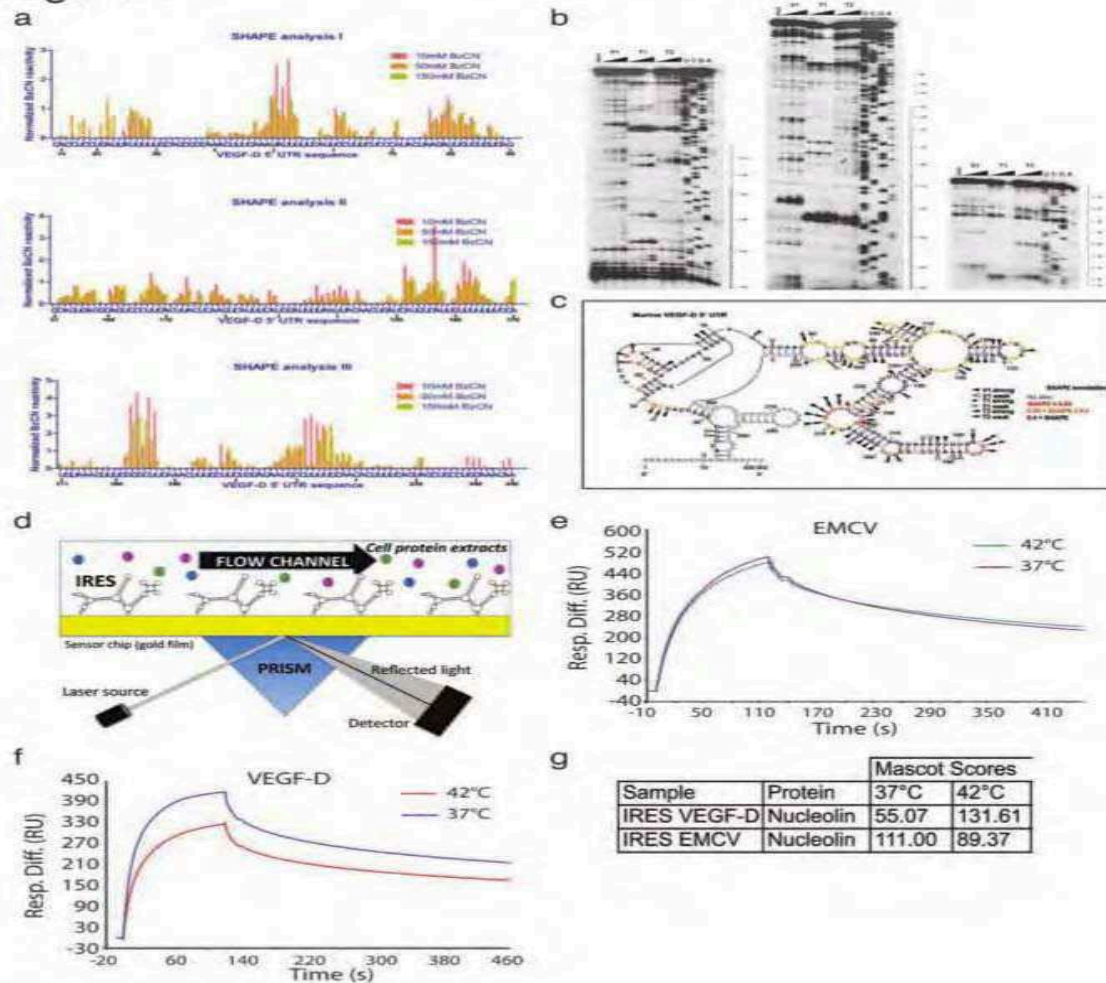
To identify *in vivo* VEGF-D IRES activity, bicistronic lentivector-transduced 4T1 and 67NR cell lines were injected in mice mammary fat pad (Fig.3k-n). IRES activity in tumours was observed using immunodetection of firefly luciferase and quantified by measuring luciferase activities after 7 and 14 days (Fig.3k-n, Fig. S4). We checked that the transduction of the reporter genes did not affect tumour growth (Fig. S4). Interestingly, VEGF-D IRES activity strongly increased in 4T1 tumours (Fig. 3k) compared to EMCV IRES (Fig. 3l), but not in 67NR tumours (Fig. 3m), which exhibit low VEGF-D protein levels. As expected, the EMCV viral IRES which is not involved in angiogenesis or lymphangiogenesis stimulation was poorly (4T1) or not (67NR) activated during tumourigenesis (Fig2. l,n).

These data demonstrate that the VEGF-D mRNA contains an IRES that is activated during tumour growth in correlation with high levels of VEGF-D protein expression. Altogether, our data suggest a cap-independent regulation of VEGF-D translation that is not related with lymphangiogenesis, but directly correlated with lymphatic vessels dilatation and metastasis formation.

### **VEGF-D IRES exhibits two alternative structures stabilized by an ITAF: the nucleolin**

In order to analyze whether the VEGF-D mRNA contains a structured 5'UTR that could be used for the IRES activity, we performed shape analysis of the mRNA 5'UTR (Fig.4a-c, Fig.S5). The pattern of benzoyl-cyanide modifications suggest that VEGF-D 5' UTR is highly structured. Our structure prediction revealed the presence of a pseudoknot (nucleotides 30-70) and several stable helices. Nevertheless, enzymatic probing data (Fig.4a, Fig.S5) showed a region (nucleotides 225-229) with double reactivity toward both double strand (V1) and single strand probes (T2), and a

**Figure 4**



**Figure 4. VEGF-D 5'UTR exhibits the presence of highly stable structures compatible with an IRES driven mechanism of translation**

(a) Quantification and normalization of the SHAPE analysis obtained by the QuSHAPE software. Three different concentrations of benzoyl-cyanide (10mM, 50mM and 150mM) have been used showing the overall high reproducibility of the analysis. The 302 nucleotides long sequence of VEGF-D 5'UTR (including 21 nucleotides of the beginning of its coding region) has been split into 3 graphs representing the 5' (graph I on the top), middle (graph II in the middle) and 3' (graph III on the bottom) regions. (b) Autoradiograms of RNA enzymatic probing experiments followed by primer extension analyzed on 8% polyacrylamide sequence gels containing 8 M urea, showing the localization of the enzymatic cleavages obtained with RNase V1 (V1), RNase T1 (T1), and RNase T2 (T2). T1 and T2 RNase treatments detect unpaired nucleotides, whereas V1 RNase treatment detects paired or stacked nucleotides. The lanes represent the following conditions: (i) RNA: control RNA without enzymes; (ii) V1, T1 and T2: three different increasing concentrations of the three RNases; (iii) RNA sequencing ladders were run in parallel (U,C,G,A lanes on each gel). Panel A, B and C show the enzymatic analysis for the murine 5'UTR of the 3', middle or 5' regions respectively. (c) Putative secondary structure of the murine 5' UTR of VEGF-D mRNA, as predicted on the basis of the ribose reactivities toward benzoyl-cyanide (SHAPE analysis). For each nucleotide, the level of normalized reactivity is indicated in red, yellow, or black font character for strong, medium, or weak reactivity, respectively. Regions which could not be probed are represented by grey characters. The cleavage sites induced by ribonucleases V1, T1, or T2 are indicated by arrows. (d-g) BIACORE T200 analysis using surface plasmon resonance. (d) The ligand corresponding to biotinylated VEGF-D or EMCV IRES is immobilized by streptavidin coupled to the sensorchip gold surface submitted to a light source through a prism and reflected in all angles except one at which it is absorbed into the gold surface in the form of an evanescent wave. The binding of the analyte corresponding to RNA binding proteins to the ligand results in a change in the index of refraction proportional to the number of bound molecules. This generates a shift in the absorption angle that is recorded by the detector and appears on a sensogram for EMCV IRES (e) and VEGF-D IRES (f). (g) Mass spectrometry analysis of proteins recovered from the BIACORE T200 experiments reveals the binding of a nuclear protein: Nucleolin.

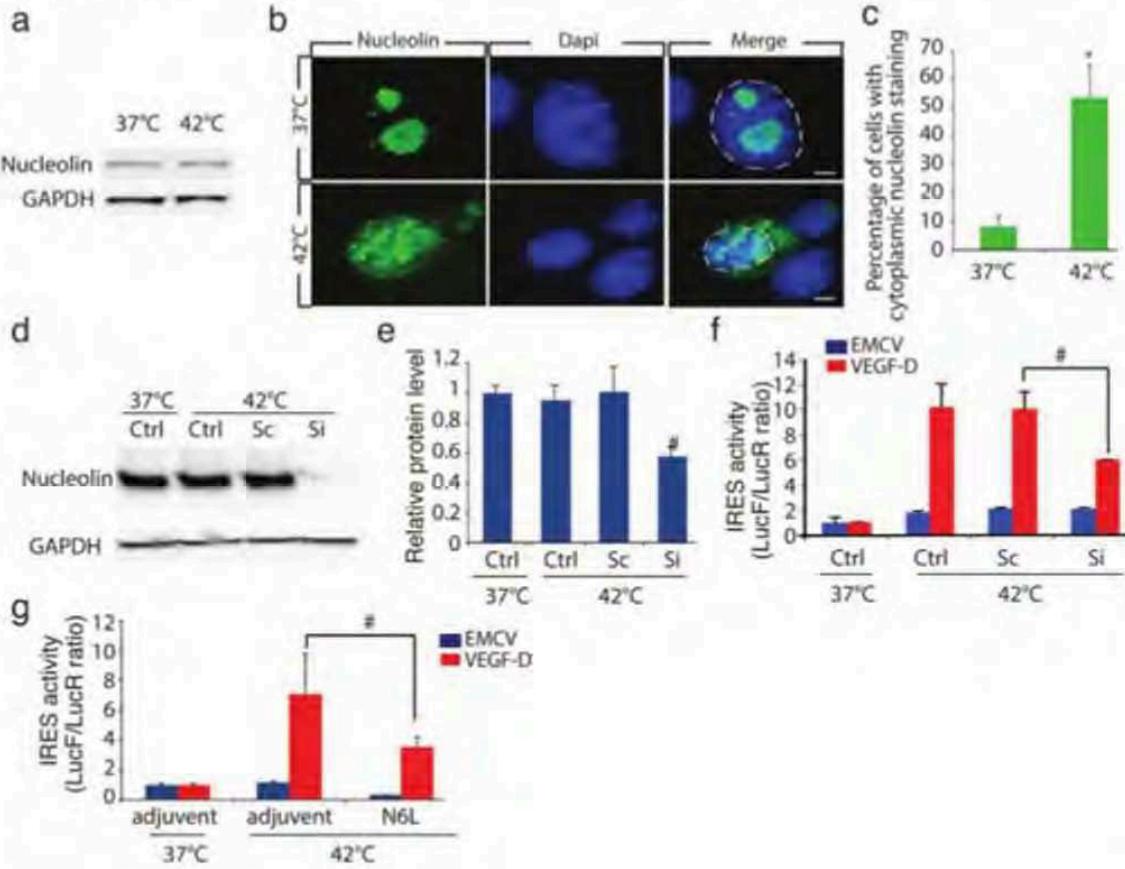


native gel analysis confirmed the presence of two alternative structures (Fig. 4b). Based on shape analysis, we identified a predictive folding of VEGF-D IRES as shown in Figure 4c.

The presence of alternative conformations at equilibrium has been previously observed also for the VEGF-C IRES<sup>2</sup> and could be an indication that the active structure might necessitate a cofactor<sup>8</sup>, i.e. an ITAF or a specific eIF, to fold correctly. IRESs activation requires binding of canonical initiation factors to initiate translation, but also other proteins called IRES trans-acting factors (ITAFs) that facilitate ribosome recruitment to the IRES<sup>21</sup>. ITAFs are RNA-binding proteins involved in other aspects of RNA metabolism that are important in carcinogenesis such as mRNA splicing, export and stability, and represent potential targeted therapy in certain types of cancer.

To identify VEGF-D ITAFs, we used an analytic method coupling surface plasmon resonance and mass spectrometry (BIA-MS)(Fig. 4d-g). Biotinylated VEGF-D and EMCV IRES RNAs were immobilized on a BIACORE streptavidin sensorchip (Fig. 4d). Control (37°C) or heat shock (42°C) total cell protein extracts were injected into the BIACORE T200 apparatus to obtain the association phase (Fig. 4e,f). Bound proteins were recovered and identified by nanoLC-MS/MS after tryptic digestion. Interestingly, proteins bound VEGF-D IRES with a lower affinity at 42°C compared to 37°C, whereas no difference was observed for EMCV IRES (Fig. 4e,f). Mass spectrometry analysis allowed identification of a few proteins bound to the VEGF-D IRES, including an RNA Binding protein, the nucleolin (Fig. 4g, Fig.S6). As nucleolin has previously been described to be an ITAF for viral IRESs<sup>22 23</sup>, and plays a role in RNA stability of cellular oncogenes such as Bcl2<sup>24</sup>, we investigated its effect on VEGF-D IRES activity.

## Figure 5



### Figure 5: VEGF-D IRES activity is regulated by Nucleolin

(a) Immunoblot of nucleolin in mouse cell lines showed no induction of protein synthesis in heated breast cancer cell lines. (b) Staining for nucleolin (green) and dapi (blue) demonstrated a significant export of nucleolin in the cytoplasm in heated breast cancer cell lines. (c) Quantification of the percentage of 4T1 cell lines, which exhibit a cytoplasm staining of nucleolin under increased temperature (\* $p < 0.001$ ). (d) Immunoblot of nucleolin in lysates of 4T1 cells incubated in physiological (37°C) or heated (42°C) temperature and treated with or without siRNA against nucleolin (Si) or a scrambled (Sc) siRNA control. (e) Densitometric quantification of the immunoblot (# $p < 0.05$ ). (f) VEGF-D IRES activity in 4T1 cells incubated in physiological (37°C) or heated (42°C) temperature and treated with or without siRNA against nucleolin (Si) or a scrambled (Sc) siRNA control (# $p < 0.05$ ). (g) VEGF-D IRES activity in 4T1 cells incubated in physiological (37°C) or heated (42°C) temperature and treated with adjuvant (mannitol) or nucleolin inhibitor (N6L) (# $p < 0.05$ ).

### **Nucleolin ITAF activity is mediated by its subcellular location**

To study whether nucleolin participates to VEGF-D translational initiation during heat shock stress, we first analysed protein expression in breast cancer cell lines (Fig. 5). Surprisingly, no difference in nucleolin protein synthesis was observed in cells submitted to an increased temperature (42°C)(Fig. 5a). Interestingly, we found a delocalization of nucleolin from the nucleus to the cell cytoplasm under heat shock (Fig. 5b,c). The protein export is in accordance with previous studies showing that ITAF activity depends on its subcellular location<sup>25</sup>.

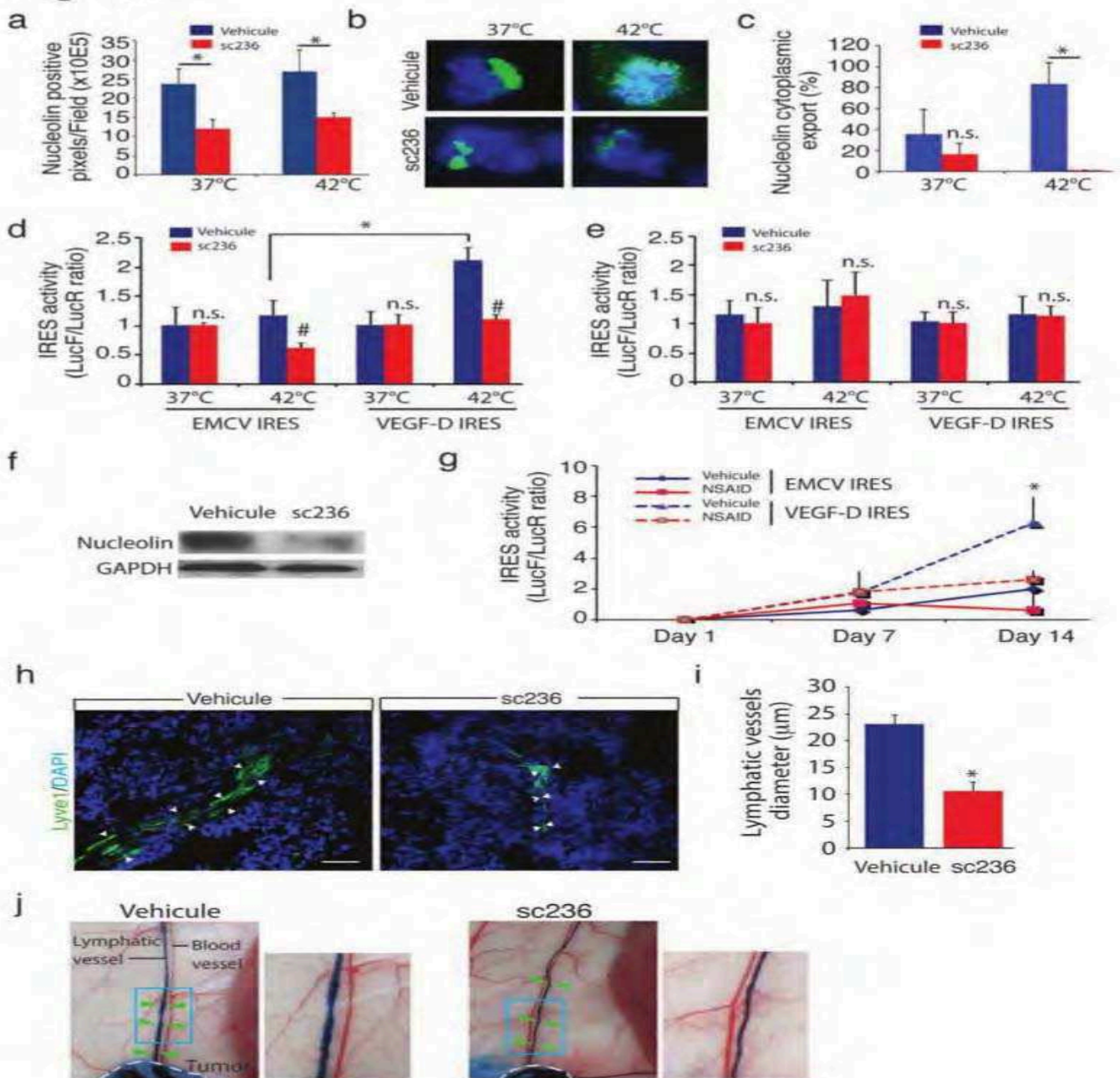
To determine the role of nucleolin in VEGF-D IRES activity under heat shock stress, we designed siRNAs against nucleolin (Fig. 5d,e). In the absence of nucleolin, VEGF-D IRES activity was strongly decreased, whereas no effect was observed for EMCV IRES activity (Fig. 5f). In this context, VEGF-D IRES was affected by nucleolin knock down, demonstrating a role of nucleolin as an ITAF under heat stress condition. To confirm the effect of nucleolin, we then used a pharmacological inhibitor, a synthetic ligand of nucleolin: N6L<sup>26</sup>. As expected, we observed a decrease of VEGF-D IRES activity in the presence of nucleolin inhibitor (Fig. 5g).

### **Cox-2 inhibitors abolish VEGF-D stress response by modulating nucleolin expression**

Recent studies have demonstrated that VEGF-D regulates the tumour-draining collecting lymphatic vessels dilatation through a prostaglandin (PG)-dependent mechanism, consistent with the elevated levels of inflammatory mediators, such as PGs<sup>17, 27</sup>. VEGF-D modulates cox-2-derived PGE2 to promote tumour progression and metastasis<sup>28, 29</sup> leading to a chemoprotective effects of cox-2 inhibitors (NSAIDs) by reducing PGE2 levels<sup>30</sup>. To determine the role of cox-2 inhibitors on molecular



**Figure 6**



**Figure6 : VEGF-D IRES activity is modulated by cox2 inhibitor**

(a) Quantification of nucleolin positive pixels in 4T1 cells submitted to heat shock (\* $p < 0.01$ ). (b) Staining for nucleolin (green) and dapi (blue) demonstrated a significant export inhibition of nucleolin in the cytoplasm in heated breast cancer cell lines incubated with cox2 inhibitor (sc236). (c) Quantification of the percentage of 4T1 cell lines incubated with sc236, which exhibit a cytoplasm staining of nucleolin under increased temperature (\* $p < 0.001$ ). (d) Stimulation of VEGF-D and EMCV IRES activity in 4T1 cell lines (# $p < 0.05$ ). (e) Stimulation of VEGF-D and EMCV IRES activity in 67NR cell lines (# $p < 0.05$ ). (f) Immunoblot of nucleolin in mouse cell lines showed no induction of protein synthesis in sc236-treated breast cancer-bearing mice. (g) Stimulation of VEGF-D IRES *in vivo* is inhibited by sc236 (h). Staining for LYVE-1 (green) and dapi (blue) demonstrated a significant decreased of lymphatic vessels dilatation in sc236-treated 4T1 tumours. (i) Quantification of lymphatic vessels diameters *in vivo* in sc236-treated 4T1 tumours (\* $p < 0.01$ ). (j) Evans blue perfusion of the 4T1 draining lymphatics exhibits a vessels dilatation that is abolished after sc236 treatment.

regulations of VEGF-D expression, we evaluated the effect of the sc236 *in vitro* (Fig. 6a-e). As shown in figure 5, the increased temperature has no effect on nucleolin synthesis (Fig. 6a). Surprisingly, we observed a cox2 inhibitor-downregulation of nucleolin synthesis at both 37°C and 42°C (Fig. 6a) suggesting that the drug interferes with VEGF-D translational initiation by modulating its ITAF synthesis. Using immunocytochemistry, we found that cytoplasmic nucleolin was hardly detected upon sc236 in 4T1 cell lines under heat shock conditions (Fig. 6b,c). In parallel, cox-2 inhibitors abolished heat shock-induced VEGF-D IRES activity in 4T1 cells (Fig. 6d), but had no effect on 67NR cell lines (Fig. 6e). To investigate whether cox-2 inhibitor could modulate VEGF-D translational regulations *in vivo*, tumour-bearing mice were treated every 2 days during 10 days by intraperitoneal injection of cox-2 inhibitors (Fig. 6f-j).

As expected, we found a downregulation of nucleolin expression in tumours (Fig. 6f). This effect is associated with a downregulation of VEGF-D IRES activity *in vivo* during tumour development (Fig. 6g), whereas no difference was observed in tumour growth (Fig.S7). In parallel, we observed a strong downregulation of lymphatic vessels diameter in tumours (Fig. 6h,i) associated with a vasoconstriction of the tumour-draining collecting vessels in cox-2 inhibitor-treated mice (Fig. 6j). These data demonstrate for the first time that an anti-inflammatory drug can modulate growth factor synthesis under stress condition by controlling and ITAF subcellular location and synthesis.

## **Discussion**

Tumour metastases are a leading cause of cancer-related mortality and can be promoted by both intrinsic and extrinsic factors in tumour cells. This study has



identified a novel translational regulation of VEGF-D expression under stress conditions in primary tumours promoting lymphatic vessels dilatation that can be reversed by NSAIDs by acting on ITAF expression. Translational initiation reprogramming was previously reported in inflammatory breast cancer due to an overexpression of eIF4GI and overexpression/dephosphorylation of 4E-BP1<sup>11,31</sup>. We found a co-localization of these two markers with VEGF-D in human breast carcinoma suggesting a cap-independent translation initiation of VEGF-D mRNA. Moreover, we show that VEGF-D transcript levels are reduced in mice tumours, whereas VEGF-D protein levels are increased due to a switch from cap-dependent to IRES-dependent VEGF-D translation. Notably, this regulation seems to depend on an increased temperature, but is not regulated by hypoxia as it has been previously described for other (lymph)angiogenic growth factors, such as VEGF-A and VEGF-C, two related and homologous members of the VEGF family<sup>2</sup>. This feature distinguishes VEGF-D from the other hypoxia-induced (lymph)angiogenic growth factors. Importantly, we found two alternative structures for VEGF-D 5'UTR suggesting an equilibrium between basal and stressed conditions to facilitate the ITAF binding. Switching from cap-dependent to IRES-dependent translation of VEGF-D in tumour cells required adapter protein called ITAFs. The VEGF-D IRES might be regulated by distinct ITAFs, which would be activated during heat shock (and in inflammation), but not during hypoxia. Our findings reveal that nucleolin, a nucleolar protein involved in the control of transcription of ribosomal RNA, is translocated to the cytoplasm in response to heat shock and controls VEGF-D mRNA translation after binding to the IRES region. Nucleolin has been previously described as an ITAF for virus IRESs such as poliovirus<sup>22</sup>. Recently, it has been found to enhance cellular IRES-dependent translation of specificity protein-1 (Sp1), a



transcription factor involved in tumour cells proliferation<sup>32,33</sup>. These results are in accordance with findings showing that IRES-dependent translation initiation is regulated by ITAFs subcellular location<sup>25</sup>.

Tumour cells spread to distant organs via lymphatic using two mechanisms: lymphangiogenesis and lymphatic dilatation. Here, we demonstrated that breast tumours lacking VEGF-D expression do not exhibit a defect in primary tumour or lymph nodes lymphangiogenesis, but have a reduced amount of dilated lymphatic vessels associated with an inhibition of metastasis. Our findings suggested that this process is restricted to breast cancer, in agreement with previous studies showing a correlation between metastases and dilated lymphatic vessels in breast cancer patients<sup>34</sup>.

We know for decades that inflammation is a major inducer of prostaglandin-induced vasodilatation<sup>18</sup>. Previous studies reported that expression of VEGF-D by cancer cells promoted tumour lymphatic vessels dilatation and metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium<sup>1</sup>. Cox-2 inhibitors, the most common non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID), reduce VEGF-D-driven metastasis by reversing the morphological changes in collecting lymphatic vessels. In this study, we demonstrated that cox-2 inhibitor-induced lymphatic vessel constriction is in part due to a downregulation of VEGF-D IRES translation initiation. We observed that the VEGF-D IRES activity is abolished by NSAIDs during tumour development. Notably, vessel diameters were reduced in cox-2 inhibitor-treated mice. These data indicate that lymphatic vessels plasticity is controlled by a regulatory loop involving VEGF-D protein synthesis and prostaglandin signaling.

Our study may be relevant to provide the first evidence of a translational initiation control of the lymphatic vessels dilatation, a major pathophysiological event in tumour

metastasis.

A key finding of our study is that increased temperature mediates lymphangiogenic growth factor responses, through the suppression of cap-dependent and an increase of IRES-mediated mRNA translation. Collectively, our data allow us to propose the existence of two VEGF-D translational control pathways involved in cancer dissemination that depends on stresses associated with inflammation. A nucleolar protein, the nucleolin, which can provide a novel therapeutic target for lymphatic vessel plasticity during tumour inflammation, controls this mechanism.

## **Experimental Procedures**

### **Tumour Studies**

Animal experiments were conducted in accordance with recommendations of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimentation. All animal experiments were performed according to the INSERM IACUC guidelines for laboratory animals' husbandry and have been approved by the local branch Inserm Ranguel-Purpan of the Midi-Pyrénées ethics committee (protocol n° 091037615).

In total,  $5 \times 10^5$  LLC or Capan-1 cells were injected subcutaneously into wild type (WT, n=8-10) mice on a C57Bl6 or NMRI Nu/Nu background respectively (n=8-10).

Animals were sacrificed 2 or 3 weeks later when tumours and inguinal lymph nodes were excised and embedded into OCT compound (Tissue-Tek; Sakura Finetek, Torrance, CA). To study the orthotopic model of breast carcinoma,  $5 \times 10^4$  syngeneic Balb/c 4T1 and 67NR cells were injected into Balb/c the fourth mammary fat pad (n=8-10). Animals were sacrificed 1 or 2 weeks later when tumour and inguinal lymph nodes were excised and embedded into OCT compound.

### **Bicistronic lentivector Construction and Transduction**

The cDNAs coding human VEGFD 5'UTR and EMCV 5'UTR were subcloned between the renilla (LucR) and firefly (LucF) genes under the control of the CMV promoter into the lentivector pTRIP-DU3-CMV-MCS as described before<sup>2</sup>. This generated the bicistronic lentivectors pTRIP-mVEGFD, pTRIP-VEGFA and pTRIP-EMCV, respectively. The four mono- or bicistronic lentivectors were produced using the tri-transfection procedure using the plasmids pLvPack and pLvSVg (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), and were evaluated for their ability to



transduce the LLC, 4T1 and 67NR as previously described<sup>2</sup>. In each case, a lentivector expressing GFP was used in parallel as a control, and GFP FACS analysis was used to visualize the transduced cells *in vitro*.

In total,  $4 \times 10^5$  cells were plated into each well of a 6-well plate and transduced overnight in 1 mL of transduction medium (OptiMEM, Life Technologies SAS, Saint Aubin, France) containing 6 µg/mL protamine sulfate in the presence of purified lentiviral vector (MOI 0.8). The medium was changed and cells were collected 48 hours after transduction. EGFP-positive cells were quantified by flow cytometry analysis on a FACScalibur (Becton Dickinson SAS, Le Pont de Claix, France).

#### **Reporter Gene Assay**

*In vitro* or *ex vivo* luciferase assays were performed on lysed cells or tissues using Luciferase Assay Buffer II (Promega, USA) from the Dual-Luciferase Assay System kit (Promega, USA). Luciferase activity was expressed in relative light unit (RLU) per mg of protein. PBS without mADSC was used as a background control.

#### **Reagents**

Rat anti-mouse VEGFD (SC101585) was from Santa Cruz (Tebu bio, Le-Perray-en-Yvelines, France). Rabbit-anti human 4E-BP1 (9644) was from Ozyme (St Quentin en Yvelines, France). Rabbit anti-mouse Lyve-1 antibody (RDI-103PA50) was from Research Diagnostics Incorporated (Concord, MA). Rat anti-mouse CD31 (MEC 13.3) was from BD Bioscience (San Diego, CA). Goat anti-PAN cytokeratin, donkey anti-rabbit and rat IgGs conjugated with Dylights Fluors 488, 568 were from TebuBio (TebuBio, Le Perray en Yvelines, France). Anti-podoplanin was from Santa Cruz. Anti-luciferase Firefly was from Promega (Madison, WI). Hypoxyprobe was from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Anti-GAPDH was from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

### **Immunohistochemistry**

Tumours and inguinal lymph nodes were embedded into OCT compound and 5 µm tissue sections were immunostained with specific antibodies. The mean number of blood and lymphatic vessels (+/- SEM for each treatment group) was quantified in 5–10 microscopic fields per cryosection using automated pixel density determination. The vessel diameters were quantified using 5 measures per vessel as described in Fig. S8. The mean number of mice with metastases in draining lymph nodes was determined by immunostaining cryosections with 10 µg/mL of anti-pancytokeratin (TebuBio, Le Perray en Yvelines, France). Immunostaining was quantified in 5–10 microscopic fields per cryosection using automated pixel density determination as the mean number of pixels +/- SEM for each group.

### **Quantitative real-time RT-PCR**

Total cellular RNA was isolated from mouse 4T1, 67NR and LLC tumours using a Tissue Lyser (Ultrathurax, IKA, Staufen, Germany) in Trizol solution according to manufacturer instructions. A total of 1 µg RNA was used to synthesize cDNA using High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Villebon s/ Yvette, France). The expression of human and murine VEGFD, LucR and LucF was investigated by SYBR Green real-time reverse transcribed polymerase chain reaction using the AB 7900 HT Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, Villebon s/ Yvette, France). Each reaction was run with 18S as a reference gene, and all data were normalized based on the expression levels of 18S.

#### **Primers:**

LucF (F): 5'- TCCTATGATTATGTCCGGTTATGTAAA-3' ; LucF (R): 5'-  
TGTAGCCATCCATCCTTGTCAA-3' ; LucR (F) : 5'- ATGGGCAAATCAGGCAAA-3' ;

LucR (R) : 5'- CGCAATATCTTCTTCAATATCAGG-3' ; mVEGF-D (F) : 5'-  
CCTATTGACATGCTGTGGGAT-3' ; mVEGF-D (R) : 5'-  
GTGGGTTCTGGAGGTAAGAG-3' ; hVEGF-D (F) : 5'-  
TTGAGTGCAAAGAAAGTCTGG-3' ; hVEGF-D (R) : 5'-  
ACTTGACATGGTCTGGTATG-3'.

### **Small Interfering RNA (siRNA) and Cell Transfection**

A pool of siRNAs synthesized by Dharmacon (Lafayette, CO) with the following sequences: siRNA-1: 5'-GCAAAUCCUAUACAUCUA-3', siRNA-2: 5'-UGUCAGAGGUCCAGUUUAA-3', siRNA-3: 5'-UGGCAAACCUGAAAGGGUAU-3', siRNA-4 : 5'-UGGGAAAAGUAAAGGGAAU-3' was used. Non-targeting siRNA (siGENOME Non-Targeting Smartpool; Dharmacon) was used as control. To examine the effect of the siRNAs on Nucleolin protein expression, 4T1 cells were plated onto 6-well plates in antibiotic-free RPMI-1640 medium supplemented with fetal bovine serum (10%) before being transfected with 20 nM siRNA diluted in SiPORT NeoFX Transfection Agent (Life Technologies) and OptiMEM medium (Life Technologies) following the manufacturer instructions. Vehicle control and non-targeting siRNA were applied to replicate cell cultures. Cells were incubated for 1 days before changing the culture medium and incubating the cells 72 hours before 30 minutes heat shock. Efficacy of downregulation was analyzed by immunoblotting.

### **N6L inhibitor treatment**

N6L inhibitor was provided by Dr Courty laboratory. Stock solution of N6L (2mM) was diluted in mannitol to a final concentration of 50 $\mu$ M. Heat shock was applied for 30min at 42°C.

### **In vitro stress activity**

Stress stimulation assays were performed in vitro on 4T1-transduced cells. Reticulum



stress was promoted using 12nM dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich) during 4 and 8 hours. Deprivation stress was performed in RPMI without serum during 8 hours at 37°C. Inflammatory stress was performed in presence of 1 µg/mL lipopolysaccharid (LPS) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) during 4 and 8 hours. Heat shock was applied during 5, 10, 20, & and 30 minutes at 37°C.

#### **In vivo anti-inflammatory treatment**

Non Steroidal Anti-Inflammatory Drugs (AINS) treatment were performed by injecting 1µg of anti-cyclooxygenase-2 inhibitor: sc-236 (Sigma-Aldrich Chimie GmbH) every 2 days during 12 days. Tumour-bearing mice were sacrificed after 2 weeks.

#### **RNA structure determination by in solution chemical and enzymatic probing**

**RNA preparation.** As template for in vitro transcription, a PCR was made on the plasmid Mouse VEGF-D 5'UTR with the oligos pair VEGF-D\_3/VEGF-D\_4. RNA was thus transcribed *in vitro* using T7 RNA polymerase as previously described (Helfer et al., 2014). Before use, RNAs were renatured by incubation for 1 min at 90°C in RNase-free water, 1 min at 4°C, followed by an incubation step for 15 min at 20°C in SBC buffer (50 mM sodium cacodylate pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM KCl).

**RNA structure probing.** RNase cleavage reactions and benzoyl-cyanide (Mortimer and Weeks, 2009) modifications were performed on renatured RNA (0.5 and 3 pmoles, respectively) essentially as described (Helfer et al., 2014), in the presence of 2 µg carrier tRNA at 20°C for 5 min and 1 min, respectively. Concentrations of the RNases were as follow: RNase V1 (Ambion) 0.0004-0.0002-0.0001 units/µl, RNase T1 (Thermo Scientific) 0.005-0.05-0.1 units/µl, and RNase T2 (Mobictec) 0.00125-0.0025-0.005 units/µl. The reactions were stopped by phenol extraction followed by RNA precipitation. Benzoyl-cyanide concentrations were 10-50-150 mM.

**RNA primer extension analysis.** The positions of cleavages and benzoyl-cyanide modifications along the RNA sequences were assigned by primer extension. For VEGF-D 5'UTR IRES analysis, primer extension was performed using the primer VEGF-D\_5 which was either radiolabelled or derivatized with the fluorophores VIC or NED. Radiolabelled cDNA products were separated on 8% polyacrylamide sequence gels containing 8 M urea, while the fluorescent cDNAs were used in the ABI 3130xl Genetic Analyser capillary electrophoretic apparatus.

**Primers :**

VEGF-D\_3: ATTCCCATTCTCCATACATTTTGAATATTTTAAATGTCTACCG

VEGF-D\_4: TAATACGACTCACTATAGGAAGATATGACCACCTCC

VEGF-D\_5: GAATATTTTAAATGTCTACCG

**Surface Plasmon Resonance assays**

All binding studies based on SPR technology were performed on BIAcore T200 optical biosensor instrument (GE Healthcare). Immobilization of biotinylated VEGF-D and EMCV IRES RNAs was performed on a streptavidin-coated (SA) sensorchip in HBS-EP buffer (10mM Hepes pH 7.4, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.005% surfactant P20) (GE Healthcare). All immobilization steps were performed at a flow rate of 2  $\mu$ l/min with a final concentration of 100 $\mu$ g/ml. Total amount of immobilized VEGF-D and EMCV IRES RNAs was 552 RU and 650 RU respectively.

Binding analyses were performed with cell protein extract at 100  $\mu$ g/ml over the immobilized VEGF-D and EMCV IRES RNAs surface at 37°C and 42°C for 7 minutes at a flow rate of 30  $\mu$ l/min.

The channel (Fc1) was used as a reference surface for non-specific binding measurements.

The recovery wizard is used to recover selected proteins from cell protein extracts at 37 °C and 42 °C. This step is carried out with 0.1% SDS. Five recovery procedures were performed to get enough amount of proteins for MS identification.

LC-MS/MS analyses were performed on Bruker Amazon ETD mass spectrometer.

### **Statistical Analysis**

All statistical analyses were performed using a two-tailed Student's t-test or one-way ANOVA. All experiments were performed three times, with one exception, where the incidence of metastasis is reported as the average  $\pm$  SEM of three separate animal experiments. All data presented are from a single representative experiment.

### **Acknowledgments**

This work has been supported by the Ligue Régionale Contre le Cancer, the foundation ARC pour la Recherche sur le Cancer, the foundation Lefoulon Delalande, Cancéropôle Grand Sud-Ouest GSO, IDEX Paul Sabatier Federal University, AFM-Telethon, Région Midi-Pyrénées. We thank Jean-José Maoret for his technical support and Y. Barreira from the platform Anexplo Genotoul (Inserm US006, Toulouse, France) for their outstanding technical assistance. We thank Dr Romina d'Angelo from the imaging platform of I2MC for her scientific and technical support. We thank Dr. P. Romby and Dr D. Silvera for their scientific support. These studies were conducted using flow cytometry and molecular biology shared resources from the Institute of Metabolic and Cardiovascular diseases of Toulouse (I2MC). All authors declare having no competing financial interests.



## REFERENCES

1. Karnezis, T. *et al.* VEGF-D promotes tumor metastasis by regulating prostaglandins produced by the collecting lymphatic endothelium. *Cancer cell* **21**, 181-195 (2012).
2. Morfoisse, F. *et al.* Hypoxia Induces VEGF-C Expression in Metastatic Tumor Cells via a HIF-1alpha-Independent Translation-Mediated Mechanism. *Cell reports* **6**, 155-167 (2014).
3. Holcik, M. & Sonenberg, N. Translational control in stress and apoptosis. *Nature reviews. Molecular cell biology* **6**, 318-327 (2005).
4. Richter, J.D. & Sonenberg, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**, 477-480 (2005).
5. Renaud-Gabardos, E. *et al.* Internal ribosome entry site-based vectors for combined gene therapy. *World journal of experimental medicine* **5**, 11-20 (2015).
6. Morfoisse, F., Renaud, E., Hantelys, F., Prats, A.C. & Garmy-Susini, B. [Lymphangiogenic gene expression adaptation in tumor hypoxic environment]. *Medecine sciences : M/S* **30**, 506-508 (2014).
7. Lewis, S.M. *et al.* Subcellular relocalization of a trans-acting factor regulates XIAP IRES-dependent translation. *Molecular biology of the cell* **18**, 1302-1311 (2007).
8. Sonenberg, N. & Hinnebusch, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**, 731-745 (2009).
9. Wang, D. & Dubois, R.N. The role of COX-2 in intestinal inflammation and colorectal cancer. *Oncogene* **29**, 781-788 (2010).
10. Deb, J., Majumder, J., Bhattacharyya, S. & Jana, S.S. A novel naproxen derivative capable of displaying anti-cancer and anti-migratory properties against human breast cancer cells. *BMC cancer* **14**, 567 (2014).
11. Silvera, D. *et al.* Essential role for eIF4GI overexpression in the pathogenesis of inflammatory breast cancer. *Nature cell biology* **11**, 903-908 (2009).
12. Cui, Y. *et al.* Use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and reduced breast cancer risk among overweight women. *Breast cancer research and treatment* **146**, 439-446 (2014).
13. Martineau, Y. *et al.* Internal ribosome entry site structural motifs conserved among mammalian fibroblast growth factor 1 alternatively spliced mRNAs. *Molecular and cellular biology* **24**, 7622-7635 (2004).
14. Pestova, T.V. *et al.* Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 7029-7036 (2001).
15. Sachs, A.B. Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail. *Cell* **101**, 243-245 (2000).
16. Vagner, S., Galy, B. & Pyronnet, S. Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep* **2**, 893-898 (2001).
17. Karnezis, T., Shayan, R., Fox, S., Achen, M.G. & Stacker, S.A. The connection between lymphangiogenic signalling and prostaglandin biology: a missing link in the metastatic pathway. *Oncotarget* **3**, 893-906 (2012).
18. Williams, T.J. & Peck, M.J. Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. *Nature* **270**, 530-532 (1977).
19. Banerji, S. *et al.* LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *The Journal of cell biology* **144**, 789-801 (1999).

20. Breiteneder-Geleff, S. *et al.* [Podoplanin--a specific marker for lymphatic endothelium expressed in angiosarcoma]. *Verh Dtsch Ges Pathol* **83**, 270-275 (1999).
21. Faye, M.D. & Holcik, M. The role of IRES trans-acting factors in carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta* (2014).
22. Izumi, R.E., Valdez, B., Banerjee, R., Srivastava, M. & Dasgupta, A. Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation. *Virus research* **76**, 17-29 (2001).
23. Peddigari, S., Li, P.W., Rabe, J.L. & Martin, S.L. hnRNPL and nucleolin bind LINE-1 RNA and function as host factors to modulate retrotransposition. *Nucleic acids research* **41**, 575-585 (2013).
24. Willimott, S. & Wagner, S.D. Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2. *Biochemical Society transactions* **38**, 1571-1575 (2010).
25. Lewis, S.M. & Holcik, M. For IRES trans-acting factors, it is all about location. *Oncogene* **27**, 1033-1035 (2008).
26. Destouches, D. *et al.* A simple approach to cancer therapy afforded by multivalent pseudopeptides that target cell-surface nucleoproteins. *Cancer Res* **71**, 3296-3305 (2011).
27. Stacker, S.A. *et al.* Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer. *Nat Rev Cancer* **14**, 159-172 (2014).
28. Jaffe, N. *et al.* L-asparaginase in the treatment of neoplastic diseases in children. *Cancer Res* **31**, 942-949 (1971).
29. Rigas, B., Goldman, I.S. & Levine, L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *The Journal of laboratory and clinical medicine* **122**, 518-523 (1993).
30. Hansen-Petrik, M.B. *et al.* Prostaglandin E(2) protects intestinal tumors from nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced regression in Apc(Min/+) mice. *Cancer Res* **62**, 403-408 (2002).
31. Avdulov, S. *et al.* Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer cell* **5**, 553-563 (2004).
32. Hung, C.Y. *et al.* Nucleolin enhances internal ribosomal entry site (IRES)-mediated translation of Sp1 in tumorigenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1843**, 2843-2854 (2014).
33. Luo, J. *et al.* Transcriptional factor specificity protein 1 (SP1) promotes the proliferation of glioma cells by upregulating midkine (MDK). *Molecular biology of the cell* (2014).
34. Lu, Q. *et al.* Imaging lymphatic system in breast cancer patients with magnetic resonance lymphangiography. *PLoS one* **8**, e69701 (2013).



## SUPPLEMENTAL INFORMATIONS

**Figure S1.** Expression of endogenous VEGF-D in mice tissues.

(A) VEGF-D mRNA was detected in all mice tissues using RT-PCR analysis. (B) VEGF-D protein analysis using western blots shows an ubiquitous expression in mice tissues except for organ that do not contain lymphatic vessels (brain) or are poorly vascularized with lymphatic vessels (muscle).

**Figure S2.** Staining for lyve-1 (green), Podoplanin (red) and dapi (blue) demonstrated a colocalization of the lymphatic markers (Merge, white arrows) in 4T1 and 67NR tumors. Bar:50 $\mu$ m

**Figure S3.** Lymph node lymphangiogenesis in 4T1 and 67NR draining (inguinal) lymph nodes was measured using Lyve-1 positive pixels densitometry analysis. Lymphangiogenesis was induced in both 4T1 or 67NR tumor-draining inguinal lymph nodes

**Figure S4.** (A,B) VEGF-D IRES-dependent Firefly luciferase immunodetection in 4T1 (A) and 67NR (B) tumors. (C,D) Leniviral transduction of 4T1 (A) and 67NR (B) cell lines do not affect tumor growth

**Figure S5.** Two RNA forms can be observed on a native 5% acrylamide gel (in TB 1X with 2 mM MgCl<sub>2</sub>) in all the different conditions used to fold in vitro the 5'UTR of

VEGF-D mRNA. The lanes represent the following conditions: 1): RNA in water at 20°C; 2): RNA in SBC buffer at 20°C; 3): RNA thermally unfolded and then refolded at 20°C in water; 4): RNA thermally unfolded and then refolded at 20°C in 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 5): RNA thermally unfolded and then refolded at 37°C in water; 6): RNA thermally unfolded and then refolded at 37°C in 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 7): RNA thermally unfolded and then refolded at 20°C in SBC buffer.

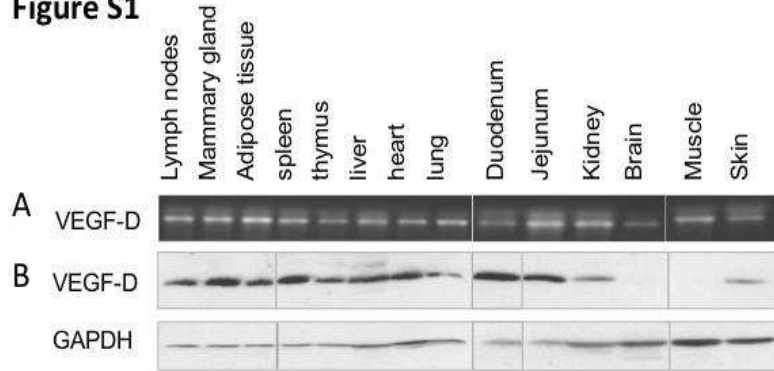
**Figure S6.** Biomolecular interaction analysis (BIA) uses a surface plasmon resonance phenomenon to characterize macromolecular interactions and has been recently been optimized to enable the recovery and identification of interacting molecules by coupling BIA with mass spectrometry (MS). BIA-MS has proven successful in the identification of the partners in protein-protein interactions as it provides a high sensitivity compared to classical affinity chromatography approaches and permits identification from small quantities of bound ligands. This novel technology was selected in the present study to search for proteins bound to the VEGF-D IRES during heat shock stress and compared to EMCV viral IRES.

**Figure S7.** 4T1-bearing mice treated with NSAID exhibits no tumor growth difference after 14 days with vehicle-treated mice.

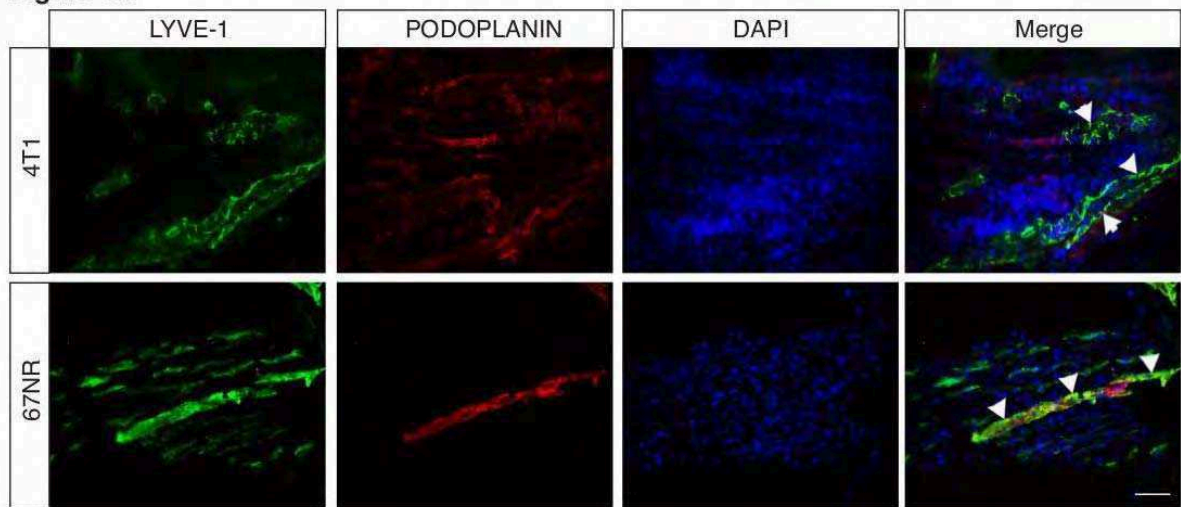
**Figure S8.** Staining for lyve-1 (green) to quantify lymphatic vessels diameter using 5 measures (white arrow) per vessel.



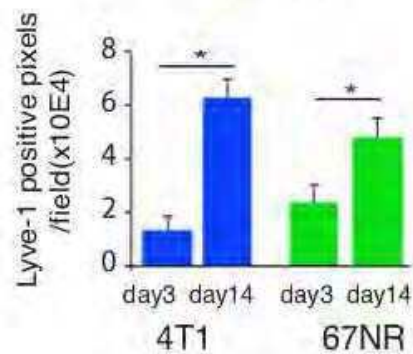
**Figure S1**



**Figure S2**



**Figure S3**



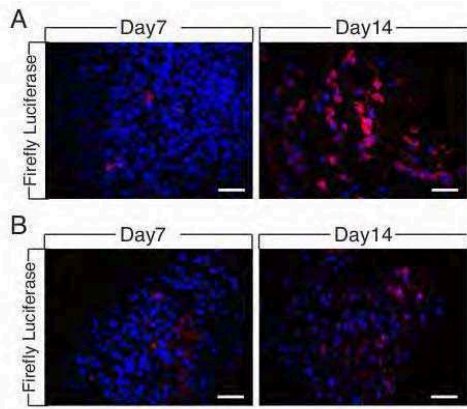


Figure S4

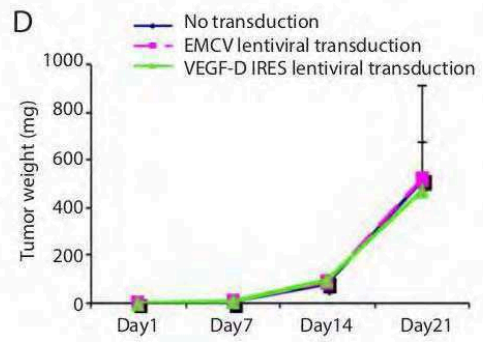
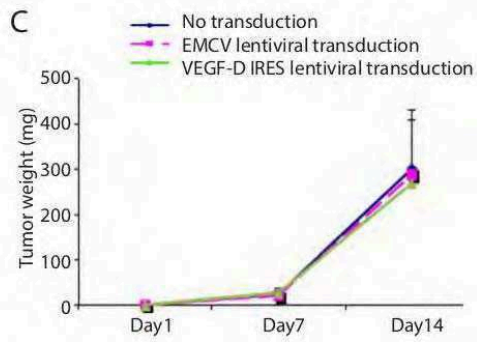
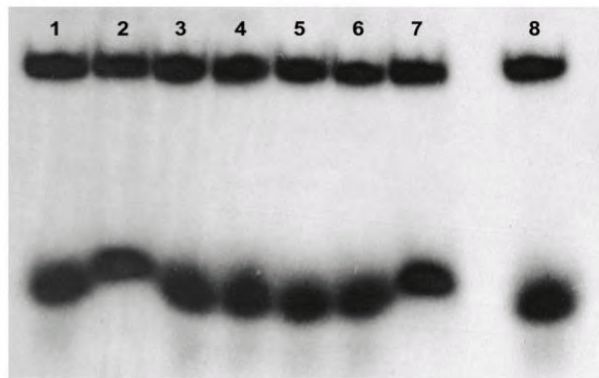


Figure S5



**Figure S6**

<b>VEGF-D 37°C</b>					
Accession	Name	MW (kDa)	pI	Mascot Score	Peptides
FIBB	Fibrinogen beta chain - Mus musculus	54.72	8.83	98.13	6
FIBG	Fibrinogen gamma chain - Mus musculus	49.36	5.47	143.13	8
<b>NUCL</b>	<b>Nucleolin - Mus musculus</b>	<b>78.68</b>	<b>4.53</b>	<b>55.07</b>	<b>1</b>
K1C10	Keratin, type I cytoskeletal 10 - Mus musculus	57.74	4.9	192.52	4
K2C8	Keratin, type II cytoskeletal 8 - Mus musculus	54.53	5.59	90.65	2
K2C79	Keratin, type II cytoskeletal 79 - Mus musculus	57.52	8.62	112.09	2

<b>VEGF-D 42°C</b>					
Accession	Name	MW (kDa)	pI	Mascot Score	Peptides
FIBB	Fibrinogen beta chain - Mus musculus	54.72	6.83	170.56	7
RQAA	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B - Mus musculus	30.81	8.74	85.4	3
CERU	Ceruloplasmin - Mus musculus	121.07	5.47	48.35	2
<b>NUCL</b>	<b>Nucleolin - Mus musculus</b>	<b>76.68</b>	<b>4.53</b>	<b>131.61</b>	<b>3</b>
K1C10	Keratin, type I cytoskeletal 10 - Mus musculus	57.74	4.90	231.86	6
K2C79	Keratin, type II cytoskeletal 79 - Mus musculus	57.52	8.62	97.41	3
K2C8	Keratin, type II cytoskeletal 8 - Mus musculus	54.53	5.59	132.68	5

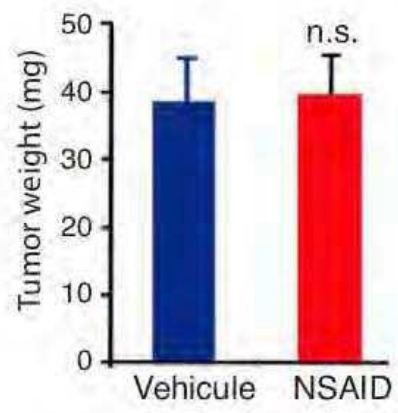
  

<b>EMCV 37°C</b>					
Accession	Name	MW (kDa)	pI	Mascot Score	Peptides
FIBB	Fibrinogen beta chain - Mus musculus	54.72	6.83	188.41	7
FIBG	Fibrinogen gamma chain - Mus musculus	49.36	5.47	171.7	4
<b>NUCL</b>	<b>Nucleolin - Mus musculus</b>	<b>76.78</b>	<b>4.53</b>	<b>111.0</b>	<b>3</b>
K1C10	Keratin, type I cytoskeletal 10 - Mus musculus	57.74	4.90	222.94	5
K2C79	Keratin, type II cytoskeletal 79 - Mus musculus	57.52	8.62	74.48	2
PA2G4	Proliferation-associated protein 2G4 - mus musculus	43.67	6.44	312.55	7

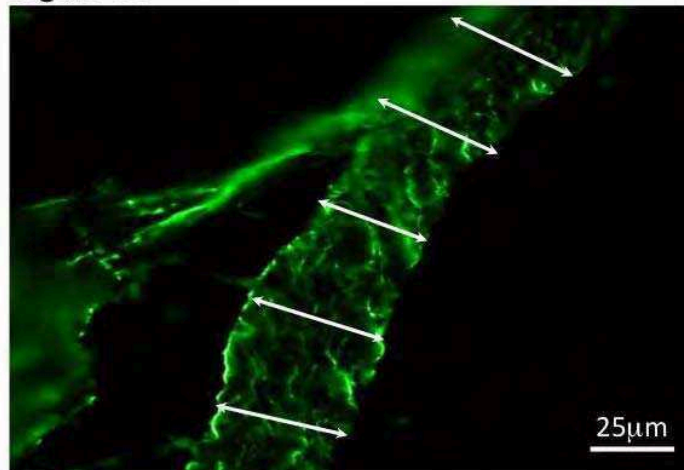
  

<b>EMCV 42°C</b>					
Accession	Name	MW (kDa)	pI	Mascot Score	Peptides
FIBB	Fibrinogen beta chain - Mus musculus	54.72	6.83	129.68	5
FIBG	Fibrinogen gamma chain - Mus musculus	49.36	5.47	190.82	8
<b>NUCL</b>	<b>Nucleolin - Mus musculus</b>	<b>76.68</b>	<b>4.53</b>	<b>89.37</b>	<b>2</b>
K1C16	Keratin, type I cytoskeletal 16 - Mus musculus	51.57	4.98	48.87	1
K2C8	Keratin, type II cytoskeletal 8 - Mus musculus	54.53	5.59	89.08	6
K22E	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal - Mus musculus	70.88	9.07	128.27	2
K1C10	Keratin, type I cytoskeletal 10 - Mus musculus	57.74	4.90	217.37	5
K2C79	Keratin, type II cytoskeletal 79 - Mus musculus	57.52	8.62	90.1	2

**Figure S7**



**Figure S8**





### C. Discussion

Dans le cas du carcinome mammaire inflammatoire, un mécanisme de reprogrammation de l'initiation de la traduction caractérisé par une surexpression de eIF4G et 4E-BP1 a été identifié au cours du développement tumoral [258]. Dans cette étude, nous avons mis en évidence une co-localisation de ces marqueurs avec le VEGF-D dans des tumeurs mammaires humaines suggérant une traduction cap-indépendante du VEGF-D. De plus, cette étude a permis d'identifier un élément IRES situé dans la région 5'NT de l'ARNm de ce facteur et activé en conditions de stress. De façon intéressante, cet IRES est activé par une augmentation de la température ce qui distingue le VEGF-D des autres facteurs lymphangiogéniques possédant un IRES activé par l'hypoxie (VEGF-A, VEGF-C, FGF2). De plus, contrairement au VEGF-C dont l'IRES s'activait dans plusieurs types de cancers, l'activation de l'IRES du VEGF-D n'est retrouvée *in vitro* et *in vivo* que dans le cadre du carcinome mammaire inflammatoire

Le passage d'un mécanisme de traduction coiffe-dépendant vers un mécanisme de traduction IRES-dépendant du VEGF-D requiert la présence de protéines régulatrices appelées ITAFs. Nos travaux révèlent que la nucléoline, protéine impliquée dans la régulation de la transcription des ARN ribosomiques et déjà décrite comme un ITAFs pour des IRES viraux et pour l'IRES de Sp-1 (facteur de transcription impliqué dans la progression tumorale) [259, 260], passe du noyau vers le cytoplasme en réponse à un choc thermique et se lie à l'IRES du VEGF-D. Son rôle d'ITAF est confirmé par la diminution de l'activité de l'IRES du VEGF-D observée après inactivation de la nucléoline par siRNA.

Il a récemment été montré que des inhibiteurs de Cox-2, un des traitements anti-inflammatoires les plus utilisés, réduisait la dilation des vaisseaux lymphatiques collecteurs induite par le VEGF-D et donc la dissémination métastatique. Notre étude vient confirmer ces résultats en apportant des précisions sur le mécanisme moléculaire : nous avons en effet constaté que ce traitement induisait une diminution de l'expression du VEGF-D en inhibant l'activité IRES de ce facteur. Cette inhibition est permise par un ciblage direct de l'expression de la nucléoline.

### **III. L'hormonothérapie induit le développement du lymphœdème en inhibant l'effet bénéfique des œstrogènes sur le système lymphatique.**

#### **Présentation de l'étude**

Le lymphœdème secondaire après cancer du sein est une pathologie du système lymphatique caractérisée par une inhibition du drainage lymphatique et une accumulation de fluides, de tissu adipeux et de fibrose dans un bras après une mastectomie associée à un curage ganglionnaire. Dix à quinze pour cent des femmes développent cette pathologie après la chirurgie. Cette pathologie handicapante et très douloureuse peut conduire dans les cas les plus sévères à une amputation ou à une immunodéficience grave. Malgré cela les traitements disponibles restent limités et uniquement symptomatiques consistant en des bandages de contention et des massages. Dans cette étude, nous émettons l'hypothèse que le développement d'un lymphœdème n'est pas uniquement un effet secondaire dû à la chirurgie mais est associé aux traitements anti-cancéreux utilisés.

Le récepteur aux œstrogènes ( $E\alpha$ ) est une cible majeure dans le cadre du cancer du sein : approximativement soixante-dix pour cent des cancers du sein étant  $E\alpha$ -positifs. Le traitement de référence pour ses cancers est le tamoxifène, un modulateur sélectif du récepteur aux œstrogènes (SERM). Par ailleurs, le contrôle hormonal du système lymphatique est un domaine encore largement inconnu et si le rôle des œstrogènes, particulièrement celui du  $17\beta$ -estradiol (E2), est bien connu pour le système vasculaire, aucune données n'est actuellement disponible en ce qui concerne les lymphatiques.

Cette étude a donc pour but, dans un premier temps de créer un nouveau modèle murin de lymphœdème secondaire reproduisant la pathologie humaine puis d'étudier les effets de l'E2 et du tamoxifène sur l'endothélium lymphatique afin de prédire l'impact des thérapies anti-cancéreuses sur le développement du lymphœdème.

Contrairement aux travaux précédents, ces résultats n'ont pas été publiés pour le moment et seront donc présentés en français.

## Résumé

Plus de 10 pour cent des patients atteints par un cancer de sein développent un lymphœdème secondaire dans les semaines ou les mois suivant la chirurgie et la radiothérapie. Le lymphœdème désigne une pathologie où la fonction lymphatique est compromise provoquant une accumulation massive de fluides et de tissu adipeux. Bien que ce soit une maladie handicapante relativement fréquente, les traitements disponibles sont limités et peu efficace.

Dans cette étude nous avons développé un nouveau modèle murin de lymphœdème secondaire associant une mastectomie à une ablation des ganglions axillaire et brachial. Nous observons la formation d'un lymphœdème deux semaines après chirurgie ainsi qu'une accumulation massive de fluides et de lipides au niveau du derme. Afin d'étudier les effets des œstrogènes sur l'endothélium lymphatique, les souris ont été ovariectomisées et traitées par des doses de 17 $\beta$ Estradiol délivrées quotidiennement (80 $\mu$ g/kg/j).

De façon surprenante, nous observons que l'estradiol protège de l'œdème et restaure le flux lymphatique. L'estradiol maintient la fonctionnalité du réseau lymphatique en activant la synthèse d'acide hyaluronique dans la peau *in vivo* et en induisant la migration, la tubulogenèse et la formation de filopode par les cellules endothéliales lymphatiques *in vitro* en ciblant le VEGFR-3.

Afin d'évaluer les effets de l'hormonothérapie sur le lymphœdème, les souris ont également été traitées avec du tamoxifène, le modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes le plus utilisé dans le traitement du cancer du sein. Nous avons constaté que les effets protecteurs de l'estradiol sur l'endothélium lymphatique étaient abolis par un traitement chronique au tamoxifène mais non par des injections ponctuelles. Nous observons une désorganisation massive du réseau lymphatique associée à une inhibition du drainage lipidique. Cet effet délétère est associé à une modification de la composition de la matrice extracellulaire ainsi qu'à une diminution de la formation des filopodes dans les cellules endothéliales lymphatiques.

En conclusion, cette étude démontre pour la première fois, l'effet bénéfique de l'estradiol sur l'endothélium lymphatique. Nous démontrons que l'hormonothérapie abolit cet effet en désorganisant le réseau lymphatique et en modifiant le microenvironnement. Ces travaux apportent donc de nouveaux éléments pour la compréhension de la prévalence du lymphœdème et constituent une première étape vers la mise au point d'un traitement du lymphœdème secondaire.

## A. Introduction

Le système lymphatique est un système unidirectionnel composé de capillaires hautement perméables et de vaisseaux collecteurs qui drainent les fluides interstitiels, les graisses et les cellules immunitaires dans les ganglions lymphatiques puis rejoint la circulation sanguine via les veines sous-claviaire. [261]. Une perte de fonction de ce système va provoquer des pathologies telles que la dissémination métastatique, le lymphœdème et un certain nombre de maladies inflammatoires. [262].

**Le lymphœdème** est une perturbation du système lymphatique caractérisée par un drainage lymphatique inhibé et une accumulation de **tissu adipeux** et de **fibrose** dans les membres supérieurs après une mastectomie associée à un curage ganglionnaire dans le cadre du cancer du sein. 10 à 15% des femmes développent un lymphœdème après cette opération. C'est une pathologie chronique qui peut conduire à une immobilisation, une amputation et une immunodéficience sévère. Bien que ce soit une maladie handicapante relativement fréquente, les traitements disponibles consistent en des manchons de contention ou des massages visant à stimuler manuellement le drainage lymphatique et sont limités et peu efficaces.

Récemment, les procédures chirurgicales ont été améliorées afin de réduire le risque de développement du lymphœdème : des biopsies des ganglions sentinelles sont réalisées ceci afin de réaliser uniquement l'ablation des ganglions touchés par des métastases et non de l'intégralité de la chaîne ganglionnaire. Le risque de développer un lymphœdème est en effet corrélé au nombre de ganglions retirés

En dépit de ces améliorations, le lymphœdème reste un effet secondaire courant de la chirurgie associée au cancer du sein. Dans cette étude nous émettons l'hypothèse que le développement du lymphœdème n'est pas seulement relié au processus chirurgical mais est également fortement influencé par les traitements anticancéreux utilisés.

Les recherches sur le rôle du système lymphatique dans le développement du lymphœdème ont longtemps été limitées par un manque de modèles expérimentaux.



Cependant, un modèle murin de lymphœdème observé après une incision circonférentielle au niveau du derme de la base de la queue a été récemment décrit [263]. En parallèle, un lymphœdème primaire humain a pu être reproduit chez la souris par des mutations inactivatrices hétérozygotes sur le gène codant pour le récepteur des VEGF-C et -D, le VEGFR-3 [264]. Dans cette étude, nous développons un nouveau modèle de lymphœdème secondaire lié au cancer du sein induit par une mastectomie associée à une ablation des ganglions lymphatiques axillaire et brachial.

Etant donné que le lymphœdème a été corrélé à l'Indice de Masse Corporelle (IMC) [265] et que la majorité des facteurs de croissance lymphangiogéniques impliqués dans la prolifération, la migration et la survie des CELs sont produits par le tissu adipeux [266], nous émettons l'hypothèse que les traitements anticancéreux peuvent affecter la synthèse des facteurs lymphangiogéniques en ciblant le tissu adipeux et donc, indirectement, la fonction de drainage des vaisseaux lymphatiques.

La régulation du réseau lymphatique par les hormones demeure encore aujourd'hui un domaine largement inexploré. Le rôle des œstrogènes, particulièrement du 17 $\beta$ -œstradiol, est clairement établi dans la reproduction et le développement des organes sexuels ainsi que dans de nombreux processus physiologiques incluant le système cardiovasculaire [267]. L'E2 induit la production de molécules vasodilatatrices telles que le monoxyde d'azote (NO) et de molécules anti-oxydantes telles que la prostaglandine et des dérivés des cyclooxygénases [268-271]. Caractériser les mécanismes moléculaires responsables des effets protecteurs des œstrogènes dans les maladies coronariennes reste un challenge majeur en Clinique, les femmes ayant moins de risques comparé aux hommes avant la ménopause. L'effet athéroprotecteur des œstrogènes a été clairement décrit dans les modèles animaux [272, 273]. Cet effet est en partie dû à l'action synergique de l'E2 avec les facteurs de croissance endothéliaux VEGF-A et FGF2 [274].

Les effets biologiques de l'E2 sont initiés après sa liaison aux récepteurs des œstrogènes  $\alpha$  et  $\beta$ , (E $\alpha$  et  $\beta$ ) une sous-famille de récepteurs nucléaires ayant une activité ligand-inductible de facteurs de transcription [275, 276]. L'effet endothélial de l'E2 est majoritairement induit par E $\alpha$ , composé d'un domaine de liaison à l'AND (DBD) et de deux domaines trans-activateurs (AF1 et AF2) [277]. Malgré une

littérature abondante sur les effets de l'E2 sur l'endothélium vasculaire, rien n'est connu sur ses effets sur l'endothélium lymphatique alors qu'il semble que ce soit un facteur important notamment dans le cadre du lymphœdème primaire [278]. Le récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  est une cible thérapeutique majeure dans le cas du cancer du sein [279]. En effet, approximativement 70% des cancers du sein sont  $E\alpha$ -positifs et traités par des thérapies hormonales [280]. Dans ce contexte, le tamoxifène, un modulateur sélecteur du récepteur aux œstrogènes (SERM) a été utilisé comme traitement pendant près de 40 ans et est utilisé comme chemoprévention depuis 10 ans [281]. Il a été le premier SERM à être appliqué en clinique pour les patients atteints de cancer du sein  $E\alpha$ -positifs [282]. Le tamoxifène a également été testé dans le cadre des maladies coronaires [283].

L'hormonothérapie (HT) a été décrite comme ayant un effet bénéfique sur les maladies coronariennes dans des études observationnelles, mais ces résultats ont été remis en question par plusieurs essais cliniques randomisés (WHI, HERS, ERA).

A la suite de l'essai WHI (Women Health Initiative), un regain d'intérêt a été porté à l'action des SERM sur le système cardiovasculaire. Les SERM peuvent en effet avoir une activité agoniste ou antagoniste du récepteur aux œstrogènes en fonction du tissu ciblé.

Dans cette étude, nous étudions les effets des œstrogènes sur l'endothélium lymphatique. Puis nous nous intéressons aux effets du tamoxifène sur le drainage et la fonction lymphatique afin de prédire son impact sur le développement du lymphœdème secondaire associé au cancer du sein. Ce projet est directement relié aux aspects médicaux de la qualité de vie après le cancer du sein car aucun traitement, excepté des manchons de contention ou des massages, n'est actuellement proposé aux femmes atteintes par un lymphœdème après avoir eu un cancer du sein.

## **B. Résultats**

### ❖ Lymphoœdème secondaire du membre supérieur chez la souris

Une ablation de la seconde glande mammaire ainsi que des ganglions axillaire et brachial a été réalisée sur des souris C57Bl/6 de 6 semaines (Fig. 1A). Les souris développent, de façon reproductible, un œdème au bout d'une période de deux semaines. (Fig.1B,C). Le volume de la patte atteint son maximum deux semaines après chirurgie (20-25% d'augmentation de diamètre). La résorption de l'œdème intervient quatre semaines après la chirurgie comme l'indique la mesure du diamètre de la patte (Fig.1C) et de l'épaisseur du derme (Fig.1D). En parallèle, nous avons évalué la fibrose de la peau par une coloration au trichrome de Masson. Nous démontrons une accumulation de la fibrose dans la peau lymphoedemateuse corrélée à un développement de l'œdème (Fig.1E) alors qu'aucune modification de la surface des adipocytes n'a été observée (Fig.1F). Afin d'évaluer l'inflammation dans ce modèle, nous avons effectué une immunodétection des macrophages à la fois au niveau superficiel et profond (Fig.1G). Nous observons une infiltration des macrophages une semaine après chirurgie dans les deux tissus alors qu'aucune infiltration n'a pu être détectée deux semaines après chirurgie suggérant que le développement de l'œdème n'est pas induit par une inflammation locale induite par la chirurgie (Fig.1G).

La technologie des micro-ondes repose sur les propriétés électriques spécifiques des tissus vivants tels que la peau, le muscle, le tissu adipeux qui se distinguent de celles des gaz (air) ou d'autres matériaux solides (verre, plastique). Ces propriétés électriques montrent une forte dépendance à la fréquence des ondes utilisées (fréquence de dispersion) et exhibent une signature spécifique de réflexion et d'absorption des ondes (Fig. 1I). Il est maintenant bien admis que les interactions tissu-micro-ondes sont dictées par la quantité d'ions et d'eau contenue dans un tissu donné. Au cours de cette étude, nous développons un système original de senseur utilisant les micro-ondes pour mesurer l'œdème du membre supérieur. Nous détectons un changement significatif du coefficient de réflexion dans la patte

lymphoedemateuse comparée à la patte contrôle suggérant une accumulation d'eau et d'ions au cours de l'œdème (Fig. 1J).

❖ L'amélioration du drainage lymphatique induite par les œstrogènes est abolie par l'hormonothérapie.

Afin d'étudier les effets des œstrogènes ou de l'hormonothérapie sur l'endothélium lymphatique, les souris ont été ovariectomisées à semaines, un âge correspondant à la puberté, et des pastilles d'E2 (0,1mg), de tamoxifène (5mg) ou de placebo délivrant une dose constante pendant 60 jours ont été implantées en sous-cutanée dans le dos des animaux (Fig.2A). Une mastectomie et une ablation des ganglions ont été réalisées sur des animaux de 6 semaines et le lymphœdème a été observé deux semaines après chirurgie (Fig.2A). Un lymphœdème se développe dans les souris ovariectomisées ou traitées au tamoxifène tandis qu'aucun œdème n'a pu être détecté dans les souris traitées à l'E2 suggérant un effet protecteur des œstrogènes (Fig. 2B). En dépit d'une absence de modification macroscopique nous observons une modification dans le contenu en eau et en ions des pattes des souris traitées à l'E2 en utilisant le senseur à micro-ondes (Fig.2C) démontrant un réel effet de la chirurgie sur la peau des pattes des souris. Cet impact sur le contenu en fluides de la peau est aggravé dans les souris traitées au tamoxifène (Fig. 2C). De façon surprenante, la fibrose est réduite à la fois dans les groupes E2 et tamoxifène suggérant un effet agoniste du tamoxifène sur la synthèse de la matrice extracellulaire (Fig. 2D).

En utilisant une technique de lymphographie développée au laboratoire, nous avons étudié les effets des traitements sur les capillaires superficiels et les vaisseaux collecteurs situés plus profondément dans la peau (Fig.2 E-V). Dans la peau contrôle, aucun effet sur le drainage lymphatique n'est observé dans les souris ovariectomisées (Fig.2E) et traitées à l'E2 (Fig.2F). A l'inverse, nous observons une perturbation du drainage des capillaires lymphatiques (Fig.2G) qui n'est pas associé à une fuite de fluides dans les souris traitées au tamoxifène (Fig.2M). En parallèle, aucun effet n'a été observé sur les vaisseaux collecteurs profonds suggérant un effet restreint au réseau des capillaires lymphatiques (Fig.2O-R). Dans les pattes lymphoedemateuses, la fuite des fluides des capillaires lymphatiques et leur



accumulation dans le tissu est réduite dans les souris traitées à l'E2 par rapport aux souris ovariectomisées (Fig.2I,J, N). Dans ce contexte, le tamoxifène aggrave la fuite de fluides (Fig.2K,L,N). Là encore aucun effet n'a été observé sur les vaisseaux (Fig.2S-V).

❖ Les effets protecteurs de l'estradiol sur les lymphatiques sont induits par le récepteur ER alpha.

Afin d'étudier les effets de l'estradiol sur les cellules endothéliales lymphatiques (CEL), nous avons réalisé des RT-PCR sur les ER alpha et beta sur des ARN totaux de CEL. Nous démontrons que seul le récepteur Er $\alpha$  est exprimé par les CELs (Fig. 3A). Afin d'étudier le rôle des œstrogènes sur l'endothélium lymphatique, nous avons réalisé des immunodétections sur trachées entières de souris déficientes pour Er $\alpha$  et Er $\beta$  (Fig.3 C,D). Aucune modification morphologique n'a pu être détectée dans ces souris par rapport aux contrôles suggérant un rôle restreint à un endothélium soumis à un stress (Fig.3 C,D).

En parallèle, des RT-qPCR ont été réalisées pour évaluer l'expression de l'ARNm du VEGF-C et VEGF-D dans la peau et le tissu adipeux (Fig. 3E-F). Nous observons une diminution des deux ARNm à la fois dans la peau (Fig. 3E) et dans le tissu adipeux (Fig. 3F) des souris traitées à l'E2 et au tamoxifène. A l'inverse, l'ARNm du VEGF-D n'est pas induit dans la peau (Fig.3E), mais est fortement régulé dans le tissu adipeux par l'E2 mais pas par le tamoxifène (Fig. 3F) suggérant un effet tissu-spécifique des œstrogènes. Afin de déterminer les effets des œstrogènes sur les CELs, nous avons étudié le niveau d'expression du VEGFR-3. Le VEGFR-3 est fortement régulé dans la peau par l'E2 mais cet effet n'est pas observé lors d'un traitement au tamoxifène (Fig 3G).

Figure 1

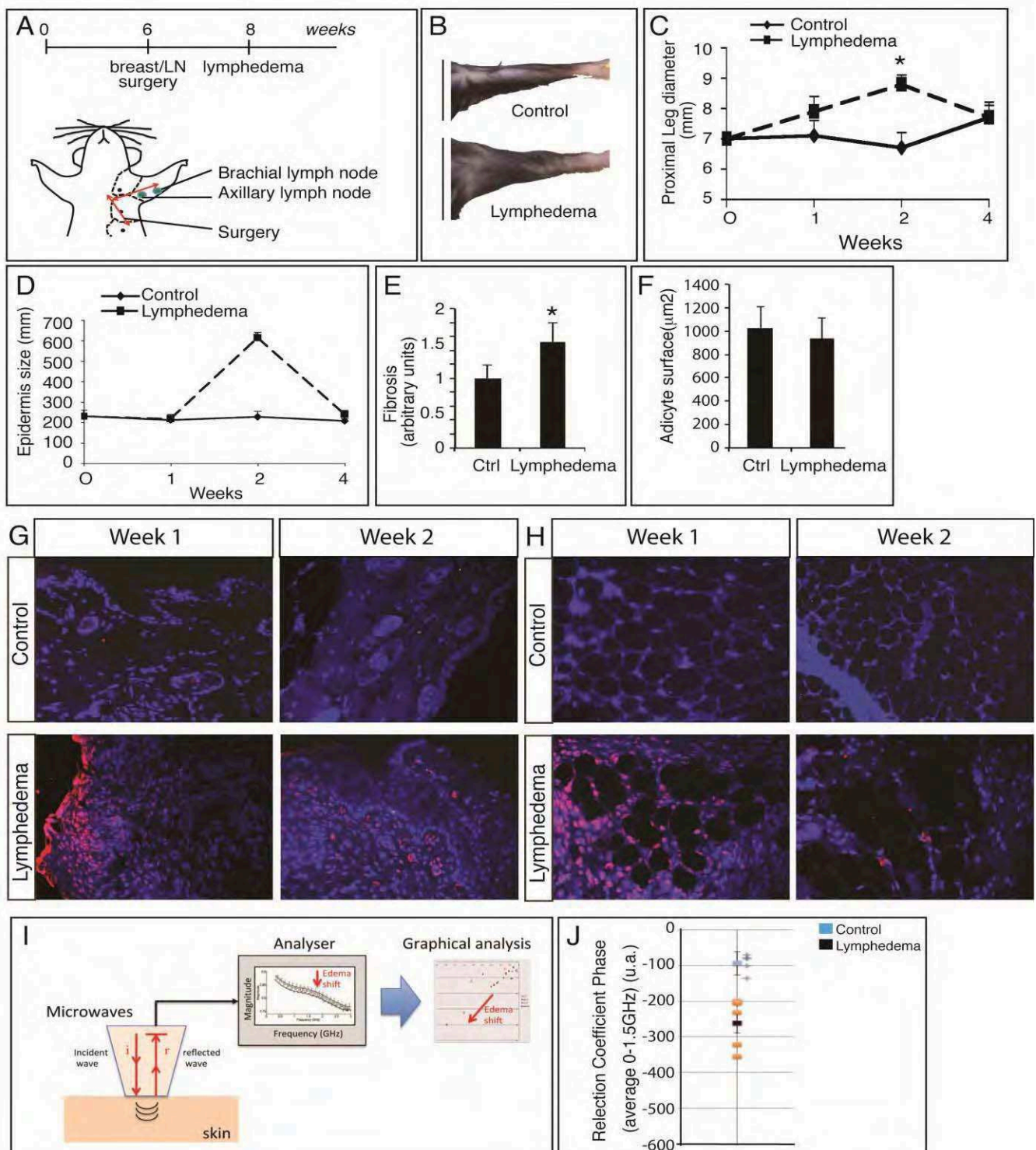
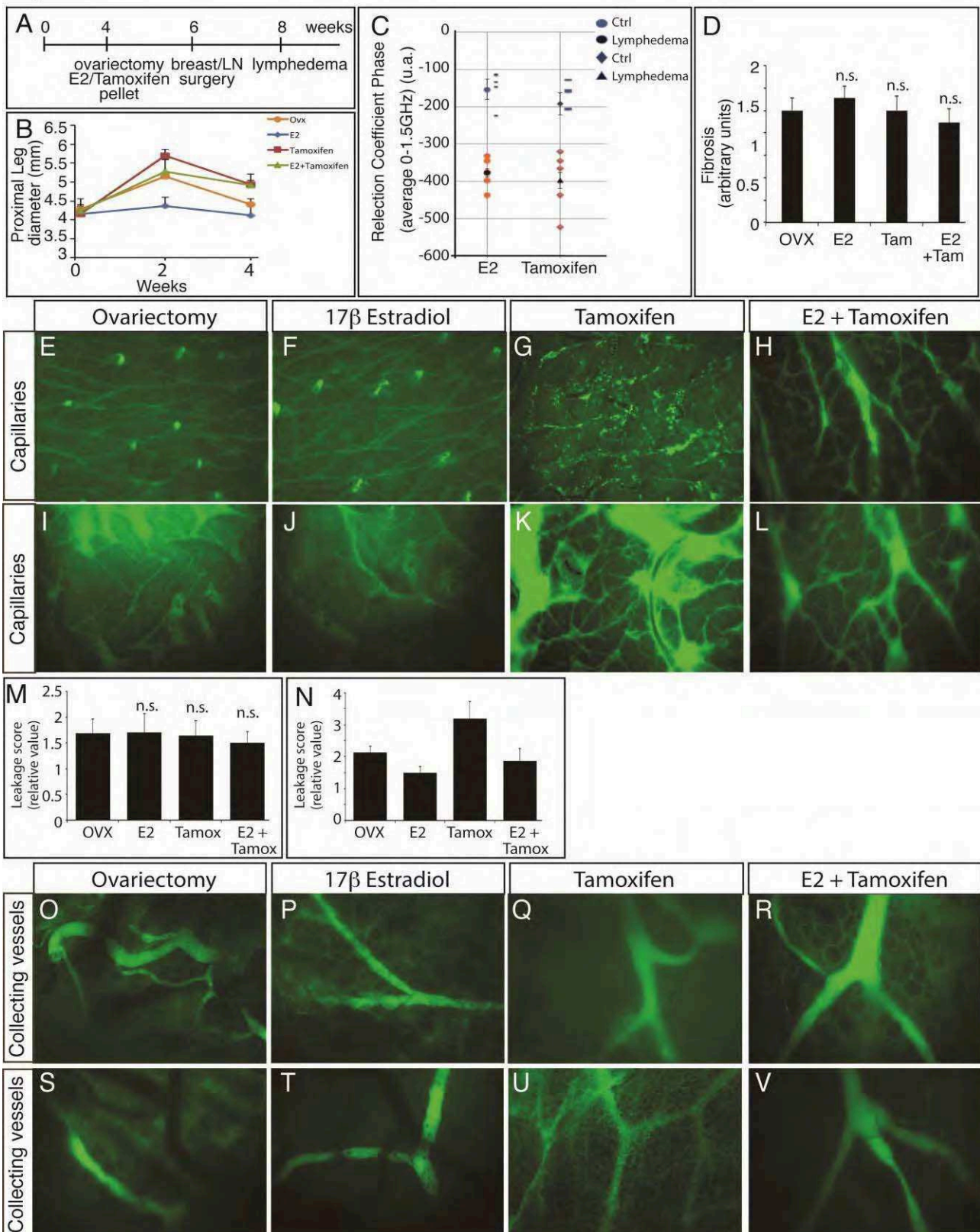


Figure 1 : Mise au point d'un nouveau modèle murin de lymphœdème secondaire associée au cancer du sein

Une mastectomie associée à une lymphadenectomie a été réalisée sur des souris de 6 semaines (A). Un lymphœdème est observé deux semaines après chirurgie (B,C). Il est caractérisé par un épaississement de l'épiderme (D), une accumulation de fibrose (E) mais aucune modification de la surface adipocytaire n'a pu être constatée (F). Immunomarquages **F4/80-DAPI** montrant une infiltration de macrophages à une semaine post-chirurgie (G,H). Détection de l'accumulation de fluides dans la patte lymphoedemateuse à l'aide d'un senseur à micro-ondes (I,J)

Figure 2

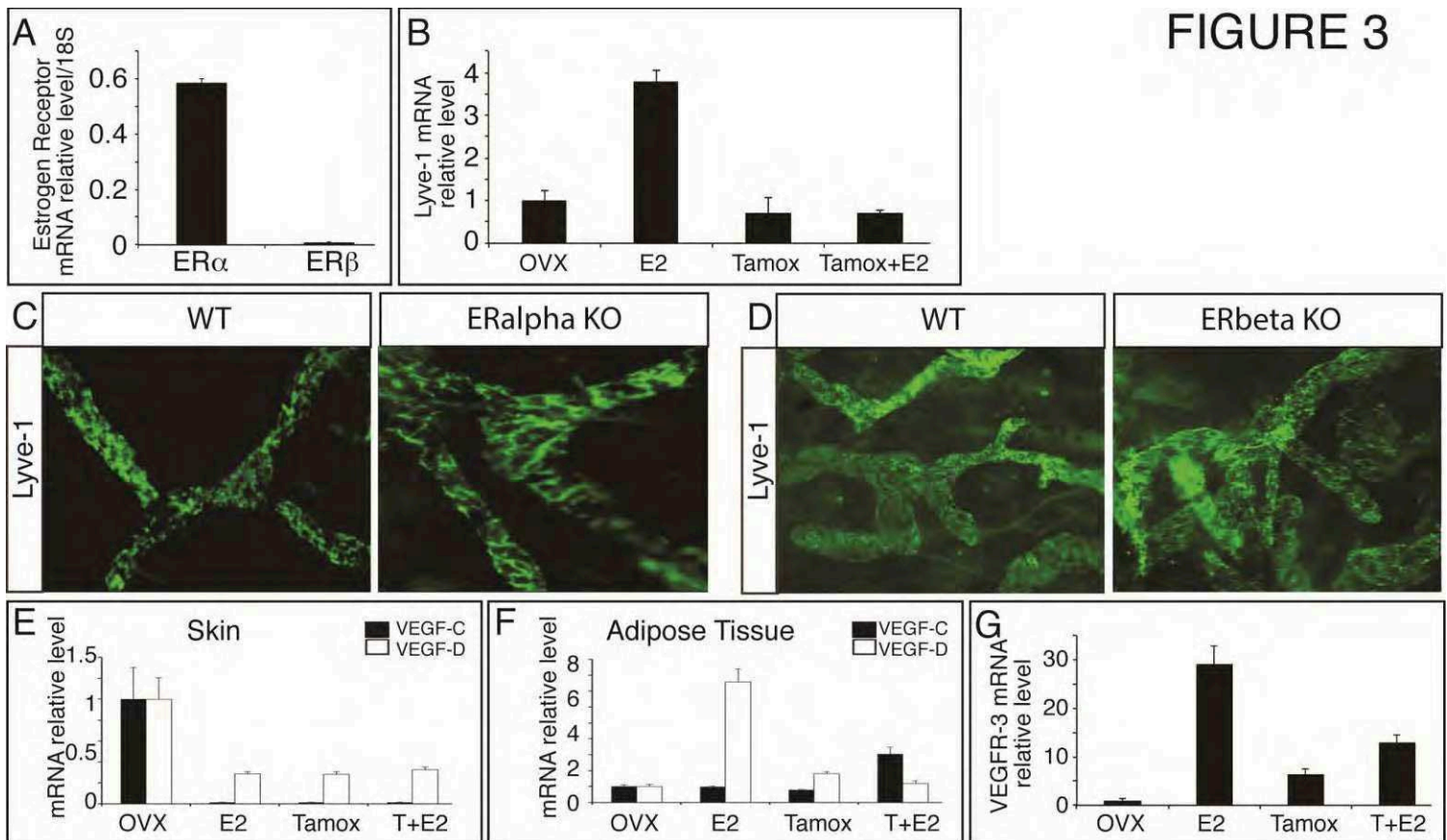


**Figure 2 : Les effets bénéfiques de l'estradiol sont abolis par l'hormonothérapie au tamoxifène**

Stratégie expérimentale utilisée dans le cadre des traitements hormonaux (A). Evaluation du volume de l'œdème (B), de l'accumulation de fluides (C) et de fibrose (D). Lymphangiographies réalisées après injection de FITC-dextran dans le plexus lymphatique du coussinet des pattes antérieures des souris. Visualisation des capillaires lymphatiques des pattes contrôles (E-H,M) et lymphoedemateuses (I-L,N). Visualisation des vaisseaux collecteurs des pattes contrôles (O-R) et lymphoedemateuses (S-V)



Ces données suggèrent un effet agoniste du ER pour le tamoxifène sur la synthèse du VEGF-D mais pas sur celle du VEGFR-3. Etant donné que la signalisation induite par le tamoxifène lors de sa fixation sur  $ER\alpha$  est dépendante du domaine AF1 de ce récepteur, ces données semblent indiquer que la synthèse de VEGF-D est AF1-dépendante tandis que celle de VEGFR-3 semble passer par AF-2. En parallèle, nous avons étudié les effets de l'œstrogène sur le marqueur lymphatique Lyve-1. Comme observé pour le VEGFR-3, Lyve-1 semble être régulé par l'E2 mais pas par le tamoxifène (Fig. 3B). La surexpression de l'ARNm du VEGFR-3 et du Lyve-1 in vivo nous conduit donc à étudier plus en détail le rôle des œstrogènes sur la lymphangiogenèse cutanée.



**Figure 3 : Les effets protecteurs de l'œstrogène sur les lymphatiques sont induits par le récepteur ER alpha.**

Analyses de RT-qPCR effectuées sur les prélèvements de peaux des pattes des souris afin de détecter les récepteurs aux œstrogènes (A) et le récepteur Lyve-1 (B). Immunomarquage Lyve-1 réalisé sur oreilles entières de souris déficientes en  $ER\alpha$  (C) et  $ER\beta$  (D). Analyses de RT-qPCR effectuées sur les prélèvements de peaux et de tissu adipeux des pattes lymphoedemateuses afin de détecter les VEGF-C et VEGF-D (E,F) et le VEGFR-3 (G).

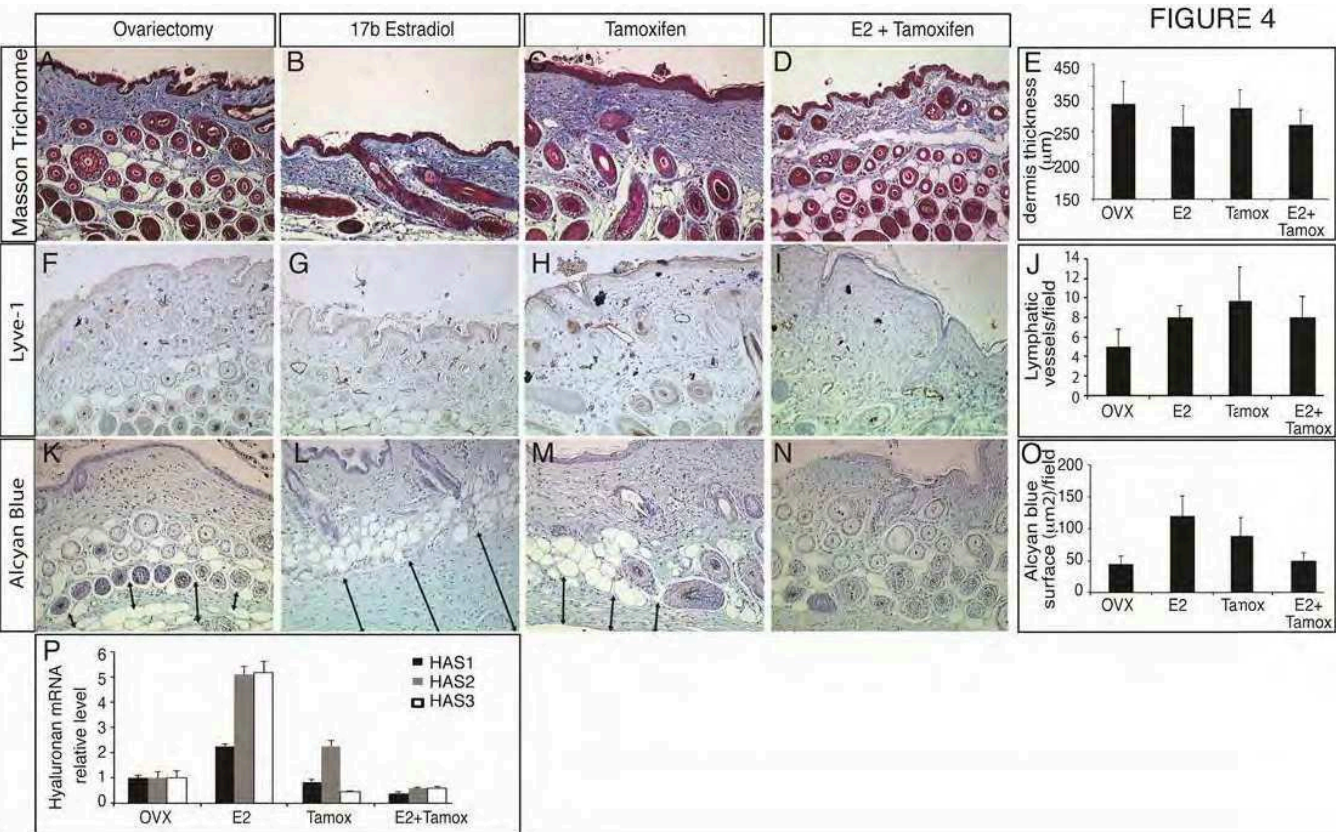


❖ L'estradiol induit la lymphangiogenèse et un remodelage de la matrice extracellulaire.

Afin d'étudier l'effet des œstrogènes sur la peau lymphoedemateuse, nous avons réalisé une coloration au trichrome de Masson afin d'évaluer la morphologie de la peau (Fig4. A-E). La taille du derme est réduite dans les souris traitées à l'E2 par rapport aux souris ovariectomisées (Fig 4 A,B, E), alors que le tamoxifène n'a aucun effet sur l'épaisseur du derme (Fig. 4C,E). En utilisant un immunomarquage au Lyve-1 nous avons évalué la lymphangiogenèse cutanée (Fig 4.F-J). Tous les traitements induisent la lymphangiogenèse comparé aux souris ovariectomisées (Fig 4. F-J). Cet effet est associé à une augmentation du contenu en acide hyaluronique du derme des souris traitées à l'E2 (Fig. 4K,L,O) et dans une moindre mesure dans les souris traitées au tamoxifène (Fig. 4K,M,O). Cette accumulation d'acide hyaluronique peut en partie être expliqué par l'étude de l'expression des hyaluronane synthases (HAS).L'estradiol stimule fortement la quantité d'ARNm des HAS2 et HAS3 Estradiol alors que l'effet du tamoxifène est restreint à l'HAS2 (Fig.4P).

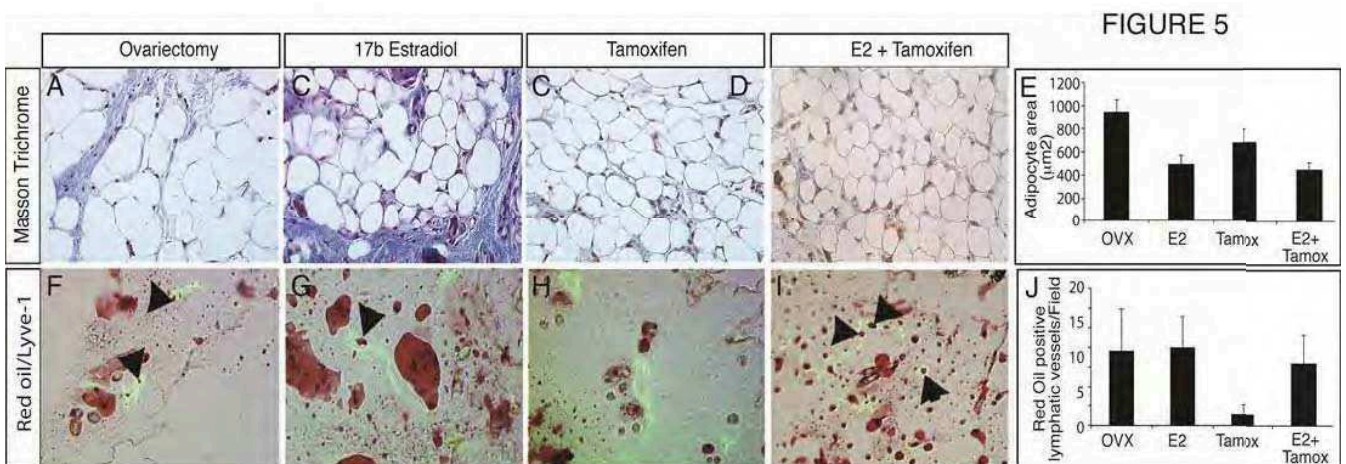
❖ Le tamoxifène limite le drainage périphérique des lipides

Afin d'étudier les conséquences de la variation de l'expression des facteurs de croissances induite par les œstrogènes dans le tissu adipeux, nous avons analysé la morphologie des adipocytes dans la peau lymphoedemateuse. L'E2 et le tamoxifène induisent tous les deux une diminution de la taille des adipocytes comparé aux animaux contrôles (Fig. 5A-E) ce qui corrèle avec une modification de la sécrétion d'adipokines. Nous avons ensuite effectué une coloration à l'huile rouge associée à un immunomarquage Lyve-1 afin d'évaluer le drainage des lipides par les lymphatiques de la peau (Fig 5. F-J). Des gouttelettes lipidiques ont pu être visualisées dans les vaisseaux lymphatiques des souris contrôles et traitées à l'E2 (Fig. 5F-G-J), alors qu'une absence de gouttelettes lipidiques a été constatée dans les lymphatiques des souris traitées au tamoxifène. (Fig.5 F-H-J).



**Figure 4 : L'estradiol induit la lymphangiogenèse et un remodelage de la matrice extracellulaire.**

Coloration au trichrome de Masson réalisée sur les peaux des pattes lymphoedemateuses de souris (A-D) et quantification de l'épaisseur du derme (E). Immunomarquage lyve-1 réalisé sur les mêmes échantillons (F-I) et quantification de la lymphangiogenèse cutanée (J). Marquage des glycosaminoglycanes au bleu alcian (K-N) et quantification de la surface marquée (O). RT-qPCR réalisées sur les mêmes échantillons afin de détecter les hyaluronanes synthases 1, 2 et 3 (P).



**Figure 5 : Le tamoxifène inhibe le drainage des lipides**

Coloration au trichrome de Masson réalisée sur les tissu adipeux des pattes lymphoedemateuses de souris (A-D) et quantification de l'aire moyenne des adipocytes(E). Immunomarquage lyve-1 réalisé sur les peaux des pattes lymphoedemateuses et associé à une coloration à l'huile rouge(F-I) et quantification du nombre de vaisseaux lymphatiques contenant des gouttelettes lipidiques marquées à l'huile rouge (J).

- ❖ Le tamoxifène réduit les interactions entre vaisseaux lymphatiques en inhibant la formation des filopodes.

Afin de comprendre comment le tamoxifène peut affecter la fonction des vaisseaux lymphatiques sans affecter leur densité, nous avons réalisé des immunodétections sur organes entiers dans trois territoires richement vascularisés par le système lymphatique : l'oreille, la trachée et le diaphragme (Fig.6). L'estradiol n'affecte pas le réseau lymphatique comparé aux souris ovariectomisées (Fig6A-B, F-G, K-L, P-O). De façon surprenante, nous démontrons une diminution massive du nombre de connections entre les vaisseaux dans les animaux traités au tamoxifène (Fig. 6C-H,M-R-E-J-O-T). Cette inhibition coïncide avec une forte diminution du nombre de filopodes suggérant une perturbation dans l'adhésion des lymphatiques avec leur microenvironnement (Fig. 6J).

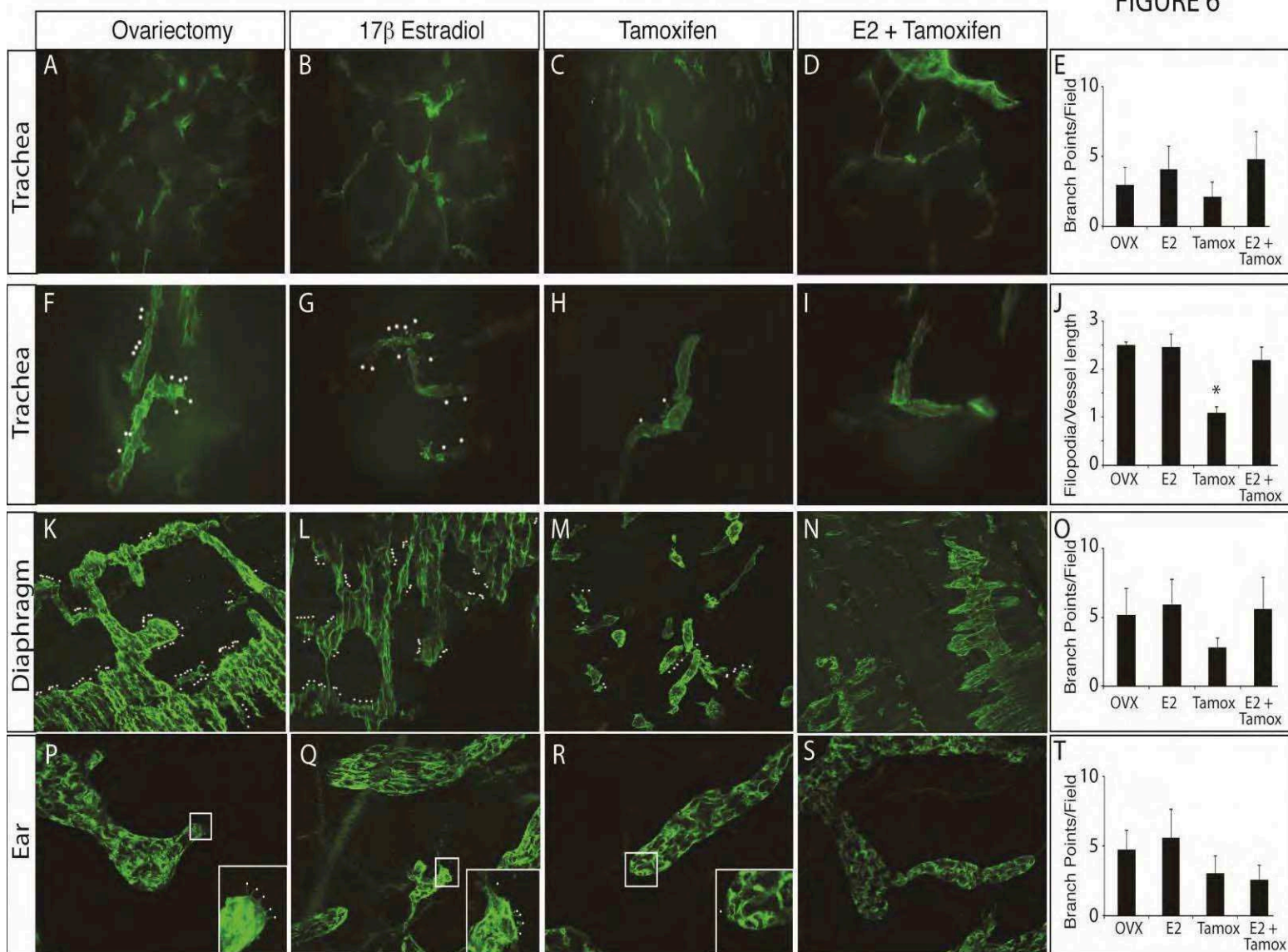
- ❖ L'effet de l'E2 sur la fonction des cellules endothéliales lymphatiques est inhibé par le tamoxifène

Afin d'évaluer les effets de l'E2 sur les CEL *in vitro*, nous avons réalisés des tests de survie, de migration, de prolifération et de tubulogenèse (Fig.7). Aucun des traitements n'affecte la survie (Fig. 7A) ou la prolifération des cellules (Fig. 7C). Le tamoxifène inhibe en revanche la migration (Fig.7B), et la tubulogenèse induite par l'E2 (Fig. 7D-I) démontrant sur ce type cellulaire un effet d'antagoniste partiel du tamoxifène sur E $\alpha$ .

Afin d'étudier si le tamoxifène modifiait la morphologie des CELs nous avons réalisé des immunodétections de la Phalloïdine. Nous avons observé que, par comparaison au contrôle et aux cellules traitées à l'E2 (Fig.7 J-L,O), les cellules traitées au tamoxifène possédait moins de filopodes (Fig.7 M-O). Cet effet reproduit les modifications de la morphologie des vaisseaux lymphatiques observées précédemment *in vivo*.



FIGURE 6

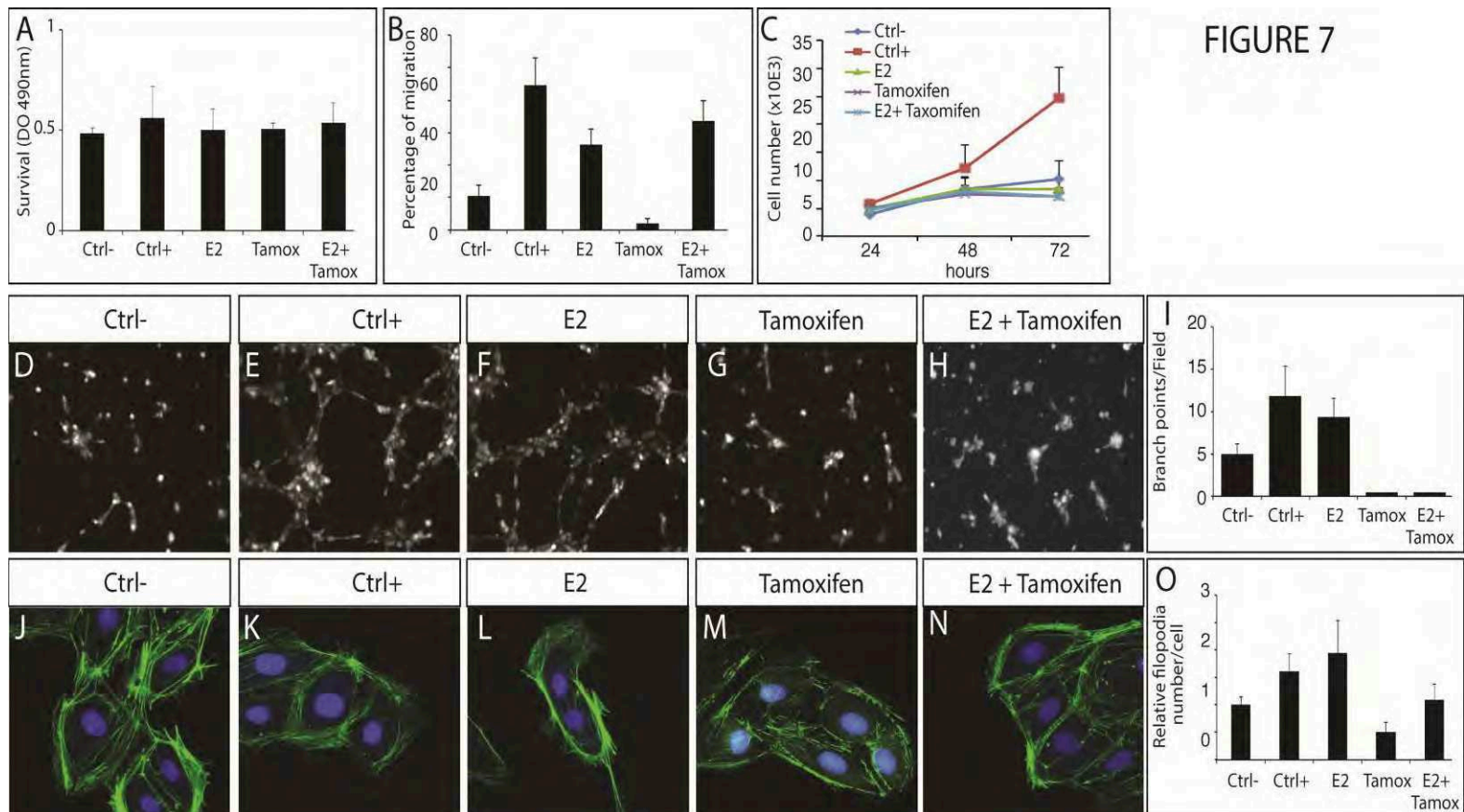


**Figure 6 :Le tamoxifène réduit les interactions entre vaisseaux lymphatiques en inhibant la formation des filopodes**

Immunomarquage Lyve-1 réalisé sur trachées entières (A-I) et quantification du nombre de points de branchement (E) et de filopodes (J). Immunomarquage Lyve-1 réalisé sur diaphragmes entiers (K-N) et quantification du nombre de points de branchement (O). Immunomarquage Lyve-1 réalisé sur oreilles entières (P-S) quantification du nombre de points de branchement (T).



FIGURE 7



**Figure 7 : L'effet de l'E2 sur la fonction des cellules endothéliales lymphatiques est inhibé par le tamoxifène**

Un dosage du lactate dans le surnageant des CELs a été effectué afin d'évaluer leur survie après 24h de traitement (A). Un test de migration de type test de blessure a été réalisé sur les CEL, l'évaluation de la migration est mesurée 24h après la blessure (B). La prolifération des CELs a été analysée 24,48 et 72h après traitement par comptage direct (C). Test de tubulogenèse en Matrigel (D-H), la quantification du nombre de points de branchement est réalisée 8h après traitement (I). Immunodétection de la phalloïdine réalisée sur les CELs (J-N) et quantification du nombre de filopodes après 24h de traitement (O).

### C. Discussion

L'étude du lymphœdème spécifique au cancer du sein a longtemps été limitée par le manque de model murin reproduisant la pathologie humaine. Notre étude a permis de mettre au point un nouveau modèle animal basé sur une mastectomie associée à une ablation des ganglions lymphatiques axillaire et brachial. Cette chirurgie induit un développement d'un œdème localisé dans le membre supérieur. De plus, nos analyses ont révélé que cet œdème est caractérisé par un épaississement de la peau, une accumulation de fluides et de fibrose tout comme dans les œdèmes humains.

Seul 10 à 20% des patientes développent un lymphœdème après chirurgie, il est donc essentiel de détecter le plus tôt possible la déficience de la fonction lymphatique pour commencer les traitements de façon précoce et ainsi améliorer leur efficacité. Dans notre étude, nous avons développé un système basé sur les propriétés de réflexion des micro-ondes des fluides intratissulaires pour détecter de façon précoce l'accumulation de fluides avant l'apparition des caractéristiques macroscopiques du lymphœdème.

Ces travaux ont également révélé, pour la première fois dans un tissu autre que l'utérus, un effet direct de l'estradiol sur l'endothélium lymphatique. *In vitro*, l'estradiol induit de façon spécifique la migration et la tubulogenèse mais pas la prolifération. Cet effet bénéfique de l'estradiol semble être dû à une action sur le sprouting des CELs, l'E2 induisant une surexpression du VEGFR3, régulateur clé du sprouting des cellules endothéliales, et favorisant la formation des filopodes aussi bien *in vitro qu'in vivo*.

De plus, un facteur de risque pour le développement du lymphœdème autre que la chirurgie a pu être identifié par cette étude. Le traitement de référence pour le cancer du sein hormono-dépendant, le tamoxifène, supprime non seulement l'effet bénéfique de l'estradiol mais aggrave le lymphœdème et retarde sa résorption chez les animaux n'ayant reçu que ce SERM. Cet effet délétère sur l'œdème est dû à une inhibition de la formation des filopodes, induite par une inhibition de l'expression de VEGFR-3, provoquant une désorganisation du réseau lymphatique. Cet impact sur les vaisseaux lymphatiques induit une perte de la fonction de ces vaisseaux en

supprimant leur capacité de drainage des fluides et des lipides laissant donc ces composés s'accumuler dans les tissus.

Ces découvertes mettent en lumière la nécessité de développer de nouveaux traitements efficaces contre le cancer du sein tout en ayant un impact limité sur le réseau lymphatique.

## DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

L'induction de la lymphangiogenèse lors de processus pathologiques (cancer, inflammation) est un phénomène bien connu, de même que la corrélation de cette croissance de nouveaux vaisseaux lymphatiques avec l'augmentation de l'expression des VEGF-C et -D. Néanmoins, les mécanismes moléculaires permettant la synthèse de ces facteurs sont encore mal connus, la plupart des stress cellulaires inhibant la traduction globale des protéines cellulaires en agissant sur la coiffe des ARNm.

Mes travaux de thèse ont contribué à l'identification d'une structure IRES dans la région 5'NT de l'ARNm du principal facteur lymphangiogénique : le VEGF-C. Cet IRES assure la régulation de la traduction du VEGF-C en conditions hypoxiques selon un mécanisme de traduction indépendant de la coiffe. Les vaisseaux lymphatiques étant eux-mêmes en hypoxie, la mise en évidence de ce mécanisme d'expression permet d'expliquer le lien déjà constaté entre stress hypoxique, progression tumorale et lymphangiogenèse. Lorsqu'une cellule tumorale se retrouve en hypoxie, elle va s'adapter en passant d'une traduction coiffe-dépendante du VEGF-C à une traduction IRES-dépendante, le VEGF-C ainsi produit accélérant ensuite la lymphangiogenèse tumorale.

L'un des résultats majeurs de cette étude a été la découverte d'une activité de l'IRES du VEGF-C très supérieure dans les cellules tumorales ayant disséminées dans les ganglions tumorales par rapport aux cellules composant la tumeur primaire. Etant donné que les tumeurs sont composées d'une alternance de zones normoxiques et hypoxiques tandis que les vaisseaux et les ganglions lymphatiques sont soumis à une sévère hypoxie, ce résultat confirme l'importance du contrôle exercé par l'hypoxie sur le niveau d'activation de l'IRES du VEGF-C.

Néanmoins, les acteurs impliqués dans l'activation hypoxique de la traduction IRES dépendante restent encore à identifier. En effet, mes travaux ont contribué à montrer que cette activation de l'IRES du VEGF-C était indépendante de HIF1- $\alpha$ , principal facteur de réponse cellulaire à l'hypoxie et le ou les ITAF(s) responsable(s) de l'activation de cet IRES n'ont pu être identifié(s). Le promoteur du VEGF-C ne



comportant pas de HRE, une intervention d'un autre facteur de transcription de la même famille tel que HIF2 semble également peu probable. Cependant, l'hypoxie induit la synthèse de nombreux autres facteurs de transcription (notamment ATF4 dont l'importance dans le processus tumoral a déjà été démontrée [284]) qui pourraient induire la transcription d'un ITAF de l'IRES du VEGF-C. Il est également envisageable que ces ITAFs soient directement sensibles à la concentration en oxygène intracellulaire : de façon inverse aux prolyl-hydroxylases qui utilisent l'O<sub>2</sub> comme cofacteur, l'oxygène aurait une action inhibitrice sur ces ITAFs abolie lors de l'hypoxie. De plus l'hypoxie diminue la synthèse protéique globale principalement en inhibant mTORC1 [285]. Là encore l'hypothèse d'un inhibiteur de l'ITAF de l'IRES du VEGF-C synthétisé en normoxie mais dont la synthèse est stoppée en hypoxie peut être envisagée. Un lien étroit a également été montré entre hypoxie, réponse au stress lié à l'accumulation de protéines mal repliées (réponse UPR) et progression tumorale. L'hypoxie active en effet les protéines chaperonnes PERK et IRE1 dont l'expression a pu être directement corrélée à la survie et la croissance tumorale [286]. Ces chaperonnes pourraient agir non pas sur l'expression d'un éventuel ITAF de l'IRES de VEGF-C mais sur sa conformation pour le faire passer d'une forme inactive en normoxie à une forme active spécifiquement en hypoxie.

Outre leur lien avec l'hypoxie, les éventuels ITAFs de l'IRES du VEGF-C semblent être intimement lié au processus tumoral. Nous avons en effet réalisé des transductions de fibroblastes à l'aide des vecteurs bicistroniques décrits dans cette étude (données non présentées) et avons mis en évidence une traduction IRES-dépendante présente à un niveau basal mais non activée par l'hypoxie dans ces cellules. Même si il serait nécessaire de tester un grand nombre de lignées cellulaires différentes pour l'affirmer ce résultat tend néanmoins à montrer que l'expression ou l'activation des ITAFs de l'IRES du VEGF-C semble aller de pair avec le développement tumoral. Ceci est d'autant plus important qu'alors que les IRES, du fait de la difficulté d'agir spécifiquement sur un ARNm, ne constituent pas une cible thérapeutique aisée, la nature protéique de leurs ITAFs permet un ciblage plus classique et fait d'eux des cibles de choix dans le cadre d'une stratégie thérapeutique.

Mes travaux de thèse ont également permis de découvrir la présence d'un élément IRES sur l'ARNm de l'autre facteur lymphangiogénique majeur : le VEGF-D.

Contrairement au VEGF-C, l'IRES du VEGF-D est activé par un stress thermique et présente une forte spécificité d'activation puisque son activation n'est retrouvée que dans une lignée de tumeur mammaire métastatique.

En plus de l'IRES, nous avons cette fois pu identifier également l'ITAF responsable de sa régulation : la nucléoline. Si la fixation de la nucléoline sur l'IRES du VEGF-D et son rôle direct dans sa capacité à initier la traduction, son mécanisme d'action sur l'IRES reste encore à déterminer. L'analyse de la structure de la région 5'NT de l'ARNm du VEGF-D nous a révélé deux structures alternatives mais nous n'avons pu établir si la fixation de l'ITAF sur l'IRES déclenchait le passage d'une structure « inactive » à une structure « active » pour initier la traduction ou si l'IRES modifiait spontanément sa structure en conditions de stress facilitant ainsi la fixation de l'ITAF.

La fonctionnalité de cet IRES a pu être validée *in vivo* mais uniquement dans un contexte tumoral. Etant donné les liens étroits qui unissent le VEGF-D, les vaisseaux lymphatiques et l'inflammation (régulation par le VEGF-D des prostaglandines produites par les vaisseaux collecteurs) il serait donc intéressant d'analyser la régulation de la traduction IRES-dépendante du VEGF-D dans des cellules de l'immunité (notamment dans les macrophages, responsables d'une forte synthèse de facteurs lymphangiogéniques) afin d'évaluer son éventuelle implication dans la lymphangiogenèse associée à l'inflammation. Sachant qu'une lymphangiogenèse accrue est associée à nombre de pathologies inflammatoires chroniques (psoriasis, polyarthrite rhumatoïde), connaître le niveau d'activation de l'IRES du VEGF-D dans un contexte inflammatoire et cibler son ITAF pourrait permettre de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques pour ces pathologies. En effet, un inhibiteur de la nucléoline étant actuellement en développement (phase2 [287]), si cette protéine jouait également un rôle d'ITAF pour l'IRES du VEGF-D dans les pathologies inflammatoires chroniques, ce traitement représenterait une nouvelle solution thérapeutique à la fois pour ces pathologies et dans le cadre du développement tumoral.

L'étude de la régulation de l'expression de ces deux facteurs lymphangiogéniques a également permis de mettre en évidence, qu'en condition de stress, l'augmentation de l'expression due à l'activation de la traduction IRES-dépendante était associée à une diminution de la quantité d'ARNm, un phénomène déjà observé pour le FGF-2

[249]. Que cette diminution de la quantité d'ARNm soit due à une diminution de la transcription ou à une augmentation de la dégradation des ARNm reste encore à déterminer, néanmoins ces résultats permettent de souligner la nécessité, lors d'une étude de l'expression d'une protéine, d'identifier précisément les régulations traductionnelles et d'éviter d'établir des liens directs entre modification de la quantité d'un ARNm donné et niveau d'expression de la protéine correspondante.

La découverte de ces éléments IRES en tant que régulateurs clés de l'expression des facteurs lymphangiogéniques nous permet d'envisager de nouvelles solutions thérapeutiques anticancéreuses. Identifier et inhiber les ITAFs responsables de l'activation de ces IRES permettra de bloquer les capacités d'adaptation des cellules tumorales aux stress cellulaires subis lors de la carcinogenèse et d'inhiber la lymphangiogenèse tumorale. Au vu des liens maintenant clairement établis entre développement des vaisseaux lymphatiques, dissémination métastatique et mauvais pronostic de survie, cibler la lymphangiogenèse tumorale semble être une stratégie d'avenir pour les traitements anti-tumoraux. De plus, les IRES sont présents sur les ARNm de nombreux facteurs de croissance (VEGF-A, FGF2 et PDGF2), de protéines anti ou pro-apoptotiques (XIAP/Apaf1) [244, 249, 288], ainsi que sur des facteurs de transcription clés pour la signalisation cellulaire (c-myc, HIF1- $\alpha$ , c-Jun, Smad5) et, de façon intéressante, également sur des acteurs majeurs de la traduction coiffe-dépendante (eIF4G). Inhiber leur activation au cours du processus tumoral permettrait de cibler de façon directe plusieurs paramètres indispensables au développement tumoral (prolifération, résistance à l'apoptose). Deux stratégies peuvent être mises en œuvre pour cibler les IRES : lorsque les ITAFs sont identifiés l'utilisation d'anticorps bloquants ou d'inhibiteurs pharmacologiques permettra d'inhiber leur capacité à activer les IRES (cf rôle des AINS dans l'inhibition de la nucléoline, ITAF de l'IRES du VEGF-D). La structure tridimensionnelle des IRES étant indispensable à leur activité traductionnelle, l'utilisation d'aptamère ciblant directement l'IRES et bloquant la formation des conformations les plus actives permettra de cibler des IRES dont les ITAFs n'ont pas encore été identifiés.

Outre la lymphangiogenèse tumorale, je me suis intéressé au cours de ma thèse à l'étude du lymphoedème secondaire dû à la chirurgie associée au cancer du sein, principale cause de lymphoedèmes dans les pays industrialisés.

Dans un modèle murin spécialement développé pour cette étude, nous avons pu identifier une action protectrice du  $17\beta$ -estradiol (E2) sur l'endothélium lymphatique. Bien que l'existence de relations entre l'E2 et le système lymphatique ait été démontrée dans l'utérus, tout du moins chez l'animal [289], c'est la première fois qu'une telle régulation hormonale est détectée dans un autre tissu. En parallèle, nous avons constaté qu'une association de l'E2 avec un traitement au tamoxifène, le SERM le plus utilisé dans le traitement des cancers du sein hormono-dépendant, supprimait les effets bénéfiques induits par l'E2. Un traitement par le tamoxifène seul aggravait même le lymphœdème et ralentissant sa résorption. Ces résultats viennent apporter un rationnel supplémentaire aux prescriptions cliniques qui prévoient d'utiliser, dans la majorité des cas le tamoxifène sur des patientes pré-ménopausées : au vu de nos résultats une utilisation post-ménopause augmenterait d'autant plus les risques d'apparition d'œdème. De plus ces résultats permettent de mettre en évidence pour la première fois un facteur de risque pour le développement du lymphœdème autre que le procédé chirurgical. Même si le tamoxifène ne semble pas être le seul facteur de risque, le lymphœdème ne touchant que 10 à 20% des femmes or 2/3 des cancers du sein sont hormono-dépendants et donc potentiellement traités par le tamoxifène, cette étude permet d'ores et déjà de mettre en place une surveillance accrue pour les patientes ayant subi une mastectomie et une lymphadenectomie et ayant été traitées au tamoxifène. Ces résultats mettent également en lumière la nécessité de développer de nouveaux SERM afin de limiter les risques d'effets secondaires tout en maintenant l'efficacité anti-tumorale

A ce stade, les mécanismes moléculaires liés à ces régulations hormonales restent encore à déterminer. Les effets protecteurs de l'estradiol semblent passer par une activation de l'expression de Lyve-1 et du VEGFR-3, surexpression abolie par le traitement au tamoxifène. Etant donné que, dans le cas de l'endothélium lymphatique, le récepteur impliqué dans les voies de signalisation induites par l'E2 et le tamoxifène semble être le récepteur ER $\alpha$ , l'explication des différents effets de l'E2 et du tamoxifène peut résider dans leur différence de liaisons aux domaines trans-activateurs AF1 et AF2 d'ER $\alpha$ . Contrairement à l'estradiol qui activera les deux domaines, le tamoxifène, agoniste partiel d'ER $\alpha$  dans la peau, n'est capable d'activer que le domaine AF1 et n'induit donc pas les mêmes voies de signalisation lors de sa fixation au récepteur. De plus, le tamoxifène dispose de récepteurs totalement



différents des récepteurs aux œstrogènes : les AEBS (AntiEstrogen Binding Site) [290] lui permettant d'induire des voies de signalisation complètement différentes de celles activées par l'interaction E2-ER de façon spécifique.

A l'heure actuelle aucun traitement n'est disponible pour le lymphœdème secondaire. Néanmoins, nos deux études réalisées sur les facteurs de croissance lymphangiogéniques peuvent nous permettre d'envisager une approche thérapeutique. L'utilisation de lentivecteurs multicistroniques intégrant non plus des gènes rapporteurs mais bien les ORFs des VEGF-C et -D séparées par leurs IRES respectifs nous permettrait, à l'aide d'un seul vecteur, de synthétiser ces facteurs localement et à long terme pour restaurer le réseau lymphatique et ainsi résorber le lymphœdème. Dans le cadre du lymphœdème primaire, utiliser les deux facteurs de façon synergique permettra d'augmenter à la fois la lymphangiogenèse et la dilatation des vaisseaux lymphatiques pour avoir un effet thérapeutique optimal. Si l'utilisation du VEGF-C pourrait paraître problématique dans ce cas de figure, une lymphangiogenèse accrue présentant un risque accru de métastases si des cellules tumorales sont encore présentes malgré la mastectomie et la lymphadenectomie, l'utilisation du VEGF-D qui participe davantage à la dilatation des vaisseaux qu'à leur prolifération pourrait permettre d'améliorer la fonction de drainage des vaisseaux tout en réduisant le risque de dissémination métastatique.

# BIBLIOGRAPHIE

1. K uchler, A.M., et al., *Development of the Zebrafish Lymphatic System Requires Vegfc Signaling*. Current Biology, 2006. **16**(12): p. 1244-1248.
2. Ny, A., et al., *A genetic Xenopus laevis tadpole model to study lymphangiogenesis*. Nat Med, 2005. **11**(9): p. 998-1004.
3. Jeltsch, M., et al., *Genesis and pathogenesis of lymphatic vessels*. Cell and Tissue Research, 2003. **314**(1): p. 69-84.
4. Louveau, A., et al., *Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels*. Nature, 2015. **523**(7560): p. 337-341.
5. E.T Withington Tr., H., *On Joints*. Vol. Vol3. 1984: Harvard University Press, Cambridge, MA.
6. Galen, M.T.G.M.T., *On the Usefulness of the Parts of the Body* 1968, Ithaca, NY: Cornell University Press.
7. Dobson, J.F., *Herophilus of Alexandria*. Proceedings of the Royal Society of Medicine, 1925. **18**(Sect Hist Med): p. 19-32.
8. H. Von Staden Tr., H., *The Art of Medicine in Early Alexandria*. Herophilus. 1989, Cambridge, UK: Cambridge University Press. 666.
9. Loukas, M., et al., *The lymphatic system: A historical perspective*. Clinical Anatomy, 2011. **24**(7): p. 807-816.
10. Albertine, K.H., L.M. Fox, and C.C.C. O'Morchoe, *The morphology of canine lymphatic valves*. The Anatomical Record, 1982. **202**(4): p. 453-461.
11. Cockett, A.T.K., *Lymphatic network of kidney I. anatomic and physiologic considerations*. Urology, 1977. **9**(2): p. 125-129.
12. Leak, L.V., et al., *Lymphatic vessels of the mammalian heart*. The Anatomical Record, 1978. **191**(2): p. 183-201.
13. Oliver, G., et al., *Prox 1, a prospero-related homeobox gene expressed during mouse development*. Mechanisms of Development, 1993. **44**(1): p. 3-16.
14. Wigle, J.T. and G. Oliver, *Prox1 Function Is Required for the Development of the Murine Lymphatic System*. Cell, 1999. **98**(6): p. 769-778.
15. Wigle, J.T., et al., *An essential role for Prox1 in the induction of the lymphatic endothelial cell phenotype*. The EMBO Journal, 2002. **21**(7): p. 1505-1513.
16. Johnson, N.C., et al., *Lymphatic endothelial cell identity is reversible and its maintenance requires Prox1 activity*. Genes & Development, 2008. **22**(23): p. 3282-3291.
17. Hong, Y.-K., et al., *Prox1 is a master control gene in the program specifying lymphatic endothelial cell fate*. Developmental Dynamics, 2002. **225**(3): p. 351-357.
18. Petrova, T.V., et al., *Lymphatic endothelial reprogramming of vascular endothelial cells by the Prox-1 homeobox transcription factor*. The EMBO Journal, 2002. **21**(17): p. 4593-4599.

19. Baxter, S.A., et al., *Regulation of the lymphatic endothelial cell cycle by the PROX1 homeodomain protein*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2011. **1813**(1): p. 201-212.
20. Aprelikova, O., et al., *FLT4, a Novel Class III Receptor Tyrosine Kinase in Chromosome 5q33-qter*. *Cancer Research*, 1992. **52**(3): p. 746-748.
21. Pajusola, K., et al., *FLT4 Receptor Tyrosine Kinase Contains Seven Immunoglobulin-like Loops and Is Expressed in Multiple Human Tissues and Cell Lines*. *Cancer Research*, 1992. **52**(20): p. 5738-5743.
22. Pajusola, K., et al., *Signalling properties of FLT4, a proteolytically processed receptor tyrosine kinase related to two VEGF receptors*. *Oncogene*, 1994. **12**: p. 3545-55.
23. Kaipainen, A., et al., *Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1995. **92**(8): p. 3566-3570.
24. Tammela, T., et al., *VEGFR-3 controls tip to stalk conversion at vessel fusion sites by reinforcing Notch signalling*. *Nature Cell Biology*, 2011. **13**(10): p. 1202-1213.
25. Banerji, S., et al., *LYVE-1, a New Homologue of the CD44 Glycoprotein, Is a Lymph-specific Receptor for Hyaluronan*. *The Journal of Cell Biology*, 1999. **144**(4): p. 789-801.
26. Knudson, W., E. Bartnik, and C.B. Knudson, *Assembly of pericellular matrices by COS-7 cells transfected with CD44 lymphocyte-homing receptor genes*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1993. **90**(9): p. 4003-4007.
27. Knudson, W. and C.B. Knudson, *Assembly of a chondrocyte-like pericellular matrix on non-chondrogenic cells. Role of the cell surface hyaluronan receptors in the assembly of a pericellular matrix*. *Journal of Cell Science*, 1991. **99**(2): p. 227-235.
28. Ponta, H., L. Sherman, and P.A. Herrlich, *CD44: From adhesion molecules to signalling regulators*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(1): p. 33-45.
29. Slevin, M., et al., *Hyaluronan-mediated angiogenesis in vascular disease: Uncovering RHAMM and CD44 receptor signaling pathways*. *Matrix Biology*, 2007. **26**(1): p. 58-68.
30. Yu, M., et al., *The cooperative role of S1P3 with LYVE-1 in LMW-HA-induced lymphangiogenesis*. *Experimental Cell Research*, 2015. **336**(1): p. 150-157.
31. Fraser, J.R., et al., *Uptake and degradation of hyaluronan in lymphatic tissue*. *Biochemical Journal*, 1988. **256**(1): p. 153-158.
32. JR, F. and L. TC, *Turnover and metabolism of hyaluronan*. *CIBA Foundation Symposium*, 1989(143): p. 41-53.
33. Schledzewski, K., et al., *Lymphatic endothelium-specific hyaluronan receptor LYVE-1 is expressed by stabilin-1+, F4/80+, CD11b+ macrophages in malignant tumours and wound healing tissue in vivo and in bone marrow*

- cultures in vitro: implications for the assessment of lymphangiogenesis.* The Journal of Pathology, 2006. **209**(1): p. 67-77.
34. T, W., et al., *LYVE-1 expression on high endothelial venules (HEVs) of lymph nodes.* Lymphology, 2005. **3**(38): p. 107-10.
  35. Breiteneder-Geleff, S., et al., *Angiosarcomas Express Mixed Endothelial Phenotypes of Blood and Lymphatic Capillaries: Podoplanin as a Specific Marker for Lymphatic Endothelium.* The American Journal of Pathology, 1999. **154**(2): p. 385-394.
  36. Navarro, A., et al., *T1 $\alpha$ /podoplanin is essential for capillary morphogenesis in lymphatic endothelial cells.* American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 2008. **295**(4): p. L543-L551.
  37. Navarro, A., et al., *Polarized migration of lymphatic endothelial cells is critically dependent on podoplanin regulation of Cdc42.* American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology, 2010. **300**(1): p. L32-L42.
  38. Pollitt, A.Y., et al., *Syk and Src Family Kinases Regulate C-type Lectin Receptor 2 (CLEC-2)-mediated Clustering of Podoplanin and Platelet Adhesion to Lymphatic Endothelial Cells.* Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(52): p. 35695-35710.
  39. B, P., et al., *Significance of podoplanin expression in cancer-associated fibroblasts : a comprehensive review.* Int J Oncol, 2013. **6**(42): p. 1849-57.
  40. Sabin, F.R., *On the origin of the lymphatic system from the veins and the development of the lymph hearts and thoracic duct in the pig.* American Journal of Anatomy, 1902. **1**(3): p. 367-389.
  41. Sabin, F.R., *On the development of the superficial lymphatics in the skin of the pig.* American Journal of Anatomy, 1904. **3**(2): p. 183-195.
  42. Huntington, G.S. and C.F.W. McClure, *The anatomy and development of the jugular lymph sacs in the domestic cat (Felis domestica).* American Journal of Anatomy, 1910. **10**(1): p. 177-312.
  43. Schneider, M., et al., *Lymphangioblasts in the avian wing bud.* Developmental Dynamics, 1999. **216**(4-5): p. 311-319.
  44. Wilting, J., et al., *Lymphangioblasts in Embryonic Lymphangiogenesis.* Lymphatic Research and Biology, 2003. **1**(1): p. 33-40.
  45. Francois, M., et al., *Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice.* Nature, 2008. **456**(7222): p. 643-647.
  46. Lee, S., et al., *Prox1 physically and functionally interacts with COUP-TFII to specify lymphatic endothelial cell fate.* Blood, 2008. **113**(8): p. 1856-1859.
  47. Yamazaki, T., et al., *COUP-TFII regulates the functions of Prox1 in lymphatic endothelial cells through direct interaction.* Genes to Cells, 2009. **14**(3): p. 425-434.
  48. Karkkainen, et al., *Vascular Endothelial Growth Factor C is required for sprouting of the first lymphatic vessels from embryonic veins.* Nat Immunol, 2003(5): p. 74-80.



49. Yang, Y., et al., *Lymphatic endothelial progenitors bud from the cardinal vein and intersomitic vessels in mammalian embryos*. *Blood*, 2012. **120**(11): p. 2340-2348.
50. Hägerling, R., et al., *A novel multistep mechanism for initial lymphangiogenesis in mouse embryos based on ultramicroscopy*. *The EMBO Journal*, 2013. **32**(5): p. 629-644.
51. Srinivasan, R.S. and G. Oliver, *Prox1 dosage controls the number of lymphatic endothelial cell progenitors and the formation of the lymphovenous valves*. *Genes & Development*, 2011. **25**(20): p. 2187-2197.
52. Bertozzi, C.C., et al., *Platelets regulate lymphatic vascular development through CLEC-2–SLP-76 signaling*. *Blood*, 2010. **116**(4): p. 661-670.
53. Uhrin, P., et al., *Novel function for blood platelets and podoplanin in developmental separation of blood and lymphatic circulation*. *Blood*, 2010. **115**(19): p. 3997-4005.
54. Abtahian, F., et al., *Regulation of Blood and Lymphatic Vascular Separation by Signaling Proteins SLP-76 and Syk*. *Science*, 2003. **299**(5604): p. 247-251.
55. Norrmén, C., et al., *FOXC2 controls formation and maturation of lymphatic collecting vessels through cooperation with NFATc1*. *The Journal of Cell Biology*, 2009. **185**(3): p. 439-457.
56. Mäkinen, T., et al., *PDZ interaction site in ephrinB2 is required for the remodeling of lymphatic vasculature*. *Genes & Development*, 2005. **19**(3): p. 397-410.
57. Dellinger, M., et al., *Defective remodeling and maturation of the lymphatic vasculature in Angiopoietin-2 deficient mice*. *Developmental Biology*, 2008. **319**(2): p. 309-320.
58. Gale, N.W., et al., *Angiopoietin-2 Is Required for Postnatal Angiogenesis and Lymphatic Patterning, and Only the Latter Role Is Rescued by Angiopoietin-1*. *Developmental Cell*, 2002. **3**(3): p. 411-423.
59. Mouta-Bellum, C., et al., *Organ-specific lymphangiectasia, arrested lymphatic sprouting, and maturation defects resulting from gene-targeting of the PI3K regulatory isoforms p85 $\alpha$ , p55 $\alpha$ , and p50 $\alpha$* . *Developmental Dynamics*, 2009. **238**(10): p. 2670-2679.
60. Zhou, F., et al., *Akt/Protein Kinase B Is Required for Lymphatic Network Formation, Remodeling, and Valve Development*. *The American Journal of Pathology*, 2010. **177**(4): p. 2124-2133.
61. Alitalo, K., T. Tammela, and T.V. Petrova, *Lymphangiogenesis in development and human disease*. *Nature*, 2005. **438**(7070): p. 946-953.
62. R, S., et al., *An immunological correlation between the anchoring filaments of initial lymph vessels and the neighboring elastic fibers : a unified morphofunctional concept*. *Lymphology*, 1997(4): p. 194-202.
63. Leak, L.V. and J.F. Burke, *ULTRASTRUCTURAL STUDIES ON THE LYMPHATIC ANCHORING FILAMENTS*. *The Journal of Cell Biology*, 1968. **36**(1): p. 129-149.

64. Baluk, P., et al., *Functionally specialized junctions between endothelial cells of lymphatic vessels*. The Journal of Experimental Medicine, 2007. **204**(10): p. 2349-2362.
65. Yao, L.-C., et al., *Plasticity of Button-Like Junctions in the Endothelium of Airway Lymphatics in Development and Inflammation*. The American Journal of Pathology, 2012. **180**(6): p. 2561-2575.
66. G, S., et al., *The structure of superficial lymphatics in the human thigh : precollectors*. Anat Rec, 1997. **1**(247): p. 53-62.
67. Bazigou, E., et al., *Genes regulating lymphangiogenesis control venous valve formation and maintenance in mice*. The Journal of Clinical Investigation, 2011. **121**(8): p. 2984-2992.
68. Sabine, A., et al., *Mechanotransduction, PROX1, and FOXC2 Cooperate to Control Connexin37 and Calcineurin during Lymphatic-Valve Formation*. Developmental Cell, 2012. **22**(2): p. 430-445.
69. Tatin, F., et al., *Planar Cell Polarity Protein Celsr1 Regulates Endothelial Adherens Junctions and Directed Cell Rearrangements during Valve Morphogenesis*. Developmental Cell, 2013. **26**(1): p. 31-44.
70. Bazigou, E., et al., *Integrin- $\alpha$ 9 Is Required for Fibronectin Matrix Assembly during Lymphatic Valve Morphogenesis*. Developmental Cell, 2009. **17**(2): p. 175-186.
71. Adair, T.H. and A.C. Guyton, *Modification of lymph by lymph nodes. II. Effect of increased lymph node venous blood pressure*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 1983. **245**(4): p. H616-H622.
72. Adair, T.H. and A.C. Guyton, *Modification of lymph by lymph nodes. III. Effect of increased lymph hydrostatic pressure*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 1985. **249**(4): p. H777-H782.
73. Adair, T.H., et al., *Quantitation of changes in lymph protein concentration during lymph node transit*. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, 1982. **243**(3): p. H351-H359.
74. Randolph, G.J., V. Angeli, and M.A. Swartz, *Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 617-628.
75. Drayton, D.L., et al., *Lymphoid organ development: from ontogeny to neogenesis*. Nat Immunol, 2006. **7**(4): p. 344-353.
76. Földi, M. and R. Strößenreuther, *Chapter 1 - Anatomy of the Lymph Vessel System*, in *Foundations of Manual Lymph Drainage (Third Edition)*, M.F. Strößenreuther, Editor. 2005, Mosby: Saint Louis. p. 1-15.
77. Földi, M. and R. Strößenreuther, *Chapter 2 - Interstitial Fluid and Lymph*, in *Foundations of Manual Lymph Drainage (Third Edition)*, M.F. Strößenreuther, Editor. 2005, Mosby: Saint Louis. p. 16-27.
78. Földi, M. and R. Strößenreuther, *Chapter 3 - Lymph Formation and Lymph Flow: "Physiological Lymph Drainage"*, in *Foundations of Manual Lymph Drainage (Third Edition)*, M.F. Strößenreuther, Editor. 2005, Mosby: Saint Louis. p. 28-37.

79. Zawieja, D.C., *Contractile Physiology of Lymphatics*. Lymphatic Research and Biology, 2009. **7**(2): p. 87-96.
80. Tammela, T. and K. Alitalo, *Lymphangiogenesis: Molecular Mechanisms and Future Promise*. Cell, 2010. **140**(4): p. 460-476.
81. Forster, R., A.C. Davalos-Missslitz, and A. Rot, *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 362-371.
82. Wick, N., et al., *Lymphatic Precollectors Contain a Novel, Specialized Subpopulation of Podoplaninlow, CCL27-Expressing Lymphatic Endothelial Cells*. The American Journal of Pathology, 2008. **173**(4): p. 1202-1209.
83. Salmi, M. and S. Jalkanen, *Cell-surface enzymes in control of leukocyte trafficking*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(10): p. 760-771.
84. Ledgerwood, L.G., et al., *The sphingosine 1-phosphate receptor 1 causes tissue retention by inhibiting the entry of peripheral tissue T lymphocytes into afferent lymphatics*. Nat Immunol, 2008. **9**(1): p. 42-53.
85. Pham, T.H.M., et al., *Lymphatic endothelial cell sphingosine kinase activity is required for lymphocyte egress and lymphatic patterning*. The Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(1): p. 17-27.
86. Schwab, S.R. and J.G. Cyster, *Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs*. Nat Immunol, 2007. **8**(12): p. 1295-1301.
87. Yoon, C.M., et al., *Sphingosine-1-phosphate promotes lymphangiogenesis by stimulating S1P1/Gi/PLC/Ca<sup>2+</sup> signaling pathways*. Blood, 2008. **112**(4): p. 1129-1138.
88. Bloom, B., I.L. Chaikoff, and W.O. Reinhardt, *Intestinal Lymph as Pathway for Transport of Absorbed Fatty Acids of Different Chain Lengths*. American Journal of Physiology -- Legacy Content, 1951. **166**(2): p. 451-455.
89. Harvey, N.L., *The Link between Lymphatic Function and Adipose Biology*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008. **1131**(1): p. 82-88.
90. Mattacks, C.A., D. Sadler, and C.M. Pond, *The cellular structure and lipid/protein composition of adipose tissue surrounding chronically stimulated lymph nodes in rats*. Journal of Anatomy, 2003. **202**(6): p. 551-561.
91. Reyne, Y., J. Nougues, and J.-P. Dulor, *Differentiation of rabbit adipocyte precursor cells in a serum-free medium*. In Vitro Cellular & Developmental Biology, 1989. **25**(8): p. 747-752.
92. Harvey, N.L., et al., *Lymphatic vascular defects promoted by Prox1 haploinsufficiency cause adult-onset obesity*. Nat Genet, 2005. **37**(10): p. 1072-1081.
93. Shimizu, Y., et al., *Adiponectin-Mediated Modulation of Lymphatic Vessel Formation and Lymphedema*. Journal of the American Heart Association: Cardiovascular and Cerebrovascular Disease, 2013. **2**(5): p. e000438.
94. Makki, K., P. Froguel, and I. Wolowczuk, *Adipose Tissue in Obesity-Related Inflammation and Insulin Resistance: Cells, Cytokines, and Chemokines*. ISRN Inflammation, 2013. **2013**: p. 12.

95. Samad, F., et al., *Elevated expression of transforming growth factor-beta in adipose tissue from obese mice*. *Molecular Medicine*, 1997. **3**(1): p. 37-48.
96. Voros, G., et al., *Modulation of Angiogenesis during Adipose Tissue Development in Murine Models of Obesity*. *Endocrinology*, 2005. **146**(10): p. 4545-4554.
97. Bäckhed, F., et al., *Postnatal lymphatic partitioning from the blood vasculature in the small intestine requires fasting-induced adipose factor*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104**(2): p. 606-611.
98. Warren, A.G., et al., *Lymphedema: A Comprehensive Review*. *Annals of Plastic Surgery*, 2007. **59**(4).
99. Connell, F.C., et al., *Analysis of the coding regions of VEGFR3 and VEGFC in Milroy disease and other primary lymphoedemas*. *Human Genetics*, 2009. **124**(6): p. 625-631.
100. Maby-El Hajjami, H. and T. Petrova, *Developmental and pathological lymphangiogenesis: from models to human disease*. *Histochemistry and Cell Biology*, 2008. **130**(6): p. 1063-1078.
101. Mellor, R.H., et al., *Mutations in FOXC2 Are Strongly Associated With Primary Valve Failure in Veins of the Lower Limb*. *Circulation*, 2007. **115**(14): p. 1912-1920.
102. Petrova, T.V., et al., *Defective valves and abnormal mural cell recruitment underlie lymphatic vascular failure in lymphedema distichiasis*. *Nat Med*, 2004. **10**(9): p. 974-981.
103. Huang, X.Z., et al., *Fatal Bilateral Chylothorax in Mice Lacking the Integrin  $\alpha 9\beta 1$* . *Molecular and Cellular Biology*, 2000. **20**(14): p. 5208-5215.
104. Ma, G.-C., et al., *A recurrent ITGA9 missense mutation in human fetuses with severe chylothorax: possible correlation with poor response to fetal therapy*. *Prenatal Diagnosis*, 2008. **28**(11): p. 1057-1063.
105. Irrthum, A., et al., *Mutations in the Transcription Factor Gene SOX18 Underlie Recessive and Dominant Forms of Hypotrichosis-Lymphedema-Telangiectasia*. *American Journal of Human Genetics*, 2003. **72**(6): p. 1470-1478.
106. Pennisi, D., et al., *Mutations in Sox18 underlie cardiovascular and hair follicle defects in ragged mice*. *Nat Genet*, 2000. **24**(4): p. 434-437.
107. Van Balkom, I.D.C., et al., *Lymphedema–lymphangiectasia–mental retardation (Hennekam) syndrome: A review*. *American Journal of Medical Genetics*, 2002. **112**(4): p. 412-421.
108. Doffinger, R., et al., *X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency is caused by impaired NF-[kappa]B signaling*. *Nat Genet*, 2001. **27**(3): p. 277-285.
109. Radhakrishnan, K. and S.G. Rockson, *The Clinical Spectrum of Lymphatic Disease*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008. **1131**(1): p. 155-184.



110. Pfarr, K.M., et al., *Filariasis and lymphoedema*. *Parasite Immunology*, 2009. **31**(11): p. 664-672.
111. Hoerauf, A., *New strategies to combat filariasis*. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2006. **4**(2): p. 211-222.
112. Stanton, A.W.B., et al., *Recent Advances in Breast Cancer-Related Lymphedema of the Arm: Lymphatic Pump Failure and Predisposing Factors*. *Lymphatic Research and Biology*, 2009. **7**(1): p. 29-45.
113. Clark, B., J. Sitzia, and W. Harlow, *Incidence and risk of arm oedema following treatment for breast cancer: a three-year follow-up study*. *QJM*, 2005. **98**(5): p. 343-348.
114. Bertheuil, N., et al., *Inguinal lymphadenectomy for stage III melanoma: A comparative study of two surgical approaches at the onset of lymphoedema*. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 2015. **41**(2): p. 215-219.
115. F, B., et al., *Surgical prevention and treatment of lymphedema after lymph node dissection in patients with cutaneous melanoma*. *Lymphology*, 2013. **46**(1): p. 20-26.
116. Greene, A.K., F.D. Grant, and S.A. Slavin, *Lower-Extremity Lymphedema and Elevated Body-Mass Index*. *New England Journal of Medicine*, 2012. **366**(22): p. 2136-2137.
117. Killars, R.C., et al., *Biomechanical Properties of the Skin in Patients with Breast Cancer-Related Lymphedema Compared to Healthy Individuals*. *Lymphatic Research and Biology*, 2015. **13**(3): p. 215-221.
118. Mayrovitz, H.N., D.N. Weingrad, and S. Davey, *Local Tissue Water in At-Risk and Contralateral Forearms of Women with and without Breast Cancer Treatment-Related Lymphedema*. *Lymphatic Research and Biology*, 2009. **7**(3): p. 153-158.
119. Achen, M.G., B.K. McColl, and S.A. Stacker, *Focus on lymphangiogenesis in tumor metastasis*. *Cancer Cell*, 2005. **7**(2): p. 121-127.
120. Karpanen, T. and K. Alitalo, *Molecular Biology and Pathology of Lymphangiogenesis*. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 2008. **3**(1): p. 367-397.
121. He, Y., et al., *Preexisting Lymphatic Endothelium but not Endothelial Progenitor Cells Are Essential for Tumor Lymphangiogenesis and Lymphatic Metastasis*. *Cancer Research*, 2004. **64**(11): p. 3737-3740.
122. Padera, T.P., et al., *Lymphatic Metastasis in the Absence of Functional Intratumor Lymphatics*. *Science*, 2002. **296**(5574): p. 1883-1886.
123. Wong, S.Y., et al., *Tumor-Secreted Vascular Endothelial Growth Factor-C Is Necessary for Prostate Cancer Lymphangiogenesis, but Lymphangiogenesis Is Unnecessary for Lymph Node Metastasis*. *Cancer Research*, 2005. **65**(21): p. 9789-9798.
124. Cao, R., et al., *PDGF-BB induces intratumoral lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis*. *Cancer Cell*, 2004. **6**(4): p. 333-345.
125. I, A. and C. G, *Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in development and cancer*. *Int J Dev Biol*, 2011(55): p. 483-494.

126. Tobler, N.E. and M. Detmar, *Tumor and lymph node lymphangiogenesis—impact on cancer metastasis*. Journal of Leukocyte Biology, 2006. **80**(4): p. 691-696.
127. Hoshida, T., et al., *Imaging Steps of Lymphatic Metastasis Reveals That Vascular Endothelial Growth Factor-C Increases Metastasis by Increasing Delivery of Cancer Cells to Lymph Nodes: Therapeutic Implications*. Cancer Research, 2006. **66**(16): p. 8065-8075.
128. Ruddell, A., et al., *Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging of Tumor-Induced Lymph Flow*. Neoplasia (New York, N.Y.), 2008. **10**(7): p. 706-713.
129. Skobe, M., et al., *Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 192-198.
130. Stacker, S.A., et al., *VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics*. Nat Med, 2001. **7**(2): p. 186-191.
131. Mandriota, S.J., et al., *Vascular endothelial growth factor-C-mediated lymphangiogenesis promotes tumour metastasis*. The EMBO Journal, 2001. **20**(4): p. 672-682.
132. Joyce, J.A. and J.W. Pollard, *Microenvironmental regulation of metastasis*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(4): p. 239-252.
133. Koyama, H., et al., *Significance of Tumor-Associated Stroma in Promotion of Intratumoral Lymphangiogenesis: Pivotal Role of a Hyaluronan-Rich Tumor Microenvironment*. The American Journal of Pathology, 2008. **172**(1): p. 179-193.
134. Kim, M., et al., *CXCR4 Signaling Regulates Metastasis of Chemoresistant Melanoma Cells by a Lymphatic Metastatic Niche*. Cancer Research, 2010. **70**(24): p. 10411-10421.
135. Shields, J.D., et al., *Induction of Lymphoidlike Stroma and Immune Escape by Tumors That Express the Chemokine CCL21*. Science, 2010. **328**(5979): p. 749-752.
136. Garmy-Susini, B., et al., *PI3K $\alpha$  activates integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 1 to establish a metastatic niche in lymph nodes*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2013. **110**(22): p. 9042-9047.
137. Harrell, M.I., B.M. Iritani, and A. Ruddell, *Tumor-Induced Sentinel Lymph Node Lymphangiogenesis and Increased Lymph Flow Precede Melanoma Metastasis*. The American Journal of Pathology, 2007. **170**(2): p. 774-786.
138. Hirakawa, S., et al., *VEGF-C–induced lymphangiogenesis in sentinel lymph nodes promotes tumor metastasis to distant sites*. Blood, 2007. **109**(3): p. 1010-1017.
139. Hirakawa, S., et al., *VEGF-A induces tumor and sentinel lymph node lymphangiogenesis and promotes lymphatic metastasis*. The Journal of Experimental Medicine, 2005. **201**(7): p. 1089-1099.
140. Contassot, E., et al., *Lymph node tumor metastases: more susceptible than primary tumors to CD8<sup>+</sup> T-cell immune destruction*. Trends in Immunology, 2009. **30**(12): p. 569-573.

141. Mesri, E.A., E. Cesarman, and C. Boshoff, *Kaposi's sarcoma and its associated herpesvirus*. Nat Rev Cancer, 2010. **10**(10): p. 707-719.
142. Hong, Y.-K., et al., *Lymphatic reprogramming of blood vascular endothelium by Kaposi sarcoma-associated herpesvirus*. Nat Genet, 2004. **36**(7): p. 683-685.
143. Wang, H.-W., et al., *Kaposi sarcoma herpesvirus-induced cellular reprogramming contributes to the lymphatic endothelial gene expression in Kaposi sarcoma*. Nat Genet, 2004. **36**(7): p. 687-693.
144. Weinberger, M.H., *Salt Sensitivity of Blood Pressure in Humans*. Hypertension, 1996. **27**(3): p. 481-490.
145. Machnik, A., et al., *Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism*. Nat Med, 2009. **15**(5): p. 545-552.
146. Wiig, H., et al., *Immune cells control skin lymphatic electrolyte homeostasis and blood pressure*. The Journal of Clinical Investigation, 2013. **123**(7): p. 2803-2815.
147. Glasgow, C.G., et al., *Involvement of Lymphatics in Lymphangioliomyomatosis*. Lymphatic Research and Biology, 2009. **7**(4): p. 221-228.
148. Pacheco-Rodriguez, G., et al., *Chemokine-Enhanced Chemotaxis of Lymphangioliomyomatosis Cells with Mutations in the Tumor Suppressor TSC2 Gene*. Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950), 2009. **182**(3): p. 1270-1277.
149. Yu, J.J., et al., *Estrogen promotes the survival and pulmonary metastasis of tuberin-null cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009. **106**(8): p. 2635-2640.
150. Carsillo, T., A. Astrinidis, and E.P. Henske, *Mutations in the tuberous sclerosis complex gene TSC2 are a cause of sporadic pulmonary lymphangioliomyomatosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000. **97**(11): p. 6085-6090.
151. Sato, T., et al., *Mutation analysis of the TSC1 and TSC2 genes in Japanese patients with pulmonary lymphangioliomyomatosis*. J Hum Genet, 2002. **47**(1): p. 20-28.
152. Glasgow, C.G., et al., *Lymphangioliomyomatosis (LAM): Molecular insights lead to targeted therapies*. Respiratory medicine, 2010. **104**(Suppl 1): p. S45-S58.
153. Radhakrishnan, K. and S.G. Rockson, *Gorham's Disease*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2008. **1131**(1): p. 203-205.
154. Hagendoorn, J., et al., *Platelet-derived growth factor receptor- $\beta$  in Gorham's disease*. Nature clinical practice. Oncology, 2006. **3**(12): p. 693-697.
155. Colucci, S., et al., *Gorham-Stout Syndrome: A Monocyte-Mediated Cytokine Propelled Disease*. Journal of Bone and Mineral Research, 2006. **21**(2): p. 207-218.

156. Baluk, P., et al., *TNF- $\alpha$  drives remodeling of blood vessels and lymphatics in sustained airway inflammation in mice*. The Journal of Clinical Investigation, 2009. **119**(10): p. 2954-2964.
157. Angeli, V., et al., *B Cell-Driven Lymphangiogenesis in Inflamed Lymph Nodes Enhances Dendritic Cell Mobilization*. Immunity, 2006. **24**(2): p. 203-215.
158. Baluk, P., et al., *Pathogenesis of persistent lymphatic vessel hyperplasia in chronic airway inflammation*. Journal of Clinical Investigation, 2005. **115**(2): p. 247-257.
159. Saban, M.R., et al., *Visualization of lymphatic vessels through NF- $\kappa$ B activity*. Blood, 2004. **104**(10): p. 3228-3230.
160. Flister, M.J., et al., *Inflammation induces lymphangiogenesis through up-regulation of VEGFR-3 mediated by NF- $\kappa$ B and Prox1*. Blood, 2010. **115**(2): p. 418-429.
161. Kataru, R.P., et al., *Critical role of CD11b<sup>+</sup> macrophages and VEGF in inflammatory lymphangiogenesis, antigen clearance, and inflammation resolution*. Blood, 2009. **113**(22): p. 5650-5659.
162. Kunstfeld, R., et al., *Induction of cutaneous delayed-type hypersensitivity reactions in VEGF-A transgenic mice results in chronic skin inflammation associated with persistent lymphatic hyperplasia*. Blood, 2004. **104**(4): p. 1048-1057.
163. E, K., K. S, and G. S, *Lymphatic vessels in the colonic mucosa in ulcerative colitis*. Lymphology, 2003(36): p. 52-61.
164. Zhang, Q., et al., *Increased lymphangiogenesis in joints of mice with inflammatory arthritis*. Arthritis Research & Therapy, 2007. **9**(6): p. R118-R118.
165. *Overexpression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in psoriasis*. The Journal of Experimental Medicine, 1994. **180**(3): p. 1141-1146.
166. Halin, C., et al., *VEGF-A produced by chronically inflamed tissue induces lymphangiogenesis in draining lymph nodes*. Blood, 2007. **110**(9): p. 3158-3167.
167. Paavonen, K., et al., *Vascular endothelial growth factors C and D and their VEGFR-2 and 3 receptors in blood and lymphatic vessels in healthy and arthritic synovium*. The Journal of Rheumatology, 2002. **29**(1): p. 39-45.
168. Polzer, K., et al., *Tumour necrosis factor blockade increases lymphangiogenesis in murine and human arthritic joints*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2008. **67**(11): p. 1610-1616.
169. Kerjaschki, D., et al., *Lymphatic endothelial progenitor cells contribute to de novo lymphangiogenesis in human renal transplants*. Nat Med, 2006. **12**(2): p. 230-234.
170. Nykänen, A.I., et al., *Targeting Lymphatic Vessel Activation and CCL21 Production by Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-3 Inhibition Has Novel Immunomodulatory and Antiarteriosclerotic Effects in Cardiac Allografts*. Circulation, 2010. **121**(12): p. 1413-1422.



171. C, C., et al., *Corneal lymphangiogenesis: evidence, mechanisms, and implications for corneal transplant immunology*. *Cornea*, 2003(22): p. 273-281.
172. Niederkorn, J.Y., *High risk corneal allografts and why they lose their immune privilege*. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 2010. **10**(5): p. 493-497.
173. Cursiefen, C., et al., *Lymphatic Vessels in Vascularized Human Corneas: Immunohistochemical Investigation Using LYVE-1 and Podoplanin*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2002. **43**(7): p. 2127-2135.
174. S, Y., D. MR, and T. T, *Draining lymph nodes play an essential role in alloimmunity generated in response to high-risk corneal transplantation*. *Cornea*, 2002(21): p. 405-409.
175. Dohlman, T.H., et al., *VEGF-trap Aflibercept Significantly Improves Long-term Graft Survival in High-risk Corneal Transplantation*. *Transplantation*, 2015. **99**(4).
176. Joukov, V., et al., *A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases*. *The EMBO Journal*, 1996. **15**(2): p. 290-298.
177. Chilov, D., et al., *Genomic Organization of Human and Mouse Genes for Vascular Endothelial Growth Factor C*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997. **272**(40): p. 25176-25183.
178. Schulte-Merker, S., A. Sabine, and T.V. Petrova, *Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease*. *The Journal of Cell Biology*, 2011. **193**(4): p. 607-618.
179. Joukov, V., et al., *Proteolytic processing regulates receptor specificity and activity of VEGF-C*. *The EMBO Journal*, 1997. **16**(13): p. 3898-3911.
180. Ichise, T., N. Yoshida, and H. Ichise, *H-, N- and Kras cooperatively regulate lymphatic vessel growth by modulating VEGFR3 expression in lymphatic endothelial cells in mice*. *Development*, 2010. **137**(6): p. 1003-1013.
181. Schubbert, S., et al., *Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome*. *Nat Genet*, 2006. **38**(3): p. 331-336.
182. Mäkinen, T., et al., *Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3*. *The EMBO Journal*, 2001. **20**(17): p. 4762-4773.
183. Liu, J., et al., *Vascular endothelial growth factor C enhances cervical cancer cell invasiveness via upregulation of galectin-3 protein*. *Gynecological Endocrinology*, 2014. **30**(6): p. 461-465.
184. Su, C.-M., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor-C Upregulates Cortactin and Promotes Metastasis of Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. *Annals of Surgical Oncology*, 2014. **21**(4): p. 767-775.
185. Wang, C.-A., et al., *Vascular endothelial growth factor C promotes breast cancer progression via a novel antioxidant mechanism that involves regulation of superoxide dismutase 3*. *Breast Cancer Research : BCR*, 2014. **16**(5): p. 462.

186. Song, W.-W., et al., *Expression of vascular endothelial growth factor C and anti-angiogenesis therapy in endometriosis*. International Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2014. **7**(11): p. 7752-7759.
187. Du, Q., et al., *Tumor necrosis factor- $\alpha$  promotes the lymphangiogenesis of gallbladder carcinoma through nuclear factor- $\kappa$ B-mediated upregulation of vascular endothelial growth factor-C*. Cancer Science, 2014. **105**(10): p. 1261-1271.
188. Min, Y., et al., *C/EBP- $\delta$  regulates VEGF-C autocrine signaling in lymphangiogenesis and metastasis of lung cancer through HIF-1 $\alpha$* . Oncogene, 2011. **30**(49): p. 4901-4909.
189. Cohen, B., et al., *Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor C by Oxidative and Thermal Stress Is Mediated by Lens Epithelium-Derived Growth Factor/p75*. Neoplasia (New York, N.Y.), 2009. **11**(9): p. 921-933.
190. Liang, X., et al., *Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$  Expression Correlates with Vascular Endothelial Growth Factor-C Expression and Lymphangiogenesis/Angiogenesis in Oral Squamous Cell Carcinoma*. Anticancer Research, 2008. **28**(3A): p. 1659-1666.
191. Okada, K., et al., *Expression of Hypoxia-inducible Factor (HIF-1 $\alpha$ ), VEGF-C and VEGF-D in Non-invasive and Invasive Breast Ductal Carcinomas*. Anticancer Research, 2005. **25**(4): p. 3003-3009.
192. Kaelin Jr, W.G. and P.J. Ratcliffe, *Oxygen Sensing by Metazoans: The Central Role of the HIF Hydroxylase Pathway*. Molecular Cell, 2008. **30**(4): p. 393-402.
193. Majmundar, A.J., W.J. Wong, and M.C. Simon, *Hypoxia inducible factors and the response to hypoxic stress*. Molecular cell, 2010. **40**(2): p. 294-309.
194. Maxwell, P.H., *The HIF pathway in cancer*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2005. **16**(4–5): p. 523-530.
195. Semenza, G.L., *Hypoxia-Inducible Factors in Physiology and Medicine*. Cell, 2012. **148**(3): p. 399-408.
196. Larsson, O., B. Tian, and N. Sonenberg, *Toward a Genome-Wide Landscape of Translational Control*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2013. **5**(1): p. a012302.
197. Silvera, D. and R.J. Schneider, *Inflammatory breast cancer cells are constitutively adapted to hypoxia*. Cell Cycle, 2009. **8**: p. 3091-3096.
198. Martineau, Y., et al., *Anti-oncogenic potential of the eIF4E-binding proteins*. Oncogene, 2013. **32**(6): p. 671-677.
199. Richter, J.D. and N. Sonenberg, *Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins*. Nature, 2005. **433**(7025): p. 477-480.
200. Koumenis, C. and B.G. Wouters, *“Translating” Tumor Hypoxia: Unfolded Protein Response (UPR)–Dependent and UPR-Independent Pathways*. Molecular Cancer Research, 2006. **4**(7): p. 423-436.
201. Jackson, R.J., *Picornaviruses break the rules*. Nature, 1988. **334**(6180): p. 292-293.

202. Macejak, D.G. and P. Sarnow, *Internal initiation of translation mediated by the 5[prime] leader of a cellular mRNA*. Nature, 1991. **353**(6339): p. 90-94.
203. Baird, S.D., et al., *Searching for IRES*. RNA, 2006. **12**(10): p. 1755-1785.
204. Spriggs, K.A., et al., *Re-programming of translation following cell stress allows IRES-mediated translation to predominate*. Biology of the Cell, 2008. **100**(1): p. 27-38.
205. Orlandini, M., et al., *Identification of a c-fos-induced gene that is related to the platelet-derived growth factor/vascular endothelial growth factor family*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1996. **93**(21): p. 11675-11680.
206. Rocchigiani, M., et al., *HumanFIGF:Cloning, Gene Structure, and Mapping to Chromosome Xp22.1 between thePIGAand theGRPRGenes*. Genomics, 1998. **47**(2): p. 207-216.
207. Debinski, W., et al., *VEGF-D is an X-linked/AP-1 regulated putative oncogene in human glioblastoma multiforme*. Molecular Medicine, 2001. **7**(9): p. 598-608.
208. Stacker, S.A., et al., *Biosynthesis of Vascular Endothelial Growth Factor-D Involves Proteolytic Processing Which Generates Non-covalent Homodimers*. Journal of Biological Chemistry, 1999. **274**(45): p. 32127-32136.
209. Harris, N.C., et al., *Proteolytic processing of vascular endothelial growth factor-D is essential for its capacity to promote the growth and spread of cancer*. The FASEB Journal, 2011. **25**(8): p. 2615-2625.
210. Baldwin, M.E., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor D Is Dispensable for Development of the Lymphatic System*. Molecular and Cellular Biology, 2005. **25**(6): p. 2441-2449.
211. Haiko, P., et al., *Deletion of Vascular Endothelial Growth Factor C (VEGF-C) and VEGF-D Is Not Equivalent to VEGF Receptor 3 Deletion in Mouse Embryos*. Molecular and Cellular Biology, 2008. **28**(15): p. 4843-4850.
212. Moustou, A.E., et al., *Expression of lymphatic markers and lymphatic growth factors in psoriasis before and after anti-TNF treatment*. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2014. **89**(6): p. 891-897.
213. Grzegorek, I., et al., *Arterial Wall Lymphangiogenesis Is Increased in the Human Iliac Atherosclerotic Arteries: Involvement of CCR7 Receptor*. Lymphatic Research and Biology, 2014. **12**(4): p. 222-231.
214. Yamashita, M., et al., *Lymphangiogenic factors are associated with the severity of hypersensitivity pneumonitis*. BMJ Open Respiratory Research, 2015. **2**(1): p. e000085.
215. Deng, J., et al., *STAT3 regulation the expression of VEGF-D in HGC-27 gastric cancer cell*. American Journal of Translational Research, 2014. **6**(6): p. 756-767.
216. Schäfer, G., et al., *Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor D by Orphan Receptors Hepatocyte Nuclear Factor-4 $\alpha$  and Chicken Ovalbumin Upstream Promoter Transcription Factors 1 and 2*. Cancer Research, 2008. **68**(2): p. 457-466.

217. Plough, H.H., *The Effect of Temperature on Linkage in the Second Chromosome of Drosophila*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1917. **3**(9): p. 553-555.
218. Vigh, L., B. Maresca, and J.L. Harwood, *Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes?* Trends in Biochemical Sciences, 1998. **23**(10): p. 369-374.
219. Tabuchi, Y., et al., *Genes and genetic networks responsive to mild hyperthermia in human lymphoma U937 cells*. Int J Hyperthermia, 2008. **24**(8): p. 613-22.
220. Izumi, R.E., et al., *Nucleolin stimulates viral internal ribosome entry site-mediated translation*. Virus Research, 2001. **76**(1): p. 17-29.
221. Willimott, S. and Simon D. Wagner, *Post-transcriptional and post-translational regulation of Bcl2*. Biochemical Society Transactions, 2010. **38**(6): p. 1571-1575.
222. Ming, J., et al., *Interleukin 7/interleukin 7 receptor induce c-Fos/c-Jun-dependent vascular endothelial growth factor-D up-regulation: A mechanism of lymphangiogenesis in lung cancer*. European Journal of Cancer, 2009. **45**(5): p. 866-873.
223. Dvorak, H.F., et al., *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis*. The American Journal of Pathology, 1995. **146**(5): p. 1029-1039.
224. Tischer, E., et al., *The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing*. Journal of Biological Chemistry, 1991. **266**(18): p. 11947-11954.
225. Vincenti, V., et al., *Assignment of the Vascular Endothelial Growth Factor Gene to Human Chromosome 6p21.3*. Circulation, 1996. **93**(8): p. 1493-1495.
226. Arcondéguy, T., et al., *VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level*. Nucleic Acids Research, 2013. **41**(17): p. 7997-8010.
227. Dellinger, M.T., et al., *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor-2 Promotes the Development of the Lymphatic Vasculature*. PLoS ONE, 2013. **8**(9): p. e74686.
228. Nagy, J.A., et al., *Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Induces Lymphangiogenesis as well as Angiogenesis*. The Journal of Experimental Medicine, 2002. **196**(11): p. 1497-1506.
229. Wuest, T.R. and D.J.J. Carr, *VEGF-A expression by HSV-1-infected cells drives corneal lymphangiogenesis*. The Journal of Experimental Medicine, 2010. **207**(1): p. 101-115.
230. Carmeliet, P., *Angiogenesis in life, disease and medicine*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 932-936.
231. Dellinger, M.T. and R.A. Brekken, *Phosphorylation of Akt and ERK1/2 Is Required for VEGF-A/VEGFR2-Induced Proliferation and Migration of Lymphatic Endothelium*. PLoS ONE, 2011. **6**(12): p. e28947.

232. Cursiefen, C., et al., *VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment*. *Journal of Clinical Investigation*, 2004. **113**(7): p. 1040-1050.
233. Jewell, U.R., et al., *Induction of HIF-1 $\alpha$  in response to hypoxia is instantaneous*. *The FASEB Journal*, 2001.
234. Weidemann, A. and R.S. Johnson, *Biology of HIF-1[ $\alpha$ ]*. *Cell Death Differ*, 2008. **15**(4): p. 621-627.
235. Forsythe, J.A., et al., *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. *Molecular and Cellular Biology*, 1996. **16**(9): p. 4604-4613.
236. Blancher, C., et al., *Relationship of Hypoxia-inducible Factor (HIF)-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  Expression to Vascular Endothelial Growth Factor Induction and Hypoxia Survival in Human Breast Cancer Cell Lines*. *Cancer Research*, 2000. **60**(24): p. 7106-7113.
237. Dibbens, J.A., et al., *Hypoxic Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stability Requires the Cooperation of Multiple RNA Elements*. *Molecular Biology of the Cell*, 1999. **10**(4): p. 907-919.
238. Ikeda, E., et al., *Hypoxia-induced Transcriptional Activation and Increased mRNA Stability of Vascular Endothelial Growth Factor in C6 Glioma Cells*. *Journal of Biological Chemistry*, 1995. **270**(34): p. 19761-19766.
239. Shima, D.T., U. Deutsch, and P.A. D'Amore, *Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability*. *FEBS Letters*, 1995. **370**(3): p. 203-208.
240. Zhou, S., et al., *MDM2 Regulates Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stabilization in Hypoxia*. *Molecular and Cellular Biology*, 2011. **31**(24): p. 4928-4937.
241. Ryan, H.E., et al., *Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  Is a Positive Factor in Solid Tumor Growth*. *Cancer Research*, 2000. **60**(15): p. 4010-4015.
242. Vumbaca, F., et al., *Double-Stranded RNA-Binding Protein Regulates Vascular Endothelial Growth Factor mRNA Stability, Translation, and Breast Cancer Angiogenesis*. *Molecular and Cellular Biology*, 2008. **28**(2): p. 772-783.
243. Huez, I., et al., *Two Independent Internal Ribosome Entry Sites Are Involved in Translation Initiation of Vascular Endothelial Growth Factor mRNA*. *Molecular and Cellular Biology*, 1998. **18**(11): p. 6178-6190.
244. Bornes, S., et al., *Translational Induction of VEGF Internal Ribosome Entry Site Elements During the Early Response to Ischemic Stress*. *Circulation Research*, 2007. **100**(3): p. 305-308.
245. Dejean, E., et al., *Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas*. *Leukemia*, 2011. **25**(12): p. 1882-1890.
246. Karaa, Z.S., et al., *The VEGF IREs are differentially susceptible to translation inhibition by miR-16*. *RNA*, 2009. **15**(2): p. 249-254.



247. Casanova, C.M., et al., *Automated High-Throughput RNAi Screening in Human Cells Combined with Reporter mRNA Transfection to Identify Novel Regulators of Translation*. PLoS ONE, 2012. **7**(9): p. e45943.
248. Cao, R., et al., *Collaborative interplay between FGF-2 and VEGF-C promotes lymphangiogenesis and metastasis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(39): p. 15894-15899.
249. Créancier, L., et al., *Fibroblast Growth Factor 2 Internal Ribosome Entry Site (Ires) Activity Ex Vivo and in Transgenic Mice Reveals a Stringent Tissue-Specific Regulation*. The Journal of Cell Biology, 2000. **150**(1): p. 275-281.
250. Kajiya, K., et al., *Hepatocyte growth factor promotes lymphatic vessel formation and function*. The EMBO Journal, 2005. **24**(16): p. 2885-2895.
251. Li, Z.-J., et al., *Insulin-like growth factor-1 induces lymphangiogenesis and facilitates lymphatic metastasis in colorectal cancer*. World Journal of Gastroenterology : WJG, 2013. **19**(43): p. 7788-7794.
252. Spinella, F., et al., *Endothelin-1 Stimulates Lymphatic Endothelial Cells and Lymphatic Vessels to Grow and Invade*. Cancer Research, 2009. **69**(6): p. 2669-2676.
253. Zheng, W., et al., *Angiopoietin 2 regulates the transformation and integrity of lymphatic endothelial cell junctions*. Genes & Development, 2014. **28**(14): p. 1592-1603.
254. Karnezis, T., et al., *VEGF-D Promotes Tumor Metastasis by Regulating Prostaglandins Produced by the Collecting Lymphatic Endothelium*. Cancer Cell, 2012. **21**(2): p. 181-195.
255. Karnezis, T., et al., *The connection between lymphangiogenic signalling and prostaglandin biology: A missing link in the metastatic pathway*. Oncotarget, 2012. **3**(8): p. 890-903.
256. Stacker, S.A., et al., *Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(3): p. 159-172.
257. Tzao, C., et al., *Expression of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 $\alpha$  and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-D As Outcome Predictors in Resected Esophageal Squamous Cell Carcinoma*. Disease markers, 2008. **25**(3): p. 141-148.
258. Braunstein, S., et al., *A Hypoxia-Controlled Cap-Dependent to Cap-Independent Translation Switch in Breast Cancer*. Molecular Cell, 2007. **28**(3): p. 501-512.
259. Hung, C.-Y., et al., *Nucleolin enhances internal ribosomal entry site (IRES)-mediated translation of Sp1 in tumorigenesis*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, 2014. **1843**(12): p. 2843-2854.
260. Luo, J., et al., *Transcriptional factor specificity protein 1 (SP1) promotes the proliferation of glioma cells by up-regulating midkine (MDK)*. Molecular Biology of the Cell, 2015. **26**(3): p. 430-439.
261. Alitalo, K., T. Tammela, and T.V. Petrova, *Lymphangiogenesis in development and human disease*. Nature, 2005. **438**(7070): p. 946-53.

262. Garmy-Susini, B., et al., *Integrin alpha4beta1 signaling is required for lymphangiogenesis and tumor metastasis*. *Cancer Res*, 2010. **70**(8): p. 3042-51.
263. Rutkowski, J.M., et al., *Secondary lymphedema in the mouse tail: Lymphatic hyperplasia, VEGF-C upregulation, and the protective role of MMP-9*. *Microvascular research*, 2006. **72**(3): p. 161-171.
264. Karkkainen, M.J. and K. Alitalo, *Lymphatic endothelial regulation, lymphoedema, and lymph node metastasis*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2002. **13**(1): p. 9-18.
265. Greene, A.K., F.D. Grant, and S.A. Slavin, *Lower-extremity lymphedema and elevated body-mass index*. *N Engl J Med*, 2012. **366**(22): p. 2136-7.
266. Cao, Y., *Angiogenesis and Vascular Functions in Modulation of Obesity, Adipose Metabolism, and Insulin Sensitivity*. *Cell Metab*, 2013. **18**(4): p. 478-489.
267. Valéra, M.-C., et al., *Protective Hematopoietic Effect of Estrogens in a Mouse Model of Thrombosis: Respective Roles of Nuclear Versus Membrane Estrogen Receptor  $\alpha$* . *Endocrinology*, 2015. **156**(11): p. 4293-4301.
268. Chambliss, K.L. and P.W. Shaul, *Estrogen Modulation of Endothelial Nitric Oxide Synthase*. *Endocrine Reviews*, 2002. **23**(5): p. 665-686.
269. Miller, V.M., et al., *Women, hormones, and clinical trials: a beginning, not an end*. *Journal of Applied Physiology*, 2005. **99**(2): p. 381-383.
270. Levin, E.R., *Integration of the Extranuclear and Nuclear Actions of Estrogen*. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 2005. **19**(8): p. 1951-1959.
271. Shearman, A.M., et al., *Estrogen Receptor  $\alpha$  Gene Variation and the Risk of Stroke*. *Stroke*, 2005. **36**(10): p. 2281-2282.
272. Mikkola, T.S. and T.B. Clarkson, *Estrogen replacement therapy, atherosclerosis, and vascular function*. *Cardiovascular Research*, 2002. **53**(3): p. 605-619.
273. Rosenfeld, M.E., et al., *Estrogen inhibits the initiation of fatty streaks throughout the vasculature but does not inhibit intra-plaque hemorrhage and the progression of established lesions in apolipoprotein E deficient mice*. *Atherosclerosis*, 2002. **164**(2): p. 251-259.
274. Garmy-Susini, B., et al., *Role of Fibroblast Growth Factor-2 Isoforms in the Effect of Estradiol on Endothelial Cell Migration and Proliferation*. *Circulation Research*, 2004. **94**(10): p. 1301-1309.
275. Thornton, J.W., E. Need, and D. Crews, *Resurrecting the Ancestral Steroid Receptor: Ancient Origin of Estrogen Signaling*. *Science*, 2003. **301**(5640): p. 1714-1717.
276. Krust, A., et al., *The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors*. *The EMBO Journal*, 1986. **5**(5): p. 891-897.
277. Arnal, J.-F., et al., *Structure-function relationship of estrogen receptors in cardiovascular pathophysiological models*. *Thrombosis Research*, 2012. **130**, **Supplement 1**: p. S7-S11.

278. Smeltzer, D.M., G.B. Stickler, and A. Schirger, *Primary Lymphedema in Children and Adolescents: A Follow-up Study and Review*. Pediatrics, 1985. **76**(2): p. 206-218.
279. Jang, E.H., et al., *Hispolon inhibits the growth of estrogen receptor positive human breast cancer cells through modulation of estrogen receptor alpha*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2015. **463**(4): p. 917-922.
280. Jeselsohn, R., et al., *ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2015. **12**(10): p. 573-583.
281. Nazarali, S.A. and S.A. Narod, *Tamoxifen for women at high risk of breast cancer*. Breast Cancer : Targets and Therapy, 2014. **6**: p. 29-36.
282. Lee, W.-L., et al., *The Role of Selective Estrogen Receptor Modulators on Breast Cancer: From Tamoxifen to Raloxifene*. Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology, 2008. **47**(1): p. 24-31.
283. Clarke, S.C., et al., *Tamoxifen Effects on Endothelial Function and Cardiovascular Risk Factors in Men With Advanced Atherosclerosis*. Circulation, 2001. **103**(11): p. 1497-1502.
284. Blais, J.D., et al., *Activating Transcription Factor 4 Is Translationally Regulated by Hypoxic Stress*. Molecular and Cellular Biology, 2004. **24**(17): p. 7469-7482.
285. Arsham, A.M., J.J. Howell, and M.C. Simon, *A Novel Hypoxia-inducible Factor-independent Hypoxic Response Regulating Mammalian Target of Rapamycin and Its Targets*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(32): p. 29655-29660.
286. Bi, M., et al., *ER stress-regulated translation increases tolerance to extreme hypoxia and promotes tumor growth*. The EMBO Journal, 2005. **24**(19): p. 3470-3481.
287. Rosenberg, J.E., et al., *A phase II trial of the nucleolin-targeted DNA aptamer AS1411 in metastatic refractory renal cell carcinoma*. Investigational new drugs, 2014. **32**(1): p. 178-187.
288. Holcik, M., et al., *A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection*. Nat Cell Biol, 1999. **1**(3): p. 190-192.
289. Brown, H.M., R.L. Robker, and D.L. Russell, *Development and Hormonal Regulation of the Ovarian Lymphatic Vasculature*. Endocrinology, 2010. **151**(11): p. 5446-5455.
290. Segala, G., et al., *5,6-Epoxy-cholesterols contribute to the anticancer pharmacology of Tamoxifen in breast cancer cells*. Biochemical Pharmacology, 2013. **86**(1): p. 175-189.

## Résumé

Le système lymphatique a pour rôle principal de drainer les fluides tissulaires et de participer à la surveillance immune. La lymphangiogenèse est principalement activée par deux facteurs : les vascular endothelial growth factors-C et -D (VEGF-C et VEGF-D). Ces facteurs participent à la progression métastatique à la fois en stimulant la prolifération des vaisseaux lymphatiques dans la tumeur et en périphérie et en provoquant la dilatation des vaisseaux collecteurs facilitant ainsi le passage des cellules tumorales de la tumeur primaire aux ganglions lymphatiques. Lors de son développement, une tumeur est soumise à de nombreux stress cellulaires tels que l'hypoxie, l'inflammation ou la déprivation en nutriments.

Ma thèse a donc été consacrée à l'analyse des régulations moléculaires permettant une surexpression des facteurs lymphangiogéniques en condition de stress cellulaire. Lors d'un premier projet de recherche j'ai démontré que l'hypoxie réduit la transcription de VEGF-C ainsi que sa traduction coiffe-dépendante mais activait une traduction médiée par un site interne d'entrée du ribosome (IRES). De plus, cette activation de la synthèse de VEGF-C en hypoxie est indépendante de HIF-1 $\alpha$  et stimule la lymphangiogenèse dans les tumeurs ainsi que dans les ganglions lymphatiques participant ainsi à la dissémination tumorale.

Dans un second temps, j'ai démontré que le VEGF-D possédait lui aussi un IRES activé par un choc thermique. L'activité de l'IRES du VEGF-D est régulée par la localisation subcellulaire d'un facteur trans-activateur de l'IRES (ITAF) : la nucléoline. Cette protéine est exportée du noyau vers le cytoplasme lors d'un choc thermique. Ce processus est inhibé par un traitement avec un anti-inflammatoire non stéroïdien ce qui supprime l'activation de la traduction IRES dépendante du VEGF-D.

Enfin lors d'un troisième projet, j'ai travaillé sur le lymphœdème secondaire, une pathologie caractérisée par une destruction du système lymphatique où la lymphangiogenèse doit être stimulée. J'ai évalué l'impact de l'hormonothérapie, principal traitement du cancer du sein, sur l'expression du VEGF-C et -D. J'ai démontré que l'estradiol stimulait l'expression de ces facteurs alors que l'hormonothérapie diminue leur synthèse et provoque une destruction de l'endothélium lymphatique. En conclusion, mes trois projets de thèse m'ont permis d'étudier les régulations moléculaires des deux facteurs lymphangiogéniques principaux dans des pathologies provoquées par une lymphangiogenèse excessive ou insuffisante.