HAL
open science

Implication de CXCR3 dans la progression tumorale : une nouvelle cible thérapeutique

Kevin Boyé

To cite this version:

Kevin Boyé. Implication de CXCR3 dans la progression tumorale : une nouvelle cible thérapeutique. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0315 . tel-01654420

HAL Id: tel-01654420

https://theses.hal.science/tel-01654420v1

Submitted on 3 Dec 2017

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.

Inserm u1029
Institut national
de la santé et de la recherche médicale

université de BORDEAUX

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Kevin Boyé

Implication de CXCR3 dans la progression tumorale: une nouvelle cible thérapeutique

Laboratoire de l'**A**ngiogenèse et du **M**icroenvironnement des **C**ancers

Soutenue publiquement le 05 Décembre 2016

Membres du jury :

Mme BILLOTTET Clotilde, Maitre de conférences universitaire	Directrice de thèse
M. BIKFALVI Andreas, Professeur universitaire, Directeur du laboratoire	Président
M. DEDIEU Stéphane, Professeur universitaire	Rapporteur
M. RUEGG Curzio, Professeur de médecine	Rapporteur
Mme EICHMANN Anne, Professeur de médecine et physiologie	Examinatrice
M. BADAUT Jérôme, Chargé de Recherche classe 1	Examinateur

Implication de CXCR3 dans la progression tumorale: une nouvelle cible thérapeutique

Résumé :

CXCR3 appartient à la famille des récepteurs couplés aux protéines G. Avec ses ligands, les chimiokines CXC, CXCR3 régule diverses fonctions biologiques et participe à de nombreux processus comme l'angiogenèse, l'inflammation et le cancer. La complexité de CXCR3 provient de son épissage alternatif qui conduit à des isoformes distinctes. CXCR3-A est reconnu pour promouvoir la prolifération, la survie et la migration cellulaire tandis que CXCR3-B induit des signaux inhibiteurs de la croissance cellulaire.

Le modèle cellulaire U87, dérivé d'un glioblastome humain, a été utilisé afin d'étudier les mécanismes moléculaires régulant l'activité et le trafic des isoformes de CXCR3 dans les cellules tumorales. CXCR3 est le récepteur fonctionnel de l'activité angiostatique de CXCL4 et son variant CXCL4L1. En fonction de leur état d'oligomérisation, ces deux chimiokines ont des interactions préférentielles avec les isoformes de CXCR3. L'activation de CXCR3-A conduit à un important changement conformationnel et induit des voies de signalisation pro-migratoires. L'étude du trafic souligne l'importance de la clathrine et du réseau Trans-Golgi dans l'internalisation et le recyclage de CXCR3-A. Pour la première fois, LRP-1 a été identifié comme nouveau partenaire de CXCR3-A. LRP1 n'est pas seulement reconnu comme un récepteur de l'endocytose mais également comme une protéine de la signalisation. LRP1 interagit avec CXCR3-A au niveau extracellulaire et régule sa conformation, son trafic et son activité pro-tumorale.

L'utilisation de modèles cellulaires d'adénocarcinome pancréatique a permis de caractériser CXCL4L1 comme facteur pro-tumoral, via l'activation de CXCR3-A dans les cellules tumorales. CXCL4L1 apparait pour la première fois comme un biomarqueur important dans la progression du cancer pancréatique.

Dans les différents modèles, les signalisations chimiokines CXC/CXCR3-A induisent une augmentation des propriétés invasives tumorales. Au niveau moléculaire, l'association de CXCR3 à diverses protéines (ligands et partenaires) est essentielle pour réguler les fonctions biologiques de la cellule tumorale.

Les nanoparticules sont désormais connues comme une nouvelle génération d'anticorps thérapeutiques présentant de nombreux avantages par rapport aux anticorps conventionnels. Ainsi, le développement de nanoparticules associées à des inhibiteurs de CXCR3 apparaît comme une nouvelle stratégie thérapeutique anti-tumorale prometteuse.

Mots clés: CXCR3, LRP1, CXCL4L1, Chimiokine, Glioblastome, PDAC, nanoparticule

---

Laboratoire de l'Angiogenèse et du Microenvironnement des Cancers

Implication of CXCR3 in tumor progression: a new therapeutical target

Abstract:

CXCR3 belongs to the G-protein-coupled receptors family. With its ligands, the CXC chemokines, CXCR3 regulates several biological functions and plays important roles in angiogenesis, inflammation and cancer. The interaction with CXCR3 is rather complex due to the presence of distinct spliced isoforms. CXCR3-A is known to promote cell proliferation, survival, and migration while CXCR3-B leads to cell growth inhibition.

The human glioblastoma cell model, U87, was used to study the molecular mechanisms regulating the activity and trafficking of CXCR3 isoforms in tumor cells. CXCR3 has been reported as the functional receptor for the angiostatic activity of CXCL4 and its variant CXCL4L1. Depending on their oligomerization status, these two chemokines present preferential interaction with CXCR3 isoforms. Activation of CXCR3-A leads to an important conformational change and induces pro-migratory signaling pathways. Studies on the vesicular trafficking highlight the importance of the clathrin and the Trans-Golgi network for both internalization and recycling of CXCR3-A. For the first time, LRP-1 is identified as a new partner of CXCR3-A. LRP1 is not only recognized as an endocytic receptor but also as a signaling protein. LRP1 interacts with CXCR3-A via its extracellular α subunit and regulates CXCR3-A conformation, trafficking and pro-tumoral activity.

Pancreatic ductal adenocarcinoma cell models were used to characterize CXCL4L1 as a pro-tumoral factor that activates CXCR3-A in tumor cells. For the first time, CXCL4L1 appears as an important biomarker for pancreatic cancer progression.

In the different cell models, signaling pathways of CXC chemokine/CXCR3-A lead to an increase in tumor invasive properties. At the molecular level, the association of CXCR3 with various proteins (ligands and partners) is essential to regulate tumor cell biological functions.

The nanoparticles are now known as a new generation of therapeutic antibodies with many advantages over conventional antibodies. Thus, the development of nanoparticles associated to CXCR3 inhibitors appears as a new promising pharmacological targeted strategy to treat cancer.

Keywords: CXCR3, LRP1, CXCL4L1, Chemokine, Glioblastoma, PDAC, nanobodies

Remerciements

Je tiens à remercier l'intégralité de mon jury de thèse d'avoir répondu présent pour ma soutenance de thèse. Je remercie grandement les Pr. Stéphane Dedieu et Pr. Curzio Rüegg pour l'évaluation objective de mon travail en leur statut de rapporteur. Je remercie également le Pr. Anne Eichmann et le Dr. Jérôme Badaut d'être membre de mon jury, je sais d'ores et déjà que vos larges connaissances scientifiques alimenteront une discussion trés animée.

Je remercie le Pr. Andreas Bikfalvi pour m'avoir permis d'intégrer son laboratoire il y a trois ans déjà. En plus de m'épanouir dans le milieu de la biologie cellulaire, j'ai pu m'ouvrir dans le domaine de la chimie, de la physique ainsi que dans les aspects translationnels et médicaux. Je ne vous remercie jamais assez pour tout cela. C'est un grand plaisir de vous avoir en tant que président de mon jury de thèse.

Aucuns remerciements ne pourront égaler ceux que je voudrais faire au Dr. Clotilde Billottet. Vous m'avez suivi et encadré au jour le jour, c'est grâce à vous si j'en suis là aujourd'hui. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir tant aidé. Cette thèse est le résultat de votre encadrement exceptionnel, merci pour tout. Si c'était à refaire, je ne changerai rien.

Merci au Pr. Stéphane Dedieu de me suivre depuis ma soutenance de mi-thèse. Vos connaissances sur LRP1 m'ont permis de mieux appréhender mon projet de thèse.

Merci au Pr. Anne Eichmann de m'avoir donné l'opportunité de présenter une partie de mes travaux devant son unité à l'université de Yale, et de m'avoir donné un avant-goût de l'après-thèse. Cette présentation était de loin la plus intense et enrichissante que j'ai pu faire (jusqu'à aujourd'hui).

Merci au Pr. Shih-Che Sue et à toute son équipe pour m'avoir permis de travailler dans son laboratoire à Taiwan. Merci notamment à Ya-Ping et à Yi Zong Lee, j'espere vous revoir bientôt. Merci également à Yi-Chieh Lin pour son aide précieuse. XieXie.

Merci au Dr. Isabel Alves. Il est rare de trouver une personne aussi dynamique et passionnée. Je suis très heureux d'avoir travaillé avec toi sur le PWR et que tu me coatch en physique.

Merci au Pr. Sebastien Lecommandoux, au Dr. Elisabeth Garanger et à Laura Rodriguez pour l'élaboration des nanoparticules. Je n'aurais surement pas le privilège de les tester *in vivo*, mais je suis sur que Laura fera des miracles.

La Team Chimiokine, ce n'est pas seulement Andreas, Clotilde et moi-même. C'est pour cela que je remercie particuliérement Nadège Pujol pour son accompagnement, son apprentissage et sa bonne humeur. Je suis capable de récuperer le cerveau d'une souris mais faire une commande Fisher reste toujours un grand mystère pour moi, donc merci pour ca aussi :). Poussin Billottet deviendra un poulet. Merci aussi à tous les stagiaires ayant participés à l'évolution du projet, je pense notamment à Manon, Marion, Kenza et Mitchell. C'était un réel plaisir de travailler avec vous.

Merci à mes collègues et ami(e)s du labo' de m'avoir porté jusqu'ici. Merci Thomas de toute ton aide, de ta rigueur, de ton sens scientifique et surtout de ta passion et l'absence totale de la demi-mesure. Merci à la team Lili-ouin FTW, on a migré ensemble dans le petit bureau pendant les travaux du bâtiment, le fait qu'on en soit jamais ressorti veut dire beaucoup pour moi. Merci à Laura pour nos duels Science Vs Médecine. Merci à Patrick pour m'avoir prouvé que la passion pour la recherche pouvait durer à jamais. Je te garde mon meilleur Beaujolais! Merci à Jessica pour être première sur les potins. Merci à Isa pour toutes tes anécdotes et de me faire autant rire. Merci à Céline de porter tout le laboratoire sur les épaules tout les jours sans flancher. Merci à Stef pour sa motivation et joie de vivre. Merci à Fafa et Marielle pour leur dynamisme. Merci à May pour toute la rigueur et l'organisation du labo, pour un psychotique de l'ordre comme moi c'est hyper agréable. Merci à Raf

pour absolument tout ton travail et dévouement à la recherche, tu nous manques. Merci à Béatrice pour l'énorme soutien et entre-aide thésardienne. On se suit depuis le master 1, ca va me faire bizarre de ne plus te voir au laboratoire. Merci à Karine et Fred, je ne sais même pas ce qu'on pourrait faire sans vous dans le labo! En gros, merci à tous les membres de l'unité INSERM 1029, cette thèse est pour vous tous.

Merci à toute mon équipe de Master 2. La team Moreau-Saltel est celle qui m'a donné envie de faire une thèse, merci à vous.

Merci aux Cateux pour toutes ces années d'amitiés. On est loin de la seconde au lycée Pape Clément et des formules 4 euros à la boulangerie, cependant rien ne change et ca fait du bien. Enfin si on a acheté une maison tous ensemble mais sinon trois fois rien. La Team-Piay perdurera.

Merci à Pessac, la mère patrie. Merci de ton ambassade à Tremolat.

Merci à Master Soirées pour ces 5 années (la vache) de rire, d'amitiés, de soirées, de débauches et d'activités improbables. Merci à tous et à toutes! Merci également aux ChoMad (like wtf) ! Mention spéciale pour toutes les personnes avec qui j'ai pu vivre en colocation durant ces 3 années de thèse : Bruno, Antonin, Veronica, Clémence, Arnaud, Baptiste, Chachou, Pauline, Chouchou et Mathilde.

Merci évidemment à toute ma famille. Notamment à mes parents, à Maë et à Rova. Pour le coup ce n’est pas 3 ans de boulot que vous avez eu avec moi, mais bien 25 ans :). Merci de me soutenir dans mes ambitions et d'être toujours présent!

Merci à Nours et Museau.

Enfin, la meilleure pour la fin :). Merci à Mathilde pour ton soutien, aide et reconfort. Merci d'être là et de m'accompagner au quotidien. Je t'aime. PS: je crois qu'on ne bluffe plus personne au laboratoire, ils sont au courant ;)

Je pourrais écrire une thèse de remerciement pour tout ce que je vous dois.

Merci.

Tables des matières

REMERCIEMENTS **4**

TABLES DES MATIERES **7**

TABLES DES ILLUSTRATIONS **13**

LISTE DES ABBREVIATIONS **17**

INTRODUCTION **22**

I. Les cancers primitifs du cerveau : les gliomes **23**

A. Histologie et classification des gliomes 23

1. Classification de l'OMS 23
2. Classification de l'hôpital Sainte-Anne 25

B. Epidémiologie, fréquence et mortalité 26

C. Diagnostic médical 26

1. Symptômes 26
2. L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) 27
3. Le diagnostic histologique 28

D. Développement et marqueurs moléculaires des glioblastomes 29

1. Les glioblastomes *de novo* ou secondaire 29
2. La Co-délétion 1p19q 29
3. Les mutations des gènes IDH1/2 29
4. Les mutations et variants de l'EGFR 30
5. Autres mutations des tumeurs gliales 31
6. Les méthylations du promoteur du gène MGMT 31

E. La recherche de biomarqueurs dans les glioblastomes 32

F. Traitement et thérapie actuels des glioblastomes 32

1. La chirurgie 32
2. Le protocole de Stupp 33
a) Radiothérapie et chimiothérapie 33
b) Le témozolomide 34
3. Traitement des récidives 35
a) Chimiothérapies de seconde ligne 35
b) Les thérapies ciblées 36
c) L'angiogenèse tumorale et les anti-angiogéniques 37
4. Mécanismes d'adaptation des glioblastomes 40
a) Plasticité et infiltration des cellules cancéreuses 40
b) Resistance aux anti-angiogéniques 41

II. Implication des chimiokines CXC et de CXCR3 dans le cancer 43
A. Les chimiokines 43
1. Classification des chimiokines 44
a) La classification structurale 44
b) Le motif "ELR" des chimiokines CXC 45
2. Rôle des chimiokines CXC 46
a) Le recrutement leucocytaire 46
b) La modulation de l'angiogenèse 47
c) Autres rôles impliquant les chimiokines 49
3. Chimiokines et cancer 49
a) L'immunité tumorale 50
b) Le « switch angiogénique » 51
c) Cas du CXCL4 et son variant CXCL4L1 53
B. Les récepteurs aux chimiokines 55
1. Nomenclature 55
2. Les voies de transduction des récepteurs aux chimiokines 56
3. Les processus de désensibilisation 58
4. Le trafic vésiculaire intracellulaire 58
5. CXCR3 60
a) Les isoformes CXCR3-A, CXCR3-B et CXCR3-alt 60
b) Structures des isoformes de CXCR3 60
6. Implication de CXCR3 dans la biologie des cancers 61

III. Implication de LRP1 dans le cancer 64
A. LRP1 : Origine, structure et maturation..... 64
1. La famille des récepteurs au LDL..... 64
2. Organisation structurale de LRP1 66
a) Le domaine extracellulaire..... 67
b) Le domaine intracellulaire..... 68
3. RAP : protéine chaperonne de LRP1 69
a) Découverte et structure de la protéine RAP 69
b) Rôle de RAP..... 70
B. LRP1, une protéine multifonctionnelle 71
1. Rôle de LRP1 dans l'endocytose des protéines plasmatiques..... 72
2. Rôle de LRP1 dans l'intégrité vasculaire..... 73
3. LRP1, régulateur de la barrière hémato-encéphalique..... 76
a) Expression de LRP1 dans le cerveau..... 76
b) Modulation de la barrière hémato-encéphalique..... 77
4. Les voies de signalisation régulées par LRP1..... 78
5. Implication de LRP1 dans la progression tumorale 80
a) Les protéases matricielles 80
b) La dégradation des protéases matricielles par LRP1 82
c) LRP1, régulateur des adhérences focales..... 84
d) Implication dans la progression du glioblastome 85

IV. Projet de thèse..... 86

CHAPITRE I : MECANISME D'ACTION ET ROLE BIOLOGIQUE DE CXCR3-A DANS LA PROGRESSION TUMORALE DES GLIOBLASTOMES 88

I. Introduction et objectifs de l'étude 89

II. Article I: « New insight into the internalization, recycling and activity of the CXC Receptor-3: Role of LRP1 »..... 90

III. Matériels et méthodes supplémentaires 133

A. Réactifs 133
B. La membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet 134
C. Immunofluorescence sur CAM 134
D. Zymographie 135

IV. Implication de CXCR3-A dans l'invasion tumorale 136
A. Impact de CXCR3-A sur la voie PI3K/AKT 136
B. Le modèle de la CAM pour l'étude de l'invasion tumorale 137
C. Phénotype des tumeurs 138
D. Caractérisation des tumeurs 140
1. Impact de CXCR3-A sur le phénotype infiltratif 140
2. Impact de CXCR3-A sur l'expression des protéases 143

V. Conclusions et perspectives 146

CHAPITRE II : DIFFERENCES D'ACTIVATION DES ISOFORMES CXCR3-A ET CXCR3-B, CAS DU CXCL4 ET CXCL4L1 149

I. Objectif de l'étude 150

II. Matériels et méthodes complémentaires 152
A. Marquage fluorescent des chimiokines 152
B. Etude par « time-lapse » microscopie 153
C. SPR 154
D. Mutagenèse dirigée du CXCL4 155

III. Etude de fixation des chimiokines sur CXCR3 par PWR (« plasmon wavelength resonance ») 156
1. Fixation des extraits membranaires sur le prisme 156
2. Intéraction des chimiokines sur les isoformes de CXCR3 157

IV. Les chimiokines CXCL4 et CXCL4L1 159
A. Intéraction préférentielle du CXCL4L1 avec l'isoforme CXCR3-A 160
1. Etude par vidéomicroscopie 161

2. Etude par résonance plasmonique de surface 161
B. Activation de CXCR3-A par CXCL4 et CXCL4L1 164
C. Impact de l'oligomerisation des chimiokines sur l'activation des récepteurs 165
1. Changement d'oligomérisation du CXCL4 par mutation..... 165
2. Impact des mutants CXCL4 sur l'activation du CXCR3-A 165
D. Activation du CXCR3-B par CXCL4 et CXCL4L1 166

V. Conclusions et perspectives 168

CHAPITRE III : CXCR3-A ET CXCL4L1 COMME POTENTIELLES CIBLES THERAPEUTIQUES..... 171

I. Introduction et objectifs de l'étude 172

II. Rôles des chimiokines CXCL4 et CXCL4L1 dans le cancer du pancréas 174
A. Régulation de l'expression de CXCL4L1 dans les adénocarcinomes pancréatiques 174
B. Rôle de CXCR3 dans le développement de l'adénocarcinome pancréatique 178
C. Le couple CXCL4L1 / CXCR3-A comme cible thérapeutique 181

III. L'utilisation de nanoparticules ciblant CXCR3 comme outil thérapeutique 183
A. Principe et historique des nanoparticules 184
B. L'utilisation des nanoparticules dans le cancer..... 185
C. Les nanoparticules associées à l'antagoniste de CXCR3..... 186
1. Principe et objectifs 186
2. Modification chimique du SCH546738 187
3. Etude de la modification du SCH546738 sur son activité..... 188

IV. Conclusions et perspectives 189

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES 192

I. CXCL4L1, une nouvelle cible thérapeutique ?..... 193

II. CXCR3, un récepteur à double tranchant..... 195

III. Corrélation entre l'expression de CXCR3 et la mutation IDH1 197

IV. LRP1 comme régulateur essentiel de l'activité pro-tumorale de CXCR3-A. 199

V. Implication du couple CXCR3-A / LRP1 dans d'autres pathologies? Exemple de l'athérosclerose 203

VI. La spécificité d'intéraction chimiokine / récepteur 204

VII. Bilan général 205

BIBLIOGRAPHIE 207

ANNEXE I : LISTE DES PUBLICATIONS 229

ANNEXE II : LISTE DES COMMUNICATIONS 230

ANNEXE III : LISTE DES CONGRES EFFECTUES..... 231

ANNEXE IV : LISTE DES FINANCEMENTS OBTENUS..... 232

ANNEXE V : ARTICLE II..... 233

Tables des illustrations

Table 1: Classification et stadification des gliomes (OMS, 2007).....*24*
Table 2: Survie moyenne des patients en fonction des différentes classes de gliome, adaptée du « CBTRUS statistical report 2005 - 2009 ».....*26*
Table 3: Survie globale des patients en fonction du grade de la tumeur, adaptée de Sanson et al. 2009.....*30*
Table 4: Classification des gliomes en fonction des biomarqueurs connus *32*
Table 5: Classification des chimiokines, d'aprés Zlotnik A et al. 2012 .....*45*
Table 6: Exemple de protéines interagissant avec le domaine intracellulaire de LRP1 et régulant des voies de signalisation, d'après Herz et al. 2001 .....*68*
Table 7: Séquences des amorces utilisées.....*133*
Table 8: Changement de polarisation selon l'isoforme du CXCR3, et KD associée à la fixation du PS372424.....*157*
Table 9: Mutation du CXCL4 et changement de l'état d'oligomérisation en solution*165*

Figure 1: Symptômes les plus communs chez les patients atteints d'un gliome, adaptée de JP. Posti et al. 2015.....27
Figure 2: Illustration et IRM d'un glioblastome dans le lobe pariétal, Mayfield Clinic 28
Figure 3: Analyse de survie Kaplan-Meier lors de l'ajout de témozolomide à une radiothérapie classique, de Stupp et al. 2005.....34
Figure 4: Facteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale, Judah Folkman 2007 ..37
Figure 5: Induction de l'angiogenèse par la voie de signalisation PI3K/AKT, adaptée de Flintoft et al. 2004 39
Figure 6: Impact du Bevacuzimab sur la survie sans progression des patients, d'après Nagpal et al. 2011.....40
Figure 7: Infiltration des cellules tumorales, adaptée de Hofer et al., 2002 41
Figure 8: Mécanismes de vascularisation des glioblastomes de Hardee ME et al. 2012.....42
Figure 9: Les 4 sous-familles de chimiokines, de Bestebroer J et al. 2009 44

Figure 10: Rôle des chimiokines dans le recrutement leucocytaire, d'aprés Adams DH et al. 1997.....47
Figure 11: Différenciation des monocytes en TAM M1 ou M2, d'après Solinas G et al. 2009.....51
Figure 12: Stratégie de normalisation vasculaire en ciblant la polarisation des TAM recrutés par les chimiokines, d'après Huang Y et al. 2011.....52
Figure 13: Différences de séquence entre CXCL4 et CXCL4L1, Kuo JH et al. 201353
Figure 14: Nomenclature des récepteurs à chimiokine et spécificité d'intéraction, d'après Balkwill F. 2004.....55
Figure 15: Activation des GPCR via leurs protéines G, d'après Li J et al. 2002.....57
Figure 16: Les differentes voies du trafic vesiculaire et expression des proteines Rab EE: Early Endosome; RE: Recycling Endosome; LE: Late Endosome; TGN : Trans Golgi Network, d'apres Wiesner C et al. 2013.....59
Figure 17: Structures des isoformes de CXCR3, d'après Billottet et al. 2013.....61
Figure 18: Les voies de signalisations activées par les isoformes CXCR3-A ou CXCR3-B, d'après Billottet et al. 2013.....63
Figure 19: Les membres de la famille des récepteurs au LDL, d'après Lillis AP et al. 2008.....65
Figure 20: Les différents domaines de LRP1, d'après Herz J et al. 2001.....67
Figure 21: Modélisation des domaines de RAP, d'après Lillis AP et al. 2008.....70
Figure 22: Carte non exhaustive des intéractants de LRP1, réalisée par le logiciel « Ingenuity Interactive Pathway Analysis », d'après Gonias et al. 2014.....71
Figure 23: Formation du complexe LRP1-PDGFbb-PDGFRb par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice SHC, d'après Loukinova et al. 2002.....74
Figure 24: LRP1, un intégrateur des voies de signalisation du S1P via la modulation de l'activité des protéines G, D'après Nakajima et al. 2014.....75
Figure 25: Inhibition de la traduction des cytokines pro-inflamatoires induite par le LPS via le clivage et le relarguage de la partie intracellulaire de LRP1, d'après Zurhove et al. 2008.....79
Figure 26: Les différents substrats des MMPs.....80
Figure 27: Mécanisme d'action du système urokinase plasminogène ECM : « Extracellular matrix ».....82
Figure 28: Internalisation du système uPAR/PAI/uPAR (ou des substrats liés aux glycosaminoglycanes comme ApoE) par LRP1, d'après Herz and Strickland 2001..83

Figure 29: Impact de la surexpression de CXCR3-A et de LRP1 sur la phosphorylation de AKT 137
Figure 30: Modèle de la CAM 138
Figure 31: Visualisation de l'angiogenèse tumorale (J10) 139
Figure 32: Observation journalière de chaque tumeur.....140
Figure 33: Expression relative de CXCR3-A dans les tumeurs, rapportée aux tumeurs contrôles. ** = P-value < 0.002 140
Figure 34: Analyse histologique des coupes de tumeurs.....141
Figure 35: Marquage vimentine sur les coupes de tumeur implantées dans la CAM142
Figure 36: Marquage lectine sur coupe de tumeur implantée dans la CAM. Echelle : 50µm 143
Figure 37: Expression relative des protéases MMP2, MMP9 et uPA rapportées aux tumeurs contrôles. *** p-value < 0.002 144
Figure 38: Zymographie de gélatine sur les tumeurs U87-CTRL et U87-CXCR3A implantées dans la CAM.....145
Figure 39: Formation de macrométastases dans les tumeurs U87-CXCR3A, à différents jours du developpement.....146
Figure 40: Principe du PWR, d'après Tolli G et al. 2003.....151
Figure 41: Couplage des chimiokines sur la puce de dextran carboxyméthylé 154
Figure 42: Fixation des extraits membranaires sur le prisme de PWR, visualisée par microscopie confocale ou par changement de masse PWR. Echelle : 50µm.....156
Figure 43: Changement de polarisation et affinité du PS372424 pour CXCR3-A...157
Figure 44: Changement de polarisation et affinité du PS372424 pour CXCR3-B...158
Figure 45: Changement de polarisation et affinité du PS372424 pour la lignée HEK-CTRL 158
Figure 46: Notion d'étalement ou d'allongement de CXCR3 en fonction de l'onde polarisée PWR.....159
Figure 47: Vidéomicroscopie montrant l'interaction du CXCR3-A avec le CXCL4L1.161
Figure 48: Etude de la fixation du CXCL4 et du CXCL4L1 sur les HEK-CTRL par SPR 162
Figure 49: Etude de la fixation du CXCL4 et du CXCL4L1 sur les HEK-CXCR3A par SPR 162
Figure 50: Etude de la fixation du CXCL4 et du CXCL4L1 sur les U87-CTRL par SPR 163

Figure 51: Etude de la fixation du CXCL4 et du CXCL4L1 sur les U87-CXCR3A par SPR 163
Figure 52: Impact de la stimulation par différentes chimiokines sur les lignées surexprimant ou non le CXCR3-A Stimulation de 5 minutes pour chaque condition.164
Figure 53: Impact du changement d'oligomérisation du CXCL4 sur l'activation de CXCR3-A. Stimulation de 5 minutes pour chaque condition.....166
Figure 54: Impact de la stimulation par différentes chimiokines sur les lignées surexprimant ou non le CXCR3-B. Stimulation de 5 minutes pour chaque condition167
Figure 55: Impact du changement d'oligomérisation du CXCL4 sur l'activation de CXCR3-A. Stimulation de 5 minutes pour chaque condition.....168
Figure 56: Expression du CXCL4L1 dans les lignées de PDAC.....175
Figure 57: Expression de certains marqueurs de CAF par les MF 176
Figure 58: Impact de la co-culture des BxPC3 sur la production du CXCL4L1.....177
Figure 59: Rôle des MF dans la production du CXCL4L1 par la lignée Panc-1. MabL1 : Anticorps du CXCL4L1 177
Figure 60: Expression de CXCR3-A et CXCR3-B dans les lignées de PDAC.....178
Figure 61: Impact de la modulation de l'activité du couple CXCR3 / CXCL4L1 dans la prolifération des cellules Panc-1. 179
Figure 62: Effet d'une stimulation chronique du CXCR3-A par le CXCL4L1.....180
Figure 63: Impact de la stimulation du CXCR3-A par le CXCL4L1 avec ou sans traitement au MabL1 ou au SCH546738 181
Figure 64: Traitement au MabL1 des tumeurs PDAC exprimant ou non le CXCR3 : BxPC3 ou Panc-1 182
Figure 65: Corrélation entre l'expression du CXCL4L1 et la formation des vaisseaux sanguins 183
Figure 66: Echelle de taille des nanoparticules 184
Figure 67: Formation des nanoparticules couplée à l'antagoniste de CXCR3.....186
Figure 68: composition du bloc amphiphile couplé au SCH546738.....187
Figure 69: Impact du traitement au SCHnm ou SCHm sur la stimulation de CXCR3-A nm: non modifié, m : modifié.....189
Figure 70: Analyse de survie des patients en fonction de l'expression de CXCR3.198
Figure 71: Corrélation de l'expression de CXCR3 avec la mutation IDH1 199
Figure 72: Modèle.....201

Liste des abbreviations

ADN: Acide DésoxyriboNucléique

AMPc: Adénosine Monophosphate Cyclique

AP2: Assembly Protein 2

ApoER2: Apolipoprotein E Receptor 2

ARN: Acide Ribonucléique

ATG: Analyse ThermoGravimétrique

BHE: Barrière Hémato-Encéphalique

BSA: Bovine Serum Albumin

CAF: Cancer Assosiated Fibroblast

CAM: Chorioallantoic Membrane

CaSMC: Coronary artery Smooth Muscle Cell

CBTRUS: Central Brain Tumor Registry of the United States

CML: Cellule Musculaire Lisse

CR: cysteine-rich complement-type repeats

CXCR: CXC-Receptor

DARC: Duffy Antigen Receptor Chemokine

DSC: Calorimétrie différentielle à balayage

EGF(R): Epidermal Growth Factor (Receptor)

FAP: Fibroblast Associated Protein

FDA: Food and Drugs Administration

FGF: Fibroblast Growth Factor

GAG: Glycosaminoglycane

GFP: Green Fluorescent Protein

GPCR: G-Protein Coupled Receptor

HDL: High Density Lipoprotein

H/E: Hématoxyline / Eosine

HEK: Human Embryonic Kidney

HIF: Hypoxia Inducible Factor

HRG: Histidine-Rich Glycoprotein

HSP: Heat Shock Protein

HUAEC: Human Umbilical Artery Endothelial Cells

HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells

IC50: 50% Inhibitory Concentration

ICAM: Intracellular adhesion molecule

IDH: Isocitrate Dehydrogenase

IFN (g): Interféron (gamme)

INCA: Institut National du CAncer

IP3: Inositol 1, 4, 5-triphosphate

IRF3: Interferon Regulatory Factor 3

IRM: Imagerie par Résonance Magnétique

KD: Constante de Dissociation

KO: Knock-Out

LDL(R): Low Density Lipoprotein (Receptor)

LPS: Lipopolysaccharide

LRP1: Low density lipoprotein Relatide Protein 1

MAPK: Mitogen Activated Protein Kinase

MCP: Monocyte Chemotactic Protein

MEGF7: Multiple EGF-repeat containing protein 7

MF: MyoFibroblaste

MGMT: O-6-méthylguanine-DNA méthyltransférase

MMP: Matrix MetalloProteinase

MMR: MisMatch Repair

MTIC: 3-methyl-(triazen-1-yl) imidazole-4-carboxamide

MT-MMP: Membrane Type-Matrix Metalloproteinase

OCT: Optimum Cutting Temperature

OMS: Organisation Mondiale de la Santé

PAI: Plasminogen Activator Inhibitor

PAR: Protease Activated Receptor

PBS: Phosphate Buffered Saline

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDAC: Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma

PDGF(R): Platelet Derived Growth Factor (Receptor)

PECAM: Platelet and Endothelial cell Adhesion molecule

PEG: Polyéthylène Glycol

PF4: Platelet Factor 4

PFA: Paraformaldéhyde

PI3K: Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase

PIGF: Placenta Growth Factor

PIP2: Phosphatidylinositol 4,5-diphosphate

PKA: Protéine Kinase A

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PTP: PhosphoTyrosine-Binding

PWR: Plasmon Wavelenght Resonance

QD: Quantum Dots

QPCR: Quantitative Polymerase Chain Reaction

RAP: Receptor-Associated Protein

RE: Reticulum Endoplasmique

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

ROP: Ring Opening Polymerisation

S1P(R): Sphingosine 1 Phosphate (Récepteur)

SAPK: Stress-Activated Protein Kinase

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SEC: Chromatographie d'exclusion stérique

SMA: Smooth Muscle Actin

SPR: Surface Plasmon Resonance

TAM: Tumor Associated Macrophage

TBS: Tris-Buffered Saline

TGF: Transforming Growth Factor

TIMP: Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases

TNF: Tumor Necrosis Factor

T-PA: Tissue-type Plasminogen Activator

UPA(R): Urokinase Plasminogen Activator (Receptor)

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VLDL: Very Low Density Lipoprotein

Introduction

I. Les cancers primitifs du cerveau : les gliomes

Les gliomes, ou tumeurs gliales, sont des tumeurs du système nerveux central qui représentent environ 70% des tumeurs primitives du cerveau. Ils dérivent de cellules dites gliales comme les astrocytes, les oligodendrocytes, les cellules microgliales ou les cellules épendymocytes. Le cerveau humain possède en moyenne 10 fois plus de cellules gliales que de neurones, qui peuvent représenter jusqu'à 90% des cellules du système nerveux central. Les gliomes proviennent le plus fréquemment d'astrocytes ou d'oligodendrocytes ayant acquis des propriétés tumorales, on parle alors d'astrocytome, d'oligodendrocytome ou d'une tumeur mixte de type oligoastrocytome.

A. Histologie et classification des gliomes

1. Classification de l'OMS

La première classification officielle de l'OMS fut publiée en 1979 (Zülch, 1979) et se base principalement sur le type histologique des tumeurs. La première adaptation de cette classification a été réalisée en 1993 (Kleihues et al., 1993) et incorpore les avancées de l'immunohistochimie dans le diagnostique pathologique des tumeurs cérébrales. Sept ans plus tard, la classification de 2000 (Kleihues and Sobin, 2000) inclue les notions de profils et d'altérations génétiques. Cette version fait aussi notion pour la première fois des signes cliniques, des donnés relatives à l'imagerie et des premiers marqueurs pronostiques associés aux gliomes (co-délétions chromosomique 1p19q, méthylations MGMT etc…). En 2007 l'OMS propose la quatrième version de classification des tumeurs du système nerveux central, qui deviendra l'une des références internationales (Louis et al., 2007). Cette classification discrimine les tumeurs gliales en fonction du type cellulaire d'origine. On y retrouve donc par exemple les tumeurs avec un phénotype astrocytaire, et des tumeurs possédant un phénotype oligodendrocytaire. Une stadification est aussi établie pour la première fois entre les différentes classes de gliome. On y retrouve les 4 grades des tumeurs gliales que nous connaissons aujourd'hui (Table 1).

- Grade I : Tumeur bénigne avec faible potentiel prolifératif. Possibilité de rétablissement après intervention et résection chirurgicales.
- Grade II : Tumeur infiltrative avec faible activité proliférative. Certaines tumeurs peuvent progresser vers des stades plus malins (Grade III / IV)
- Grade III : Tumeur maligne présentant des cellules anaplasiques. Activité mitotique modérée.
- Grade IV : Tumeur maligne avec activité mitotique élevée. Présente des zones de tissus nécrosés et entourés de cellules hautement anaplasiques.

	I	II	III	IV
Astrocytic tumours				
Subependymal giant cell astrocytoma	•			
Pilocytic astrocytoma	•			
Pilomyxoid astrocytoma		•		
Diffuse astrocytoma		•		
Pleomorphic xanthoastrocytoma		•		
Anaplastic astrocytoma			•	
Glioblastoma				•
Giant cell glioblastoma				•
Gliosarcoma				•
Oligodendroglial tumours				
Oligodendroglioma		•		
Anaplastic oligodendroglioma			•	
Oligoastrocytic tumours				
Oligoastrocytoma		•		
Anaplastic oligoastrocytoma			•	

Table 1: Classification et stadification des gliomes (OMS, 2007)

La classification de l'OMS, permet de définir la classe histologique et le grade de la tumeur en groupant les tumeurs à phénotype astrocytaires ou oligodendrocytaires. Ceci se fait sans prendre en compte l'aspect biologique de chaque tumeur, pouvant être différent pour differentes tumeurs de type astrocytaire par exemple.

2. Classification de l'hôpital Sainte-Anne

L'hôpital Sainte-Anne, en association avec la clinique Mayo (Etats-Unis) propose, en 1997, une autre méthode de classification des tumeurs gliales (Daumas-Duport et al., 1997a, 1997b). Celle-ci, contrairement à la classification de l'OMS, se base principalement sur l'intégration des données cliniques, histologiques, ainsi que sur l'imagerie à résonance magnétique (IRM). Cette méthode permet de pallier au problème de la représentativité des prélèvements effectués dans une tumeur très hétérogène, contrairement aux méthodes de classification de l'OMS. La classification se base principalement sur l'évaluation de certains critères de l'angiogenèse tumorale : l'hyperplasie des cellules endothéliales et la prise de contraste en IRM après injection de gadolinium (agent de contraste). On distingue ainsi 3 types de tumeurs gliales :

- Gliome de grade A : Absence de prise de contraste après injection de gadolinium. Pas d'hyperplasie des cellules endothéliales
- Gliome de grade B : Prise de contraste modérée possible après injection au gadolinium. Hyperplasie des cellules endothéliales
- Glioblastome : Prise de contraste très importante après injection au gadolinium, forte hyperplasie des cellules endothéliales.

Malgré les avantages en termes de reproductilibilité fournis par cette classification, elle est incompatible avec la classification de l'OMS du fait qu'elle ne différencie pas l'origine astrocytaire de celle oligodendrocytaire des glioblastomes. Ce pourquoi elle n'est pas reconnue par la communauté scientifique internationale

B. Epidémiologie, fréquence et mortalité

Les gliomes représentent la classe la plus importante des tumeurs cérébrales par leur morbidité et mortalité. Chez l'adulte, ce sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes. Selon l'OMS, l'incidence est, pour 100 000 habitants, de l'ordre de 5 nouveaux cas par an, ce qui correspond environ à 2000 à 3000 nouveaux cas par an en France.

Bien que les glioblastomes soient les gliomes les plus agressifs, ils correspondent également aux tumeurs cérébrales les plus fréquentes (53% des gliomes). L'évolution d'un glioblastome est en général très rapide (2 à 3 mois) et la survie globale est de 15 mois. Le taux de survie à 5 ans d'un adulte présentant un glioblastome est inferieur à 5% (Dolecek et al., 2012) (Table 2). L'âge moyen de découverte d'un glioblastome est de 65 ans. Sa prévalence atteint un maximum entre 70 et 80 ans avec environ, pour 100 000 habitants, 30 nouveaux cas par an. En 2015, environ 50 % des nouveaux cas de glioblastomes ont été diagnostiqués chez des patients de plus de 65 ans.

Grade	Type histologique	Survie à 1 an	Survie à 5 ans	Survie à 10 ans
I	Astrocytomes pilocytiques	97.64	94.05	91.32
II	Astrocytomes	70.08	46.82	36.2
III	Astrocytomes anaplasique	60.98	34.7	19.01
IV	Glioblastome	35.2	4.7	2.32

Table 2 : Survie moyenne des patients en fonction des différentes classes de gliome, adaptée du « CBTRUS statistical report 2005 - 2009 »

C. Diagnostic médical

1. Symptômes

Seules les analyses médicales par imagerie IRM associées aux analyses histologiques permettent de diagnostiquer un gliome. Cependant, un certain nombre de symptômes peuvent être évocateurs, comme la présence de troubles cognitifs, de crises d'épilepsies, apparition d'aphasie, paralysie motrice, des maux de tête ou

encore des hémorragies cérébrales. Les symptômes les plus fréquents sont les troubles cognitifs et épileptiques (Posti et al., 2015), et sont présents chez plus de 50% des patients atteints d'un gliome (Figure 1). La fréquence d'apparition de troubles cognitifs augmente avec le grade du gliome, mais aussi selon l'âge du patient. Au contraire, l'apparition de troubles épileptiques est visible quel que soit le grade de la tumeur et touche plus particulièrement les jeunes patients (de moins de 50 ans) et diminue avec l'âge (Figure 1). Tous les ans, sur 100 000 habitants, on estime entre 70 et 100 le nombre de personnes qui vont effectuer leur première crise d'épilepsie. Parmi eux, 2 à 3% des individus seraient atteint d'un gliome non diagnostiqué.

Symptômes	Pourcentage (%)
Trouble cognitif	57
trouble epileptique	52,8
Aphasie	25,4
Paralysie moteur	21,8
maux de tête	19,7

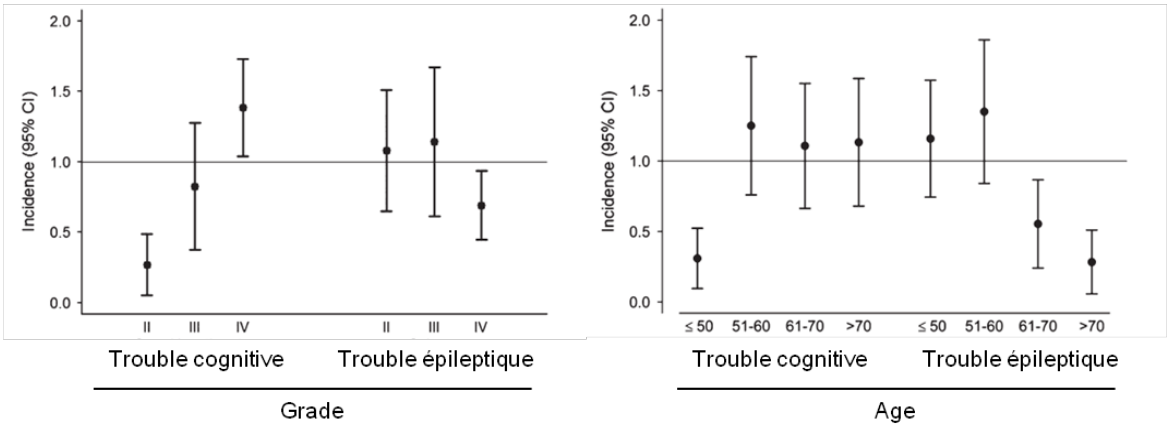


Figure 1 : Symptômes les plus communs chez les patients atteints d'un gliome, adaptée de JP. Posti et al. 2015.

2. L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM)

La réalisation d'une IRM cérébrale est systématique lors de la suspicion d'une tumeur gliale (Figure 2). Il s'agit d'une technique d'imagerie des tissus du corps humain, non invasive, indolore et basée sur le principe de résonance magnétique nucléaire (RMN). Il s'agit d'observer la RMN des protons de l'eau présents dans

l'organisme suite à une excitation électromagnétique. L'information renvoyée par l'échantillon, ou phénomène de relaxation du proton, se décompose sur deux axes : les relaxations transversale et longitudinale. Ces informations permettent la reconstitution d'image cérébrale par section en 2D puis en 3D. Le gadolinium, agent de contraste ayant la propriété de se concentrer dans la tumeur cérébrale est souvent injecté au cours de l'examen afin de mieux visualiser la partie affectée.

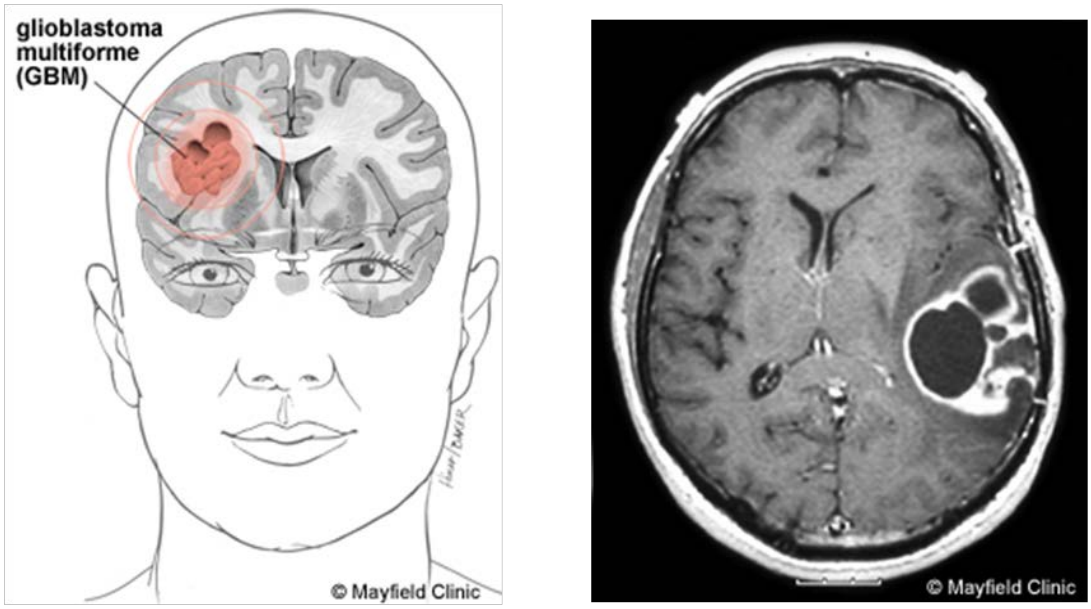


Figure 2 : Illustration et IRM d'un glioblastome dans le lobe pariétal, Mayfield Clinic

3. Le diagnostic histologique

Comme indiqué précédemment, le diagnostique histologique, déterminé selon les critères de l'OMS, est essentiel. Il repose sur l'examen anatomopathologique du tissu tumoral suite à une biopsie par voie stéréotaxique ou une ablation chirurgicale. La classification et la stadification de la tumeur gliale vont se faire en fonction de différents critères d'anaplasie cellulaire comme la différenciation, la densité ou la prolifération cellulaire. D'autres critères comme la présence de tissus nécrotiques ou l'hyperplasie endothéliale sont aussi examinés. Les glioblastomes se caractérisent spécifiquement par une faible différenciation cellulaire, accompagnée d'une haute densité cellulaire, une atypie et une activité mitotique très marquée, la présence de tissu nécrosé et une prolifération vasculaire importante.

D. Développement et marqueurs moléculaires des glioblastomes

1. Les glioblastomes *de novo* ou secondaire

Deux catégories distinctes de glioblastomes sont reconnus : les glioblastomes *de novo* (ou glioblastome primaire) et les glioblastomes secondaires. Les premiers se développent directement en tant que glioblastomes alors que les glioblastomes secondaires dérivent de gliomes de bas grade. Ces deux sous-types de glioblastomes se différencient par des altérations génétiques et épigénétiques différentes. Le pronostic ainsi que les réponses aux thérapies conventionnelles ne sont également pas les mêmes (Kleihues and Ohgaki, 1999).

2. La Co-délétion 1p19q

Certaines délétions chromosomiques sont fréquentes dans les gliomes. Notamment, les co-délétions du petit bras du chromosome 1 (1p) et du grand bras du chromosome 19 (19q) ont été identifiées en 1998 (Cairncross et al., 1998) et sont depuis très largement étudiées. Cette co-délétion est bénéfique pour les patients puisqu'elle est associée à une meilleure survie et à une meilleure réponse aux chimiothérapies et traitements adjuvants, comme au temozolomide (Brandes et al., 2006). Même si les mécanismes moléculaires sous-jacents sont encore mal compris, la présence ou non de cette co-délétion est reconnue comme facteur diagnostique et pronostique. En effet, il est estimé que la co-délétion est retrouvée dans 80-90% des oligodendrogliomes de grade II, pour 50 à 70% dans les grades III (Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402 et al., 2006), mais qu'elle est faiblement présente voir absente dans les astrocytomes et les glioblastomes (Aldape et al., 2007).

3. Les mutations des gènes IDH1/2

L'isocitratre déshydrogenase (IDH) est une enzyme du cycle de Krebs qui catalyse la conversion de l'isocitratre en α-cetoglutarate. Initialement mises en évidence dans les glioblastomes, les mutations IDH1 entrainent la formation d'enzymes mutées qui ont la capacité de transformer l'α-cetoglutarate en (R)-2-

hyderoxyglutarate. La fonction exacte de la mutation IDH1 n'est pas encore élucidée, mais certaines études montrent une stimulation de la voie β-caténine ainsi qu'une stabilisation du facteur HIF-1 (« *Hypoxia Inducible Factor 1* ») (Fu et al., 2012). Ces mutations ont été identifiées comme très fréquentes dans les gliomes de bas grade par rapport à ceux de haut grade. En effet, environ 77% des gliomes de grade II et 55% des gliomes de grade III ont la mutation IDH1, contre environ 6% des glioblastomes (Sanson et al., 2009). Parmi la population de glioblastomes présentant une mutation IDH1, 73,3% sont des glioblastomes secondaires alors que 3,7% sont des glioblastomes *de novo* (Nobusawa et al., 2009). Ainsi, les mutations IDH1 sont des puissants marqueurs des glioblastomes secondaires. Des études de survie de patients présentant différents grades de gliome mutés ou non pour IDH1 démontrent clairement l'impact bénéfique de cette mutation sur la survie globale (Sanson et al., 2009) (Table 3).

Grade	IDH1 non muté	IDH1 muté
II	60,1 mois	150,9 mois
III	9,2 mois	19,4 mois
IV	8,8 mois	14 mois

Table 3 : Survie globale des patients en fonction du grade de la tumeur, adaptée de Sanson et al. 2009

4. Les mutations et variants de l'EGFR

« *Epidermal Growth Factor Receptor* », ou EGFR, est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase. L'activation de ce récepteur par différents ligands comme le TGF-α (« *Transforming Growth Factor-α* ») joue un rôle dans la progression tumorale via l'activation de voies de transductions pro-tumorales. On note par exemple l'activation de la voie des MAP kinases (« *Mitogen-Activated Protein Kinase* », ou MAPK) qui est liée à l'activation de la protéine G oncogénique Ras, ou encore via l'activation de la voie de la phosphatidyl-inositol 3-kinase (PI3K). L'augmentation de la transcription du gène de l'EGFR est un phénomène décrit depuis 1988 dans les gliomes (Humphrey et al., 1988). Cette amplification se produit dans 15 à 30% des gliomes de grade III, et dans plus de 50% des glioblastomes (Omuro et al., 2007; Smith et al., 2001). Ces altérations de l'EGFR dans les glioblastomes sont principalement retrouvées dans les glioblastomes *de novo*, et non

dans les glioblastomes secondaires, contrairement à la mutation IDH1. En plus d'être un marqueur des glioblastomes *de novo*, cette amplification s'accompagne de l'amplification d'un variant de l'EGFR, l'EGFR vIII qui induit une activation constitutive de la voie PI3K (Eskilsson et al., 2016; Sugawa et al., 1990), renforçant ses mécanismes pro-tumoraux.

5. Autres mutations des tumeurs gliales

D'autres mutations sont présentes dans les gliomes mais leurs utilisations diagnostiques ou pronostiques sont moins répandues. On note des altérations par exemple dans le gène B-RAF entrainant une activation de la voie Ras-Raf et des voies pro-tumorales liées à la prolifération ou à la survie. Ces mutations seraient présentes dans plus de 60% des gliomes de grade I (Jones et al., 2008). Des mutations de PTEN (antagoniste de PI3K) ont aussi été retrouvées dans les gliomes de grade III et les glioblastomes. Elles sont associées à une diminution de la survie des patients (Smith et al., 2001).

6. Les méthylations du promoteur du gène MGMT

Les chimiothérapies alkylantes agissent, comme leur nom l'indique, en alkylant les groupements guanine de l'ADN, entrainant des mécanismes de mort cellulaire. La O-6-méthylguanine-DNA méthyltransférase (MGMT) est une enzyme de réparation de l'ADN qui va enlever ces groupements alkyles des guanines de l'ADN. L'activité de cette enzyme est grandement étudiée dans de nombreux cancers (Gerson, 2004). L'expression de la protéine MGMT est très variable dans les gliomes, elle se trouve diminuée dans environ 40% des gliomes. Ceci est lié au statut épigénétique du promoteur du gène. En effet, l'hyperméthylation de ce promoteur entraine une diminution de la réparation de l'ADN en inhibant la transcription du gène MGMT (Qian and Brent, 1997). Dans les glioblastomes en particulier, des études cliniques ont montré que les méthylations de ce géne représentent un facteur de bon pronostique. En effet, la diminution de l'expression du gène MGMT entraine un défaut dans la réparation de l'ADN après chimiothérapie alkylante, ceci se traduisant par une augmentation de la survie globale des patients d'environ 8 à 21mois (Esteller et al., 2000).

E. La recherche de biomarqueurs dans les glioblastomes

Les marqueurs moléculaires permettent d'appuyer l'analyse histologique de la tumeur gliale pour le diagnostic. En fonction du grade et du sous-type histologique de la tumeur, le pronostic vital change, et les méthodes thérapeutiques pourraient évoluer vers une médecine personnalisée. Cependant, il n'existe pas ou peu de marqueurs aujourd'hui se suffisant à lui-même en termes de diagnostic et de pronostic. La recherche de nouveaux biomarqueurs pouvant aider à différencier les différentes classes histologiques des tumeurs gliales reste donc essentielle.

Très récemment (début 2016), une nouvelle classification des gliomes de l'OMS à été publiée (Louis et al., 2016). Il s'agit d'une mise à jour de la classification de 2007 en incorporant la recherche de biomarqueurs comme les mutations IDH1, dans la caractérisation des gliomes (Table 4). Cette récente publication va permettre d'aider au diagnostic des tumeurs gliales, d'affiner leur pronostic, et d'améliorer les traitements proposés aux patients. Ceci souligne l'importance de la caractérisation moléculaire de ces tumeurs afin de mieux comprendre la biologie des gliomes

Classification	Co-déplétion 1p19q	Mutation IDH1	Mutation PTEN	Méthylation MGMT	Amplification EGFR
Grade II	X	X		X	
Grade III	X	X		X	X
GBM secondaire		X	X	X	
GBM de novo				X	X

Table 4 : Classification des gliomes en fonction des biomarqueurs connus

F. Traitement et thérapie actuels des glioblastomes

1. La chirurgie

Lorsque la tumeur est accessible, le traitement est dans un premier temps chirurgical. Il s'agit d'une ablation chirurgicale de la tumeur, ou exérèse, la plus radicale possible. Ceci permet d'enlever le plus rapidement, et le plus efficacement la masse tumorale accessible. Des biopsies sont également effectuées afin de débuter

des analyses histologiques et moléculaires, de confirmer le diagnostic, et d'optimiser la suite des traitements. La précision chirurgicale est en constante amélioration avec les progrès de l'imagerie, des instruments chirurgicaux à laser et de la qualité de l'environnement opératoire. De plus, la chirurgie guidée par fluorescence a permis d'optimiser et d'améliorer l'ablation des gliomes et ainsi d'augmenter la survie globale des patients (Stummer et al., 2006). Cette chirurgie est possible après injection d'acide 5-aminolévulinique entrainant la synthèse et l'accumulation de porphyrines fluorescentes dans les cellules de glioblastome. Cependant, du fait de la grande infiltration des glioblastomes dans le parenchyme cérébral, il est en général impossible de réséquer toute la tumeur, au risque d'être délétère pour les fonctions neurologiques du patient.

2. Le protocole de Stupp

a) Radiothérapie et chimiothérapie

Depuis les années 1970, la radiothérapie est utilisée dans le cadre du traitement du glioblastome, après l'exérèse chirurgicale si elle a eu lieu. Elle consiste à utiliser des rayonnements, ou irradiation, permettant de détruire les cellules cancéreuses en bloquant leurs capacitées de se multiplier, tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants. L'impact de la chimiothérapie dans le traitement de première ligne des glioblastomes a été introduit plus récemment. La chimiothérapie consiste à utiliser une approche médicamenteuse pour le traitement d'un cancer. Elle peut être délivrée de manière locale ou systémique. L'administration systémique d'une molécule est cependant limitée pour le traitement des tumeurs cérébrales du fait de la présence de la barrière hémato-encéphalique, protégeant le parenchyme cérébral des substances présentes dans le sang. Au contraire, lors d'une chimiothérapie locale, l'agent thérapeutique est directement administré au lieu de l'exérèse chirurgicale, permettant ainsi de délivrer des concentrations élevées de molécules, tout en s'affranchissant de la barrière hémato-encéphalique.

Depuis 2005, le traitement des glioblastomes est relativement standardisé. Il s'agit, après résection chirurgicale la plus optimale possible, de procéder à une radiothérapie du lit chirurgical associée à une chimiothérapie adjuvante systémique par témozolomide (Temodal®) (Stupp et al., 2005, 2009) (Figure 3).

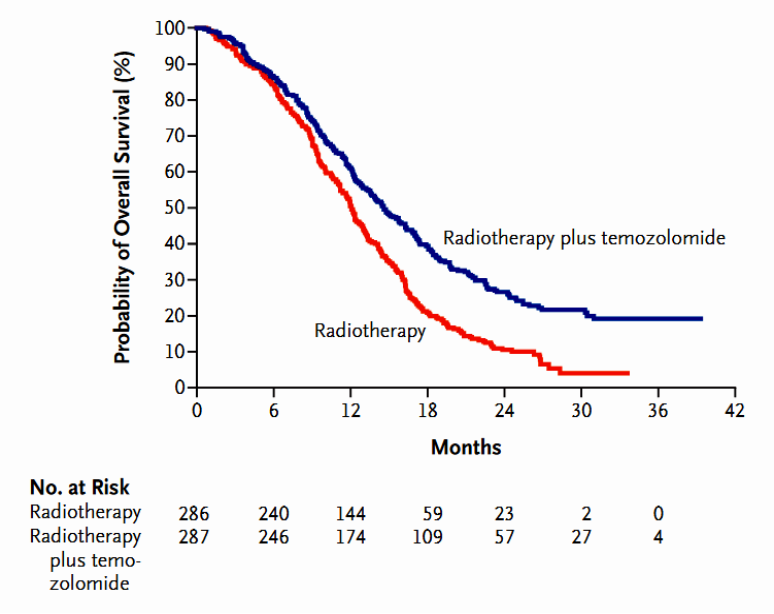


Figure 3: Analyse de survie Kaplan-Meier lors de l'ajout de témozolomide à une radiothérapie classique, de Stupp et al. 2005

b) Le témozolomide

Le témozolomide est un agent alkylant de l'ADN découvert au début des années 1980, et qui fait maintenant référence dans le traitement des glioblastomes. Le témozolomide a la capacité de passer la barrière hémato-encéphalique et présente une forte biodisponiblité au niveau du système nerveux central, ce qui permet de l'administrer par voie orale. L'activation de cette molécule se fait via la conversion spontanée du témozolomide en 3-methyl-(triazen-1-yl) imidazole-4-carboxamide (MTIC), un puissant métabolite antitumoral. L'agent alkylant MITC va méthyler des guanines en position O^6 et N^7 et des adénines en position O^3, entrainant un mauvais appariement du double brin de l'ADN (Denny et al., 1994; Friedman et al., 2000). Ceci va entrainer l'activation du système de réparation de l'ADN MMR (« *mismatch repair* ») qui aboutira à des cassures de l'ADN et au déclenchement de la mort cellulaire. Ainsi, lors d'une diminution de la production de

l'enzyme de réparation de l'ADN MGMT (via la méthylation de son promoteur), l'effet du témozolomide sera amplifié et ceci se traduira par une augmentation de la survie (Esteller et al., 2000). Certaines études montrent que cette enzyme de réparation de l'ADN est inactivée lors du traitement par témozolomide (Tolcher et al. 2003).

3. Traitement des récidives

Du fait des capacités infiltratives élevées des cellules tumorales de glioblastome dans le parenchyme cérébral, ainsi que de sa grande plasticité tumorale, la récidive après traitement est presque inévitable. Le suivi de la tumeur pendant et après le traitement est donc primordial. Une fois le traitement de première ligne effectué, le suivi des patients par examen clinique et IRM cérébrale se fait généralement tous les 2 à 3 mois pour évaluer l'évolution et les complications. Il n'existe pas, à ce jour, de protocole standard pour les prises en charge de seconde ligne.

Lors de la récidive du glioblastome, une nouvelle imagerie par IRM est faite pour évaluer si une chirurgie de seconde ligne est envisageable ou non. Cela dépend alors de l’infiltration du glioblastome au niveau cérébral, mais également de l’état général du patient, souvent altéré. Différentes options sont aussi envisageables comme des chimiothérapies de seconde ligne, des traitements par thérapies ciblées ou l'inclusion dans certaines études cliniques.

a) Chimiothérapies de seconde ligne

Lors d'une chimiothérapie de seconde ligne, différentes molécules alkylantes peuvent être utilisées en monothérapie, ou en association par exemple avec du témozolomide. Il s'agit aussi de molécules capables de traverser la barrière hémato-encéphalique et qui entraînent un arrêt du cycle cellulaire. Ces molécules font principalement partie de la famille des nitroso-urées, comme la carmustine (BCNU) ou la lomustine (CCNU). Le témozolomide est parfois réintroduit en modifiant la dose d'administration.

La carmustine est même utilisée de manière locale lors de chirurgie de seconde ligne. En effet, le Gliadel, qui est un implant composé de polymères

biodégradables imprégnés de carmustine, possède une autorisation de mise sur le marché. Ces implants peuvent être déposés directement dans la cavité d'exérèse. Ils peuvent être indiqués dans les traitements de première ligne, bien que cela ne s'accorde pas au protocole de Stupp, mais aussi en traitement de seconde ligne depuis 1996 lorsqu'une résection chirurgicale est réalisable (Brem et al., 1995).

b) Les thérapies ciblées

Depuis la mise en évidence des anomalies moléculaires au sein des différents glioblastomes, les thérapies ciblant spécifiquement les mécanismes essentiels à leur survie sont de plus en plus nombreuses. Puisque la compréhension et la recherche de nouveaux biomarqueurs sont devenues des priorités pour la prise en charge des patients atteints de glioblastome, ces thérapies sont en constante évolution. Dans le cas des glioblastomes, les thérapies ciblent principalement le microenvironnement tumoral, les récepteurs et voies de signalisations impliquées dans la progression tumorale.

L'étude des récepteurs à activité tyrosine kinase est importante dans les glioblastomes. Comme indiqué précédemment, l'amplification de l'activité de l'EGFR / EGFR vIII représente l'une des caractéristiques principales des glioblastomes. De nombreuses thérapies ciblées ont pour objectif d'inhiber l'activité de ces récepteurs. Ainsi, le Gefitinib (Iressa®) et l'Erlotinib (Tarceva®), inhibiteurs spécifiques de l'EGFR ont été développés. Bien que leur utilité clinique est encore incertaine, les études précliniques sont très encourageantes (Raizer, 2005). De la même manière, l'Imatinib (Glivec®) est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase, mais du récepteur au PDGF qui est fréquemment surexprimé dans les gliomes. Les essais en monothérapies montrent une efficacité limitée. Des études de thérapies en combinaison avec des hydroxyurées semblent prometteuses bien que cliniquement incertaines (Dresemann, 2005; Reardon et al., 2009).

Autre que les récepteurs tyrosine kinase, de nombreuses molécules inhibant certaines voies de signalisation altérées dans les glioblastomes sont développées ou en cours de développement. Ces molécules s'intéressent principalement aux voies de signalisation RAS/MAPK ou PI3K/mTOR/AKT (Mao et al., 2012).

c) *L'angiogenèse tumorale et les anti-angiogéniques*

L'angiogenèse est le processus de formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux existants. Il s'agit d'un processus physiologique primordial dans le développement, mais qui peut être détourné par les tumeurs pour devenir pathologique. Le phénomène d'angiogenèse tumorale est un processus permettant aux tumeurs de se développer via la formation de vaisseaux sanguins au sein de la tumeur. Les glioblastomes font partie des tumeurs les plus vascularisées (Norden et al., 2009), ce qui en fait des cibles de choix pour les traitements anti-angiogéniques. La croissance tumorale va dépendre de ce processus d'angiogenèse tumorale, où les vaisseaux vont permettre d'irriguer la tumeur et ainsi favoriser la progression tumorale. De ce fait, inhiber cette formation de vaisseaux sanguins tumoraux est, depuis longtemps, un grand axe de recherche dans la progression tumorale (Folkman, 1971, 1974; Folkman et al., 1971). Un des facteurs essentiels pour cette angiogenèse est le VEGF (« *Vascular Endothelial Grotwh Factor* »), qui, en se fixant sur son récepteur, va induire la formation de vaisseaux sanguins (Folkman, 2007) (Figure 4).

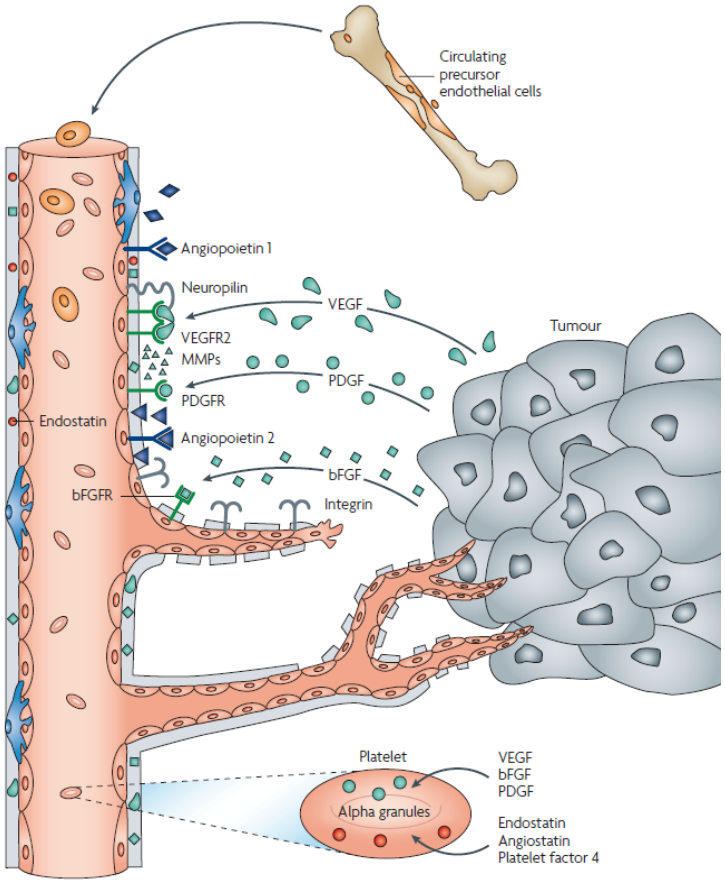


Figure 4: Facteurs impliqués dans l'angiogenèse tumorale, Judah Folkman 2007

Les cellules tumorales, instables génétiquement, peuvent sécréter du VEGF et ainsi entrainer l'induction de l'angiogenèse tumorale (Bergers and Benjamin, 2003; Ferrara, 2002). Le récepteur au VEGF étant exprimé par les cellules endothéliales, la fixation de ce facteur de croissance induit le bourgeonnement, ou « *sprouting* » des cellules endothéliales à partir de vaisseaux préexistants. Ceci nécessite au préalable la dégradation de la membrane basale du vaisseau sanguin, qui est réalisée par différentes protéases telles que les métalloprotéases ou le système urokinase/plasmonigène que nous détaillerons plus bas. Les cellules endothéliales vont alors proliférer et migrer le long du gradient de VEGF, et permettre ainsi l'établissement d'un néo-vaisseau sanguin. Les cellules vont alors former des jonctions intercellulaires permettant la création de la lumière dans le néo-vaisseau sanguin. Après restauration de la membrane basale, des cellules péricytaires vont être recrutées, et ces dernières vont avoir un rôle protecteur du vaisseau et stabiliser la migration des cellules endothéliales. Dans le cadre de l'angiogenèse tumorale, du fait de l'expression dérégulée des facteurs pro-angiogèniques, la couverture péricytaire n'est souvent que partielle et le vaisseau n'est jamais totalement stabilisé, entrainant la formation d'un réseau vasculaire irrégulier, perméable et tortueux (Baluk et al., 2005).

L'expression du VEGF par les cellules tumorales est principalement liée à l'hypoxie. En effet, en condition hypoxique, l'expression du facteur de transcription HIF-1α augmente et régule de nombreuses protéines, dont le VEGF (Fischer et al., 2005). La formation d'une zone hypoxique liée à la masse tumorale grandissante induit l'expression fortement accrue de HIF-1α. Ceci va permettre la secrétion de VEGF par les cellules tumorales et ainsi induire la vascularisation tumorale. Les vaisseaux tumoraux étant tortueux et dérégulés, l'irrigation sanguine ne va pas être optimale et certaines zones tumorales resteront fortement hypoxiques. Ces zones provoquent l'expression continue de facteur pro-angiogènique comme le VEGF. La normalisation vasculaire consiste à permettre aux vaisseaux sanguins tumoraux de retrouver une configuration physiologique, et ainsi d'inhiber les zones hypoxiques de la tumeur. Cependant, HIF-1α peut aussi être activé par la modulation de voies de signalisations oncogéniques comme celle de la PI3K, hautement et fréquemment dérégulée dans les glioblastomes (Flintoft, 2004) (Figure 5).

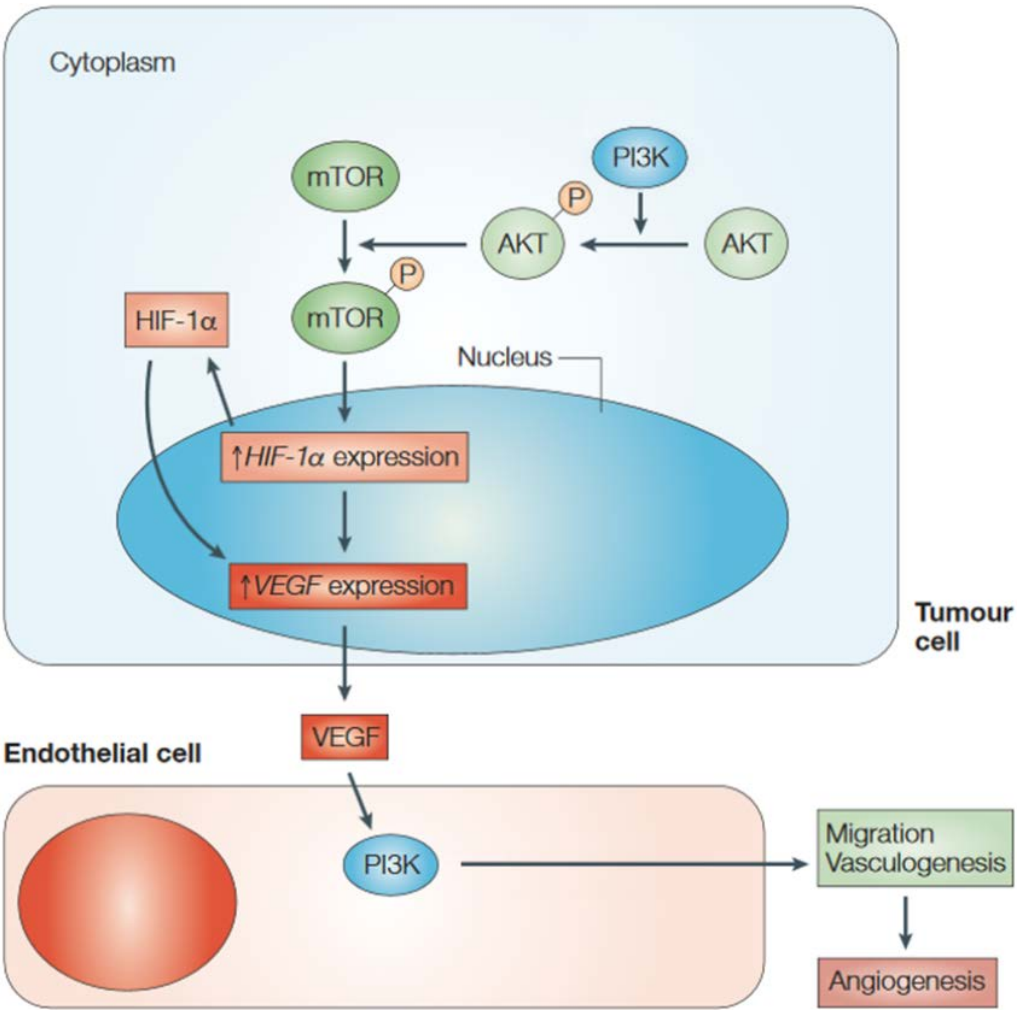


Figure 5: Induction de l'angiogenèse par la voie de signalisation PI3K/AKT, adaptée de Flintoft et al. 2004

Le Bevacuzimab (Avastin®, ou BEV) est un anticorps monoclonal humanisé ciblant et se fixant sur un sous-type de VEGF, le VEGF-A. Cette fixation bloque l'activité du VEGF en empêchant sa fixation sur son récepteur. Ceci entraine un ralentissement de l'angiogenèse et ainsi de la croissance tumorale. Depuis Mai 2009, suite à des études cliniques de phase II ayant montré une amélioration de la survie sans progression, mais pas de la survie globale, le Bevacizumab est largement utilisé lors de la récidive tumorale. Cependant, il n'a pas d'autorisation dans cette indication en Europe. A noter qu'il est autorisé par la FDA (« *Food and Drug Administration* ») aux Etats-unis lors de la récidive des glioblastomes, ce qui rentre alors dans le cadre du protocole Stupp (Cohen et al., 2009; Nagpal et al., 2011) (Figure 6).

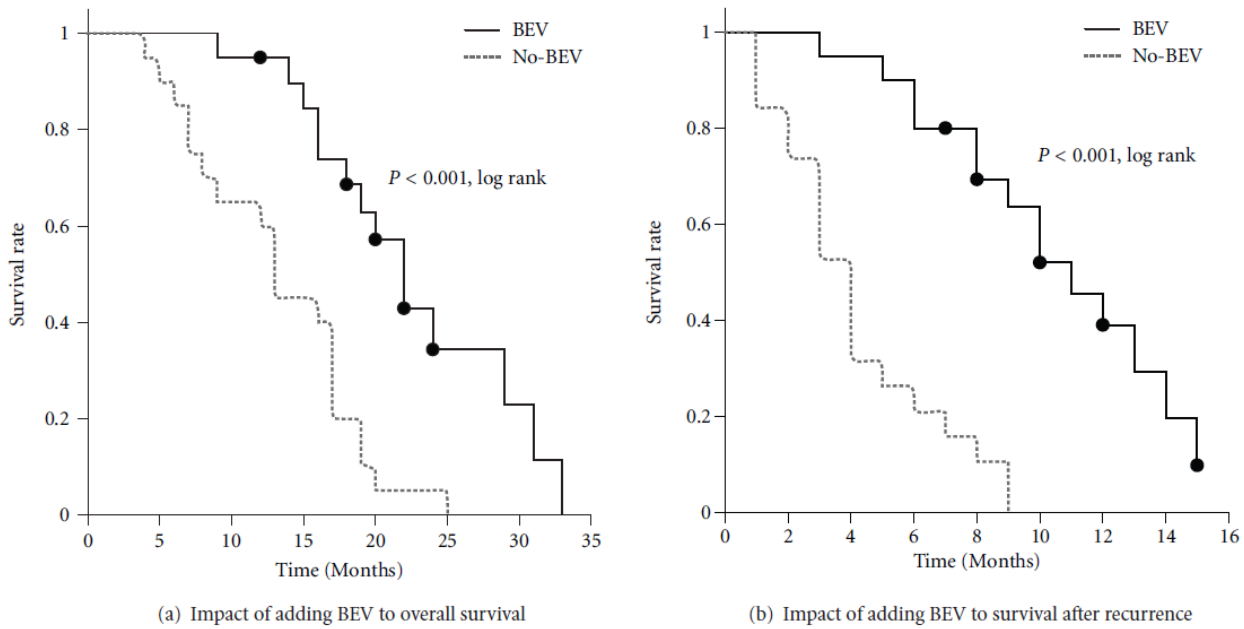


Figure 6: Impact du Bevacuzimab sur la survie sans progression des patients, d'après Nagpal et al. 2011

Bien que les essais cliniques en phase II soient très prometteurs, le manque d'étude clinique de phase III du Bevacuzimab en fait un traitement très controversé dans le monde. En effet, la réponse modeste en comparaison à une radiothérapie simple fait du Bevacuzimab l'une des thérapies ciblées dans le glioblastome la plus discutée à ce jour (Seystahl et al., 2016; Verhoeff et al., 2009; Wick et al., 2010).

4. Mécanismes d'adaptation des glioblastomes

a) Plasticité et infiltration des cellules cancéreuses

L'une des principales causes de récidive des glioblastomes est liée à la grande infiltration des cellules tumorales dans le cerveau (Hofer and Merlo, 2002) (Figure 7). Il est difficile de distinguer le tissu tumoral du tissu cérébral sain dans certaines zones d'infiltration. De plus, une résection tumorale étendue est généralement impossible du fait de la proximité de zones du cerveau fonctionnelles. Malgré les progrès de la chirurgie guidée par fluorescence, l'infiltration tumorale invisible induit la récidive du glioblastome chez la quasi-totalité des patients, et ceci dans un délai d'environ 9 mois.

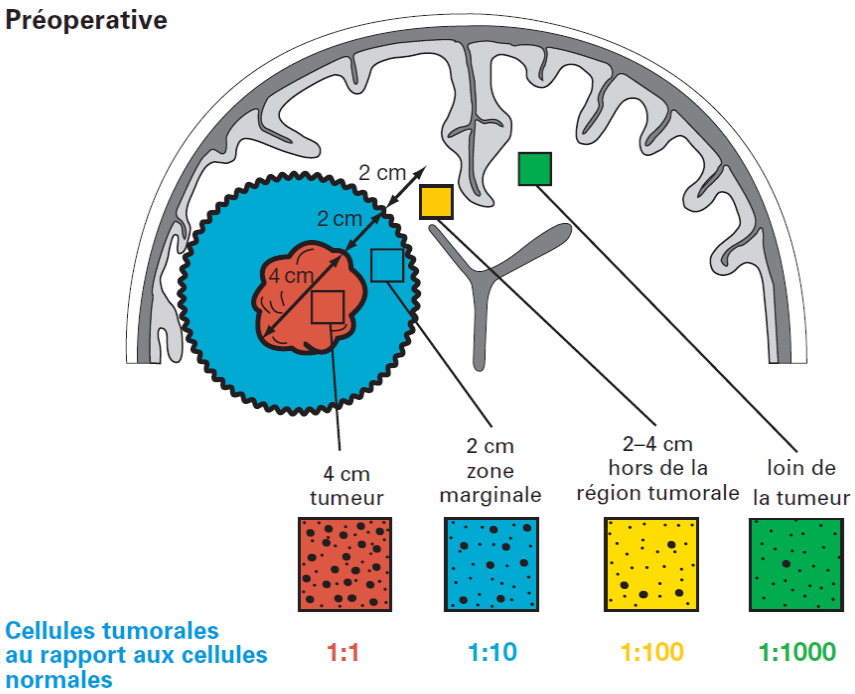


Figure 7: Infiltration des cellules tumorales, adaptée de Hofer et al., 2002

b) Resistance aux anti-angiogéniques

Sous thérapeutiques anti-angiogéniques, il a été montré que les cellules de glioblastomes sont capables de développer des résistances intrinsèques ou adaptatives à ces traitements. Ainsi, les glioblastomes sont capables d'assurer leur développement indépendamment de l'angiogenèse tumorale par différents mécanismes comme la co-option vasculaire ou la vasculogenèse (Hardee and Zagzag, 2012).

Les cellules tumorales de glioblastomes sont capables de migrer et d'envahir le tissu sain. Lorsqu'elles sont capables de migrer le long des capillaires sanguins, les cellules vont former une masse tumorale dont le réseau vasculaire est celui du tissu envahi, on parle alors de co-option (Holash et al., 1999) (Figure 8). Les cellules tumorales vont ainsi être capables de migrer vers des vaisseaux sanguins pré-existants lorsque l'angiogenèse est inhibée (Rubenstein et al., 2000).

Un autre processus de développement du glioblastome indépendamment de l'angiogenèse tumorale est la vasculogenèse (Figure 8). Il s'agit de la mobilisation et la différenciation de cellules circulantes issues de la moelle osseuse en cellules endothéliales dans le mur vasculaire. Ce processus est dépendant de l'hypoxie dans cette pathologie tumorale (Lyden et al., 2001). Certaines études montrent que le processus de vasculogenèse pourrait être impliqué dans la récidive des glioblastomes (Kioi et al., 2010).

D'autres processus favorisant le développement des glioblastomes indépendamment de l'angiogenèse sont connus (mimétisme vasculaire, transdifférenciation des cellules tumorales en cellules endothéliales), mais leurs implications dans les phénomènes de récidives restent encore à élucider.

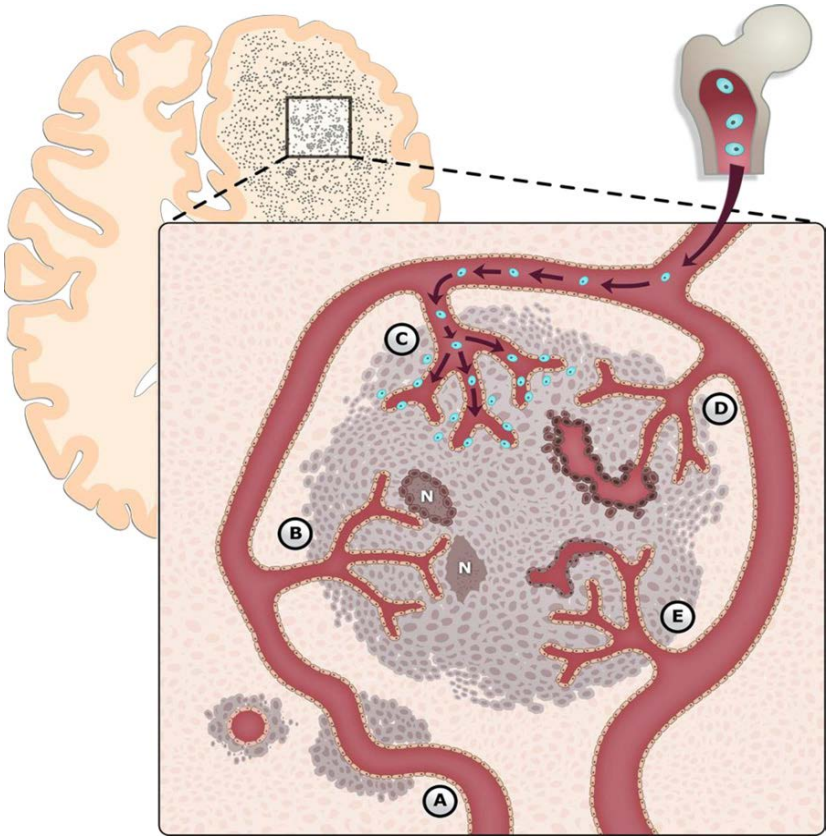


Figure 8: Mécanismes de vascularisation des glioblastomes de Hardee ME et al. 2012

A: co-option vasculaire. B: angiogenèse tumorale. C: Vasculogenèse. D: mimétisme vasculaire. E : transdifférenciation de cellules tumorales en cellules endothéliales. N : nécrose

II. Implication des chimiokines CXC et de CXCR3 dans le cancer

A. Les chimiokines

Les cytokines sont des protéines de signalisation, comparables aux hormones, qui sont généralement sécrétées suite à une stimulation. Elles agissent sur les cellules en se fixant sur des récepteurs spécifiques, et régulent de nombreuses fonctions biologiques dans la cellule (comme la différenciation, la prolifération, la migration, la survie ou encore la mort cellulaire).

Les chimiokines constituent une sous-famille de cytokine. Il s'agit de petites protéines (7 à 14 kDa) avec une activité chimio-attractante, c'est à dire qu'elles ont la capacité d'orienter les cellules et d'induire leurs migrations au cours de différents processus. Historiquement, les chimiokines ont d'abord été décrites pour leur important rôle dans le système immunitaire, notamment au niveau du chimiotactisme des leucocytes vers les sites inflammatoires de l'organisme. Désormais, les chimiokines sont connues pour intervenir dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques tels que l'embryogenèse, l'inflammation, l'angiogenèse et le développement tumoral (Krieg and Boyman, 2009).

En plus de fixer leurs récepteurs pour activer leurs fonctions biologiques, les chimiokines interagissent aussi avec les glycosaminoglycanes. Il s'agit de polymères saccharidiques linéaires à longue chaîne présents dans pratiquement tous les tissus. Ils se présentent sous forme soluble (Héparine) ou liée à la membrane cellulaire (héparane sulfate). Les glycosaminoglycanes sont capables de fixer de nombreuses protéines, dont les chimiokines, ce qui les protègent de l'activité protéolytique de certaines peptidases et protéinases (Sadir et al., 2004). Les différences d'affinités de fixation des chimiokines sur les glycosaminoglycanes pourraient également jouer sur la biodisponibilité de ces chimiokines (Dubrac et al., 2010; Kuschert et al., 1999).

1. Classification des chimiokines

a) La classification structurale

Sécrétées par un grand nombre de cellules, les chimiokines sont divisées en quatre sous-familles : C, CC, CXC ou CX3C. Cette division est fondée sur leurs propriétés structurales et leurs séquences primaires en acides aminés, présentant des résidus cystéines conservés (Bestebroer et al., 2010; Murphy, 2002; Murphy et al., 2000; Rossi and Zlotnik, 2000; Zlotnik and Yoshie, 2000) (Figure 9). L'émergence de la classification internationale des chimiokines se basant sur ces propriétés structurale date de 1999 et provient du symposium « Chimiokines et récepteurs à chimiokines » (« *Chemokines and Chemotactic Receptors, Keystone symposium 1999* »). Cette classification fut rapidement publiée (Zlotnik and Yoshie, 2000), acceptée, et a grandement aidée pour établir une base et une nomenclature standard permettant l'étude de ces protéines.

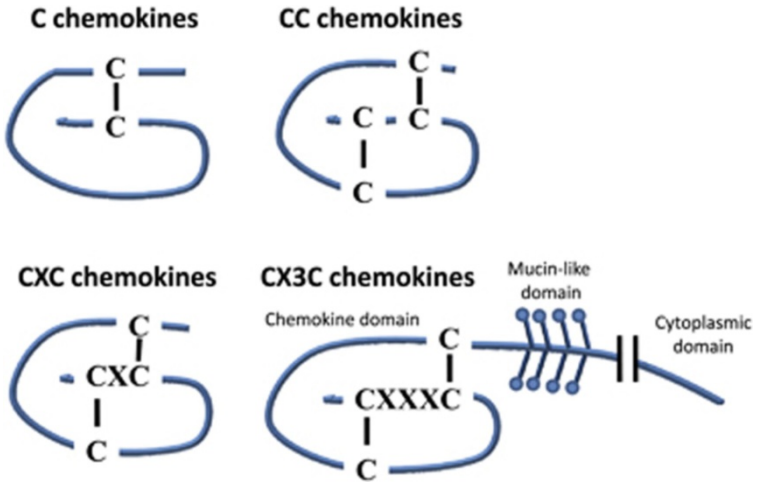


Figure 9: Les 4 sous-familles de chimiokines, de Bestebroer J et al. 2009

Pour la classe de chimiokines C, la cystéine en N-terminale est très conservée. Pour les familles CC, CXC et CX3C, deux cystéines en N-terminale sont très conservées. Pour les chimiokines CC, les deux résidus cystéines sont côte à côte, il n'y a aucun autre acide aminé entre ces deux résidus. Au contraire, pour la famille CXC, un acide aminé, nommé X, se trouve entre les deux résidus, et enfin pour la famille CX3C, trois acides aminés séparent les deux résidus cystéines en N-terminale. Les familles CC et CXC représentent la grande majorité des chimiokines

découverte à ce jour. On distingue aujourd'hui environ 50 chimiokines différentes, ce qui en fait la plus grande famille de cytokine. Ces chimiokines sont toutes caractérisées selon ce modèle de classification structurale.

b) Le motif "ELR" des chimiokines CXC

Les chimiokines CXC appartiennent à une grande famille de peptides homologues présentant une activité positive ou négative sur le contrôle de l'angiogenèse en fonction de la présence ou non d'un motif d'acide aminés, le motif ELR (Glutamate, Leucine, Arginine). Ce motif ELR se trouve en amont des cystéines conservées permettant leurs classifications (Table 5). Les protéines CXC contenant le motif ELR sont dites pro-angiogéniques (Belperio et al., 2000; Salcedo and Oppenheim, 2010; Strieter et al., 1995). Les chimiokines CXC dépourvue de la séquence ELR ont quant à elles des propriétés angiostatiques. La balance d'expression de ces dernières peut être modifiée dans un contexte pathologique. Notamment, le modèle de Strieter propose que la balance d'expression des chimiokines ELR+ / ELR- joue un rôle important dans le développement tumoral (Rossi and Zlotnik, 2000; Strieter et al., 1995, 2006).

Famille	Nomenclature	Nom	Motif ELR
CC	CCL1	I-309	-
	CCL2	MCP-1	-
	CCL3	MIP-1a	-
	CCL3L1	LD78b	-
	CCL3L3	LD78b	-
	CCL4	MIP-1b	-
	CCL4L1	AT744.2	-
	CCL4L2		-
	CCL5	RANTES	-
	CCL7	MCP-3	-
	CCL8	MCP-2	-
	CCL11	Eotaxin	-
	CCL12	MCP-5	-
	CCL13	MCP-4	-
	CCL14	HCC-1	-
	CCL15	HCC-2	-
	CCL16	HCC-4	-
	CCL17	TARC	-
	CCL18	PARC / DC-CK1	-
	CCL19	MIP-3b / ECL / exodus-3	-
	CCL20	MIP-3a / LARC / exodus-1	-
	CCL21	SLC / exodus-2	-
	CCL22	MDC	-
	CCL23	MPIF-1	-
	CCL24	MIPF-2 / eotaxin2	-
	CCL25	TECK	-
	CCL26	eotaxin-3	-
	CCL27	CTACK / ILC	-
	CCL28	MEC	-

Famille	Nomenclature	Nom	Motif ELR
CC	CCL21	SLC / exodus-2	-
	CCL22	MDC	-
	CCL23	MPIF-1	-
	CCL24	MIPF-2 / eotaxin2	-
	CCL25	TECK	-
	CCL26	eotaxin-3	-
	CCL27	CTACK / ILC	-
	CCL28	MEC	-
CXC	CXCL1	GRO-a	ELR+
	CXCL2	GRO-b	ELR+
	CXCL3	GRO-g	ELR+
	CXCL4	PF4	ELR-
	CXCL4L1	PF4V1	ELR-
	CXCL5	ENA-78	ELR+
	CXCL6	GCP-2	ELR+
	CXCL7	NAP-2	ELR+
	CXCL8	IL-8	ELR+
	CXCL9	MIG	ELR-
	CXCL10	IP-10	ELR-
	CXCL11	I-TAC	ELR-
	CXCL12	SDF-1	ELR-
	CXCL13	BLC / BCA-1	ELR-
	CXCL14	BRAK / Bolekine	ELR-
	CXCL15		ELR+
	CXCL16	Small inductible cytokine B6	ELR+
	CXCL17	DMC	ELR-
C	(X)CL1	Lymphotactine	-
	(X)CL2	-	-
CX3C	CX3CL1	Fractalkine	-

Table 5: Classification des chimiokines, d'aprés Zlotnik A et al. 2012

2. Rôle des chimiokines CXC

Historiquement, les chimiokines ont été décrites pour leur fonction au niveau du recrutement des leucocytes vers les sites inflammatoires ou infectieux de l'organisme (Taub, 1996). Les chimiokines sont maintenant connues pour avoir de nombreuses fonctions physiologiques comme pathologiques dans l'organisme.

a) Le recrutement leucocytaire.

Le nombre de cellules immunitaires résidentes au sein des tissus est limité. Le processus inflammatoire ou infectieux met en place le recrutement de ces cellules, présentes dans la circulation sanguine. Ceci se fait via la production de chimiokines. Les leucocytes sont les cellules impliquées dans la réponse immunitaire et se classent en trois familles : les granulocytes, les monocytes et les lymphocytes.

Le recrutement leucocytaire est un processus comprenant plusieurs phases. Les leucocytes sont présents et circulent dans le sang, on parle de phase de roulement, ou *« rolling »*. Les gradients de chimiokines formés au niveau de l'inflammation sont capables de mobiliser ces leucocytes circulants. Ces gradients se forment via la fixation des chimiokines sur les glycosaminoglycanes. De plus, en se fixant sur leurs récepteurs présents à la surface cellulaire, les chimiokines vont induire la migration des cellules d'intérêt au site de l'inflammation. Une fois le recrutement effectué, l'adhésion des leucocytes sur l'endothélium vasculaire est un processus dynamique mettant en jeu l'activation et l'interaction de protéines spécifiques (Adams and Shaw, 1994). L'adhésion s'effectue par l'action de séléctines-P, protéines d'adhésion présentes à la surface des cellules endothéliales activées et reconnaissant les résidus glucidiques présents sur les leucocytes. Une seconde phase renforce cette adhésion et se met en place via la fixation d'intégrines à leur recepteur ICAM (*« Intracellular adhesion molecule »*) présents sur la paroi vasculaire. La phase d'extravasation des leucocytes, ou diapédèse, correspond au passage de la cellule immunitaire à travers deux cellules endothéliales par dissociation locale des jonctions intercellulaires (Adams and Lloyd, 1997; Schaerli and Moser, 2005). Les leucocytes se trouvant dans le tissu seront dirigés vers la zone infectieuse ou inflammatoire en fonction du gradient de chimiokines dans le tissu (Figure 10).

Suivant les leucocytes recrutés, différentes réactions de l'immunité se mettront en place. Il peut s'agir de la production d'anticorps par les lymphocytes pour les réactions infectieuses, de la production de médiateur chimique par certains granulocytes pour les réactions inflammatoires, ou encore de la mise en place de mécanismes de phagocytose par les monocytes (via leurs différenciations en macrophage).

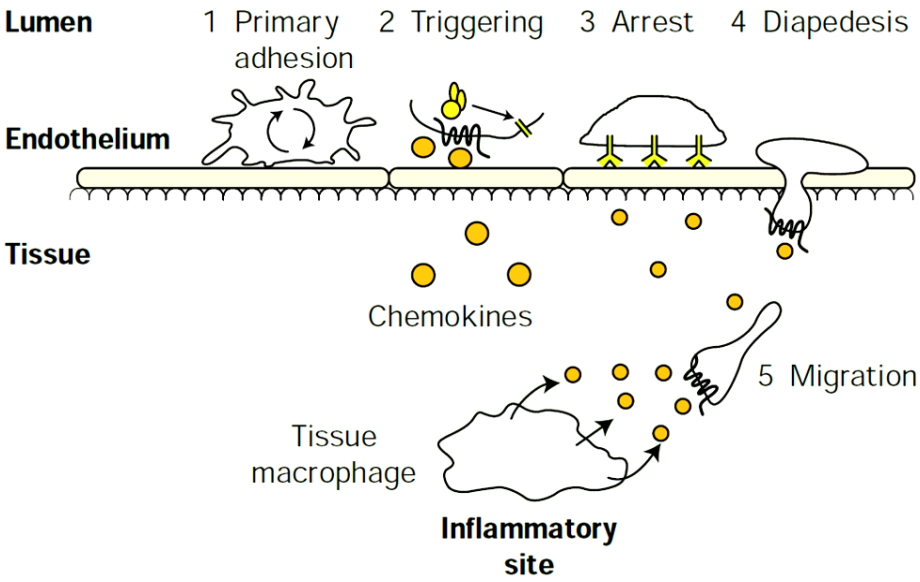


Figure 10: Rôle des chimiokines dans le recrutement leucocytaire, d'aprés Adams DH et al. 1997

b) La modulation de l'angiogenèse

Comme introduit précédemment, les chimiokines CXC ont un rôle très important comme modulateur de l'angiogenèse en fonction de la présence ou non d'un motif d'acide aminés, le motif « ELR ». Les chimiokines possédant le motif ELR sont pro-angiogéniques, contrairement aux chimiokines dépourvues du motif ELR qui sont angiostatiques (Strieter et al., 2005).

CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL6, CXCL7 et CXCL8 constituent les chimiokines pro-angiogeniques. Parmi elles CXCL8, plus connue sous le nom d'Interleukine-8, fut la première chimiokine ELR+ décrite comme pro-angiogénique. Les chimiokines ELR+ sont capables d'induire le chimiotactisme des cellules endothéliales ainsi que leur activité de prolifération, permettant l'angiogenèse *in vivo* (Strieter et al., 1995). Les facteurs pro-angiogéniques présents dans le microenvironnement, peuvent promouvoir l'angiogenèse par de multiples méthodes directes ou indirectes. Par exemple, l'activation physiologique des cellules endothéliales par le VEGF peut entrainer l'augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2. Cette dernière a été caractérisée comme stimulant l'expression de la chimiokine CXCL8 qui va fonctionner de manière autocrine et paracrine pour maintenir ce phénotype angiogénique (Nör et al., 2001). De plus, des mutations de CXCL8 entrainant une disparition du motif ELR permettent la formation d'une chimiokine ELR- capable d'inhiber l'angiogenèse. Ceci confirme le rôle essentiel du motif ELR dans le contrôle de l'angiogenèse par les chimiokines (Strieter et al., 1995).

CXCL4, CXCL4L1, CXCL9, CXCL10, CXCL11 et CXCL14 constituent les chimiokines angiostatiques. Ne variant que de 3 acides aminés par rapport au CXCL4, le CXCL4L1 présente des capacités d'inhibition de l'angiogenèse plus importantes. En effet, CXCL4L1 inhibe le chimiotactisme des cellules endothéliales à une concentration trente fois inférieure à celle utilisée pour le CXCL4, ainsi que l'angiogenèse *in vivo* induite par le FGF-2 (« *Fibroblast Growth Factor-2* ») dans des cornées de rat (Struyf et al., 2004, 2007; Vandercappellen et al., 2010). Ces deux chimiokines, ainsi que CXCL9, CXCL10 et CXCL11, sont induites par l'interféron gamma (IFNγ), et inhibent l'angiogenèse stimulée par les chimiokines ELR+ ou d'autres facteurs de croissances comme le FGF-2 ou le VEGF (Strieter et al., 1995). Les IFN sont des molécules aux propriétés anti-prolifératives et angiostatiques. Tandis que l'expression CXCL8, CXCL1 ou encore CXCL5 est augmentée par de nombreux facteurs tel que le TNF ou l'interleukine1 pour stimuler l'angiogenèse, l'IFNγ entraine une diminution de leur expression (Gusella et al., 1993; Schnyder-Candrian et al., 1995). De plus, il a été montré que l'IFNγ stimule l'expression des chimiokines ELR- (Farber, 1993), et apparait donc comme essentiel dans les

phénomènes angiostatiques induits par les chimiokines ELR-. CXCL14, pour sa part, est connu pour inhiber spécifiquement la chimiotaxie des cellules endothéliales induites par le CXCL8 ou par des facteurs de croissance comme le FGF-2 ou le VEGF (Shellenberger et al., 2004).

c) Autres rôles impliquant les chimiokines

L'implication des chimiokines dans le système immunitaire via le recrutement des leucocytes, ainsi que leurs rôles dans l'angiogènese font parties des plus grandes fonctions physiologiques étudiées pour ces protéines. Cependant, les chimiokines jouent des rôles essentiels dans d'autres processus physiologiques ou pathologiques.

En effet, ces dernières ont un rôle dans le développement embryonnaire, au niveau de l'implantation de l'embryon et dans le développement du système nerveux central (Raman et al., 2011). Les chimiokines sont également impliquées dans la réparation et la cicatrisation cutanée, lors des phases d'inflammation, de prolifération et de remodelage cellulaire (Gillitzer and Goebeler, 2001). Elles interviennent aussi dans de nombreux processus pathologiques comme l'asthme et les allergies via le recrutement leucocytaire (Pease, 2006), ou encore dans les infections au VIH (Berger et al., 1999; Lusso, 2006). De nos jours, de plus en plus d'études émergent sur le rôle des chimiokines dans le cancer, ayant à la fois des fonctions pro-tumorales ou anti-tumorales (Krieg and Boyman, 2009).

3. Chimiokines et cancer

Dans la plupart des tumeurs solides, le microenvironnement tumoral est riche en chimiokines. Les cellules tumorales, elles-mêmes, peuvent secréter des chimiokines. La chimiotaxie, le recrutement leucocytaire sur le site tumoral, l'angiogenèse tumorale, ainsi que les fonctions biologiques liées à la prolifération, la survie cellulaire et l'invasion, sont des fonctions essentielles au développement tumoral, qui sont régulées par les chimiokines.

a) L'immunité tumorale

Le premier lien entre inflammation et cancer date de 1863, où Rudolf Virchow faisait l'hypothèse que l'origine du cancer se trouvait dans les sites d'inflammations chroniques de l'organisme. De nos jours, ce lien est accepté mais fait toujours l'objet de nombreuses études (Balkwill and Mantovani, 2001; Coussens and Werb, 2002).

On retrouve plusieurs cellules inflammatoires associées aux tumeurs. En effet, des cellules associées à l'inflammation sont présentes dans le stroma ainsi que dans la tumeur. Par exemple, les macrophages associés aux tumeurs (*« TAM* – Tumor-associated macrophages *»*), ou encore les lymphocytes associés aux tumeurs (Lymphocytes T CD4+ ou CD8+ principalement) font partis des leucocytes recrutés par les chimiokines, et qui vont avoir un rôle important dans le développement tumoral.

Les macrophages sont des éléments du système immunitaire provenant de la différenciation de leucocytes spécifiques, les monocytes. Ils ont différents rôle comme la phagocytose, c'est-à-dire l'élimination de cellules mortes, de débris cellulaires ou encore de pathogènes, mais aussi un rôle dans la sécrétion de cytokines et chimiokines. Les macrophages sont aussi impliqués dans les communications intercellulaires, notamment avec les lymphocytes T via la présentation d'antigènes spécifiques à leurs surfaces cellulaires. Les TAMs sont parmi les composants de la réponse inflammatoire les plus importants dans les tumeurs, et sont recrutés principalement par les chimiokines de type CC et de la famille MCP, pour *« Monocyte Chemotactic Protein »*, comme CCL2, CCL7, CCL8, CCL12 ou encore CCL13.

Une fois recrutés, les monocytes vont se différencier en deux types de TAM selon le microenvironnement tumoral, les TAM M1, anti-tumoraux, ou TAM M2, pro-tumoraux (Mantovani et al., 2004; Solinas et al., 2009) (Figure 11). Cette plasticité des monocytes à se différencier en différent type de macrophages est un des régulateurs essentiels à la progression tumorale. Cette différenciation est liée au microenvironnement tumoral, et notamment aux chimiokines qui sont présentes et qui les ont recrutés sur le site inflammatoire (Mantovani et al., 2004).

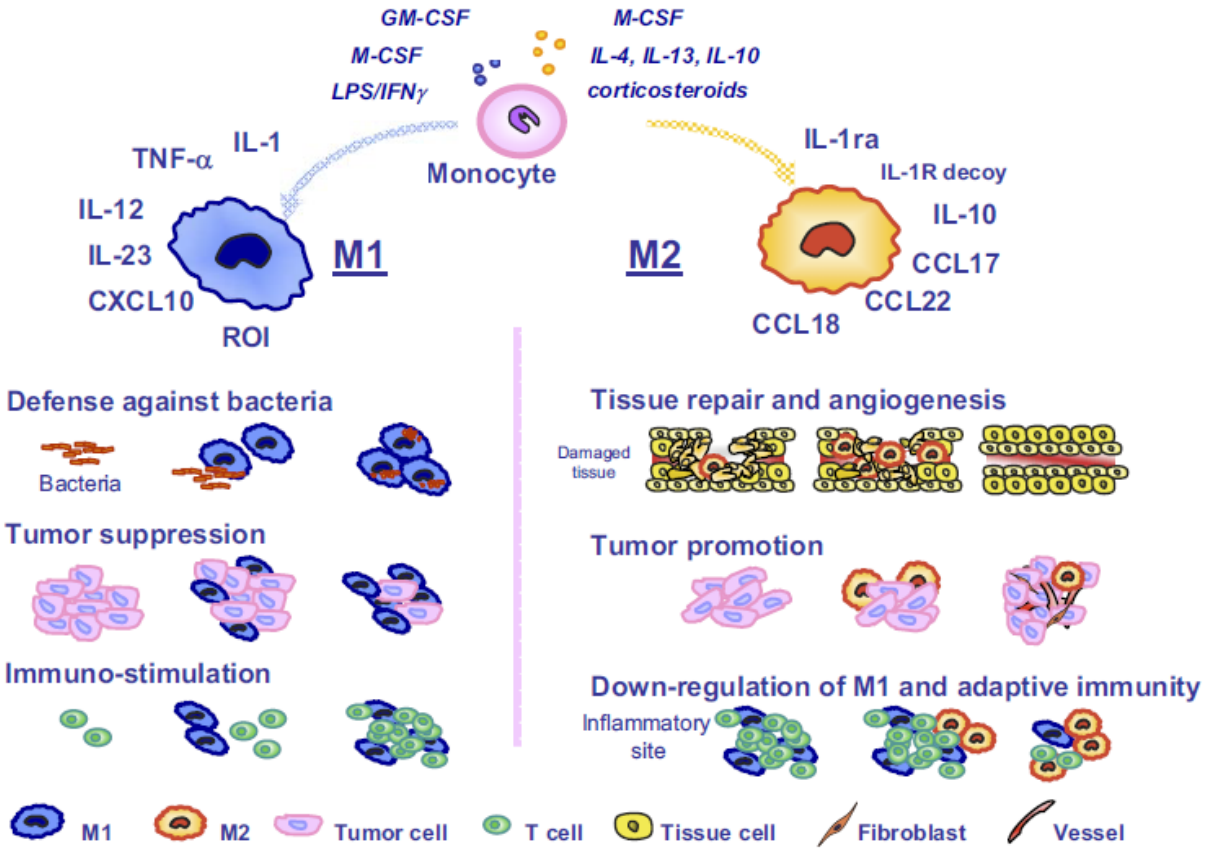


Figure 11: Différenciation des monocytes en TAM M1 ou M2, d'après Solinas G et al. 2009

b) Le « switch angiogénique »

Comme expliqué précédemment, l'angiogenèse tumorale est un processus essentiel pour le développement des tumeurs. Cette angiogenèse est finement régulée par la balance entre des molécules pro- ou anti-angiogéniques. Dans la tumeur, la balance entre ces deux types de molécules est fortement déséquilibrée vers un phénotype angiogénique. Lorsque ce phénotype apparait, on parle de « *switch angiogénique* » (Bergers and Benjamin, 2003; Hanahan and Folkman, 1996). Les membres de la famille de chimiokine CXC, pro- ou anti-angiogéniques selon le motif ELR jouent un rôle essentiel dans l'angiogenèse physiologique comme détaillée précédemment, mais aussi dans le switch angiogénique.

Au niveau tumoral, les chimiokines sont impliquées de deux manières différentes pour réguler l'angiogenèse tumorale. Soit directement via les chimiokines CXC et leurs motifs ELR, régulant la prolifération et le chimiotactisme endothéliales, soit indirectement via le recrutement leucocytaire. En effet, le processus

inflammatoire ainsi que les macrophages, neutrophiles ou encore les mastocytes participent à l'induction de l'angiogenèse et à son maintien dans le développement tumorale (Qian and Pollard, 2010). Notamment, les TAMs de type M2 sont capables de fortement induire l'angiogenèse. De nombreuses études émergent sur l'importance de la différenciation des monocytes en TAM M1 ou M2 pour réguler l'angiogenèse tumorale. La protéine HRG (*« Histidine-Rich Glycoprotein »*) est un anti-angiogénique physiologique régulant la normalisation vasculaire. Cette protéine est capable d'induire la polarisation des TAM M2 en TAM M1 via, entres autres, la diminution du facteur de croissance placentaire PIGF (pour *« Placenta Growth Factor »*) produit par les macrophages et qui induit la polarisation en TAM M2 (Huang et al., 2011; Rolny et al., 2011) (Figure 12). Ainsi, de nombreuses stratégies thérapeutiques apparaissent sur le recrutement leucocytaire des chimiokines et la différenciation des TAM sur la normalisation vasculaire et le switch angiogénique.

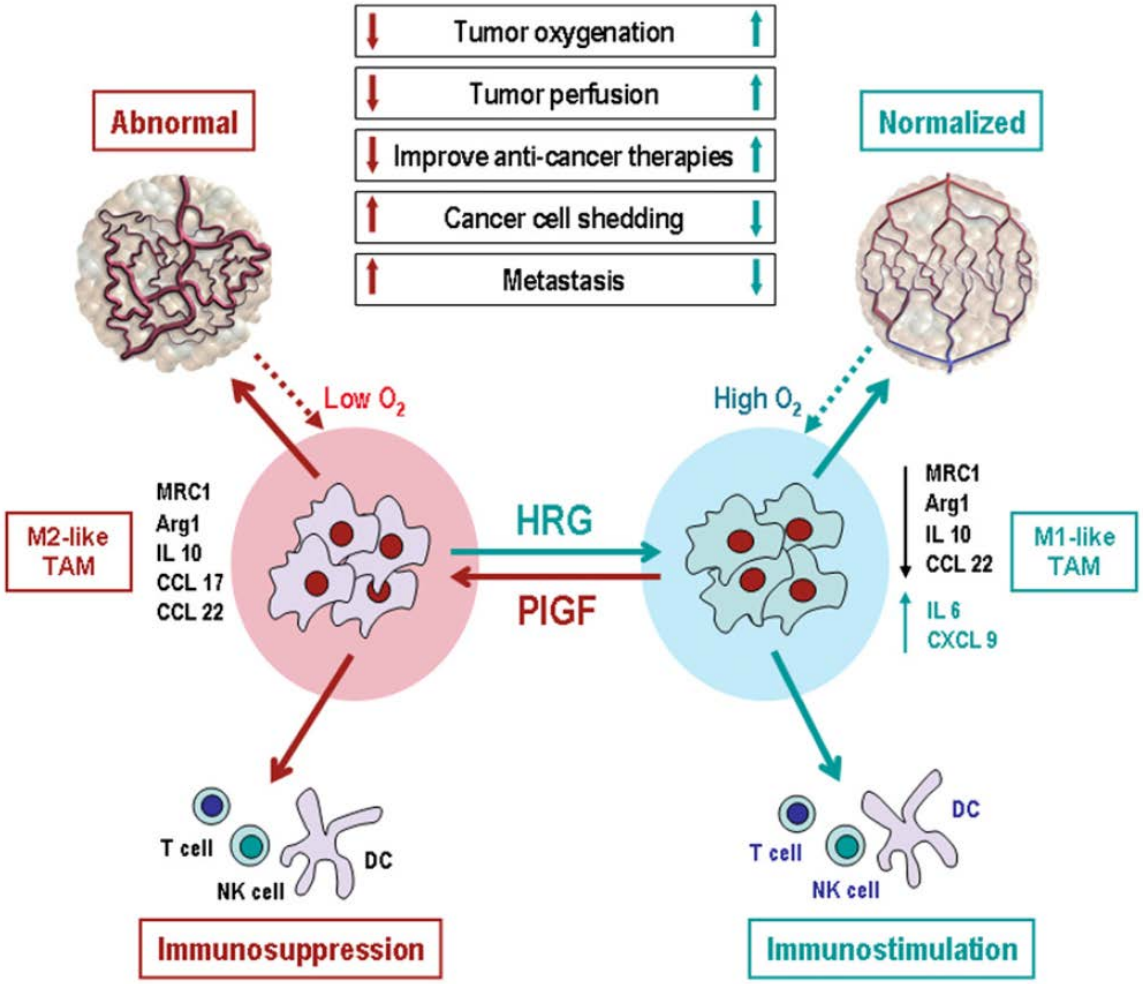


Figure 12: Stratégie de normalisation vasculaire en ciblant la polarisation des TAM recrutés par les chimiokines, d'après Huang Y et al. 2011

c) Cas du CXCL4 et son variant CXCL4L1

Le CXCL4, aussi connu sous le nom de PF4 (« *Platelet Factor 4* ») fut la première chimiokine isolée (Poncz et al., 1987), mais aussi la première chimiokine décrite pour ses propriétés angiostatiques (Maione et al., 1990) avec son absence de motif ELR. CXCL4 a été décrite comme une chimiokine multifonctionnelle intervenant dans d'autres rôles que la régulation de l'angiogenèse, comme dans la coagulation (Dehmer et al., 1995), la modulation du système immunitaire (Romagnani et al., 2005) et le développement tumoral (Strieter et al., 2006). Un nouveau variant hautement homologue à CXCL4, nommé CXCL4L1 a été décrit en 2004. Ces deux dernières chimiokines ne diffèrent seulement que de 3 acides aminés dans le domaine C-terminal (P58L, K66E, et L67H, du CXCL4 au CXCL4L1) (Struyf et al., 2004) (Figure 13). Il a été montré que parmi les 3 acides aminés qui diffèrent entre les deux variants, la substitution de l'histidine67 (présent uniquement dans le CXCL4) en Leucine67 (présent uniquement dans le CXCL4L1) entrainait une forte diminution de l'affinité du CXCL4L1 pour les glycosaminoglycanes (Dubrac et al., 2010). La ré-organisation structurale du domaine carboxy terminal liée à la substitution d'un seul acide aminé permet aussi au CXCL4L1 de présenter une activité inhibitrice beaucoup plus élevée sur la croissance des vaisseaux (Struyf et al., 2004, 2007).

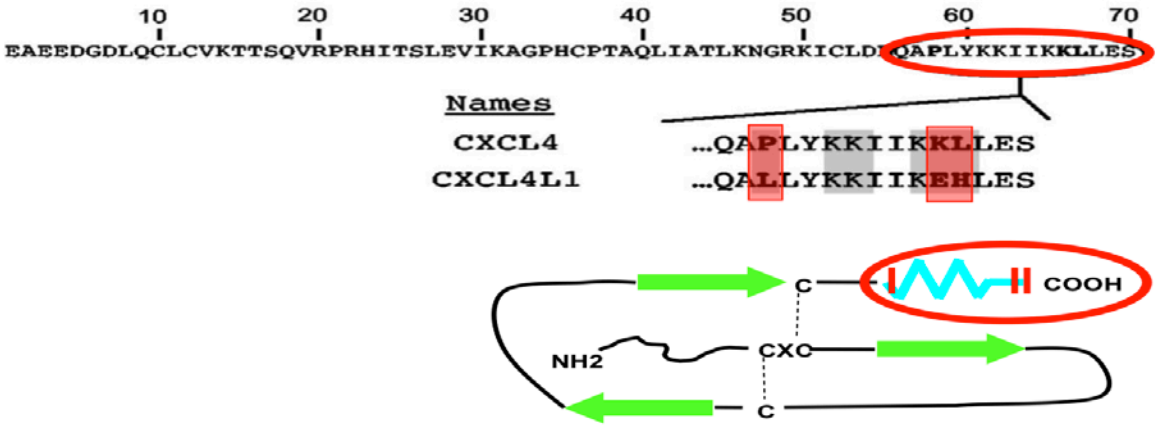


Figure 13: Différences de séquence entre CXCL4 et CXCL4L1, Kuo JH et al. 2013

CXCL4 et CXCL4L1 ont une localisation subcellulaire distincte et sont sécrétées différemment. CXCL4 est stockée dans des granules de sécrétions cytoplasmiques et est relarguée de façon aigüe et massive en réponse à un stimulus. CXCL4L1, synthétisée continuellement, est quant à elle sécrétée par voie constitutive (Lasagni et al., 2007). Les caractéristiques de diffusibilité et de biodisponibilité des chimiokines CXCL4 et CXCL4L1 ont aussi été étudiées. Il a été montré que ces paramètres étaient liés aux affinités plus faibles du CXCL4L1 pour les glycosaminoglycanes (héparine, héparanes sulfates et chondroitines sulfates B) par rapport au CXCL4 (Dubrac et al., 2010).

L’expression de CXCL4 a été rapportée dans un grand nombre de cancers. En effet, une étude menée par spectrométrie de masse a permis de détecter des différences d’expression de CXCL4 dans un large éventail de tumeurs humaines greffées chez la souris (Cervi et al., 2007) faisant de lui un potentiel biomarqueur de la progression tumorale. Notamment, le dosage du taux plasmatique de CXCL4 sur 146 échantillons de patients atteints d’ostéosarcomes a mis en évidence une corrélation entre la surexpression de CXCL4 et le mauvais pronostique vital des patients (Li et al., 2011). Cependant, dans la plupart des études où l’expression de CXCL4 est signalée, la distinction entre les deux variants n’est pas réalisée. Les résultats précédemment cités suggèrent donc que CXCL4 et possiblement CXCL4L1 constituent des marqueurs potentiels pour le diagnostic et le pronostic des cancers chez l'homme. Notamment, dans le cadre du cancer du pancréas, des études menées par notre groupe et auxquelles j'ai participé ont pu montrer l'importance de l'expression de CXCL4L1 dans la progression et l'invasion tumorale (Article II, Annexe V).

B. Les récepteurs aux chimiokines

Les chimiokines exercent leurs activités en interagissant avec des récepteurs spécifiques et exprimés à la surface des cellules. Il s'agit de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à des protéines G hétérotrimériques, les *« G Protein Coupled Receptors »,* ou GPCR.

1. Nomenclature

Les GPCRs présentent une extrémité amino-terminale extracellulaire, trois boucles extracellulaires, trois boucles intracellulaires et une extrémité carboxy-terminale intracellulaire. La nomenclature des GPCRs se base sur le groupe de chimiokines auquel appartient son ligand, on distingue donc les récepteurs de la famille (X)CR, CCR, CXCR et CX3CR (Murphy, 2002; Murphy et al., 2000). Les récepteurs des chimiokines CXC sont de se fait nommés CXCR1, CXCR2 etc. (Figure 14).

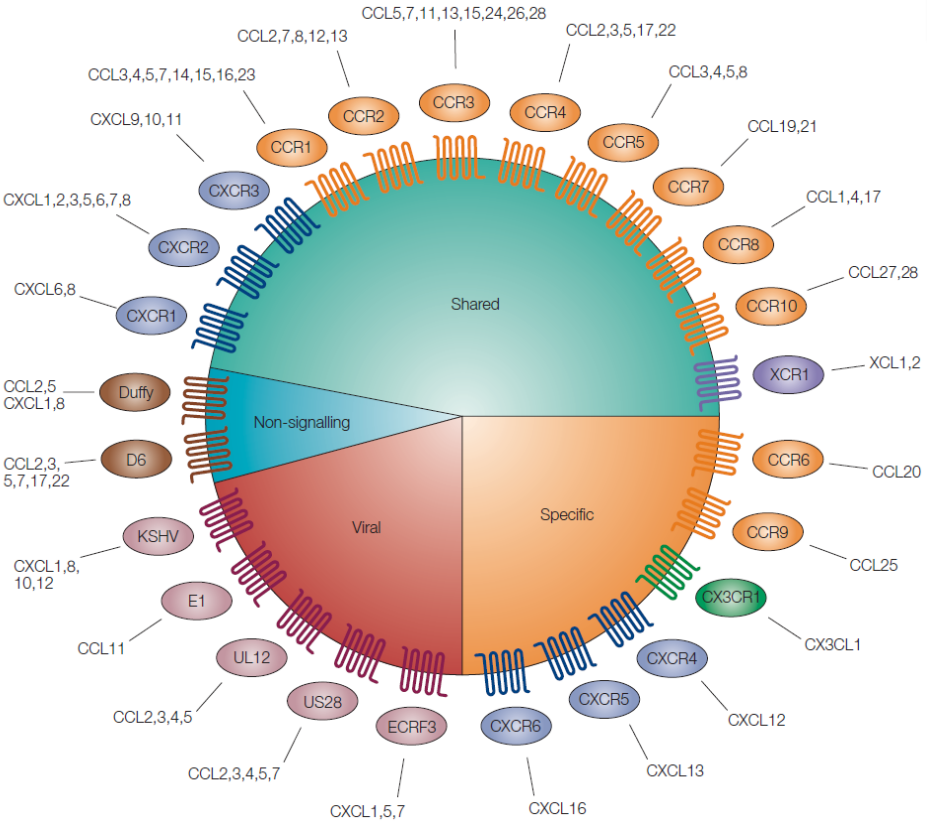


Figure 14: Nomenclature des récepteurs à chimiokine et spécificité d'intéraction, d'après Balkwill F. 2004

Certains récepteurs de chimiokines ne peuvent reconnaitre qu'une seule chimiokine, alors que d'autres vont pouvoir interagir avec de nombreuses chimiokines. De la même manière certaines chimiokines ne pourront reconnaitre qu'un récepteur, alors que d'autres pourront fixer de nombreux récepteurs différents, on parle de la spécificité d'interaction chimiokine / récepteur à chimiokine (Zlotnik and Yoshie, 2012) (Figure 14). Aussi, il faut noter que même si généralement les chimiokines agissent comme des agonistes sur leurs récepteurs, certaines peuvent se comporter comme des antagonistes. Par exemple, certains ligands agonistes du récepteur CXCR3 comme CXCL9, CXCL10 ou CXCL11 sont les antagonistes du récepteurs CCR3, et *vice versa* (Loetscher et al., 2001).

Certaines chimiokines peuvent aussi se fixer sur des récepteurs qui ne sont pas couplés à des protéines G, on parle de récepteurs leurres. Parmi eux, on distingue principalement les récepteurs D6, des récepteurs Duffy, aussi appelés DARC (Duffy Antigen Receptor Chemokine). Ces récepteurs sont silencieux, c'est à dire qu'ils n'activent pas de signalisation intracellulaire, mais servent à réguler la biodisponibilité des chimiokines circulantes (Mantovani et al., 2006).

2. Les voies de transduction des récepteurs aux chimiokines

Les principales voies de transduction des récepteurs aux chimiokines sont dépendantes des protéines G. La liaison de la chimiokine au récepteur induit un changement de conformation de ce dernier, qui peut être spécifique au récepteur. Suite à ce changement de conformation, les protéines G hétérotrimériques pourront être activées afin d'assurer la transduction du signal du couple chimiokine/récepteur. Toutes les protéines G sont composées de trois sous-unités : α, β et γ. Avant l'activation du récepteur, les 3 sous-unités sont liées entres elles, et les protéines Gα sont liées au GDP. Lorsque le récepteur sera activé par les chimiokines, le GDP sera physiquement remplacé par du GTP, ceci aura deux grandes conséquences. Premièrement la protéine Gα-GTP deviendra active pour transduire ses voies de signalisations ou signaux intracellulaires, et secondairement les sous-unités β / γ seront libérées du complexes α - β - γ afin d'activer d'autres molécules à proximité et au niveau de la membrane plasmique. Le GTP sera par la suite hydrolysé pour

retourner sous sa forme GDP, les sous-unités α - β - γ se réassocieront et le récepteur redeviendra inactif (Li et al., 2002) (Figure 15).

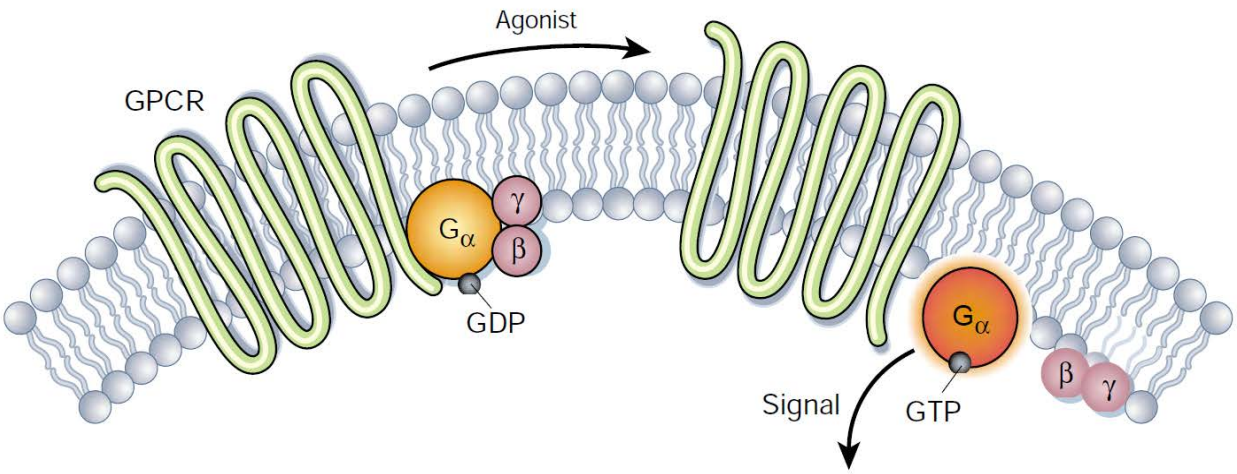


Figure 15: Activation des GPCR via leurs protéines G, d'après Li J et al. 2002

La sous-unité Gα détermine la spécificité du récepteur. Il existe trois grands types de sous-unité alpha : α-s, α-i/o et α-q, nommées en fonction de leurs activités. La protéine Gα-S stimule l'activité de l'adénylate cyclase permettant la conversion de l'ATP en AMPc. Au contraire les protéines Gα-i/o vont inhiber l'activité de l'adénylate cyclase, et les protéines Gα-q stimulent la phospholipase C. Cette dernière hydrolyse le PIP2 (du phosphatidylinositol 4,5-diphosphate) en inositol 1, 4, 5-triphosphate (IP3) ce qui entraine la libération de calcium des stocks intracellulaires. Les sous-unités β et γ forment un complexe pouvant agir comme molécule de signalisation et réguler directement des protéines à proximité, notamment la phospholipase C, entrainant la libération du calcium intracellulaire (Clapham and Neer, 1997; Katz et al., 1992).

Les récepteurs au chimiokine interagissent généralement avec des protéines G-α-i/o (Murphy, 2002; Murphy et al., 2000) mais on observe cependant des interactions de certains récepteurs avec des protéines Gα -s ou Gα -q (Maghazachi and Al-aoukaty, 1998).

3. Les processus de désensibilisation

Suite à l'activation du récepteur et de ses protéines G induisant les voies de signalisation spécifiques du récepteur, des phénomènes de désensibilisation sont mis en place par la cellule afin de stopper cette activité. La désensibilisation se fait via la phosphorylation de résidus tyrosines dans le domaine carboxy-terminal intracellulaire (Ferguson, 2001). Ceci entraine le recrutement de protéines spécifiques de la désensibilisation au niveau des sites phosphorylés, les β-arrestines. Ces protéines vont induire l'interaction avec certains acteurs de l'internalisation et de la désensibilisation des récepteurs aux chimiokines. En effet les β-arrestines, en plus de former un complexe avec les récepteurs activés, vont recruter les protéines AP-2 (« *Assembly Protein-2* ») et la clathrine, cette dernière formant ce qu'on appelle un « manteau de clathrine » au niveau de la membrane plasmique (Pierce and Lefkowitz, 2001). La clathrine est le moteur responsable de la déformation de la membrane lors de la formation des vésicules d'internalisation. Les récepteurs aux chimiokines peuvent être internalisés par des mécanismes indépendant de la clathrine, comme des internalisations dépendante de la caveoline, ou encore de radeaux lipidiques présents dans les membranes (Neel et al., 2005).

4. Le trafic vésiculaire intracellulaire

Une fois internalisé dans ce qu'on appelle les endosomes précoces, plusieurs voies du trafic vésiculaire des GPCR peuvent être utilisées dans la cellule. Les récepteurs pourront, depuis les endosomes précoces être déphosphorylés, puis être recyclés à la membrane plasmique, c'est le processus de recyclage rapide des GPCR. Les récepteurs pourront aussi être recyclés via un trafic rétrograde passant par l'appareil de golgi (dans la zone Trans-Golgi), on parle de recyclage long des GPCR (Nichols, 2002). Le trafic rétrograde est bien moins étudié que les voies de recyclage ou de dégradation classique. Il permet de moduler la vitesse de recyclage des récepteurs, mais aussi de former des zones de stockage intracellulaire et stable des récepteurs internalisés. Ce trafic a été mis en évidence pour certains GPCR comme le récepteur β-adrenergique, mais aussi pour d'autres familles de récepteurs (Koliwer et al., 2015; Shewan et al., 2003). Enfin une troisième voie de trafic est possible aprés désensibilisation des récepteurs, il s'agit du trafic vers des

endosomes tardifs, qui deviendront des lysosomes, et où les récepteurs seront dégradés (Figure 16).

Il existe plusieurs marqueurs spécifiques des differentes voies du trafic vésiculaire intracellulaire. Parmi eux, un des acteurs importants dans le trafic vésiculaire des GPCRS est représenté par la famille des Rab GTPases. Ces protéines Rab participent à la régulation de la dynamique des membranes et sont essentielles pour la régulation du trafic. L'expression differentielle des protéines Rab dans les vésicules permettent de suivre le recyclage rapide, long, ainsi que la degradation des récepteurs internalisés (Darchen and Goud, 2000; Hutagalung and Novick, 2011; Wiesner et al., 2013) (Figure 16). D'autres marqueurs tout aussi importants existent pour les differentes vesicules, comme EEA1 (marqueur des endosomes précoces), Lamp-1 (marqueur des lysosomes) ou encore Syntaxin6 (marqueur du recyclage long passant par le Trans-Golgi).

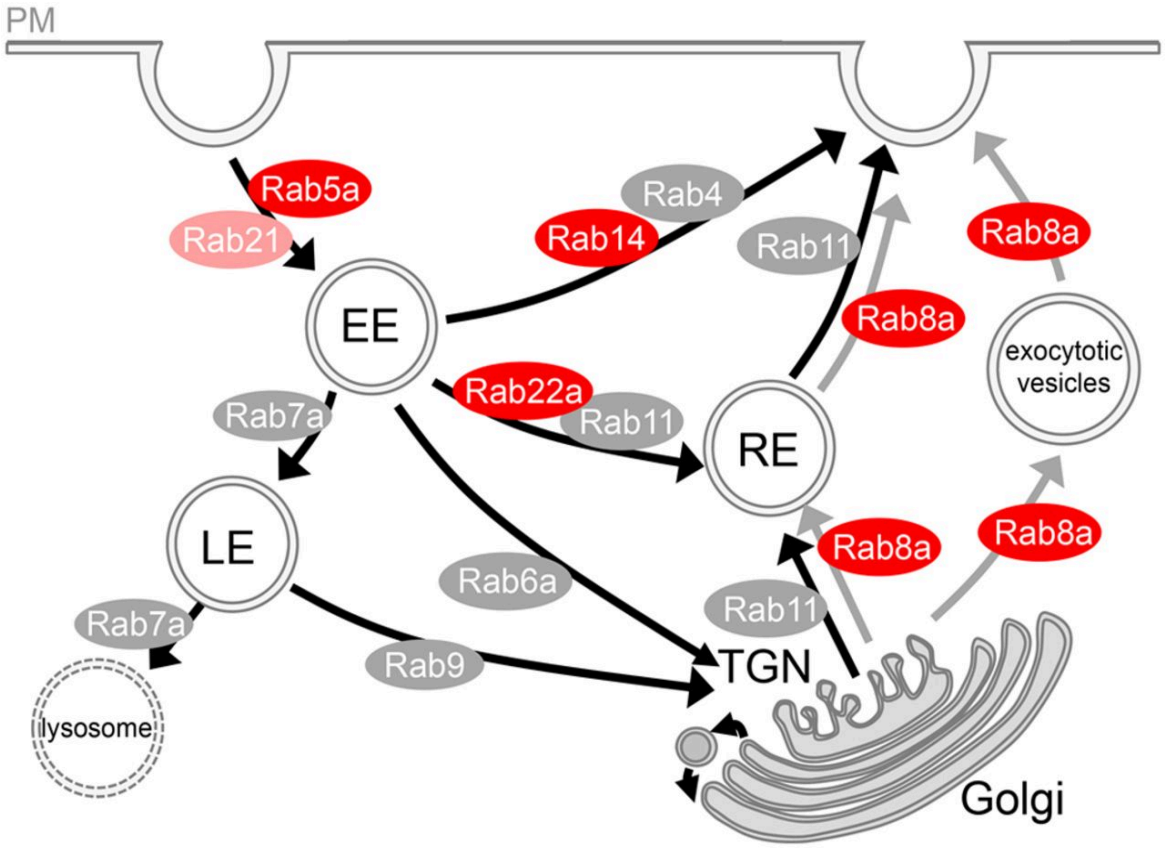


Figure 16: Les differentes voies du trafic vesiculaire et expression des proteines Rab EE: Early Endosome; RE: Recycling Endosome; LE: Late Endosome; TGN : Trans Golgi Network, d'apres Wiesner C et al. 2013

5. CXCR3

a) Les isoformes CXCR3-A, CXCR3-B et CXCR3-alt

Fixant les chimiokines CXCL4, CXCL4L1, CXCL9, CXCL10 et CXCL11, le récepteur CXCR3 se trouve être le principal récepteur des chimiokines ELR-. Cependant, les études d'intéraction avec CXCR3 sont complexes à cause de la présence de trois isoformes : CXCR3-A, CXCR3-B et CXCR3-ALT. Ces variants d'épissage alternatif identifiés chez l'Homme, n'existent pas chez la souris. La découverte de CXCR3-B, retrouvé principalement dans les cellules endothéliales, a permis une meilleure compréhension de la façon dont les chimiokines ELR-, notamment CXCL4, exercent leurs effets anti-angiogéniques (Lasagni et al., 2003; Romagnani et al., 2001). CXCR3-B possède aussi des fonctions anti-proliférative et apoptotique dans les cellules tumorales (Datta et al., 2010; Hu et al., 2015; Kim et al., 2002; Petrai et al., 2008; Wu et al., 2012). Au contraire, CXCR3-A se trouve être un récepteur pro-tumoral, bien qu'il fixe des chimiokines ELR-. En effet, des études montrent que CXCR3-A induit la prolifération, la migration ainsi que la survie cellulaire (Wu et al., 2012). Etant bien moins exprimé que les autres isoformes *in vivo*, le rôle de l'isoforme CXCR3-ALT n'est encore que très peu connu. Ce dernier se retrouve toujours au niveau des membranes cellulaires et montre toutefois des effets chimioattractants via la fixation de CXCL11 (Ehlert et al., 2004).

b) Structures des isoformes de CXCR3

CXCR3 est un GPCR possédant une partie amino-terminal extracellulaire, 3 boucles extracellulaires ainsi que 3 boucles intracellulaires, toutes séparée par 7 domaines transmembranaires, et enfin une partie carboxy-terminal intracellulaire. De manière conservée avec les récepteurs aux chimiokines, CXCR3 possède deux cystéines spécifiques, une à l'extrémité amino-terminale, et l'autre sur la troisième boucle extracellulaire formant ainsi un pont disulfure essentiel pour la fixation de la chimiokine et l'activation du récepteur (Karnik et al., 2003). La deuxième boucle intracellulaire possède le motif DRYLAIV, qui est essentiel pour le couplage avec les protéines G. Les fonctions de CXCR3 sont induites par différents domaines, et notamment, des études ont montré que la sulfatation de résidues tyrosine dans le domaine amino-terminale de CXCR3 est essentielle pour la fixation et l'activation du récepteur par le CXCL9, CXCL10 et CXCL11 (Colvin et al., 2004, 2006)

Le gène de CXCR3 subit un épissage alternatif menant à la formation de ces trois isoformes. Ces dernières différent dans leurs parties carboxy- ou amino-terminal. Notamment, CXCR3-B posséde une partie amino-terminale plus grande que celle du CXCR3-A de 52 acides aminées (Lasagni et al., 2003). Au contraire, CXCR3-ALT possède la même partie amino-terminale, mais possède une partie carboxy-terminal tronquée, ce qui entraine l'absence de plusieurs domaines transmembranaires (Figure 17).

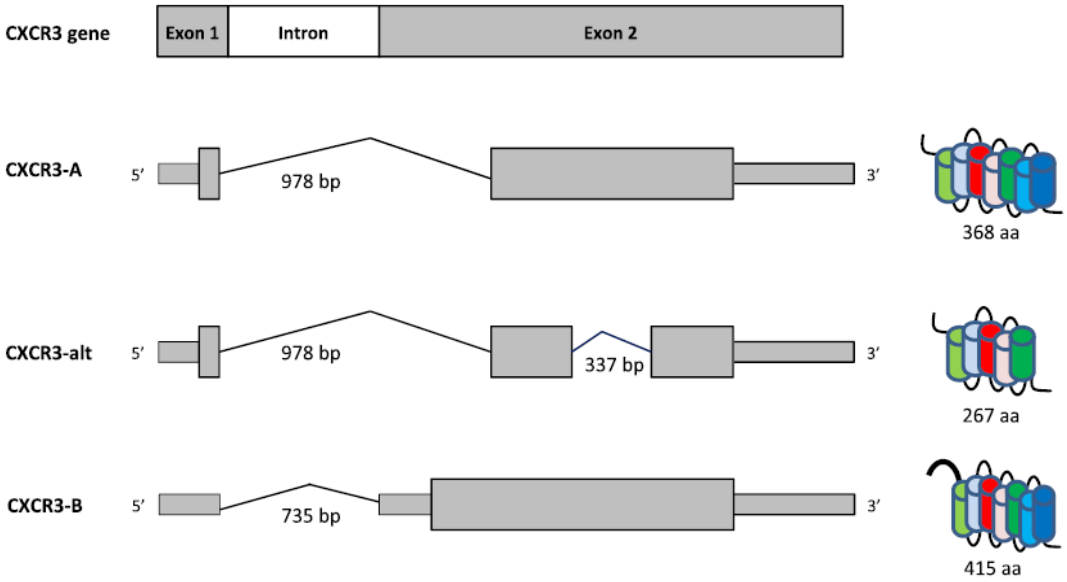


Figure 17: Structures des isoformes de CXCR3, d'après Billottet et al. 2013

6. Implication de CXCR3 dans la biologie des cancers

Bien que les ligands de CXCR3 soient très largement décrits pour leurs fonctions angiostatiques, ils sont aussi de plus en plus étudiés dans le développement tumoral du fait de leurs récepteurs CXCR3. En effet, une augmentation de l'expression de CXCR3 a été trouvée dans de nombreux cancers humain, décrivant CXCR3 comme un facteur de mauvais pronostique dans le cancer du sein, du colon, du rein et dans les glioblastomes (Ma et al., 2009; Murakami et al., 2013; Pu et al., 2015; Walser et al., 2006). Dans le cancer du rein, des études montrent que la balance d'expression entre les isoformes de CXCR3 est en faveur de CXCR3-A et induit des effets pro-tumoraux (Datta et al., 2008). Cependant, la sur-expression de CXCR3-B dans les cellules de ce même cancer inhibe la prolifération

cellulaire et favorise les processus d'apoptose (Datta et al., 2010). De même, dans le cancer gastrique, l'expression de CXCR3-B est un facteur de pronostique favorable (Hu et al., 2015). De ce fait, CXCR3-B semble inhiber le développement tumoral et la formation de métastases alors que CXCR3-A apparait comme un récepteur pro-tumoral. Ainsi, le profil d'expression de ces deux variants module grandement les effets de leurs ligands sur la croissance tumorale.

Le récepteur CXCR3 semble aussi impliqué dans les processus d'invasion tumoral et de formation de métastase. En effet, l'expression de CXCR3 dans les cancers du colon, du sein ou de la peau accélère la formation de métastases et de nodules lymphatiques (Kawada et al., 2004; Ma et al., 2009). De plus, ce récepteur est exprimé par les cellules tumorales mammaires, et des études ont pu montrer son importance dans la formation de métastases pulmonaires dans le cancer du sein (Walser et al., 2006). CXCR3 est aussi impliqué dans la formation de métastases pulmonaires dans les ostéosarcomes et son inhibition par un antagoniste chimique l'AMG487 permet la diminution de ces métastases dans un modèle murin d'ostéosarcome (Cambien et al., 2009; Pradelli et al., 2009).

Après stimulation de CXCR3 et de ses protéines G par les différentes chimiokines, les voies de signalisations activées sont très variées et jouent sur la phospholipase C, la PI3K ou sur les voies des MAPK (Bonacchi et al., 2001; Brightling et al., 2005; Shahabuddin et al., 2006). Les isoformes de CXCR3 activant des voies totalement opposées, des études ont été menées afin de déterminer les protéines G mobilisées suite à l'activation de ses isoformes. Ainsi, CXCR3-A mobiliserait principalement des protéines Gα-i/o ou Gα-q activant des voies pro-tumorale comme PI3K/Akt ou les voies MAPK (ERK, JNK) dans les cellules de glioblastome par exemple (Maru et al., 2008), ou encore dans le cancer de la prostate avec le recrutement des protéines Gα-q et l'activation de la phopholipase C et des voies de l'invasion tumorale (Wu et al., 2012). Au contraire, l'isoforme CXCR3-B inhiberait la prolifération et la migration cellulaire via le recrutement de protéine Gα-S activant l'adénylate cyclase. En effet, la formation d'AMPc via l'activation de l'adénylate cyclase induit la stimulation de la protéine kinase A (PKA), un puissant

angiostatique qui inhibe la prolifération des cellules endothéliales et active leur apoptose (Kim et al., 2002) (Figure 18).

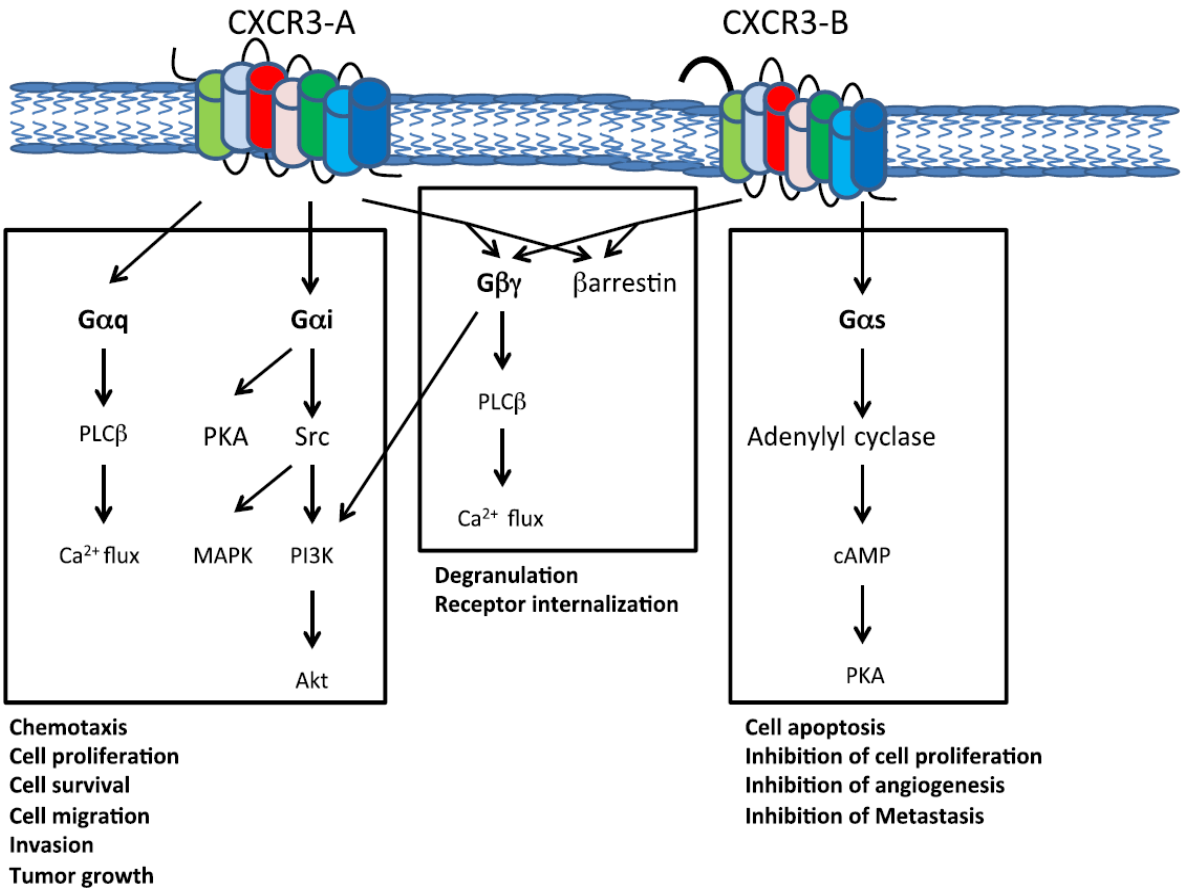


Figure 18: Les voies de signalisations activées par les isoformes CXCR3-A ou CXCR3-B, d'après Billottet et al. 2013

La stimulation de l'isoforme CXCR3-ALT a pour conséquence d'activer les voies de MAPK/ERK ainsi que la phosphorylation de AKT, bien que aucun lien ne prouve son implication dans la prolifération cellulaire (Korniejewska et al., 2011).

L'ensemble des données relatives à CXCR3 lui suggère un rôle central dans la progression tumorale. Plusieurs études montrent clairement que le ligand de CXCR3, le CXCL10, est exprimé par les cellules de glioblastomes murines et humaines (Liu et al., 2011; Maru et al., 2008; Sharma et al., 2016). De plus, l'expression de ce ligand, ainsi que de CXCR3 lui-même, est augmentée dans les gliomes de grade III

et les glioblastomes (Maru et al., 2008; Pu et al., 2015; Sharma et al., 2016). Plusieurs études supportent donc le rôle de CXCR3 et de ses ligands dans la progression du glioblastome, un cancer où la decouverte de nouveaux biomarqeurs de la progression tumorale est une réelle necessité. L'inhibition pharmacologique de CXCR3 sur modèle murin permet de diminuer la progression du glioblastome, faisant de CXCR3 une potentielle et nouvelle stratégie thérapeutique (Liu et al., 2011). Cependant, la discrimination des isoformes, ainsi que les mécanismes d'actions de CXCR3 restent à ce jour peu connu.

III. Implication de LRP1 dans le cancer

A. LRP1 : Origine, structure et maturation

1. La famille des récepteurs au LDL

Les lipoprotéines sont des molécules de haut poids moléculaire, composées de lipides et de protéines nommées apolipoprotéines. Circulantes dans le sang, les lipoprotéines permettent le transport des composés hydrophobes et insolubles, les lipides.

Différentes lipoprotéines existent et sont classées selon leur densité. En effet, plus le ratio lipides/protéines sera élevé, plus la densité sera faible. On distingue ainsi la famille des HDL (*« High Density Lipoprotein »*), des LDL (*« Low Density Lipoprotein »*) ou encore des VLDL (*« Very Low Density Lipoprotein »*). Les LDL étant fortement composées d'esters de cholestérol, la famille des LDL est essentielle pour le métabolisme cellulaire. Les cellules expriment des récepteurs membranaires reconnaissant les LDL, les internalisant et libérant, après digestion lysosomale, le cholestérol dans la cellule. Historiquement, le récepteur au LDL nommé LDLR a été identifié dans les cas d'hypercholestérolémie associée aux maladies cardiovasculaires (Brown MS et al. 1986). Diverses études ont par la suite pu établir le rôle des LDLR se trouvant mutés dans les cas d'hypercholestérolémie familiale (Kajinami K, et al. 1988).

De nos jours, chez les mammifères, la famille des récepteurs au LDL comporte 7 membres : le LDLR, LRP1, LRP1b, la mégaline (ou LRP2, ou gp330), le VLDLR (very-LDLR), l'ApoER2 (Apolipoprotein E Receptor 2 ou LRP8) et MEGF7 (ou LRP4) (May et al., 2007) (Figure 19).

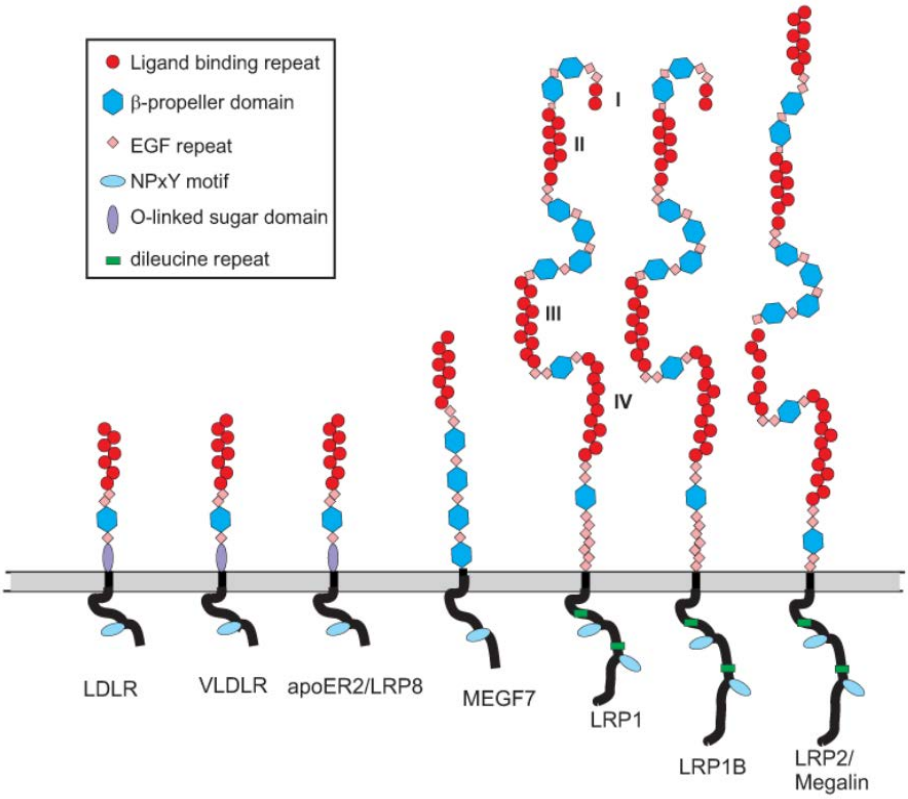


Figure 19: Les membres de la famille des récepteurs au LDL, d'après Lillis AP et al. 2008

Le LDLR, protéine d'environ 150 kDa, est principalement exprimé dans le foie où il agit sur le métabolisme du cholesterol. Au contraire, les autres membres de cette famille ont une expression tissulaire plus large, suggérant des rôles plus diversifiés. Le VLDLR (140-180kDa) ainsi que l'ApoER2 (74 kDa) ont une structure similaire au LDLR. Ces deux récepteurs régulent des voies de signalisation essentielles pour le développement du cerveau, le positionnement des neurones et la neurotransmission dans le cerveau adulte (Beffert, 2003; D'Arcangelo, 2005).

LRP1 (*« Low density lipoprotein Related Protein 1 »*) est une protéine de 600 kDa faisant d'elle la plus grosse protéine de la famille des récepteurs au LDL. LRP1, aussi connu sous le nom de CD91 ou *« Alpha2-macroglobulin receptor »*, est une protéine ubiquitaire multifonctionnelle (Herz and Strickland, 2001). Ces deux fonctions biologiques les plus importantes caractérisées à ce jour sont celle du processus d'endocytose et celle de la régulation de voies de signalisation. Partageant plus de 60% d'homologie avec LRP1, LRP1b est une protéine d'environ 500 kDa. Ses fonctions sont peu connues, mais LRP1b semble avoir des fonctions de gène suppresseur de tumeur dans certains cancers notamment le glioblastome (Tabouret et al., 2015). La mégaline (LRP2 ou encore gp330), est un récepteur endocytique fixant de nombreux ligands et complexes de protéases, vitamines ou encore des lipoprotéines. Elle est exprimée principalement dans les endosomes cellulaires mais aussi à la surface des cellules épithéliales des tubes proximaux du rein ou elle permet de réguler l'abondance de nombreuses protéines (Zou et al., 2004). MEGF7 (Multiple EGF-repeat containing protein 7), ou LRP4, est une protéine de 250 kDa. Ses fonctions restent méconnues mais des études utilisant des souris KO pour MEGF7 suggèrent un rôle dans le développement embryonnaire (Johnson, 2005).

2. Organisation structurale de LRP1

Durant sa biosynthèse, LRP1 est initialement sous la forme d'un précurseur de 600 kDa. Lors de son passage dans l'appareil de Golgi il sera clivé par une protéine convertase, la furine, en deux sous unités non covalentes : on parle de chaine alpha (515kDa) et de chaine beta (85 kDa). Après clivage, LRP1 sera adressé à la membrane où la chaine alpha correspondra à la partie extracellulaire, et la chaine beta sera la partie transmembranaire et intracellulaire. Le domaine transmembranaire de LRP1 (environ 25 acides aminés) permet son ancrage à la surface des cellules ainsi que le couplage entre partie extra- et intra-cellulaire.

De manière similaire aux autres membres de la famille des récepteurs au LDL, LRP1 présente certaines caractéristiques structurales : des motifs NPxY, des domaines composés de séquences riches en cystéine nommées *« cysteine-rich complement-type repeats »* (ou *« Ligand binding type repeat »*) des domaines de

répétition à l'EGF, des domaines homologues aux précurseurs à l'EGF, et des domaines de type β-propeller (Lillis et al., 2008) (Figure 20).

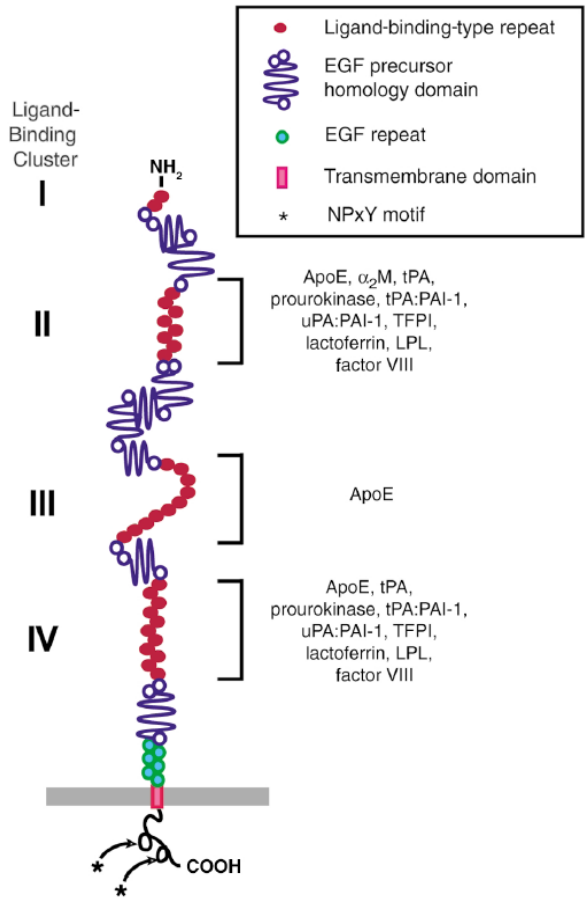


Figure 20: Les différents domaines de LRP1, d'après Herz J et al. 2001

a) Le domaine extracellulaire

Tous les membres de la famille des récepteurs au LDL possèdent ces domaines de répétitions riches en cysteines de type complément (CR), aussi appelés domaines de liaison aux ligands. Ces domaines sont sur la partie extracellulaire de LRP1 et se regroupe en 4 clusters (cluster I à IV). Des études utilisant des mini-récepteurs LRP1 contenant chacun un cluster ont pu montrer que la plupart des ligands fixent les clusters II et/ou IV (Neels et al., 1999; Obermoeller-McCormick et al., 2001; Willnow et al., 1994). Par exemple, on peut citer la liaison entre le recepteur CD44 et le cluster IV de LRP1 (Perrot et al., 2012), la liaison entre la protéine TIMP-1 et les clusters II / IV de LRP1 (Thevenard et al., 2014), ou encore la liaison entre le facteur de coagulation Von Willebrand et les clusters II / IV de LRP1 (Saenko et al., 1999)

Les clusters contenant les domaines CR sont séparés physiquement par 4 autres domaines composés de séquences homologues à celles du précurseur de l'EGF et encadrant des domaines dit β-propeller. Ces derniers sont des motifs d'acides aminés YWTD qui permettent la séparation de LRP1 avec ses ligands. En effet, lors de l'internalisation de LRP1 couplé avec son ligand dans les lysosomes, le faible pH permet la fixation compétitive des domaines β-propeller sur les domaines CR de LRP1, induisant la séparation des ligands (Davis et al., 1987).

b) Le domaine intracellulaire

Après fixation des ligands au niveau extracellulaire, LRP1 peut induire l'internalisation du complexe et/ou réguler des cascades de signalisations spécifiques. Le domaine cytoplasmique est quant à lui reconnu pour interagir avec de nombreuses molécules adaptatrices et avec des protéines impliquées dans la signalisation intracellulaire ou le trafic vésiculaire (Lillis et al., 2008) (Table 6).

Adapter and scaffold proteins that bind to the intracellular domain	
Disabled-1 (Dab1)	Activation of Src family kinases, neuronal migration
FE65	APP processing?, actin remodeling
SEMCAP-1	Axon guidance, vesicular transport?
JIP1 JIP2	Regulation of MAPK and SAPK, including JNK
PSD-95	Scaffolding protein of the postsynaptic density, coupling to NMDA receptors
Talin-like protein	Coupling to actin cytoskeleton
OMP25	Mitochondrial transport
CAPON	Regulation of nitric oxide synthase
PIP4,5 kinase–like protein	Regulation of inositol signaling
ICAP1	Integrin-mediated signaling?
Shc	Ras activation

Table 6: Exemple de protéines interagissant avec le domaine intracellulaire de LRP1 et régulant des voies de signalisation, d'après Herz et al. 2001

Le domaine intracellulaire contient aussi deux motifs dileucine (LL) ainsi que deux motifs NPxY. Les motifs LL sont impliqués dans l'endocytose et le trafic vésiculaire de LRP1, notamment dans son recyclage (Donoso et al., 2009). Les motifs NPxY sont sujets à des phosphorylations sur les résidus tyrosines (les résidus 4473 ou 4507). LRP1 peut ainsi interagir avec de nombreuses protéines possédant des domaines de fixation aux tyrosines phosphorylées (*« PhosphoTyrosine-Binding, PTP domain »*) (Trommsdorff et al., 1998).

3. RAP : protéine chaperonne de LRP1

a) Découverte et structure de la protéine RAP

La Protéine Associée au Récepteur (RAP, *« Receptor-Associated Protein »*) a été découverte par co-purification avec LRP1 par chromatographie d'affinité (Strickland et al., 1990). Elle était tout d'abord décrite comme un polypeptide de 39kDa pouvant fixer LRP1 avec une haute affinité (Kd = 18nM). Depuis, il a été montré que RAP est une protéine séquestrée dans le réticulum endoplasmique pouvant fixer plusieurs domaines de LRP1 et a été caractérisée comme la protéine chaperonne de LRP1, essentielle pour sa maturation.

La structure de RAP, possédant trois grands domaines distincts (D1, D2 et D3), fut proposée en 1995 en se basant sur des données prédictives de modélisation (Bu et al., 1995). Depuis, la cristallisation des domaines D1, D2 et D3 a pu être effectuée par spectroscopie à Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) et par cristallographie aux Rayons X (Lee et al., 2006, 2007; Wu et al., 2004). Les domaines sont composés de trois hélices alpha et sont connectés entre eux par des longues boucles flexibles permettant à RAP d'adopter de nombreuses conformations différentes en solution (Figure 21).

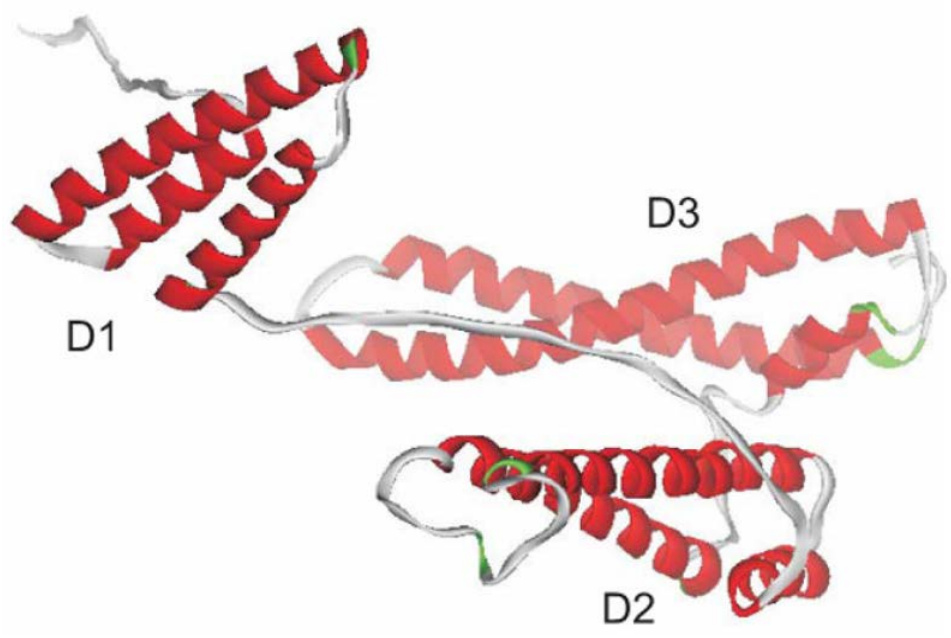


Figure 21: Modélisation des domaines de RAP, d'après Lillis AP et al. 2008

b) Rôle de RAP

La première fonction de RAP a été découverte via l'utilisation de souris déficientes pour cette protéine (Willnow et al., 1995). Ces souris montrent une réduction de l'expression de LRP1 mature et fonctionnelle dans le cerveau ainsi que dans le foie. LRP1 permettant la degradation de l'alpha2 macrogloguline, un inhibiteur très conservé de protéases, la fonctionnalité de LRP1 a été vérifiée en mesurant la quantité de cette protéase circulante dans le foie. Ces expériences ont permis de valider le rôle de protéine chaperonne de RAP pour LRP1. RAP est une protéine possédant un motif HNEL dans son domaine C-terminal ce qui entraine sa séquestration dans le réticulum endoplasmique. De ce fait, la maturation de LRP1 par le RAP s'effectue lors du passage de LRP1 dans le reticulum endoplasmique (RE) (Bu et al., 1995). RAP accompagne LRP1 du RE à l'appareil de Golgi puis se dissocie de LRP1. Cette balance liaison/dissociation de RAP avec LRP1 est finement régulée par des changements de charge sur le domaine D3 de RAP. En effet, la diminution de pH ayant lieu au cours de la voie sécrétoire induit une augmentation positive de la charge d'une région du domaine D3, grâce à la présence de résidus histidines, ce qui permet la dissociation de RAP avec LRP1.

RAP pouvant se fixer avec une affinité très forte sur LRP1, une autre fonction de cette protéine a pu être mise en évidence, celle d'antagoniste compétitif. En effet, RAP peut adopter de nombreuses conformations du fait de ses grandes boucles flexibles, ce qui lui permet de se fixer à de nombreux endroits de LRP1 et notamment sur différents domaines CR (Jensen et al., 2009). Physiologiquement, ceci permet d'empêcher la liaison du récepteur avec la plupart de ses ligands. Ainsi, RAP peut être utilisé de manière exogène comme un antagoniste de LRP1.

B. LRP1, une protéine multifonctionnelle

LRP1 interagit avec un grand nombre de protéines (ligands/protéines extracellulaires, récepteurs, intégrines, glycosaminoglycanes) mais également avec diverses protéines adaptatrices cytoplasmiques (Gonias and Campana, 2014) (Figure 22). Cette liaison bi-fonctionnelle (extracellulaire et intracellulaire) fait de LRP1 une protéine reconnue comme multifonctionnelle. En effet, LRP-1 n'est pas seulement un récepteur de l'endocytose mais également une protéine de la signalisation cellulaire.

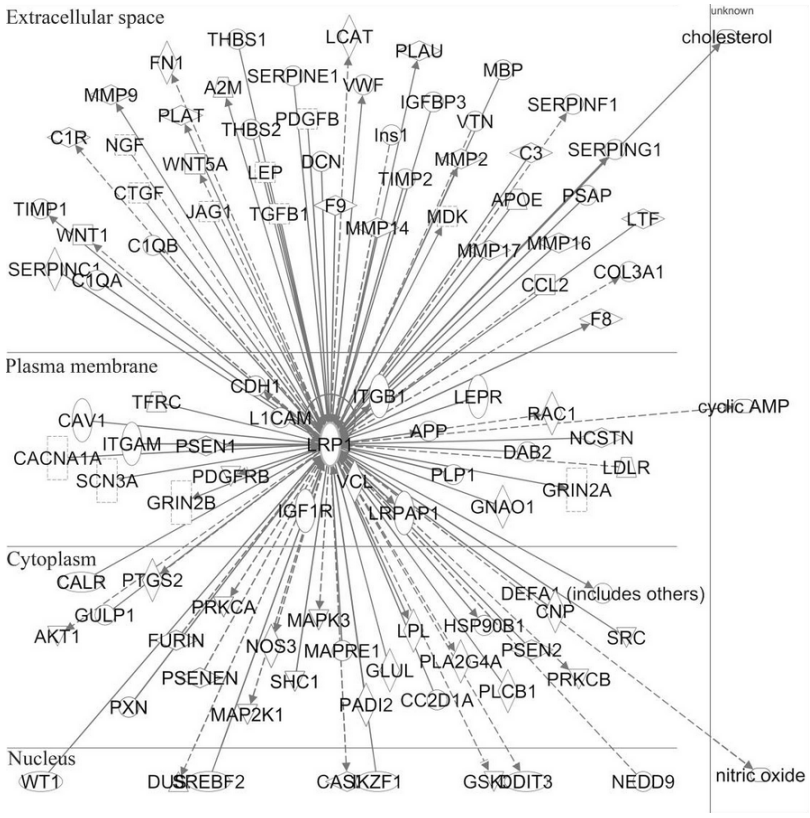


Figure 22: Carte non exhaustive des intéractants de LRP1, réalisée par le logiciel « Ingenuity Interactive Pathway Analysis », d'après Gonias et al. 2014

1. Rôle de LRP1 dans l'endocytose des protéines plasmatiques

Le rôle le plus étudié de LRP1 est l'endocytose. En effet, via sa capacité à lier un très grand nombre de ligands par son domaine extracellulaire, LRP1 va pouvoir internaliser de nombreuses protéines, et permettre leur dégradation par protéolyse (Strickland and Ranganathan, 2003).

Les fonctions de dégradation de LRP1 au niveau hépatique lui confèrent un rôle essentiel dans l'homéostasie des protéines plasmatiques. En effet, LRP1 est connu pour être le récepteur responsable de la dégradation hépatique de l'alpha2 macroglobulin (Sottrup-Jensen, 1989). Cette dernière inactive la majorité des protéases dont la plasmine, la thrombine et les métalloprotéinases matricielles. L'alpha2 macroglobulin est synthétisée et libérée dans le sang lors de processus inflammatoire et son taux chronique élevé est un marqueur de fibrose très important. LRP1 a aussi le rôle de dégradation d'autres inhibiteurs de protéase comme les inhibiteurs de serine protéase (les serpines). La formation de complexes entre les serpines et leurs protéines cibles entrainent leurs reconnaissance par LRP1, mais aussi par d'autres récepteurs aux LDL, et induit la dégradation des complexes du plasma.

Les facteurs de coagulation sont aussi des cibles plasmatiques de LRP1. Notamment le facteur VIII, une protéine clef de la coagulation, qui circule dans le sang de manière inactive sous la forme de complexe avec le facteur de Von Willebrand. Lors d'un traumatisme vasculaire, le facteur VIII se dissocie du facteur de Von Willebrand et devient actif, on parle de facteur VIIIa. Ceci permet une activation séquentielle de nombreux facteurs induisant la coagulation, on parle de la cascade de coagulation (Fay and Jenkins, 2005). Encore une fois, LRP1 est un récepteur clef pour l'internalisation et la dégradation de ce facteur (Saenko et al., 1999). Le LDLR est aussi un récepteur jouant dans cette dégradation. L'augmentation prolongée du facteur VIIIa dans le sang induit des formes sévères de thrombose.

En plus de son rôle au niveau hépatique, les fonctions d'endocytose de LRP1 ont été étudiées au niveau du développement embryonnaire. En effet, le KO global pour LRP1 est létal dans les phases précoces du développement. Cette létalité s'explique par le fait que les cellules du trophoblaste expriment une protéase

nommée uPA (*« Urokinase Plasminogen Activator »)* qui sera rapidement captée par une serpine spécifique : PAI-1. Le complexe uPA/PAI-1 interfère avec l'implantation et le développement de l'embryon, et LRP1 est capable de reconnaitre et dégrader ce complexe (Herz et al., 1992).

Les fonctions d'endocytoses de LRP1 sont aussi très largement étudiées dans de nombreux contextes pathologiques comme dans la maladie d'Alzheimer ou le cancer, que nous détaillerons après.

2. Rôle de LRP1 dans l'intégrité vasculaire

L'athérosclérose se caractérise par le dépôt massif de LDL (ou plaque d'athérome) sur la paroi des artères. Ceci peut entrainer la lésion de la paroi vasculaire, l'obstruction ou la rupture du vaisseau. La génération de souris déficientes pour LRP1 spécifiquement dans les cellules musculaire lisses (CML), a montré que LRP1 a un rôle essentiel dans l'intégrité de la paroi vasculaire et un rôle protecteur contre l'athérosclérose (Boucher et al., 2003).

Lors d'une atteinte de l'intégrité vasculaire, les cellules endothéliales secrètent un facteur permettant aux CML de proliférer et migrer afin de rétablir l'intégrité vasculaire, il s'agit du *« Platelet-Derived Growth Factor »* (PDGF), notamment de la forme PDGF-bb. Lors du développement de l'athérosclérose, les cellules endothéliales sont endommagées et le niveau de PDGF actif est grandement augmenté. La prolifération non contrôlée et anarchique des CML par le PDGF entraine la formation des plaques d'athérome, et ceci est réversible en inhibant l'action du PDGF (Ferns et al., 1991). La délétion du gène de LRP1 dans les CML entraine une forte activation du récepteur au PDGF, le PDGFR-β, et mène à ce phénotype d'athérosclérose (Boucher et al., 2003). Des études ont pu mettre en évidence que le PDGF-bb se fixe sur la partie extracellulaire de LRP1 entrainant par l'intermédiaire du PDGFR-β, la phosphorylation du domaine NPxY de LRP1. Ceci entraine, via le recrutement de protéines adaptatrices comme la protéine SHC, l'internalisation du complexe LRP1-PDGFbb-PDGFRβ vers des voies de dégradation (Loukinova, 2002; Zhou et al., 2009) (Figure 23). La modulation physiologique de l'activation du PDGFR-β via LRP1 permet la protection vasculaire, et démontre un

important rôle pour LRP1 en tant que co-récepteur de récepteur membranaire dans les CML.

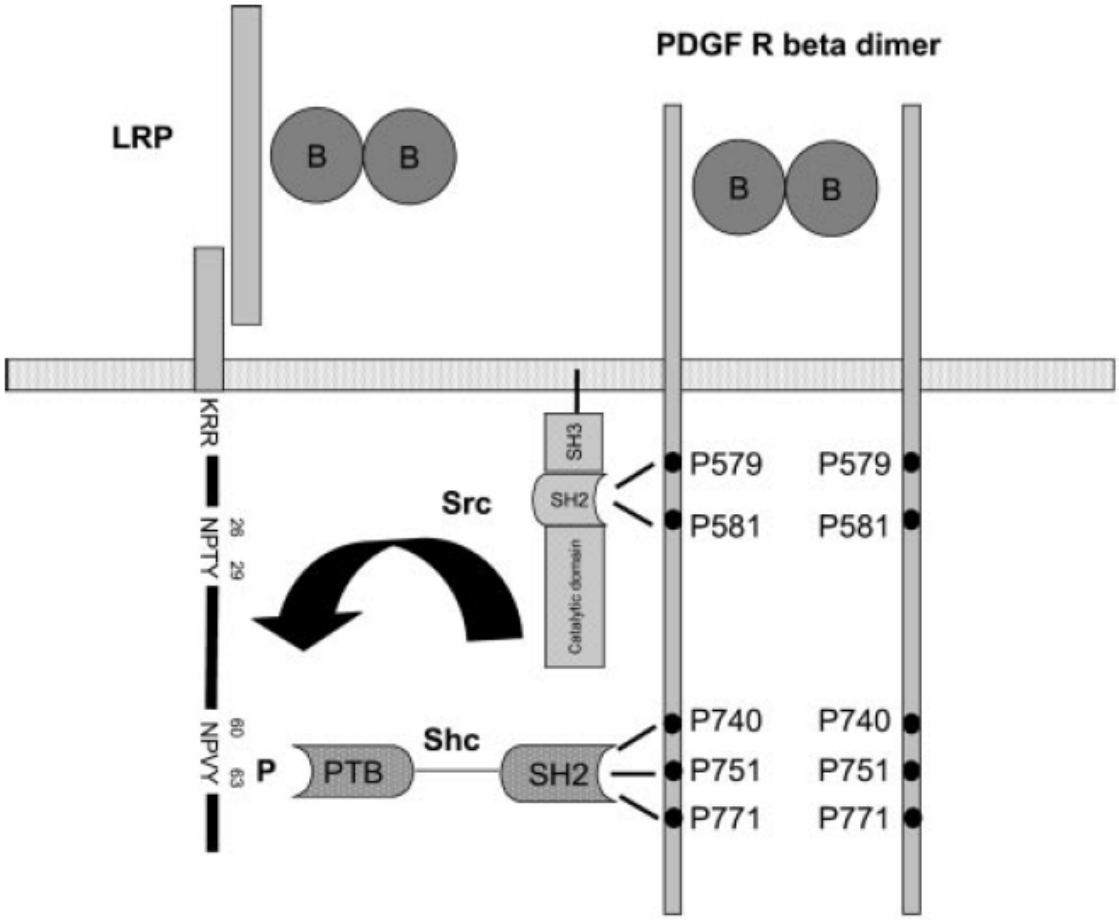


Figure 23: Formation du complexe LRP1-PDGFbb-PDGFRb par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice SHC, d'après Loukinova et al. 2002

En plus de son rôle sur l'hyperplasie endothéliale, le PDGF-bb peut se fixer au PDGFR-β présent au niveau des cellules murales (CML et péricytes) et est impliqué dans le recrutement de ces cellules et le maintien de la stabilité vasculaire (Hellström et al., 1999). Il a été montré que la sphingosine-1-phosphate (S1P) est impliqué dans la modulation de la réponse au PDGF-bb (Hobson et al., 2001; Liu et al., 2000). Ses récepteurs S1PR1 ou S1PR2 sont présents principalement dans les cellules endothéliales (pour S1PR1) ou dans les CML (pour S1PR2), et induisent des effets biologiques opposés. S1PR1 et S1PR2 activent la GTPase RAC1 via la protéine Gi et augmente la migration cellulaire. S1PR2 peut aussi inhiber cette même GTPase via la protéine Gq et ainsi inhiber la migration cellulaire (Goparaju et al., 2005;

Okamoto et al., 2000). Il a été montré que la migration induite par le PDGF-bb peut être inhibée par co-traitement au S1P. De même, après utilisation d'un antagoniste du S1PR2 (le JTE-013), le S1P n'est plus capable d'inhiber la migration induite par le PDGF-bb, et va même augmenter cette migration via le S1PR1 (Nakajima et al., 2014). De manière extrêmement intéressante, après extinction de l'expression de LRP1, le S1P n'est plus capable d'inhiber cette migration, et l'antagoniste JTE-013 n'induit plus aucun effet, suggérant que les effets inhibiteurs du S1PR2 sont liés à LRP1 (Nakajima et al., 2014). LRP1 n'interagit avec aucun des récepteurs du S1P, mais a été caractérisé comme un intégrateur de voie de signalisation de ce dernier via la modulation de l'activation de la protéine Gi. En effet, l'inhibition de la protéine Gi par la toxine pertussique est capable de récapituler les effets de LRP1 dans des cellules déficientes pour LRP1. Ainsi, en présence de LRP1, le S1P va activer le S1PR2 et la protéine Gq (LRP1 inhibant l'activation de la protéine Gi) et induire l'inhibition de la migration liée au PDGF-bb (Nakajima et al., 2014) (Figure 24).

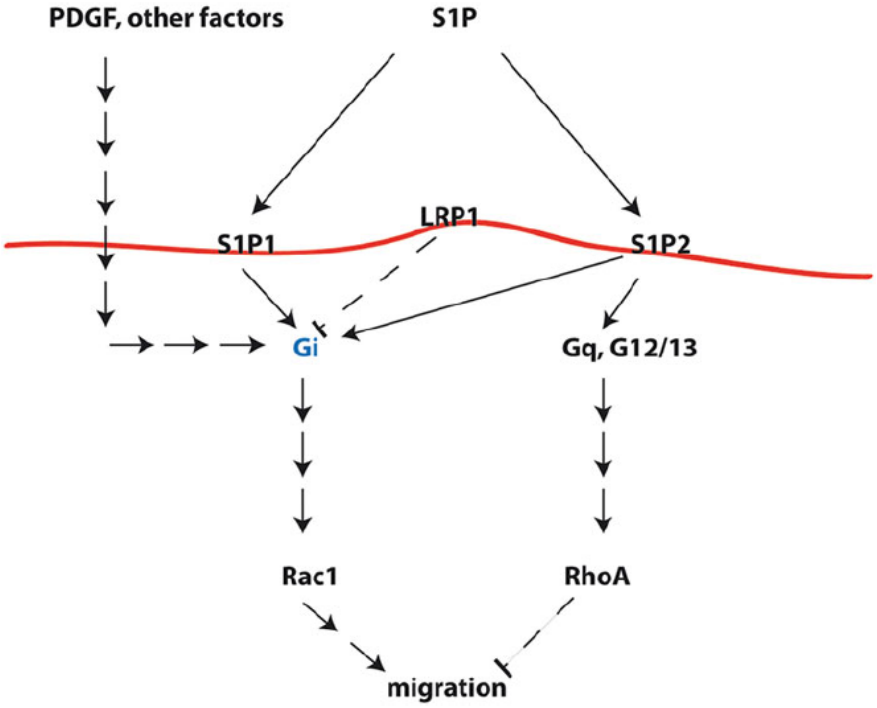


Figure 24: LRP1, un intégrateur des voies de signalisation du S1P via la modulation de l'activité des protéines G, D'après Nakajima et al. 2014

Ainsi, via sa directe interaction et internalisation avec le complexe PDGFbb-PDGFRβ (Boucher et al., 2003; Loukinova, 2002; Zhou et al., 2009), mais aussi via son rôle sur la protéine Gi et l'activation des récepteurs au S1P (Nakajima et al., 2014), LRP1 est un récepteur essentiel pour la régulation de l'homéostasie vasculaire, et assure la protection vasculaire tant au niveau des cellules endothéliales qu'au niveau des cellules murales.

3. LRP1, régulateur de la barrière hémato-encéphalique

a) Expression de LRP1 dans le cerveau

LRP1, comme d'autres membres de la famille des récepteurs au LDL, est très fortement exprimé dans le cerveau, notamment au niveau des astrocytes, des péricytes et des neurones (Lillis et al., 2008). LRP1 est impliqué dans de nombreuses fonctions essentielles et des défauts au niveau de son expression sont liés à certaines pathologies. En effet, bien que son implication soit controversée, certaines évidences définissent le rôle de LRP1 dans l'apparition de la maladie d'Alzheimer, et notamment par son action sur un peptide spécifique : le peptide amyloide B (AB) (Selkoe, 1999). LRP1 va pouvoir internaliser le précurseur du peptide AB, et le cliver en peptide AB dans les cellules neuronales (Kounnas et al., 1995; Ulery and Strickland, 2000). Décrite depuis 1907 par Aloïs Alzheimer, la neuropathologie associée à la maladie d'Alzheimer est de nos jours principalement décrite par deux facteurs : la formation de dépôts extracellulaires composés essentiellement du peptide AB, aussi appelés plaques amyloides ou plaques séniles, mais aussi par la dégénérescence neurofibrillaires liée à la protéine Tau phosphorylée que nous ne détaillerons pas. L'activation et la formation de peptide AB actif via LRP1 le décrit comme un promoteur de la maladie d'Alzheimer. Cependant si on ne se focalise pas au rôle de LRP1 dans les neurones, mais que l'on regarde au niveau de la barrière hémato-encéphalique (BHE) globale, LRP1 favorise l'efflux du peptide AB afin de limiter son expression dans le cerveau (Ulery and Strickland, 2000), lui conférant cette fois un rôle protecteur contre cette maladie.

b) Modulation de la barrière hémato-encéphalique

En jouant sur les efflux de la BHE de certaines protéines, LRP1 est impliqué dans le maintien de l'intégrité de cette dernière. La perméabilité de la BHE est nécessaire pour l'homéostasie cérébrale. Des études ont montré que la protéine t-Pa (*« Tissue-type Plasminogen activator »*) régule cette perméabilité et que l'augmentation de son expression induit une hausse de la perméabilité de la BHE (Yepes et al., 2003). L'utilisation de souris KO, ou d'inhibiteurs pharmacologiques ont permis de prouver que l'action du t-PA sur la perméabilité de la BHE est uniquement dépendante de son activité protéolytique (Yepes M et al. 2003). En effet, l'utilisation de la neuroserpine, un inhibiteur de l'activité protéolytique du t-PA bloque l'augmentation de la perméabilité de la BHE. Cependant, l'ajout d'inhibiteur de LRP1 comme le RAP ou même d'anticorps bloquant de LRP1 empêche également cette augmentation de perméabilite. LRP1 apparait donc essentielle dans la régulation de la perméabilité de la BHE induite par le t-Pa (Yepes et al., 2003). Les mécanismes d'action par lesquelles LRP1 transduit les effets du t-PA restent méconnus. Plusieurs hypothèses ont été suggérées. Il se pourrait que la fixation du t-PA sur LRP1 entraine le clivage d'un substrat du t-PA entrainant cette signalisation. Il pourrait également s'agir de la partie intracellulaire de LRP1 elle-même, caractérisée comme pouvant être relarguée de la membrane par un clivage protéolytique et pouvant réguler certaines voies de signalisation (May, 2002). Enfin, il pourrait aussi s'agir de l'activation d'un récepteur de la famille PAR (*« Proteinase-Activated Receptor »*) parmi lesquelles les récepteurs de la thrombine font partie. Cependant, aucune interaction entre LRP1 et un GPCR n'a pu être, pour le moment, démontrée.

Ces différentes fonctions de LRP1 sont extrêmement importantes sachant que le t-PA est un agent thrombolytique utilisé en thérapie malgré ces effets secondaires d'induction ou d'aggravation d'hémorragie intracérébrale (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). De plus la perspective thérapeutique de moduler la perméabilité de la BHE, notamment dans le cas des glioblastomes, permettrait l'élaboration de nouvelles molécules cliniquement pertinentes, mais aussi de nouvelles stratégies de normalisation vasculaire. Enfin, la dysfonction de la BHE peut entrainer de nombreuses maladies neurologiques mais

aussi la formation d'œdèmes cérébraux, il est donc essentiel de bien comprendre les mécanismes d'actions pouvant réguler sa perméabilité.

4. Les voies de signalisation régulées par LRP1

Décrit en premier lieu uniquement comme un récepteur d'endocytose, il est désormais clair que LRP1 peut interagir avec de nombreuses protéines cytoplasmiques régulant des voies de signalisations spécifiques. Cet interaction se fait via le domaine intracellulaire de LRP1 (chaine β de LRP1), qui, comme expliqué précédemment, possède deux domaines NPxY capables de fixer des protéines à domaines PTP (Trommsdorff et al., 1998). De nombreuses protéines ont de nos jours été identifiées comme pouvant interagir avec LRP1 et moduler les voies de signalisation, comme la protéine Disabled-1 jouant dans la migration des cellules neuronales pendant le développement du cerveaux, ou encore la protéine SHC connu comme activateur de la voie de signalisation Ras/MAPK (Barnes et al., 2001). Le nombre de ligands pouvant ainsi interagir avec LRP1 souligne le rôle important de ce dernier dans de nombreuses pathologies (Table 6) (Herz and Strickland, 2001).

De plus, d'autres études montrent clairement que LRP1 agit comme un régulateur de la voie des protéines kinases, activant MAPK/ERK et inhibant des protéines impliquées dans les processus d'inflammation et d'apoptose comme SAPK/JNK (Stress-Activated Protein Kinase/c-Jun N terminal Kinase) (Langlois et al., 2010). Par utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces kinases (U0126 pour ERK et SP600125 pour JNK), les auteurs ont pu montrer que via la modulation de ces voies de signalisation, LRP1 est fortement impliqué dans la dynamique de désassemblage des structures d'adhésions cellulaires, permettant de maintenir les cellules dans un état d'adhérence favorable aux processus d'invasions tumorales (Langlois et al., 2010).

La découverte d'une forme soluble de LRP1 dans le plasma a permis de mettre en évidence le clivage de LRP1 et son relarguage de la membrane cellulaire (Quinn et al., 1997). En plus de libérer la forme soluble tronquée dans le plasma, ce clivage protéolytique libère la partie intracellulaire de LRP1 dans le cytoplasme et permet de réguler l'abondance de LRP1 à la membrane cellulaire. Ceci est effectué

par une enzyme de type γ-secretase qui permet de libérer la forme intracellulaire de LRP1 de 55kDa, mais aussi de réguler les voies de signalisation de LRP1 par différents processus (May, 2002). En effet, la partie intracellulaire peut recruter de nombreuses protéines comme expliqué ci-dessus, et la libération de la partie intracellulaire permet de transloquer le complexe dans des zones cibles de la cellule. Cette translocation peut même avoir lieu dans les noyaux cellulaires afin de réguler la transcription de gènes spécifiques. Il a notamment été montré que la forme intracellulaire clivée de LRP1, une fois dans les noyaux, permet l'inhibition de la transcription des gènes pro-inflamatoires activés par les lipopolysaccharides (LPS), ceci via l'export nucléaire du facteur de transcription activé par les LPS, IRF3 (« *Interferon Regulatory Factor 3* ») (Zurhove et al., 2008). Ainsi, en plus de réguler l'activation de voie de signalisation, LRP1 est aussi capable de réguler directement la transcription de certains gènes en réponse à son clivage protéolytique (Figure 25).

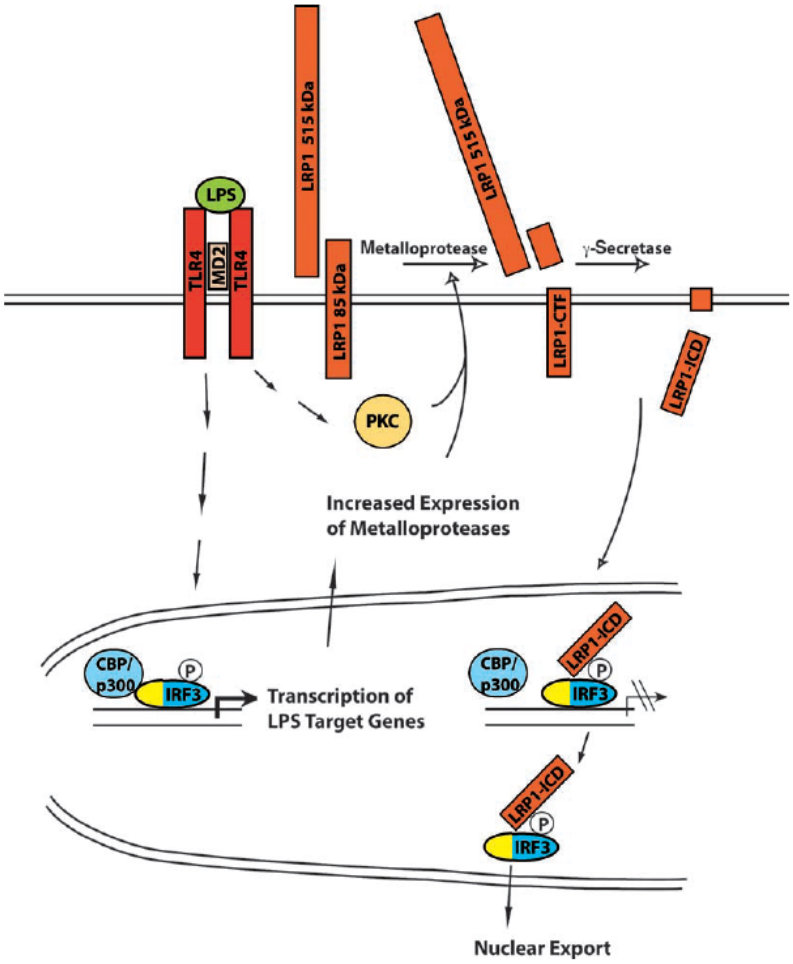


Figure 25: Inhibition de la traduction des cytokines pro-inflamatoires induite par le LPS via le clivage et le relarguage de la partie intracellulaire de LRP1, d'après Zurhove et al. 2008

5. Implication de LRP1 dans la progression tumorale

De part sa fonction d'internalisation et de dégradation de protéases extracellulaires, LRP1 participe activement à la progression tumorale. Les protéases les plus étudiées dans ce contexte sont les métalloprotéinases matricielles (MMPs) et le système urokinase/plasminogène (uPA). De plus, via sa capacité à moduler l'activation de certaines protéines de signalisation cellulaire, LRP1 est impliqué dans les processus biologiques tumoraux tels que la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire.

a) Les protéases matricielles

Bien que la protéolyse et la migration à travers différents tissus soient des fonctions cellulaires physiologiques, il est clairement établi qu'une caractéristique commune aux cellules cancéreuses est leur capacité à sécréter des enzymes protéolytiques lors de l'invasion et de l'angiogenèse tumorale. La corrélation positive entre l'agressivité tumorale et le niveau de protéases est bien documentée (Coussens and Werb, 1996; Egeblad and Werb, 2002; Rao, 2003).

Il existe 8 grandes familles de MMP, dont 1 famille de MMPs transmembranaires (MT-MMP pour « *Membrane Type-Matrix Metalloproteinases* »). Leurs substrats sont variés et permettent une dégradation de la plupart des composants de la matrice extracellulaire (Figure 26).

Substrats des MMPs

Collagenases	Gelatinases	Stromelysines	Matrilysines
MMP1 MMP8 MMP13	MMP2 MMP9	MMP3 MMP10 MMP11	MMP7 MMP26
Elastases	**Enamelysines**	**MMPs Membranaires**	**Autres**
MMP12	MMP20	MMP14 / MT1-MMP MMP15 / MT2-MMP MMP16 / MT3-MMP MMP17 / MT4-MMP MMP24 / MT5-MMP MMP25 / MT6-MMP	MMP12 MMP18 MMP19 MMP21 MMP37 MMP38

Figure 26: Les différents substrats des MMPs

Les MMPs sont synthétisées sous une forme inactive "pré-pro-MMP". Le domaine "pré" constitue un peptide signal permettant l'adressage des MMPs vers le RE lors de la traduction. Le site catalytique de ces enzymes contient un domaine de fixation au Zinc qui va interagir avec le domaine thiol (SH) du domaine "pro" de la MMP. Cette fixation entraine une conformation particulière de la pro-enzyme, la rendant inactive. La rupture de cette interaction se fait par clivage du domaine "pro" de la MMP entrainant un réarrangement structural faisant apparaitre les domaines protéolytiques actifs (Bergers and Coussens, 2000). Ce clivage peut être réalisé par des sérines protéases, par l'uPA ou par les MT-MMPs (Danø et al., 1999). La principale fonction des MMPs est la dégradation de la matrice extracellulaire, faisant des MMPs des protéases essentielles dans les processus d'invasion tumorale, de formation de métastases mais aussi au niveau de l'angiogenèse tumorale (Bergers and Coussens, 2000; Chang and Werb, 2001; Egeblad and Werb, 2002). L'activité des MMPs est régulée entre autres par leurs inhibiteurs: les protéines de la famille TIMP (*« Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases »*). Il existe 4 membres au sein de cette famille (TIMP-1 à TIMP-4) qui se lient au domaine catalytique des MMPs activées, ce qui entraine une inhibition de l'activité protéolytique des MMPs (Baker et al., 2002). Les TIMPs peuvent aussi fixer la partie amino-terminale de certaines pro-MMPs afin de réguler leurs clivages et leurs activations (Baker et al., 2002). Ainsi, de nombreuses études montrent que les TIMPs peuvent inhiber les processus d'invasion *in vitro*, mais aussi la formation de métastases *in vivo*, et l'angiogenèse (Gomez et al., 1997).

L'uPA est une protéase fortement impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Comme pour les MMPs, l'uPA est synthétisée sous forme inactive "prépro-uPA". Son peptide signal induit sa sécrétion, et l'activation de la pro-uPA se fait par clivage partiel qui permet la formation d'une protéine à deux chaines peptidiques covalentes (Ichinose et al., 1986; Petersen et al., 1988). Comme pour les MMPs, ce clivage permet l'activation de l'enzyme. L'uPA actif et sécrété permettra d'activer par clivage une autre protéase sécrétée, le plasminogène, en plasmine. Cette dernière est une serine protéase polyvalente, qui pourra activer les pro-MMPs ou encore dégrader la plupart des composants de la matrice extracellulaire. Le récepteur à l'uPA, uPAR, via la fixation de son ligand, va permettre de maintenir l'uPA à la surface cellulaire et ainsi de faciliter la dégradation du plasminogène en plasmine (Zhang et al., 1993), mais aussi de favoriser le clivage de la pro-uPA en

protéase active (Ellis and Danø, 1993) (Figure 27), ceci via le recrutement d'enzymes extracellulaires spécifiques comme la cathepsine D ou la plasmine elle-même (Kobayashi et al., 1991).

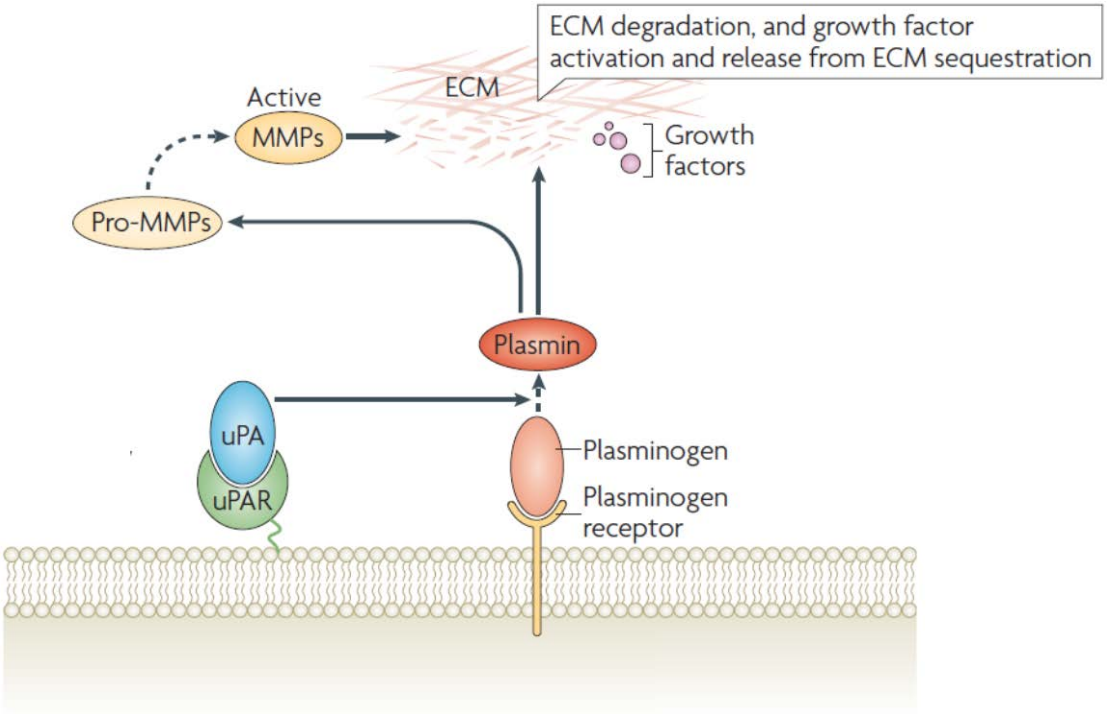


Figure 27: Mécanisme d'action du système urokinase plasminogène
ECM : « Extracellular matrix »

Comme pour les MMPs, les inhibiteurs de l'uPA sont connus : il s'agit des protéines PAI (*« Plasminogen Activators Inhibitors »*). Les protéines PAI se composent de 4 membres (PAI-1 à PAI-4). PAI-1, inhibiteur de la famille des Serpines, régule le système uPA-uPAR en s'y fixant et en formant un complexe ternaire qui va faciliter l'internalisation et la dégradation de l'uPA (Bajou et al., 2001; Loskutoff et al., 1999).

b) La dégradation des protéases matricielles par LRP1

La capacité de LRP1 à internaliser ses protéases permet de moduler la protéolyse de la matrice extracellulaire, et donc, de réguler les processus de remodelage de la matrice extracellulaire qui sont essentiels pour le développement tumoral. LRP1 régule la dégradation de trois MMPs spécifiques : les MMP-2, 9 et 13. Pour les MMPs de type gélatinases (MMP-2 et 9), l'association avec LRP1 se fait via

la formation d'un complexe ternaire avec les inhibiteurs TIMP-1 ou TIMP-2 (Hahn-Dantona et al., 2001). Les protéines TIMPs se fixent à LRP1 sur le cluster II et/ou IV (Thevenard et al., 2014). Ainsi, en s'associant avec les protéines TIMPs, les MMPs vont être reconnues par LRP1, internalisées puis dégradées. Autres que les TIMPs, de nombreux co-recepteurs de LRP1 commencent à être découverts et permettent l'internalisation de différentes protéines extracellulaires. C'est le cas notamment de la Thrombospondine-2 qui, via son interaction avec LRP1, permet l'internalisation et la dégradation de la MMP-2 (Yang et al., 2001).

Comme expliqué précédemment, LRP1 est aussi capable d'internaliser la protéase uPA une fois reconnue par son inhibiteur PAI-1, et ainsi permettre l'implantation et le développement embryonnaire. Les protéases du système plasminogène comme l'uPA sont d'importants médiateurs de la migration et l'invasion tumorale via la dégradation de la matrice, et sont très largement étudiés dans la progression tumorale. Le complexe uPA-PAI-1 se fixera sur le récepteur de l'uPA (uPAR) et le complexe ternaire sera ainsi reconnu par LRP1. uPA sera dégradée dans les lysosomes tandis que uPAR sera recyclé à la membrane (Nykjaer et al., 1997) (Figure 28).

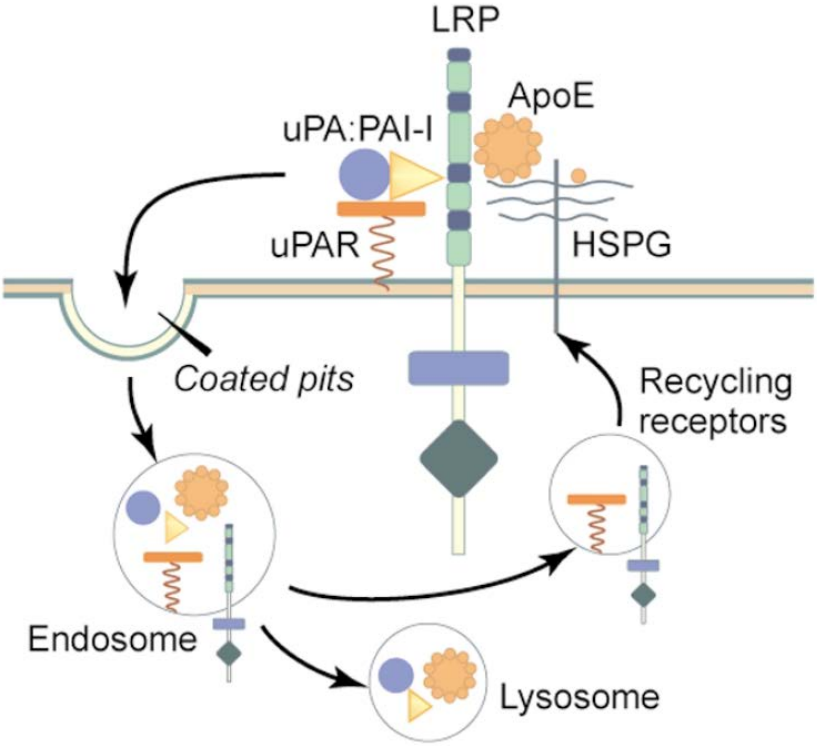


Figure 28: Internalisation du système uPAR/PAI/uPAR (ou des substrats liés aux glycosaminoglycanes comme ApoE) par LRP1, d'après Herz and Strickland 2001

Le complexe uPA-uPAR, sans PAI-1 est faiblement internalisé par LRP1, ce qui souligne le rôle essentiel de PAI-1 dans la reconnaissance du complexe. De récentes études se sont plus particulièrement intéressées aux domaines d'interactions et ont pu montrer que 4 acides aminés (des regions CR4, CR5 et CR6) de PAI-1 permettaient l'interaction avec le cluster II de LRP1. Les mutations de ces acides aminés résultent en un défaut de formation et de dégradation du complexe (Gettins and Dolmer, 2016).

c) LRP1, régulateur des adhérences focales

Les fonctions d'endocytose de LRP1, et notamment la régulation de la dégradation des MMPs et du système uPA font de LRP1 une protéine longtemps caractérisée comme anti-tumorale. Néanmoins, de plus en plus d'études nous amènent à reconsidérer le statut suppresseur de tumeur de LRP1. En effet, en fonction du contexte cellulaire et des ligands impliqués, LRP1 possède également des propriétés pro-tumorales. Notamment, par sa capacité à réguler la formation d'adhérence focale, LRP1 joue un rôle important dans les capacités pro-migratoires et invasives des cellules tumorales. Via la formation d'un complexe Thrombonspondin-calréticuline-LRP1, les complexes d'adhérence focale se trouvent diminuer, permettant aux cellules de migrer et d'envahir de manière plus efficace l'environnement (Orr et al., 2004). Ainsi, les cellules déficientes en LRP1 ont leurs capacités migratoires inhibées en raison d'une adhérence accrue à la matrice extracellulaire. Ces cellules présentent également une diminution au niveau de la formation de frange invasive et de polarisation permettant la migration tumorale (Dedieu et al., 2008). Les complexes d'adhérences focales sont composés de récepteurs spécifiques, les intégrines. LRP1 interagit avec les différentes intégrines afin de favoriser leurs endocytoses. Notamment, il a été montré que LRP1 interagit et induit l'internalisation de l'intégrine β1. Ceci permet de moduler négativement la dynamique de formation des adhésions focales, entrainant la formation d'un microenvironnement favorable pour la migration tumorale (Rabiej et al., 2016).

d) Implication dans la progression du glioblastome

Du fait de sa forte expression dans le cerveau, de son rôle au niveau de l'intégrité vasculaire mais aussi de la BHE, le rôle de LRP1 dans la progression du glioblastome est de plus en plus étudié. En effet, l'expression de LRP1 est augmentée dans les astrocytomes malins, et particulièrement dans les glioblastomes, suggérant que LRP1 serait impliqué au niveau de la progression des glioblastomes (Yamamoto et al., 1997). De nos jours, bien que son effet anti- ou pro-tumoral ne soit pas clair, LRP1 apparait comme un régulateur de la progression tumoral dans le glioblastome. Des études ont prouvé que LRP1 stimule la migration des cellules de glioblastome, non pas en diminuant le nombre d'adhésion focale, mais en stimulation l'expression des MMPs actives, allant ainsi à l'encontre de ses fonctions d'endocytose des protéases. En effet, inhiber l'expression de LRP1 induit une diminution de 30% de l'expression de MMP2 et de 50 % de celle MMP9. Ceci est lié à une diminution de l'activité de leurs promoteurs (30% pour MMP2 et 60% pour MMP9) (Song et al., 2009).

En plus de ces effets liés à l'endocytose et à la l'intégrité vasculaire, la capacité de LRP1 à réguler certaines voies de signalisation l'implique dans le développement de certains cancers. Notamment, dans les cellules de glioblastomes, la protéine chaperonne HSP90 a été caractérisée comme pouvant fixer LRP1 et induire des voies de signalisation pro-tumorales via l'activation de la voie PI3K/Akt. De plus, le complexe HSP90-LRP1 agit comme le co-recepteur du récepteur tyrosine kinase à l'éphrine, l'EphA2 (Gopal et al., 2011). L'EphA2 est fortement surexprimé dans les glioblastomes, et induit la migration et l'invasion cellulaire de ces cellules une fois stabilisé par l'HSP90. Ce mécanisme représente un facteur de mauvais pronostique (Wang et al., 2008; Wykosky, 2005).

IV. Projet de thèse

L'intérêt croissant du récepteur CXCR3 et de ses ligands, les chimiokines CXC, dans le cancer a conduit notre équipe à étudier les mécanismes d'action et les fonctions des isoformes de ce récepteur dans la progression tumorale. Je me suis plus particulièrement intéressé aux mécanismes d'action de CXCR3-A, l'isoforme pro-tumorale, dans plusieurs lignées cellulaires afin de mieux appréhender ses propriétés structurales, biochimiques et fonctionnelles. Un autre récepteur impliqué par la réponse induite par le CXCL4 est LRP1. Il a été montré que CXCL4 active les cellules endothéliales et inhibe la mégacaryopoïese via l'intermédiaire de LRP1 (Lambert et al., 2009; Yu et al., 2005). LRP-1 n'est pas seulement reconnu comme un récepteur de l'endocytose mais également comme une protéine de la signalisation cellulaire. Il est de plus en plus étudié pour ses fonctions de co-récepteur. Mon projet de thèse a porté sur le rôle de LRP1 dans l'internalisation de CXCR3 mais également en tant que co-récepteur capable de réguler l'activité de CXCR3. Plusieurs études ont émergé sur l'implication de ces deux récepteurs dans la progression tumorale des gliomes, cependant aucune étude n'identifie LRP1 comme régulateur direct ou indirect d'un récepteur aux chimiokines classique tel que CXCR3. Au cours de ma thèse, j'ai démontré une interaction physique entre CXCR3-A et LRP1 dans plusieurs lignées cellulaires physiologiques et tumorales (lignée de glioblastomes, et cellules de patients atteints de glioblastome). J'ai également montré que cette intéraction est essentielle dans la régulation de l'activité de CXCR3.

L'étude des mécanismes d'action de CXCR3-A et l'implication du complexe CXCR3 / LRP1 dans le contexte du glioblastome ont constitué la majeure partie de mon travail au cours de ces trois années de thèse. Au vu des résultats originaux, j'ai pu établir et/ou participer dans de nombreux projets parallèles nous permettant de mieux comprendre la biologie de CXCR3 et de son partenaire LRP1. En collaboration avec l'équipe du Pr. Shih-Che Sue, et suite aux travaux de plusieurs mois effectués dans son laboratoire à Taiwan (Novembre - Décembre 2014, puis Juillet - Aout 2015), les différences physiques entre les isoformes CXCR3-A et CXCR3-B ont été étudiées, ainsi que leurs interactions préférentielles avec les chimiokines CXCL4 et son variant CXCL4L1. Toujours dans l'optique de mieux comprendre les différences

entre CXCR3-A et CXCR3-B, la technique de résonance plasmonique couplée aux ondes guidées (PWR) a été utilisée. Ce projet en collaboration avec le Dr. Isabel Alves a permis de caractériser la conformation des récepteurs après activation et de suivre en temps réel l'activité de ces protéines membranaires. J'ai également contribué à l'étude plus particulière des effets *in vitro* et *in vivo* du CXCL4L1 dans la progression tumorale du cancer du pancréas, où l'importance de la signalisation CXCR3-A / CXCL4L1 dans la cellule tumorale a été mise en évidence (publié dans Cancer Research en 2016).

CXCR3-A apparait, de part nos études, essentiel dans la progression tumorale et se caractérise comme un biomarqueur important en cancérologie. De ce fait, le développement de nouvelles techniques anti-tumorales ciblant CXCR3 apparait comme une intéressante stratégie thérapeutique. Ainsi, en collaboration avec une équipe de chimiste dirigée par le Pr. Sébastien Lecommandoux, l'élaboration et le développement de nanoparticules composées d'antagonistes spécifiques du CXCR3 est en cours de réalisation. Les premiers resultats sont prometteurs, ainsi la caractérisation de ces nanoparticules pourrait permettre l'élaboration de futures stratégies thérapeutiques ciblées.

Chapitre I : Mécanisme d’action et rôle biologique de CXCR3-A dans la progression tumorale des glioblastomes

I. Introduction et objectifs de l’étude

Comme décrit en introduction, les glioblastomes font partie des cancers les plus agressifs, présentant une survie à 5 ans proche de 0%. La récidive lors du protocole de Stupp au Temozolomide constitue le problème principal lors de la prise en charge du glioblastome. La forte vascularisation des glioblastomes permet leur développement et c’est pour cela que les stratégies secondaires anti-angiogeniques ont été mises en place. Les chimiokines CXC peuvent réguler l’angiogenèse physiologique et tumorale, et font donc parties de nombreuses études pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cependant, du fait de la grande plasticité des glioblastomes, aucune thérapie curative n’est connue à ce jour. La recherche de biomarqueur pour le diagnostique précoce, ainsi que pour le traitement est essentielle pour la prise en charge du glioblastome. Plusieurs études démontrent que l’expression de CXCR3 (Liu et al., 2011; Maru et al., 2008; Sharma et al., 2016) ainsi que celle de LRP1 (Song et al., 2009; Yamamoto et al., 1997) pourraient jouer un rôle dans la progression et l’invasion tumorale des glioblastomes

L’étude consiste à caractériser l’implication de CXCR3, et plus particulièrement de l’isoforme pro-tumorale CXCR3-A, dans la progression des glioblastomes. Les mécanismes d’action de l'isoforme demeurent peu connus. Une grande partie de l’étude sera donc de caractériser les mécanismes d’action, d’activation ou encore de recyclage / dégradation de ce récepteur dans un contexte physiologique et tumoral. LRP1, fortement exprimé dans le cerveau, a aussi été caractérisé comme régulant la progression tumorale. Nous allons étudier les modes d'action de CXCR3-A et son implication dans le developpement du glioblastome, et aussi si CXCR3-A est un nouveau co-recepteur de LRP1, ce dernier jouant dans l’activité et l’internalisation de CXCR3-A.

II. Article I: « New insight into the internalization, recycling and activity of the CXC Receptor-3: Role of LRP1 »

L'article a été soumis dans « *The Journal of Cell Biology* » en octobre 2016.

New insight into the conformation, trafficking and activity of the CXC Receptor-3: Role of LRP1

Kevin Boyé[1,2], Nadège Pujol[1,2], Isabel Alves[3], Ya-Ping Chen[4], Thomas Daubon[1,2], Lorenzo Bello[5], Marco Rossi[5], Marion Constantin[1,2], Shih-Che Sue[4], Andreas Bikfalvi*[1,2] and Clotilde Billottet*[1,2]

[1]INSERM U1029, Pessac, France; [2]Université de Bordeaux, Pessac, France; [3]CBMN UMR 5248 CNRS, Pessac, France ; [4]Department of Life Science NTHU, Taiwan; [5] Division of Neurosurgery, Department of Neurological Sciences, Milan, Italy.

* co-PI and co-corresponding authors

Correspondance to:

Clotilde Billottet/Andreas Bikfalvi

Molecular Angiogenesis Laboratory

INSERM U1029

University Bordeaux

Allée Geoffroy St Hilaire

33 Pessac

Phone: CB (33) 5 40 00 29 03/ AB (33) 5 40 00 87 03

Fax: (33) 5 40 00 87 05

E-mail: clotilde.billottet@u-bordeaux.fr/ andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr

Running title: LRP1 as a new regulator of CXCR3

Keywords: CXCR3, LRP1, glioma, internalization, recycling, signaling

ABSTRACT

CXCR3 belongs to the G-protein-coupled receptors family and plays important roles in angiogenesis, inflammation and cancer. The interaction with CXCR3 is rather complex due to the presence of spliced isoforms. Here, we focused on CXCR3-A conformational dynamics and on the mechanisms controlling its activity and trafficking in tumor cells. Agonist stimulation induces an anisotropic response in the receptor with major conformational changes occurring along its longitudinal axis. We demonstrated that CXCR3-A interacts with domain IV of LRP1, an endocytic receptor involved in vascular development and cancer. CXCR3-A is internalized via clathrin-coated vesicles and early endosomes, and is recycled through the retrograde trafficking. Silencing of LRP1 leads to an increase in the magnitude of ligand-induced receptor conformational change with CXCR3-A focalized at the cell membrane, leading to a sustained receptor activity and an increase in tumor cell migration. Our data are important for tumor biology, since, we evidenced CXCR3-LRP1 interactions and its modulation in human glioma cells and in patient samples. These results show that, LRP1 is critically involved in the regulation of CXCR3, which may have important consequences for tumor development.

INTRODUCTION

The CXC chemokine receptor CXCR3 belongs to the family of G-protein-coupled receptors (GPCRs) that mediate diverse biological functions upon extracellular stimuli. CXCR3 has been reported to interact with various ligands which include CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL4 and its variant CXCL4L1. It plays important roles in development, immune responses and wound repair and is associated with a variety of human diseases, including chronic inflammation, immune dysfunction, cancer and metastasis (Belperio et al., 2000, Groom and Luster, 2011, Moore et al., 1998, Strieter et al., 2004, Strieter et al., 2005, Vandercappellen et al., 2011). An increase in CXCR3 expression has been found in many human tumors and has been correlated with poor prognosis in patients with breast cancer, colon cancer, glioma, osteosarcoma and renal cell carcinoma (Ma et al., 2009, Murakami et al., 2013, Pradelli et al., 2009, Walser et al., 2006, Pu et al., 2015).

However, the interaction with CXCR3 is rather difficult to study due to the presence of three distinct spliced isoforms including CXCR3-A, CXCR3-B and CXCR3-alt, CXCR3-A and CXCR3-B being the more studied isoforms. CXCR3-B displays a longer amino-terminal domain than CXCR3-A (Lasagni et al., 2003) and CXCR3 ligands have opposing effects depending on the CXCR3 isoform expressed in cells. CXCR3-A is reported to promote cell proliferation, survival and migration, while CXCR3-B mediates growth-inhibitory activity and apoptosis. In renal carcinoma cells, the relative expression of CXCR3-A and CXCR3-B determines the effect on cell proliferation and survival. Indeed, overexpression of CXCR3-B in renal cancer cells significantly inhibits cell proliferation and promotes apoptosis (Datta et al., 2010). In gastric cancers overexpresssion of CXCR3-B correlates with favorable prognosis (Hu et al., 2015). Thus, CXCR3-A appears to mediate "switch on" signaling while CXCR3-B appears to mediate "switch off" signaling in tumors.

CXCR3 is able to elicit increases in intracellular calcium levels and activates multiple signaling pathways, which correlates with the ability to induce cellular responses, such as actin reorganization, proliferation, chemotactic migration, invasion and cell survival. Many reports have shown that in various cell types (pericytes, endothelial cells, myofibroblast, T cells, epithelial cells and tumor cells), binding of CXC chemokines to CXCR3 induces activation of signaling pathways including p38 and ERK/ Mitogen Activated Protein Kinases (MAPK), phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) and phospholipase C (PLC) (Bonacchi et al., 2001, Kouroumalis et al., 2005, Petrai et al., 2008, Shahabuddin et al., 2006, Smit et al., 2003). A method that in the past has been demonstrated ideal to follow GPCR activation and first signaling events is plasmon waveguide resonance (PWR) (Alves et al., 2004 ; Alves et al., 2006). The method is highly sensitive (can detect femtomole quantities of material), direct (no labelling is necessary) and allows to measure the affinity and kinetics of molecular interactions. Additionally it can follow the orientation of anisotropic oriented

samples and thus is ideal to study oriented lipid films and membrane proteins. The drawback is that the majority of studies performed so far require the membrane protein to be isolated and reconstituted in the lipid film, a process that is laborious. Herein, we applied a new protocol to capture on the sensor surface cell fragments from living cells expressing the CXCR3-A.

Lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) is a large multi-ligand endocytic receptor that belongs to the low-density lipoprotein (LDL) receptor family (Lillis et al., 2008). Members of this family were thought to be exclusively involved in receptor-mediated uptake of extracellular molecules such as lipoproteins and proteases, but more and more studies have revealed new roles of this family of receptors. LRP1 is widely expressed in several cell types such as fibroblasts, neurons, astrocytes, macrophages, smooth muscle cells and tumor cells. LRP1 is synthesized as a 600-kDa precursor protein that interacts with the ER chaperone receptor-associated protein (RAP) (Bu et al., 1995) and is processed by furin into two non-covalently associate molecules: an extracellular ligand-binding subunit of 515 KDa (α chain) and a transmembrane subunit of 85-kDa (β chain). The α-chain contains four extracellular ligand-binding domains, termed domains I to IV, each composed of a cluster of cystein-rich complement-type repeats, and the β chain binds several adaptor proteins for efficient endocytic trafficking and signaling (Lillis et al., 2005). LRP1 is reported to regulate the abundance or the function of receptors/cell signaling proteins in the plasma membrane, including uPAR, EphA2 and neuropilin-1 (Gaultier et al., 2010, Gonias et al., 2011, Gopal et al., 2011, Nakajima et al., 2014). LRP1 has been reported to mediate endothelial and megakaryocyte cells responses to the CXC chemokine (CXCL4, Lambert et al., 2009) Mice lacking LRP1 in smooth muscle cells show greatly diminished vessel integrity (Boucher et al., 2003). Nakajima et al. further demonstrated that LRP1 modulates the GPCR sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling. LRP1 does not interact with GPCR S1P but restrains the activation of Gαi subunit, which integrates input from several signaling pathways (PDGF-BB) crucial for mural cell recruitment (Nakajima et al., 2014). LRP1 is also critically involved in many processes that drive tumorigenesis and tumor progression (Montel et al., 2007).

In this article, we studied the status of CXCR3-A in tumor cells and we provide herein new observations for receptor function and regulation. We demonstrated that CXCR3-A confers *in vitro* and *in vivo* migratory properties to glioma cells. We further investigated conformational dynamic of CXCR3-A using plasmon waveguide resonance (PWR). We demonstrated that agonist induces an anisotropic response in CXCR3-A with major conformational changes occurring perpendicular to the membrane that can be attributed to receptor elongation known to occur upon activation. One of our major finding is the involvement of LRP1 in the regulation of CXCR3 bioactivity and trafficking. For the first time, we demonstrated that LRP1 interacts with CXCR3-A

and has an essential role in the clathrin-dependent internalization of CXCR3-A. CXCR3-A is rapidly internalized into clathrin-coated vesicles and EEA1-positive early endosome, where LRP1 is enriched, and is recycled through the trans-golgi pathway. Silencing of LRP1 in glioblastoma cells leads to improper conformation, internalization of CXCR3, and results in CXCR3-A accumulation at the cell membrane with sustained receptor activation. This has consequences for cell signaling and behavior that have been confirmed *in vivo* with glioblastoma patients. This is the first study that reports an interaction between a classical CXC chemokine receptor and LRP1, and a regulatory role of LRP1 in GPCR conformation, trafficking and tumor biological activity.

RESULTS

Expression of CXCR3 isoforms in glioma cells

We investigated the expression of CXCR3 in different glioma cell lines from low grade (grade II/III) to high grade (grade IV) by quantitative RT-PCR to distinguish CXCR3-A from CXCR3-B. As reliable CXCR3-isoforms specific antibodies are lacking, we did immunoblotting for total CXCR3. Glioma cell lines express both CXCR3-A and CXCR3-B mRNA, CXCR3-B being the predominant form (Fig. 1A). Endogenous CXCR3 protein levels measured by immunoblotting are variable in the different cell lines and seem not related to the tumor grade. Indeed, CXCR3 is detected in both, lower grade (1321N1, NHATS and NHATSR) and high grade glioma (U118 and T98G) cell lines (Fig. 1B). To gain insights into CXCR3's mechanism of action and function, we used the U87 glioma cell line in all subsequent studies since this cell line expresses low CXCR3 levels (Fig. 1B) and can, therefore, be engineered with adequate expression vectors. To reinforce our results, we used, in addition, the Hek-293 cell line which also expresses low CXCR3 levels. Since the main tumor promoting receptor is CXCR3-A (Datta et al., 2010), we focused our investigations specifically on this receptor isoform.

Expression and function of CXCR3-A in glioma cells both *in vitro* and *in vivo*

To study CXCR3-A function *in vitro* and *in vivo*, we stably transfected U87 with vectors encoding CXCR3-A (U87-CXCR3A). CXCR3-A expression was validated in transfected cell lines by qPCR, Western-blot, flow cytometry and siRNA directed against CXCR3 (Fig. S1). Since CXCR3 is a receptor with chemotactic properties, the functional significance of CXCR3-A activation was first tested by performing *in vitro* cell migration assays. U87-CXCR3A cells migrate more (5 fold increase) in response to the CXCR3 agonist (PS372424) in comparison to empty-vector transfected control cells (U87-CTRL cells) (Fig. 1C). The increase in cell migration is inhibited by treatment with the CXCR3 antagonist (SCH546738). To study the tumor growth and cell metastasis *in vivo*, the chick embryo's chorioallantoic membrane (CAM) model was used by implanting U87-CTRL and U87-CXCR3A tumor cells on the membrane. In fact, the CAM is especially well suited for xenograft

experiments due to its immune-deficient environment and dense capillary network. In our study, the CAM sustains tumor formation within several days following cell grafting of both cell lines, U87-CTRL and U87-CXCR3A (Fig. 1D). U87-CXCR3A tumors express high amounts of CXCR3-A *in vivo* as measured by qPCR (Fig. F. U87-CTRL tumors are much larger and well demarcated from the CAM tissue while U87-CXCR3A tumors are smaller but display invasion into host tissue (Fig. 1D). Strands of U87-CXCR3A cells are present along the capillary network of the CAM invading the chicken tissue. Infiltrative and non-infiltrative phenotypes were quantified and are depicted in Fig. 1E. These results are reinforced by measurements of uPA and metalloproteinases which show a strong increase in U87-CXCR3A expressing tumors (Fig. 1F). Overall, this CAM experimental model shows that CXCR3-A is able to increase glioma invasiveness.

Conformational and dynamic properties of CXCR3-A

To gain insight into the mechanism of activation of CXCR3-A, we conducted PWR experiments. To this aim, cell membrane fragments of CXCR3-transfected or control cells were bound onto silica (glass slides or PWR sensor) and analyzed by fluorescence microscopy and PWR. Following treatment of silica with polylysine, the glass slide or the PWR sensor are pressed against U87-CTRL and U87-CXCR3-A cells (following a short osmotic shock) to allow partial cell disruption and capture of cell fragments by the surface. Fluorescence microscopy performed on glass slides indicates that cell fragments are captured because of smaller size than whole cells (Fig. 2A). PWR spectra performed before and after cell adhesion on the sensor show a large increase in resonance minimum position (about 100 mdeg), which correlates with mass increase due to capture of the cell fragments (Fig. 2B). The magnitude of the spectral shift correlates well with that observed for a pure lipid membrane across the entire PWR sensor (Harte et al, 2014). The addition of the CXCR3 agonist (PS372424) to the CXCR3-A cell membrane fragments captured in the sensor leads to spectral changes for both polarizations, but specially for the p-polarization (Fig. 2C). The incremental addition of ligand results in a saturable binding response whose data was fitted and the dissociation constant determined (Fig. 2D) (KD of 36 +/- 9 nM in U87-CXCR3A cells). It should be noted that the addition of ligand to U87-CTRL cell membrane fragments leads to spectral changes (Fig. 2D), which result from ligand-induced receptor conformational changes. It is worth noting that ligand-induced spectral changes are anisotropic (shifts in p-polarisation are much higher than those in s-pol) (Fig. 2C). This reflects anisotropic conformational changes of the receptor with major changes, in this case elongation, along the receptor longitudinal axis. Similar receptor-conformational changes and affinity were obtained with Hek-293 cells transfected with vectors encoding for GFP-CXCR3-A (Figs. S1 and S2).

Downstream activation of CXCR3-A in glioma cells

GPCRs are critically regulated by β-arrestins, which not only desensitize G-protein signaling but also initiate a G-protein-independent wave of signaling pathways. Our results show that after 15 minutes of stimulation, β-arrestin 1 and β-arrestin 2 are recruited at the cell membrane (Fig. S3). GPCR receptors initiate a signaling cascade that results in changes in calcium levels within the cell. Therefore, activation of CXCR3 has been monitored by measuring the increase in intracellular calcium levels. Figure 3A shows that receptor activation after stimulation with the CXCR3 agonist is detected only in cells expressing CXCR3-A, (U87-CXCR3A and Hek293-CXCR3A cells). A peak in intracellular calcium levels is observed after 20 sec of stimulation with the CXCR3 agonist and is inhibited by the specific CXCR3 antagonist (SCH 546738, Fig. 3B left panel for Hek293-CXCR3A and right panel for U87-CXCR3A). To investigate the impact of CXCR3 ligands on downstream signaling, phosphorylation of MAPK/Erk pathway in U87-CXCR3A and Hek-293-CXCR3A cells was assessed. The functional activation of CXCR3-A was assessed after 5 minutes of stimulation with the CXCR3 agonist PS372424 and other ligands, including CXCL10 and CXCL4L1. All tested ligands have a marked increase of phospho-Erk1 and phospho-Erk2 on cells which overexpress CXCR3-A (Fig. 3C). Treatment of U87-CXCR3A and Hek-293-CXCR3A cells with the CXCR3 antagonist SCH546738 leads to a reduction in MAPK activation after CXCR3 agonist stimulation (Fig. 3D).

First evidence for an interaction between CXCR3 and LRP1

LRP1 modulates the GPCR sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling. LRP1 does not interact with GPCR S1P but restrains the activation of Gαi subunit (Nakajima et al., 2014). In addition, LRP1 has been reported to be involved in CXCL4 activity in megacaryocytes and endothelial cells (Lambert et al., 2009). This let us to investigate a possible link between CXCR3 and LRP1. The subcellular localization of CXCR3 and of LRP1 was assessed by super-resolution microscopy in U87-CXCR3-A using Stimulated Emission Depletion (STED) microscopy. STED improves resolution between 70 nm to 100 nm in the XY direction under optimal conditions. Figure 4A shows that both CXCR3-A and LRP1 are mainly present in the cytoplasm near the nucleus and colocalized perfectly in the super resolution's space of the STED (Fig. 4A). It is worth to emphasize that the plot profile analysis of each fluorophore significantly correlates in a space of 100 nm (Fig. 4A). Double staining with antibodies against CXCR3 and LRP1 confirms colocalization of CXCR3-A with LRP1 (Pearson's correlation > 0.5 in both cell lines) (Fig. 4B). Upon stimulation with the CXCR3 agonist, both receptors are present at the cell membrane, and Pearson's correlation are increased (Fig. 4B), suggesting that more CXCR3 and LRP1 colocalize upon stimulation.

We next aimed at addressing whether this interaction also occurs with endogenous CXCR3 and LRP1 in glioma cells, and also whether it can be generalized to other cell types, as well. To this aim, in addition to U87-CXCR3A cells, we used the glioma cell line 1321N1 (Fig. 1C) and CaSMC (Coronary Artery Smooth Muscle Cells). Both cell types express endogenously high levels of LRP1 and CXCR3. In all cases, the interaction between CXCR3 and LRP1 can be demonstrated (Fig. 4C). Both subunits of LRP1 (alpha chain and beta chain) are found in the LRP1 immunoprecipitates.

To investigate whether the interaction between CXCR3 and LRP1 also occurs *in vivo*, U87-CXCR3A grown on the chick chorioallantoic membrane (CAM) were investigated which showed that this was indeed the case (Fig. 4D). More importantly, we could also evidence the CXCR3/LRP1 interaction directly in patient-derived glioblastoma cells lines (Fig. 4D).

To assess the specificity of LRP1 for CXCR3, another classical GPCRs CXCR7, known to be involved in glioma (Liu et al., 2015), was tested. Western blotting of LRP1 immunoprecipitates did not reveal CXCR7 (Fig. 4E). Thus, the interaction between LRP1 and CXCR3 seems specific.

CXCR3-A binds LRP1 through its extracellular ligand-binding domains IV

To decipher in more depth the interaction between LRP1 and CXCR3-A, co-immunoprecipitation experiments were carried out using RAP, a chaperone that binds tightly to domains II, III and IV of LRP-1 through its C-terminal heparin-binding domain and antagonizes ligand binding to LRP-1 (Obermoeller-McCormick et al., 2001). The amount of immunoprecipitated CXCR3-A decreases upon RAP treatment (Fig. 4F). These data demonstrate that endogenous LRP-1 and CXCR3-A might indeed interact through the α chain of LRP1. As most of LRP-1 ligands bind to domain IV of the α chain, we used Hek 293 cells that express weakly LRP1 compared to U87 cells, for further experiments (Fig. 4G). Therefore, Hek293-CXCR3-A cells were stably transfected with the minireceptor carrying only the extracellular binding-domain IV and containing a HA tag at the amino-terminus of the α-chain (mini-LRPIV, Perrot G et al. 2012). Stable expression of mini-LRPIV was assessed by HA tag-directed immunoprecipitation and by immunoblotting analysis using an anti-HA antibody, which revealed the expected molecular weight of mini-LRPIV and using an anti-GFP antibody, which revealed CXCR3-A (Fig. 4G). These data demonstrate that LRP-1 mediates the binding of CXCR3-A mainly through its extracellular domain IV.

Clathrin-dependent internalization of CXCR3 and recycling through the retrograde trafficking

As LRP1 has dual functions in endocytosis and signal transduction, we next aimed at studying CXCR3 trafficking. Internalization of plasma membrane proteins and lipids is mediated by clathrin-dependent and independent pathways (Gruenberg, 2001). Studies using available markers, such as antibodies for clathrin, for early

endosomes (EEA1 and Rab5), for trans-golgi recycling network (GOPC and syntaxin 6) or lysosomal degradation pathway (Lamp-1), have been performed to label particular cellular organelles or membranes in U87-CXCR3A (Fig. 5A and S4). In unstimulated U87-CXCR3A cells, colocalization of CXCR3-A with each marker is found near to the nucleus. In agonist-stimulated U87-CXCR3A cells, colocalization is seen at or near the plasma membrane for all the markers, and the Pearson's correlation is increased for clathrin and EEA1 after 15 min of stimulation (Fig. 5A and S4). At 60 min of stimulation, CXCR3-A, LRP1, GOPC and syntaxin 6 are mainly detected in the cytoplasm (Fig. 5A and S4). CXCR3-A colocalizes with GOPC and syntaxin 6 suggesting its recycling through the trans-golgi network. The same results were obtained in the Hek-293-CXCR3A cells with clathrin, EEA1 and Rab5 immunostaining at 15 min of stimulation and with GOPC and syntaxin 6 immunostaining at 60 min of stimulation (Fig. S5A). Inhibition of clathrin by Pitstop 2^{tm} demonstrates that CXCR3-A remains at the cell membrane after 60 min of CXCR3 agonist treatment but also in the non-stimulated condition (Fig. 5B and 5C). After 3 min of stimulation, a sustained increase in intracellular calcium is observed (Fig. 5 D).

In addition, we showed that CXCR3 colocalizes with clathrin, EEA1 and syntaxin 6 in the non-stimulated condition (Fig. 5A, S4 and S5). This suggests that both, constitutive internalization and CXC chemokine-dependent internalization of CXCR3 are clathrin-dependent and that receptors are subsequently recycled back to the plasma membrane. We demonstrated that CXCR3-A is internalized with LRP1 in a clathrin-dependent manner to EEA1-positive early endosomes. No colocalization was found with caveolin and late endosomes or lysosomes (Lamp-1) (Fig. S5B). This indicates that CXCR3 and LRP1 use a recycling pathway instead of degradation. Furthermore, we showed that CXCR3-A is colocalized with GOPC and syntaxin 6, which indicates that endocytosed CXCR3 receptors are protected from lysosomal degradation. This leads to a slower receptor turnover. A similar mechanism has already been described for other receptors such as GPCR β1-adrenergic (Koliwer et al., 2015) and GLUT4 receptors (Shewan AM et al., 2002).

LRP1 as a novel regulator of CXCR3 and mechanism of action

As LRP1 appears to be a new partner for CXCR3-A, we study whether LRP-1 is involved in CXCR3-A conformational dynamics and trafficking. Efficient down-regulation of LRP-1 expression was performed using 3 interference RNAs against human LRP1 in the control U87 and U87-CXCR3A cells (Fig. 6A).

PWR studies were performed in U87 cells expressing CXCR3-A following or not treatment with siRNA Ligand-induced conformational changes of the receptor were monitored as described above. While siRNA treatment does not alter the amount of cell fragments captured by the sensor (as similar spectral shifts are produced following cell fragments deposition), the response

to the ligand is greatly affected (Fig. 6B and S2D). The anisotropy of the ligand-induced receptor conformational change is greatly altered (higher shifts in p- than s-polarisation are observed) the response is less anisotropic (Fig. 6B). This indicates that the ligand-induced conformational change of the receptor is affected by the presence of LRP1 in the membrane. Moreover, the magnitude of the spectral changes induced by the ligand is much larger (more than double) than those observed for cells treated with control siRNA which is correlated with a higher amount of receptors present in the cell fragments (Fig. 6C). Thus the data supports the idea that LRP1 knock-down leads to receptor accumulation at the cell membrane and a ligand-induced conformational change. However, the affinity of the ligand to the receptor is very much comparable to that observed in U87-CXCR3A treated with control siRNA (KD of 38 +/-9 for siRNA LRP1 and KD of 41 +/-11 for siRNA control) (Fig. 6C and Fig. S2E).

Furthermore, strong modifications in the subcellular localization of CXCR3 are observed when LRP1 is knocked down. After LRP1 knock-down, CXCR3-A is accumulated at the cell membrane from the rear to the front and along membrane ruffles (Fig. 6D). To quantify CXCR3-A protein expression at the cell membrane, we performed CXCR3 flow cytometry and western blot for CXCR3 on subcellular membraneous fractionation. Figures 6E and 6F confirm the increase of CXCR3-A at the cell membrane when LRP1 is down-regulated. We next analyzed vesicular trafficking and recycling of CXCR3-A in LRP1 knock-down cells. In this case, clathrin is still recruited and colocalizes with CXCR3-A at the plasma membrane in the absence of LRP1 (Fig. 6G). This indicates that internalization of CXCR3-A is strongly impaired in the absence of LRP1. This is also associated with impaired clathrin-coated vesicle formation (Fig. 6G).

LRP1 as a novel regulator of CXCR3 activation and function

CXCR3-A appears to mediate "switch on" signaling in tumor cells. We next studied the functional consequences of LRP1 knock-down on signaling in U87-CXCR3A cells. To this aim, measurements of intracellular calcium levels were performed. We observed that the increase in intracellular calcium level is not only present 20 sec after stimulation with the CXCR3 agonist but is sustained for a prolonged period of time (up to 3 minutes, Fig. 7A, right panel). The same experiments were performed in the glioma cell line T98G that expresses endogenously higher levels of CXCR3-A (Fig. 1B). CXCR3-A is activated 20 sec after stimulation as documented by the increase in calcium-induced flux (left panel). Furthermore, CXCR3-A activation is sustained 1 min post-stimulation when LRP1 is silenced (right panel) (Fig. 7B). In addition, a marked phosphorylation of Erk1/2 is still observed in U87-CXCR3A cells at 60 minutes of stimulation when LRP1 is knocked-down (Fig. 7C, left panel). The same results were obtained using RAP (receptor-associated protein), known to competitively inhibit LRP1-dependent endocytosis (Fig. 7C, right panel). In addition, cell

migration was further increased in agonist-stimulated U87-CXCR3A cells after LRP1 knock-down (Fig. 7D, left panel) or LRP1 inhibition using RAP (Fig. 7D, right panel).

LRP1 and CXCR3 expression in glioma samples from patients

CXCR3 and LRP1 are expressed in low grade and high grade gliomas (Sun et al, 2006). These global data base-derived analysis does not take into account the regional heterogeneity of gliomas. We therefore analyzed the regional distribution of CXCR3 and LRP1 by focusing on high-grade gliomas (Glioblastomas, GBM). To this aim, samples were taken from central and peripheral areas of the tumor based on functional MRI imaging. In the angiogenic core of the tumors, CXCR3 and LRP1 are both detected (Fig. 8, left panels). LRP1 localized both in tumor and stroma cells and the vasculature whereas CXCR3 is mainly present in the tumor cells and localized in the cytoplasm. In the infiltrative part of the tumor, LRP1 expression is completely shut-down while CXCR3 is still present in tumor cells (Fig. 8, right panels). Most importantly, CXCR3 is localized at the cell membrane in this case. These results are in agreement with our mechanistical studies where we modulated the expression of LRP1 and CXCR3 in glioma cells. Taken together, our results are in favor of a role of CXCR3 and LRP1 in tumor cell invasion and infiltration where LRP1 is down-regulated at the infiltrative areas of the tumor to allow accumulation of CXCR3 at the cell membrane leading to a sustained CXCR3 activation and increase in tumor cell migration and invasion.

DISCUSSION

CXCR3 belongs to the class of G protein-coupled receptors and was initially characterized through its ability to direct the migration of leukocytes to sites of inflammation (Groom and Luster, 2011). Since then, additional studies have reported a broader role for CXCR3 (Billottet et al., 2013, Van Raemdonck et al., 2015). A number of studies have reported an association with tumor growth and metastasis by its involvement in cell proliferation, migration, invasion and survival (Ma et al., 2009, Murakami et al., 2013, Pradelli et al., 2009, Walser et al., 2006). However, due to the presence of three distinct spliced isoforms, it is important to understand the relative contribution of each CXCR3 isoform in tumor.

In the present study, we focused only on CXCR3-A isoform since this form exhibit tumor-promoting effects, using glioma cells as a model system. Gliomas are classified according to World Health Organization (WHO) (Louis et al., 2007) in low grade and high grade gliomas. Grade IV tumors (Glioblastomas) are highly malignant and usually resistent to chemotherapy. Glioblastomas are highly vascularized, proliferative, infiltrative and associated with a poor prognosis (Bello et al., 2004). Recent reports suggest an involvement of CXCR3 in glioma development (Liu et al., 2011, Pu et al., 2015). Maru et al. reported a strong correlation of CXCL10/CXCR3 expression with

tumor grade in cultured cells derived from grade III astrocytomas and from grade IV glioblastomas (Maru et al., 2008). However, neither the specific roles of the CXCR3 isoforms nor the mechanisms of activation and receptor expression have been investigated in this study. As reliable specific antibodies for CXCR3-isoforms are lacking, it is impossible to determine the ratio of CXCR3-A/CXCR3-B isoforms at the protein level.

We found that mRNAs of the CXCR3 isoforms are expressed at variable levels in glioma cell lines of various grade which is in agreement with previously published data (Liu et al., 2011). Liu et al. have reported that high expression levels of CXCR3 conferred poor prognosis and could represent an independent prognostic marker for glioblastomas (Liu et al., 2011). This is in contrast to TCGA data, where global expression CXCR3 does not impact on survival (our own analysis).

To gain insights into the functional role of CXCR3 in glioma biology, we studied the role of CXCR3-A in different situations and both *in vitro* and *in vivo*. Firstly, glioma cells were engineered to overexpress CXCR3 (U87-CXCR3A). Secondly, the role of endogenous CXCR3 was studied in glioma cells that already expressed high levels of CXCR3 (1321N1 and T98G). We, furthermore, used Hek-293 cells engineered with CXCR3-A as controls (Hek-293-CXCR3A). Both, *in vitro* cell migration experiments and analysis in the experimental glioma model in the chick embryo were performed, which demonstrated that CXCR3-A was able to increase cell glioma migration and invasion in both conditions. In the chick embryo model, glioma cells overexpressing CXCR3-A demonstrated high invasive capacity. Tumors were whitish, a hallmark of reduced intratumor angiogenesis. Tumor strands migrated away from the main tumor mass in vicinity of CAM blood vessels. These results clearly show that CXCR3 promotes glioma cell migration which is consistent with a pro-invasive effect and is in agreement with the clinical data.

At present, high-resolution crystallography structure is not yet available for CXCR3. Therefore, we used PWR to study the conformational dynamics, activity and signaling of CXCR3-A. PWR results demonstrated that ligand-induced spectral changes are anisotropic (shifts in p-polarisation are much higher than those in s-pol). This reflects anisotropic conformational changes in the receptor with larger changes, in this case elongation, along the receptor long axis. It is noteworthy that the conformational change observed here is not modifying the affinity for the ligand. This implies that receptor elongation is not significantly affecting ligand affinity.

It is to emphasize that this is the first study using PWR for the analysis of a classical CXCR receptor. Plasmon resonance studies on rhodopsin, which belongs to another GPCR family, have demonstrated that upon light-activation, the surrounding lipid environment suffers a considerable increase in membrane thickness (Salamon et al, 1994). This was confirmed by high resolution structural studies where protein elongation was attributed to structural changes

along TM helix 5 (Standfuss et al., 2011; Choe et al., 2011).

Stimulation of CXCR3-positive glioma cells with the CXCR3 agonist lead to a marked increase in calcium flux after 20 sec of stimulation and of phospho-Erk1 and phospho-Erk2 after 5 minutes of stimulation together with an increase in glioma cell migration. These results are in agreement with earlier studies that have shown that CXCR3 is able to elicit an increase in intracellular calcium levels and activation of multiple signaling pathways (Bonacchi et al., 2001, Kouroumalis et al., 2005, Petrai et al., 2008, Shahabuddin et al., 2006, Smit et al., 2003). This correlates with the ability of CXCR3 to induce invasion and cell survival, compatible with a role in metastasis (Datta et al., 2010).

Receptor internalization and trafficking are essential for controlling the magnitude and duration of cell signaling by removing receptors from the plasma membrane. Internalization of receptors limits receptor availability at the cell surface, and thus ligand binding. When receptors reach endosomes, they can be sorted directed into the recycling pathway which contributes to resensitization of receptor signaling or targeting into the degradative pathway. Diverse mechanisms of endocytosis have been reported for GPCR (Wolfe and Trejo, 2007). For CXCR3, most of the studies have been performed in T lymphocytes. The chemokine system is rather complex in these cells, as ligands of CXCR3 can preferentially activate distinct internalization pathways (Colvin et al., 2004). Meiser et al. have described in detail endocytosis of CXCR3 in T lymphocytes after CXCL11 stimulation (Meiser et al., 2008). They showed that CXCR3 is rapidly down-regulated and that CXCR3 can be internalized independently of clathrin, β-arrestin 1 and β-arrestin 2. CXCR3 is directed into the degradative pathway, mediated in part by lysosomes and proteosome, leading to long-term attenuation of signaling. Cell surface replenishment of CXCR3 occurred over several hours and is dependent upon *de novo* CXCR3 synthesis. This is in stark contrast with our study. Plasma membrane localization and beginning of internalization of CXCR3-A were observed after short-term stimulation (15 min with the CXCR3 agonist), and complete internalization with cytoplasmic localization of CXCR3-A was observed after long-term stimulation (60min with CXCR3 agonist). Our results demonstrate that β-arrestin 1 and β-arrestin 2 are recruited just 15 min after agonist stimulation. CXCR3-A is rapidly internalized via clathrin-coated vesicles enriched with LRP1, and it is then recycled to the cell surface using the retrograde trafficking from endosomes to the trans-Golgi network. A similar recycling mechanism has already been described for GPCR β1-adrenergic and GLUT4 receptors (ajouter ref GLUT4) (Koliwer et al., 2015, Shewan et al. 2002). We can only speculate about the reasons for these differences. Our study investigates CXCR3-kinetics in tumor cells and not immune cells. Furthermore, the difference may reside in the ligands used in both studies. Our contention is supported by Luker et al. who

showed that, in breast cancer cells, GPCR CXCR7 trafficking is regulated by β-arrestin 2 and that internalization is clathrin-dependent. He further demonstrated that CXCR7 is recycled to the cell membrane (Luker et al., 2010). CXCR7 has properties similar to those of CXCR3 in that it is known to promote tumor growth and metastasis in mammary carcinoma and other malignancies. In addition, our results show that in the absence of stimulation by CXCR3 agonist, the perinuclear localization of CXCR3 is observed and colocalization with clathrin, EEA1 or syntaxin is found. These results indicate that CXCR3 is constitutively internalized and present in early endosomes and recycled back to the plasma membrane through the retrograde trafficking from endosomes to the trans-Golgi network. In fact, constitutive clathrin-dependent internalization is important for receptor homeostasis and has been already reported for other GPCR receptors, including PAR-1, CXCR7 and M1 muscarinic acetylcholine receptors (Luker et al., 2010, Uwada et al., 2014, Wolfe and Trejo, 2007).

The most important aspect of our study is related to the involvement of LRP1 in CXCR3 signalling, trafficking and activity. LRP1 has been reported to be involved in tumor progression, in part through the modulation of the extracellular tumor environment (Lambert et al., 2009, Montel et al., 2007, Van Gool et al., 2015). LRP1 is essential for the integrity of the vascular wall through its capacity to regulate PDGFRβ-dependent activation of PI3K (Boucher et al., 2003, Zhou et al., 2009). It is, furthermore, critically involved in invasion and neovascularization, processes which drive tumor progression and metastasis (Montel et al., 2007). LRP1 expression was detected in glioblastoma and to a lesser extent in lower grade astrocytomas (Baum et al., 1998, Yamamoto et al., 1997). In addition, LRP1 has been shown to mediate endothelial and megakaryocyte cells responses to the CXC chemokine (CXCL4, Lambert et al. 2009) and to modulate the GPCR sphingosine-1-phosphate (S1P) signaling without interacting with S1P receptors but by restraining the activation of Gαi subunit (Nakajima et al., 2014). We clearly demonstrate in this study that LRP1 is critically involved in CXCR3 trafficking and activation which is an entirely new finding for a classical CXC receptor. LRP1 functions in endocytosis and intracellular signaling for a variety of structurally diverse ligands, including both extracellular proteins and membrane receptors (Gonias et al., 2011, Muratoglu et al., 2010, Shi et al., 2009, Zhou et al., 2009). In our study, we provide strong arguments for a physical interaction between CXCR3 and LRP1 that is of general significance. This is based on the following: (1) the complex is co-immunoprecipitated in CXCR3/LRP1 expressing cells (2) the complex is present not only in tumor cells, but also in non-transformed cells such smooth muscle cells which have an important role in vessel maintenance and integrity, (3) high resolution imaging demonstrate a close spatial proximity between CXCR3 and LRP1.

The interaction between CXCR3 and LRP1 is inhibited using the LRP1-specific chaperone, receptor-associated protein (RAP). This indicates that CXCR3 mainly interacts with the large extracellular α chain of LRP1, known to bind to various other ligands such as CD44, TIMP-1 (Perrot et al., 2012, Thevenard et al., 2014). The α chain of LRP1 is composed of four extracellular ligand-binding domains named domains I to IV, each containing a cluster of cystein-rich complement-type repeats. We addressed CXCR3 interaction with vectors encoding for extracellular ligand-binding domains of LRP-1 and especially vectors encoding for the extracellular binding-domain IV (mini-LRPIV), as most of LRP-1 ligands bind to this domain (Perrot G et al. 2012). We clearly demonstrate that the extracellular ligand-binding domain IV of LRP1 interacts with CXCR3-A. To investigate the role of LRP1 in CXCR3 conformational dynamics, trafficking and function, we knocked-down or functionally silenced LRP1 using the potent CXCR3 inhibitor, RAP. Knock-down of LRP1 leads to a considerable increase in the magnitude (more than two-fold) of the ligand-induced receptor conformational change and an increase in receptor population at the level of the membrane. Moreover the ratio of the spectral shifts obtained with p- and s-pol (correlated with receptor anisotropy) is quite different when LRP1 was knock-down, suggesting different ligand-induced receptor conformational changes.

Our results showed that silencing of LRP1 induces a defect in CXCR3 internalization. CXCR3 remains at the cell membrane, which results in a sustained increase in calcium flux after agonist stimulation as well as a marked increase of phospho-Erk1 and phospho-Erk2 after 60 minutes of stimulation. In addition, LRP1 knock-down or functional silencing increases further cell migration of glioma cells.

CXCR3 and LRP1 are expressed in low grade and high grade gliomas (Sun et al, 2006). These global data base-derived analyses do not take into account the regional heterogeneity of gliomas. Glioblastomas are heterogenous tumors and are characterized by pronounced angiogenesis and tumor cell infiltration. Global analysis of the tumor transcriptome cannot evidence regional changes in expression that reflect tumor heterogeneity. We clearly show regional heterogeneity in glioblastoma when various areas from the angiogenic core and the infiltrative zone are analyzed. While CXCR3 is expressed in both, angiogenic and infiltrative areas, LRP1 expression is totally shut-down in infiltrative zones of the tumor. Most importantly, CXCR3 is localized in the infiltrative areas at the tumor cell membrane, while in angiogenic parts of the tumor CXCR3 is mostly found at an intracellular location. This is in full agreement with our *in vitro* mechanistical studies.

Taken together, we provide in this article a number of solid arguments for a regulatory role of LRP1 in CXCR3 function. This constitutes the first description of a regulatory role of LRP1 for a classical CXC chemokine receptor. Our findings may also be of importance for glioma pathobiology. Indeed, glioblastoma multiforme (GBM) is the most malignant and lethal type of

glioma. It has a highly invasive behavior and high recurrence rate because of cells infiltrating the adjacent tissues during the evolution of the disease (Louis et al., 2007). Thus, our finding may not only enrich our knowledge of chemokine biology but also suggest strategy for therapeutic intervention.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and antibodies

CXCR3 agonist (PS372424) and recombinant human CXCL10 (300-12) were purchased from Calbiochem and Peprotech, respectively. CXCR3 antagonist (SCH546738) was a kind gift of Dr. Sebastien Lecommandoux (LCPO, Bordeaux, France). Clathrin inhibitor Pitstop®2, mouse monoclonal antibody against CXCR3 [2ar1] (ab64714), mouse monoclonal antibody against CXCR3 [1C6] (ab125255), rabbit polyclonal antibody against CXCR3 (ab77907), rabbit monoclonal antibody against CXCR3 (ab154845), mouse monoclonal antibody against LRP1 [5a6] (ab28320) and mouse monoclonal antibody against LRP1 [8G1] (ab20384) were purchased from AbCam. Rabbit monoclonal antibody against LRP1 (2703-1) was purchased from Epitomics. Mouse monoclonal antibody against GFP [B-2] (sc-9996) was purchased from Santa Cruz Biotechnology. Purified Mouse Anti- β-Arrestin Clone 10/β-Arrestin1 (RUO) was purchased from BD Bioscience (610550). Vesicle Trafficking Antibody Sampler Kit (9765), endosomal Marker Antibody Sampler Kit (12666), PathScan Multiplex Western Cocktail I (5301S) and rabbit primary antibody against total p42/p44 MAPK (9102) were purchased from Cell Signaling Technology. Mouse monoclonal antibody against vinculin (V9131) was purchased from Sigma-Aldrich.

Recombinant CXCL4L1 Expression and Purification

CXCL4L1 was expressed in Escherichia coli BL21 (DE3) harboring an expression plasmid, pET-43.1a-CXCL4L1. Cells were cultured in LB media with 100 μg/ml ampicillin at 37°C and subsequently induced by 1 mM isopropyl-thio-β-galactopyranoside (IPTG) for 4 hours. Cells were harvested by centrifugation, stored at -20°C and resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 100 mM NaCl), followed by sonication. After centrifugation, the pellet of recombinant CXCL4L1 was resuspended in lysis buffer containing 0.8% (v/v) Triton X-100 and 0.8% sodium deoxycholate with stirring for 20 min at room temperature, followed by centrifugation. This process was repeated three times. The final pellet was dissolved in denaturation buffer (6 M guanidinium hydrochloride, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, and 5 mM β-mercaptoethanol) and stirred 2 h at room temperature. The denatured CXCL4L1 was dialyzed with refolding buffer (0.9 M guanidinium chloride, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 500 mM NaCl, 5 mM freshly added cysteine and methionine) at 4°C for 6 h. The refolding buffer was replaced by the binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4 and 500 mM NaCl). Precipitate of protein solution was removed by

centrifugation. The protein solution containing folded CXCL4L1 was subjected to a heparin high-performance affinity column (ÄKTA FPLC system, GE Healthcare) equilibrated with binding buffer. Bound CXCL4L1 was eluted in 1M NaCl and injected into a Superdex 75 HR 10/300 column (ÄKTA FPLC system) in 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, 150 mM NaCl. The eluted CXCL4L1 was further purified by HPLC system (Beckman Coulter Inc.) using a C18 reverse phase column (Phenomenex Inc.). The purified CXCL4L1 was lyophilized and kept frozen at -80°C.

Construction of CXCR3 expression plasmids

The coding regions of human CXCR3A cDNA were cloned in two consecutive steps. Human CXCR3-A cDNA fragments were amplified by PCR (forward primer: aaaacggtaccatggtccttg and reverse primer: aaaaggatcccaagcccgagt) from pEGFPN2-CXCR3-A (a kind gift of Dr. Alexandre Dubrac, Yale University, New Haven, USA). The CXCR3-A amplicons of 1125 bp were subcloned into the pCDNA3.1+ vector (Amersham Biosciences). Purified PCR products were digested with BamHI and KpnI restriction enzymes and inserted into the pCDNA3.1+ vector. Sequences of the plasmids were confirmed by DNA sequencing.

Cell culture and transfection

Human Embryonic Kidney (HEK-293) cell line and glioma cell lines (U87, U118, U251, U373, NHATS, NHATSR, T98G) were regularly tested for contamination and were all mycoplasma-free. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS), 5% antibiotics (Penicillin and Streptavidin) and 5% L-glutamine. Patient-derived cell lines were cultured as spheroids in Neurobasal Medium (NBM, Thermo Fisher Scientific) supplemented with 0.2% heparin and 0.02% basic fibroblast growth factors. All cells were grown at 37°C, 5% CO_2 and split at 70%-90% of confluence with 0.25% Trypsin. Cell transfection was performed using Effecten kit (Qiagen) according to the manufacter's instruction. Control U87 (stably transfected with empty pCDNA3.1 vectors) and U87-CXCR3A cells (stably transfected with pCDNA3.1+CXCR3-A vectors) were grown in the presence of G418 antibiotics (500 µg/ml). Control HEK-293 (stably transfected with empty pEGFPN2 vectors) and HEK-293-CXCR3A cells (stably transfected with pEGFPN2+CXCR3-A vectors) were grown in the presence of Zeocin (200µg/ml). Control HEK293 and HEK-293-CXCR3A, both stably transfected with HA-miniLRPIV, were grown in the presence of Zeocin (200µg/ml) and G418 (750µg/ml).

CAM Assays

Fertilized chicken eggs (*Gallus gallus)* were incubated at 37°C and 65% humidified atmosphere and submitted to a rotation of 25° every 4 hours during 3 days. On day 3 of development, a window was made in the eggshell and sealed with Durapore tape. On day 10, plastic rings (made from Nunc Thermanox coverslips) were put on the CAM. 3 millions of U87-CTRL or

U87-CXCR3A cells were deposited as a thin layer on the surface of the CAM, inside the plastic ring, after gentle laceration of the surface. On day 17, the CAMs were fixed *in vivo* with 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. The area containing the ring was cut out and included in OCT (Optimal Cutting Temperature compound) or directly frozed in liquid nitrogen, for further analysis.

Gene expression analysis

Total RNA was isolated from cells using Trizol reagent (Invitrogen) according to the manufacter's instruction. 1µg of total RNA was reverse-transcribed into cDNA using the high-capacity cDNA reverse transcription kit (AbCam 4368814). The resulting cDNAs were amplified using specific primers for the genes of interest (see Table 1). GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), and HPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, Fisher Scientist, Hs99999909_m1) were used as internal controls. We applied the real-time PCR method using the FG, POWER SYBR GREEN PCR (Fisher Scientist, 10658255) for CXCR3-A: forward sequence CCATGGTCCTTGAGGTGAGTG and reverse sequence AGCTGAAGTTCTCCAGGAGGG, for MMP2: forward sequence CCGTCCCCATCATCAA and reverse sequence: AGGTATTGCACTGCCAACTCTTT, and for uPA: forward sequence CTTAACTCCAACACGCAAGGGG and reverse sequence: AGCTTGTGCCAAACTGGGGATC. TAQMAN UNIV PCR MASTER MIX (Fisher 10157154) was used for CXCR3-B: probe sequence (6FAM)CCCGTTCCCGCCCTCACAGG, forward sequence TGCCAGGCCTTTACACAGC and reverse sequence TCGGCGTCATTTAGCACTTG. Real-time PCR reactions were performed on a StepOnePlus Real-Time PCR system using StepOne software V2.3 (Applied Biosystems).

Western Blot and immunoprecipitation analysis

Cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and dissolved in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 1%TritonX-100, 1mM EDTA supplemented with protease and phosphatase inhibitors cocktails (Roche). Protein concentration was quantified by Bradford assay (Euromedex). Cell lysates were resuspended in Laemmli Buffer (62.5 mM Tris pH6.8, 10% glycerol, 2.5% SDS, 2.5% β-mercapto-ethanol), boiled for 5 minutes and resolved by SDS–PAGE. For immunoprecipitation, 500 µg of precleared cell lysate was incubated with 5 µg/ml LRP1, 5 µg/ml CXCR3 antibodies or 5 µg/ml of control IgG overnight at 4°C, and then with protein G-Sepharose (Amersham) for 2 h at 4°C. For both immunoprecipitations, the immunocomplexes were then washed three times in lysis buffer and twice in PBS. For western-blot, 50µg of protein cell lysate were used for each conditions. Allsamples were boiled in 4× sample buffer, subjected to electrophoresis and transferred. Proteins were electroblotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Fisher Scientist, 10344661). Membranes were

incubated with blocking buffer (EuroBio 927-40003) for 1h, probed overnight at 4°C with the primary antibodies of interest, followed by detection using secondary antibodies coupled to Fluoroprobes (goat anti rabbit IR Dye 680CW, 926-68021; goat anti rabbit IR Dye 800CW, 926-32211; goat anti mouse IR Dye 680CW, 926-68020; goat anti mouse IR Dye 800CW, 926-32210 or goat anti rat IR Dye 800CW, 926-32219) and Odyssey infrared imaging system (Li-Cor Biosciences, Nebraska, US). Densitometry analysis was performed using Image Studio Lite 4.0 software.

Plasmon waveguide resonance (PWR)

PWR measurements were performed in a homemade instrument equiped with a He-Ne laser with a fixed wavelenght in the visible region (λ = 632 nm; Melles Griot), a rotating table allowing the incident angle to be changed by steps ≤ 1 mdeg (thus resolution being on that order; Newport) and a photodiode detector (Hamamatsu) to measure the reflected light as a function of the incident angle. The polarisation angle of the incident beam is placed at 45° allowing both *p*- and *s*-polarized spectra to be obtained within the same angular scan. The sensor consisted in a BK-7 prism coated with silver and silica (to support waveguide modes) (Harte et al., 2014). All measurements were performed at 22°C in a temperature controlled room. The instrument allows molecular interactions to be analysed in terms of affinity (from pM to mM), kinetics (down to msec) and anisotropy (when the systems is anisoptropic and oriented as is the case of lipids and membrane proteins). More details about this technology can be found in Harte et al. Publication (Harte et al., 2014).

The protocol for adhesion of cell fragments on silica (glass slides or PWR sensor) was adapted from reported work from Vogel and collaborators (Perez et al., 20116). Briefly, the silica surface was washed with Ethanol and cleaned and activated by Plasma cleaner for 2 min (Diener). The silica surfaces are then incubated with a solution of polylysine (0.1 mg/mL) for 40 minutes following wash with PBS buffer. Cells grown to less than 50% confluence are washed with PBS and covered with water to induce osmotic swelling of the cells. Imediately, the glass coverslip of the sensor is placed directly on top of cells. Pressure is applied for about 2 min on the glas slide or prism to induce cell rupture and caption of cell fragments. After that they are removed ripping off cell fragments containing speciallythe upper membrane. The glass slide or sensor is washed with PBS to remove cell debris and kept with buffer to prevent drying and loss of membrane protein activity. PWR measurements are performed right away. The PWR cell sample (a teflon block with a volume capacity of 250 µL) is placed in contact with the prism and filled with PBS. Followiong stabilisation of the signal (no changes in the resonance minimum position with time), the ligand is added in a incremental fashion to this chamber and specral shifts followed with time. Ligand affinity to the receptor present in the cell membrane fragments is calculated by ploting the shifts in the resonance minimum position as a

function of ligand concentration and fitting using an hyperbolic function that describes ligand binding to a protein (single site) (Graph Pad Prism).

Small interfering RNA knockdown experiments

For inhibition of CXCR3 and LRP1 expression, cells were transiently transfected with annealed siRNA. CXCR3 and LRP1 specific siRNAs were used (ON-TARGETplus Human CXCR3 (2833) and ON-TARGETplus Human LRP1 (4035), GE Healthcare Europe GmbH, Dharmacon). A siRNA-random (siRNA CTRL, SR-CL000-005) used as a negative control and two others siRNAs against human LRP1 were synthesized by Eurogentec (Angers, France). The LRP1-specific sense and antisense RNA oligonucleotides were as follows: 1/ sense siRNA, GCAGUUUGCCUGCAGAGAUtt and antisense siRNA, AUCUCUGCAGGCAAACUGCtt and 2/ sense SiRNA AUGCUGACCCCGCCGUUGCtt and antisense siRNA GCAACGGCGGGGUCAGCAUtt. Transfection was performed using lipofectamine RNAimax kit (Fisher 10601435) in accordance with the manufacturer's protocol, with siRNA at a final concentration of 20 nM in media without antibiotics. After transfection, cells were washed with PBS and fresh complete media was added for 48h.

Indirect immunofluorescence staining

Cells were seeded on glass coverslips and fixed 10 minutes with 4% paraformaldehyde at room temperature. Cells were permeabilized 10 minutes with 0.1% TritonX-100, washed with PBS and incubated for 1 h with blocking buffer (PBS containing 2% FBS and 1% BSA) at room temperature. Cells were incubated with primary antibodies diluted in blocking buffer overnight at 4°C, washed with PBS, and incubated with secondary antibodies diluted in blocking buffer (Interchim, FluoProbes® 488H, 547H or 647H Goat or Donkey Anti-Mouse, Rabbit or Goat IgG (H+L)). Dapi was used as counterstained agent to label nuclei (Fisher Scientist, 10374168). Coverslips were mounted using Prolong Gold antifade reagent (Fisher Scientist, 11559306). For STED microscopy staining, secondary antibody (STAR 580 and ATTO 647N) were a kind gift from the Bordeaux Imaging Center (BIC).

Confocal and STED microscopy

Confocal images were acquired with a Nikon Eclipse Ti inverted laser scanning fluorescence microscope equipped with acquisition software (NIS-Element, NIS) and x63 oil immersion objective (numerical aperture [NA], 1.4). Triple or quadruple imaging were obtained using selective laser excitation (405, 488, 547 or 647nm). Each channel was imaged sequentially before merging. Z-stack images were taken at sequential 1µm depth slices and 3D representation were performed on NIS-Element software. STED images were acquired in the BIC institute with a Leica SP8-STED microscope equipped with LAS-AF software and with x100 oil immersion objective. The depletion laser were used at 775nm. Plot

profile analysis were performed on ImageJ software.

Flow cytometry analysis

Cells were washed 3 times with PBS 5% BSA and labeled in suspension with R-phycoerythrin (PE) Mouse anti-human CD183 (BD Pharmingen, 557185) or PE Mouse IgG1, Isotype Control (BD Pharmingen, 555749) for 20min at 4°C. Cells were then washed 3 times with PBS 5% BSA and analyzed on an AccuriC6 flow cytometer with BD AccuriC6 software (BD, San Jose, CA) as recommended to the manufacter's instruction. A minimum of 10000 events was recorded per sample.

Calcium measurement

Intracellular calcium concentration was measured using Calcium Assay Kit (BD 640176) according to the manufacter's procedure. In brief, cells were placed in suspension and 1X Dye loading solution was added for 20min at 37°C. Calcium concentration was then recorded for 5min on the AccuriC6 flow cytometer. CXCR3 agonist stimulation was performed after 2min of recording and intracellular calcium increase was visualized. Calcium concentration after stimulation was normalized by calcium concentration before stimulation. Cells without 1X dye loading solution were used as a negative control in order to quantify the background level.

Migration assays

Migration assays were performed on transparent Polyethylene Terephthalate (PET) membrane 8.0 µm pore size (Dutscher 353097). 25000 cells were seeded on the top part of the membrane and CXCR3 agonist (100ng/ml) was added below in the well in serum-free medium. For migration experiments using RAP (Receptor-Associated Protein, potent inhibitor of LRP1), cells were stimulated 24h with RAP (5µM) and then seeded in the top part of the membrane with CXCR3 agonist (100ng/ml) and RAP (5µM). For migration experiments using siRNA for LRP1, a CXCR3 agonist gradient was performed with 100ng/ml on top part of the membrane and 500 ng/ml below in the well. After 6h, cells were fixed 10 minutes with 30% Acetic acid and 40% methanol and then stained 15 minutes with 40% methanol, 30% acetic acid and 0.5% coomassie blue. Cells which migrated through the membrane were then counted with an inverted epifluorescence microscope (Nikon Eclipse TE200, Obj 10x).

Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5 software. Multiple comparisons were performed with one-way analysis of variance, followed by Tukey post hoc tests. Pearson's analyses were performed directly on NIS-Element AR 64-Bit software. Statistical comparison between two groups was performed by using the Mann-Withney test.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Alexandre Dubrac (Yale University, New Haven, USA) for the kind gift of pEGFPN2-CXCR3-A, Christel Poujol and the Bordeaux Imaging Center (University of Bordeaux, Bordeaux, France) for STED acquisition and interpretation of data, Pr. Stéphane Dedieu (UMR CNRS 7369 MEDyC, Reims, France) for the kind gift of the mini-LRPIV (plasmid encoding for the domain IV of the extracellular part of LRP1) and Pr. Dudley Strickland (University of Maryland, Baltimore, USA) for the kind gift of goat monoclonal antibody against LRP1. We would like to thank Dr. Laura Salabert (Inserm U1029, LAMC, Bordeaux, France) for gift and culture of glioma patient-derived cell lines and Mitchell Kramer and Kenza Rhalies for qPCR experiment on CAM experiments.

Competing interests

No competing interests declared.

Author contributions

K.B., N.P., M.C., I.A, Y-P.C., T.B. and C.B. contributed to *in vitro* experiments. I.A. contributed to PWR experiments and T.B. to *in vitro* glioma patient-derived cells generation. L.B. and M.R contributed to the obtention of glioma patient tissue samples. K.B., N.P., I.A and C.B. contributed to analysis and interpretation of data. C.B. and A.B. contributed to the design of research and wrote the paper. K.B. contributed to the conception of the figures. S-C.S. revised it critically for important intellectual content.

Funding

K.B. is a recipient of MRT (Ministere de la Recherche des Sciences et Techniques) PhD Fellowship. Work from the laboratory was supported by the National Institute of Cancer (INCA, PLBIO11-091, "Chemokines and Angiogenesis" 2012-2015), the Ligue contre le Cancer ("CXCR3 chemokines: structure and function" 2013-2016) and the Conseil Regional d'Aquitaine.

References

BAUM, L., DONG, Z. Y., CHOY, K. W., PANG, C. P. & NG, H. K. 1998. Low density lipoprotein receptor related protein gene amplification and 766T polymorphism in astrocytomas. *Neurosci Lett,* 256, 5-8.

BELLO, L., GIUSSANI, C., CARRABBA, G., PLUDERI, M., COSTA, F. & BIKFALVI, A. 2004. Angiogenesis and invasion in gliomas. *Cancer Treat Res,* 117, 263-84.

BELPERIO, J. A., KEANE, M. P., ARENBERG, D. A., ADDISON, C. L., EHLERT, J. E., BURDICK, M. D. & STRIETER, R. M. 2000. CXC chemokines in angiogenesis. *J Leukoc Biol,* 68, 1-8.

BILLOTTET, C., QUEMENER, C. & BIKFALVI, A. 2013. CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis. *Biochim Biophys Acta,* 1836, 287-95.

BONACCHI, A., ROMAGNANI, P., ROMANELLI, R. G., EFSEN, E., ANNUNZIATO, F., LASAGNI, L., FRANCALANCI, M., SERIO, M., LAFFI, G., PINZANI, M., GENTILINI, P. & MARRA, F. 2001. Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. *J Biol Chem,* 276, 9945-54.

BOUCHER, P., GOTTHARDT, M., LI, W. P., ANDERSON, R. G. & HERZ, J. 2003. LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. *Science,* 300, 329-32.

BU, G., GEUZE, H. J., STROUS, G. J. & SCHWARTZ, A. L. 1995. 39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein. *EMBO J,* 14, 2269-80.

COLVIN, R. A., CAMPANELLA, G. S., SUN, J. & LUSTER, A. D. 2004. Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. *J Biol Chem,* 279, 30219-27.

DATTA, D., BANERJEE, P., GASSER, M., WAAGA-GASSER, A. M. & PAL, S. 2010. CXCR3-B can mediate growth-inhibitory signals in human renal cancer cells by down-regulating the expression of heme oxygenase-1. *J Biol Chem,* 285, 36842-8.

GAULTIER, A., SIMON, G., NIESSEN, S., DIX, M., TAKIMOTO, S., CRAVATT, B. F., 3RD & GONIAS, S. L. 2010. LDL receptor-related protein 1 regulates the abundance of diverse cell-signaling proteins in the plasma membrane proteome. *J Proteome Res,* 9, 6689-95.

GONIAS, S. L., GAULTIER, A. & JO, M. 2011. Regulation of the urokinase receptor (uPAR) by LDL receptor-related protein-1 (LRP1). *Curr Pharm Des,* 17, 1962-9.

GOPAL, U., BOHONOWYCH, J. E., LEMA-TOME, C., LIU, A., GARRETT-MAYER, E., WANG, B. & ISAACS, J. S. 2011. A novel extracellular Hsp90 mediated co-receptor function for LRP1 regulates EphA2 dependent glioblastoma cell invasion. *PLoS One,* 6, e17649.

GROOM, J. R. & LUSTER, A. D. 2011. CXCR3 in T cell function. *Exp Cell Res,* 317, 620-31.

GRUENBERG, J. 2001. The endocytic pathway: a mosaic of domains. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 2, 721-30.

HU, M., LI, K., MASKEY, N., XU, Z., YU, F., PENG, C., LI, Y. & YANG, G. 2015. Overexpression of the chemokine receptor CXCR3 and its correlation with favorable prognosis in gastric cancer. *Hum Pathol,* 46, 1872-80.

KOLIWER, J., PARK, M., BAUCH, C., VON ZASTROW, M. & KREIENKAMP, H. J. 2015. The golgi-associated PDZ domain protein PIST/GOPC stabilizes the beta1-adrenergic receptor in intracellular compartments after internalization. *J Biol Chem,* 290, 6120-9.

KOUROUMALIS, A., NIBBS, R. J., APTEL, H., WRIGHT, K. L., KOLIOS, G. & WARD, S. G. 2005. The chemokines CXCL9, CXCL10, and CXCL11 differentially stimulate G alpha i-independent signaling and actin responses in human intestinal myofibroblasts. *J Immunol,* 175, 5403-11.

LAMBERT, M. P., WANG, Y., BDEIR, K. H., NGUYEN, Y., KOWALSKA, M. A. & PONCZ, M. 2009. Platelet factor 4 regulates megakaryopoiesis through low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) on megakaryocytes. *Blood,* 114, 2290-8.

LASAGNI, L., FRANCALANCI, M., ANNUNZIATO, F., LAZZERI, E., GIANNINI, S., COSMI, L., SAGRINATI, C., MAZZINGHI, B., ORLANDO, C., MAGGI, E., MARRA, F., ROMAGNANI, S., SERIO, M. & ROMAGNANI, P. 2003. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J Exp Med,* 197, 1537-49.

LILLIS, A. P., MIKHAILENKO, I. & STRICKLAND, D. K. 2005. Beyond endocytosis: LRP function in cell migration, proliferation and vascular permeability. *J Thromb Haemost,* 3, 1884-93.

LILLIS, A. P., VAN DUYN, L. B., MURPHY-ULLRICH, J. E. & STRICKLAND, D. K. 2008. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions

revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev,* 88, 887-918.

LIU, C., LUO, D., REYNOLDS, B. A., MEHER, G., KATRITZKY, A. R., LU, B., GERARD, C. J., BHADHA, C. P. & HARRISON, J. K. 2011. Chemokine receptor CXCR3 promotes growth of glioma. *Carcinogenesis,* 32, 129-37.

LOUIS, D. N., OHGAKI, H., WIESTLER, O. D., CAVENEE, W. K., BURGER, P. C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B. W. & KLEIHUES, P. 2007. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol,* 114, 97-109.

LUKER, K. E., STEELE, J. M., MIHALKO, L. A., RAY, P. & LUKER, G. D. 2010. Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene,* 29, 4599-610.

MA, X., NORSWORTHY, K., KUNDU, N., RODGERS, W. H., GIMOTTY, P. A., GOLOUBEVA, O., LIPSKY, M., LI, Y., HOLT, D. & FULTON, A. 2009. CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model. *Mol Cancer Ther,* 8, 490-8.

MARU, S. V., HOLLOWAY, K. A., FLYNN, G., LANCASHIRE, C. L., LOUGHLIN, A. J., MALE, D. K. & ROMERO, I. A. 2008. Chemokine production and chemokine receptor expression by human glioma cells: role of CXCL10 in tumour cell proliferation. *J Neuroimmunol,* 199, 35-45.

MEISER, A., MUELLER, A., WISE, E. L., MCDONAGH, E. M., PETIT, S. J., SARAN, N., CLARK, P. C., WILLIAMS, T. J. & PEASE, J. E. 2008. The chemokine receptor CXCR3 is degraded following internalization and is replenished at the cell surface by de novo synthesis of receptor. *J Immunol,* 180, 6713-24.

MONTEL, V., GAULTIER, A., LESTER, R. D., CAMPANA, W. M. & GONIAS, S. L. 2007. The low-density lipoprotein receptor-related protein regulates cancer cell survival and metastasis development. *Cancer Res,* 67, 9817-24.

MOORE, B. B., ARENBERG, D. A., ADDISON, C. L., KEANE, M. P., POLVERINI, P. J. & STRIETER, R. M. 1998. CXC chemokines mechanism of action in regulating tumor angiogenesis. *Angiogenesis,* 2, 123-34.

MURAKAMI, T., KAWADA, K., IWAMOTO, M., AKAGAMI, M., HIDA, K., NAKANISHI, Y., KANDA, K., KAWADA, M., SENO, H., TAKETO, M. M. & SAKAI, Y. 2013. The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis. *Int J Cancer,* 132, 276-87.

MURATOGLU, S. C., MIKHAILENKO, I., NEWTON, C., MIGLIORINI, M. & STRICKLAND, D. K. 2010. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) forms a signaling complex with platelet-derived growth factor receptor-beta in endosomes and regulates activation of the MAPK pathway. *J Biol Chem,* 285, 14308-17.

NAKAJIMA, C., HAFFNER, P., GOERKE, S. M., ZURHOVE, K., ADELMANN, G., FROTSCHER, M., HERZ, J., BOCK, H. H. & MAY, P. 2014. The lipoprotein receptor LRP1 modulates sphingosine-1-phosphate signaling and is essential for vascular development. *Development,* 141, 4513-25.

PETRAI, I., ROMBOUTS, K., LASAGNI, L., ANNUNZIATO, F., COSMI, L., ROMANELLI, R. G., SAGRINATI, C., MAZZINGHI, B., PINZANI, M., ROMAGNANI, S., ROMAGNANI, P. & MARRA, F. 2008. Activation of p38(MAPK) mediates the angiostatic effect of the chemokine receptor CXCR3-B. *Int J Biochem Cell Biol,* 40, 1764-74.

PERROT, G., LANGLOIS, B., DEVY, J., JEANNE, A., VERZEAUX, I., ALMAGRO, S., SARTELET, H., HACHET, C., SCHNEIDER, C., SICK, E., DAVID, M., KHRESTCHATISKY, M., EMONARD, H., MARTINY, L., DEDIEU, S. 2012. LRP-1--CD44, a new cell surface complex regulating tumor cell adhesion. *Mol. Cell. Biol., 16, 3293-3307.*

PRADELLI, E., KARIMDJEE-SOILIHI, B., MICHIELS, J. F., RICCI, J. E., MILLET, M. A., VANDENBOS, F., SULLIVAN, T. J., COLLINS, T. L., JOHNSON, M. G., MEDINA, J. C., KLEINERMAN, E. S., SCHMID-ALLIANA, A. & SCHMID-ANTOMARCHI, H. 2009. Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs. *Int J Cancer,* 125, 2586-94.

PU, Y., LI, S., ZHANG, C., BAO, Z., YANG, Z. & SUN, L. 2015. High expression of CXCR3 is an independent prognostic factor in glioblastoma patients that promotes an invasive phenotype. *J Neurooncol,* 122, 43-51.

SHAHABUDDIN, S., JI, R., WANG, P., BRAILOIU, E., DUN, N., YANG, Y., AKSOY, M. O. & KELSEN, S. G. 2006. CXCR3 chemokine receptor-induced chemotaxis in human airway epithelial cells: role of p38 MAPK and PI3K signaling pathways. *Am J Physiol Cell Physiol,* 291, C34-9.

SHI, Y., MANTUANO, E., INOUE, G., CAMPANA, W. M. & GONIAS, S. L. 2009. Ligand binding to LRP1 transactivates Trk receptors by a Src family kinase-dependent pathway. *Sci Signal,* 2, ra18.

SMIT, M. J., VERDIJK, P., VAN DER RAAIJ-HELMER, E. M., NAVIS, M., HENSBERGEN, P. J., LEURS, R. & TENSEN, C. P. 2003. CXCR3-mediated chemotaxis of human T cells is regulated by a Gi- and phospholipase C-dependent pathway

and not via activation of MEK/p44/p42 MAPK nor Akt/PI-3 kinase. *Blood,* 102**,** 1959-65.

STRIETER, R. M., BELPERIO, J. A., PHILLIPS, R. J. & KEANE, M. P. 2004. CXC chemokines in angiogenesis of cancer. *Semin Cancer Biol,* 14**,** 195-200.

STRIETER, R. M., BURDICK, M. D., GOMPERTS, B. N., BELPERIO, J. A. & KEANE, M. P. 2005. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev,* 16**,** 593-609.

UWADA, J., YOSHIKI, H., MASUOKA, T., NISHIO, M. & MURAMATSU, I. 2014. Intracellular localization of the M1 muscarinic acetylcholine receptor through clathrin-dependent constitutive internalization is mediated by a C-terminal tryptophan-based motif. *J Cell Sci,* 127**,** 3131-40.

VAN GOOL, B., DEDIEU, S., EMONARD, H. & ROEBROEK, A. J. 2015. The Matricellular Receptor LRP1 Forms an Interface for Signaling and Endocytosis in Modulation of the Extracellular Tumor Environment. *Front Pharmacol,* 6**,** 271.

VAN RAEMDONCK, K., VAN DEN STEEN, P. E., LIEKENS, S., VAN DAMME, J. & STRUYF, S. 2015. CXCR3 ligands in disease and therapy. *Cytokine Growth Factor Rev,* 26**,** 311-27.

VANDERCAPPELLEN, J., VAN DAMME, J. & STRUYF, S. 2011. The role of the CXC chemokines platelet factor-4 (CXCL4/PF-4) and its variant (CXCL4L1/PF-4var) in inflammation, angiogenesis and cancer. *Cytokine Growth Factor Rev,* 22**,** 1-18.

WALSER, T. C., RIFAT, S., MA, X., KUNDU, N., WARD, C., GOLOUBEVA, O., JOHNSON, M. G., MEDINA, J. C., COLLINS, T. L. & FULTON, A. M. 2006. Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer. *Cancer Res,* 66**,** 7701-7.

WOLFE, B. L. & TREJO, J. 2007. Clathrin-dependent mechanisms of G protein-coupled receptor endocytosis. *Traffic,* 8**,** 462-70.

YAMAMOTO, M., IKEDA, K., OHSHIMA, K., TSUGU, H., KIMURA, H. & TOMONAGA, M. 1997. Increased expression of low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor in human malignant astrocytomas. *Cancer Res,* 57**,** 2799-805.

ZHOU, L., TAKAYAMA, Y., BOUCHER, P., TALLQUIST, M. D. & HERZ, J. 2009. LRP1 regulates architecture of the vascular wall by controlling PDGFRbeta-dependent phosphatidylinositol 3-kinase activation. *PLoS One,* 4**,** e6922.

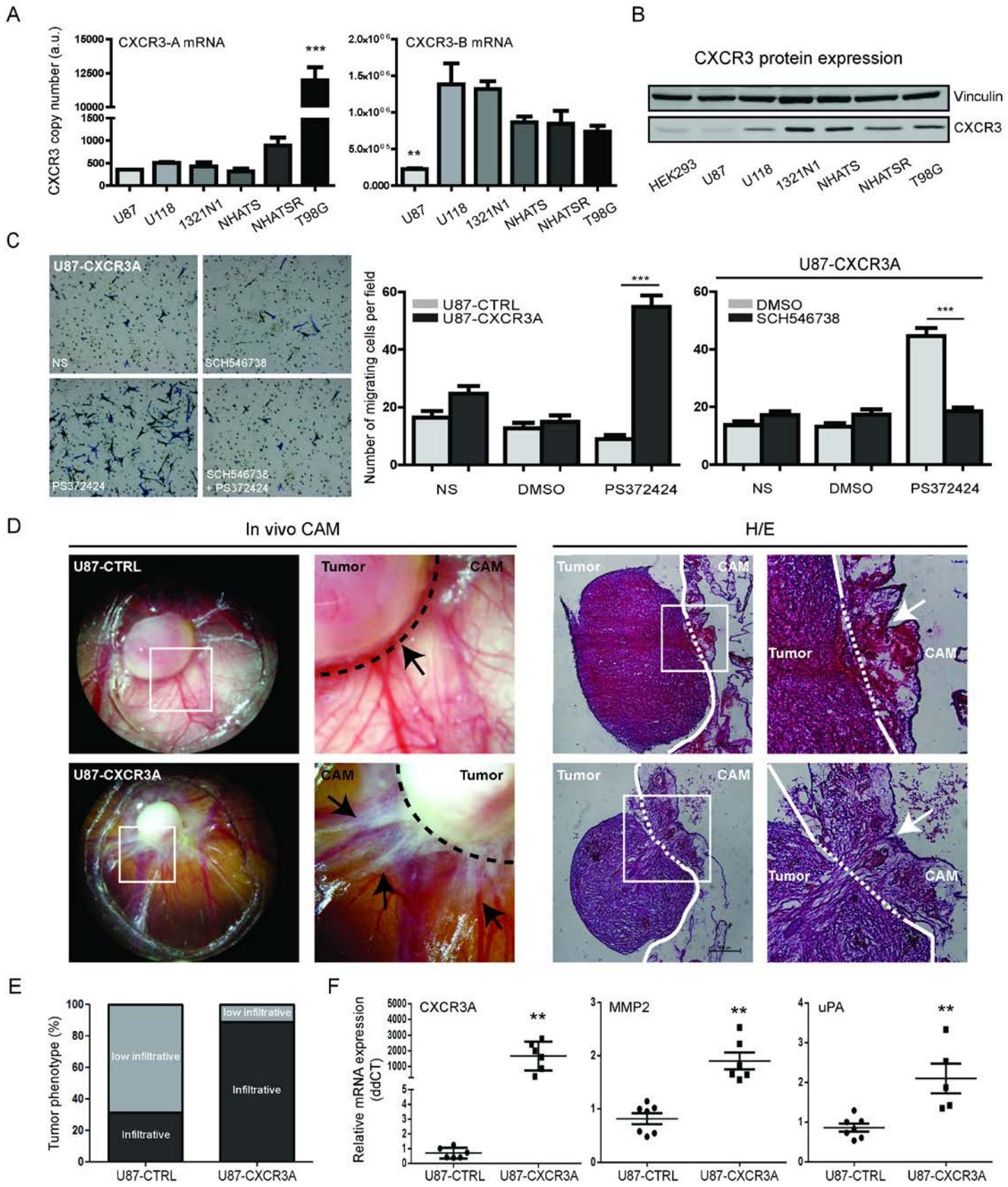
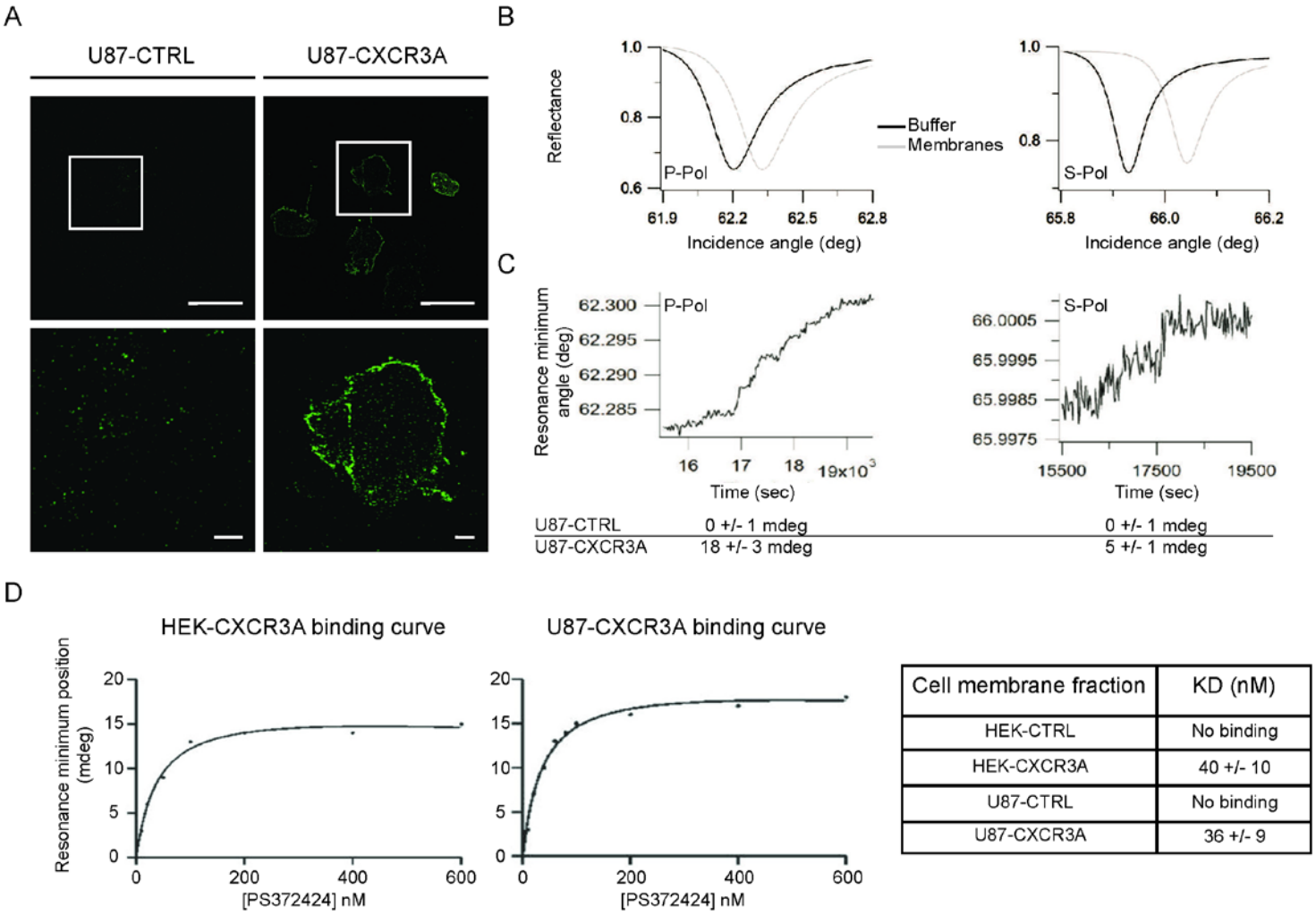

A
CXCR3-A mRNA
CXCR3 copy number (a.u.)
15000
12500
10000
1500
1000
500
0
***
U87
U118
1321N1
NHATS
NHATSR
T98G
CXCR3-B mRNA
2.0x10^06
1.5x10^06
1.0x10^06
5.0x10^05
0.000
**
B
CXCR3 protein expression
Vinculin
CXCR3
HEK293
U87
U118
1321N1
NHATS
NHATSR
T98G
C
U87-CXCR3A
NS
SCH546738
PS372424
SCH546738 + PS372424
Number of migrating cells per field
U87-CTRL
U87-CXCR3A
60
40
20
0
***
NS
DMSO
PS372424
U87-CXCR3A
DMSO
SCH546738
D
In vivo CAM
H/E
U87-CTRL
Tumor
CAM
U87-CXCR3A
E
Tumor phenotype (%)
100
80
60
40
20
0
low infiltrative
Infiltrative
U87-CTRL
U87-CXCR3A
F
Relative mRNA expression (ddCT)
CXCR3A
MMP2
uPA
5000
4000
3000
2000
1000
5
4
3
2
1
0
**
U87-CTRL
U87-CXCR3A

Figure 1: Expression and functional role of CXCR3-A both in vitro and in vivo.

(A) CXCR3 isoforms mRNA expression (copy number) in different glioma cell lines. Values were normalized to the reference gene. The results from three independent experiments were combined to calculate mean and SEM. a.u. for arbitrary unit (B) CXCR3 protein expression in HEK-293 and glioma cell lines. Vinculin was used as a loading control. (C) Migration assays performed in control U87 (U87-CTRL) and U87-CXCR3A (U87-CXCR3A). CXCR3 stimulation was performed using the CXCR3 agonist PS372424 (100 ng/ml). U87-CXCR3A cells were pretreated (1h) or not with CXCR3 antagonist SCH546738 (SCH, 2.2nM). NS: non-stimulated condition. DMSO: negative control. All the results from three independent experiments were combined to calculate mean and SEM, and values were normalized to those obtained for the control cells. *** $P<0.001$, ** $P<0.002$. (D) CAM assays were performed using U87-CTRL or U87-CXCR3A cells. Seven days after implantation, CAM images were taken (left panel) and corresponding H/E staining performed (right panel). (E) Quantification of tumor infiltrative phenotype in U87-CTRL (n=20) and U87-CXCR3A tumors (n=23). (F) Relative expression of CXCR3-A, MMP2 and uPA in U87-CTRL and U87-CXCR3A tumors were performed 7days after implantation in the CAM.



Cell membrane fraction	KD (nM)
HEK-CTRL	No binding
HEK-CXCR3A	40 +/- 10
U87-CTRL	No binding
U87-CXCR3A	36 +/- 9

Figure 2: Conformational and dynamic properties of CXCR3-A in U87-CXCR3A cells.

(A) Caption on the PWR prism of U87 cell fragments containing U87-CXCR3A. Sections were observed at 630× magnification under a confocal laser-scanning microscope (Nikon eclipse Ti) and images were acquired with the NIS Image browser software. Scale: 5µm. (B) PWR spectra for the PWR sensor before and after immobilization of the cell membrane fragments obtained with p- (left panel) and s- (right panel) polarized light. (C) Changes in the minimum resonance position following incremental addition of PS372424 to U87-CXCR3A cell fragments as a function of time obtained with p-polarized (left panel) or s-polarized (right panel) light. (D) Binding curve and KD values for PS372424 interaction with CXCR3-A in U87-CXCR3A and Hek-CXCR3A.

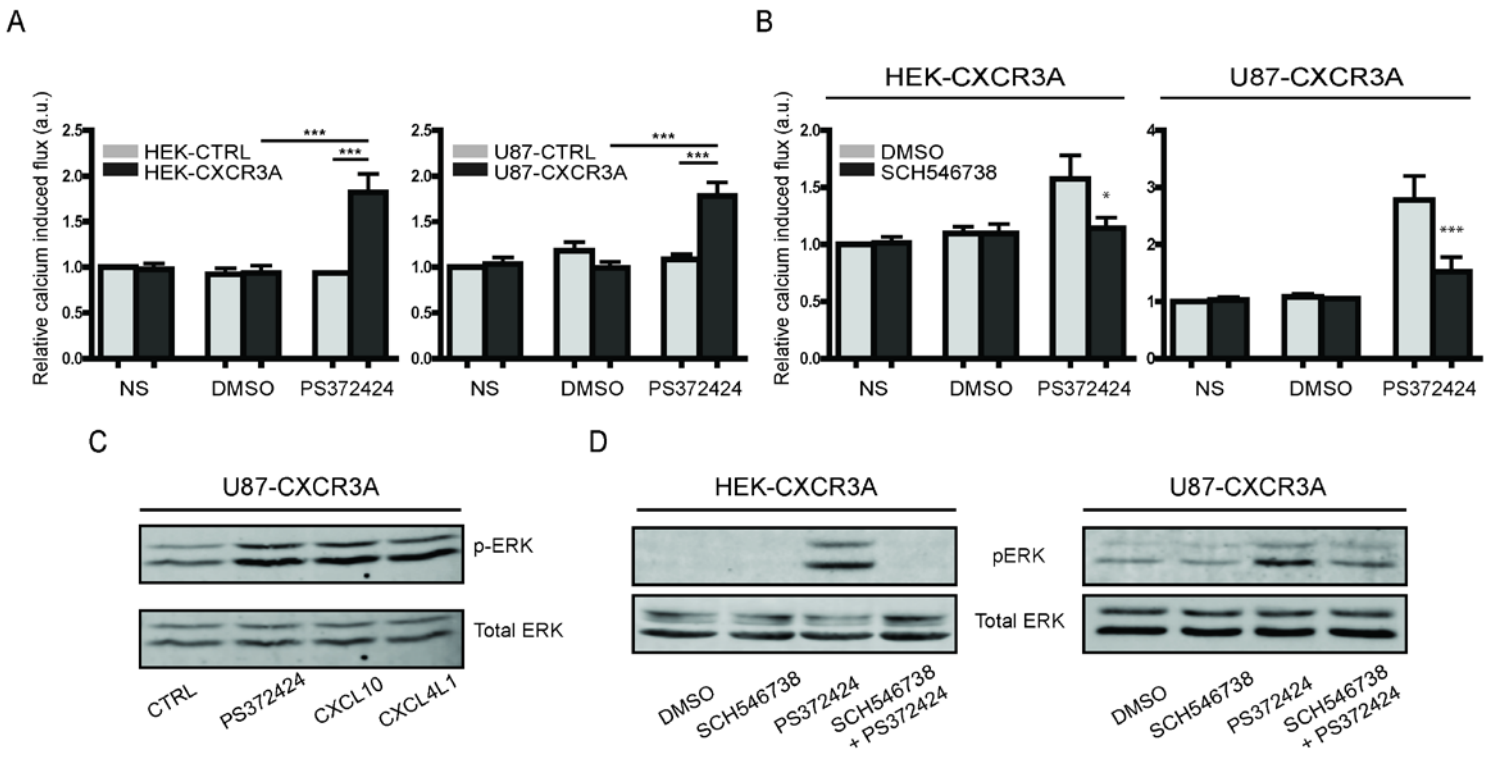


Figure 3: Activation of downstream pathways of CXCR3-A.

(A) Relative calcium-induced flux in HEK-CTRL / HEK-CXCR3A cells (left panel) and in U87-CTRL / U87-CXCR3A cells (right panel) after 20 seconds of CXCR3 agonist (PS372424) stimulation. (B) Relative calcium flux in non-stimulated and stimulated HEK-CXCR3A cells (left panel) and U87-CXCR3A cells (right panel) when cells were pretreated (1h) or not with CXCR3 antagonist (SCH546738, 2.2 nM). (C) Activation was assessed by measuring the phosphorylation level of ERK1/2 after 5minutes of stimulation with 100 ng/ml of CXCR3 agonists: PS372424, CXCL10 and CXCL4L1. (D) Activation of MAPK/ERK pathways after CXCR3 stimulation when cells were pretreated (1h) or not with CXCR3 antagonist SCH546738 (SCH, 2.2 nM). Total ERK was used as loading control. NS: non-stimulated condition, DMSO: negative control, a.u. for arbitrary unit. All the results represent three independent experiments combined to calculate mean and SEM, and values were normalized to those obtained for the control cells. *** $P<0.001$, * $P<0.005$.

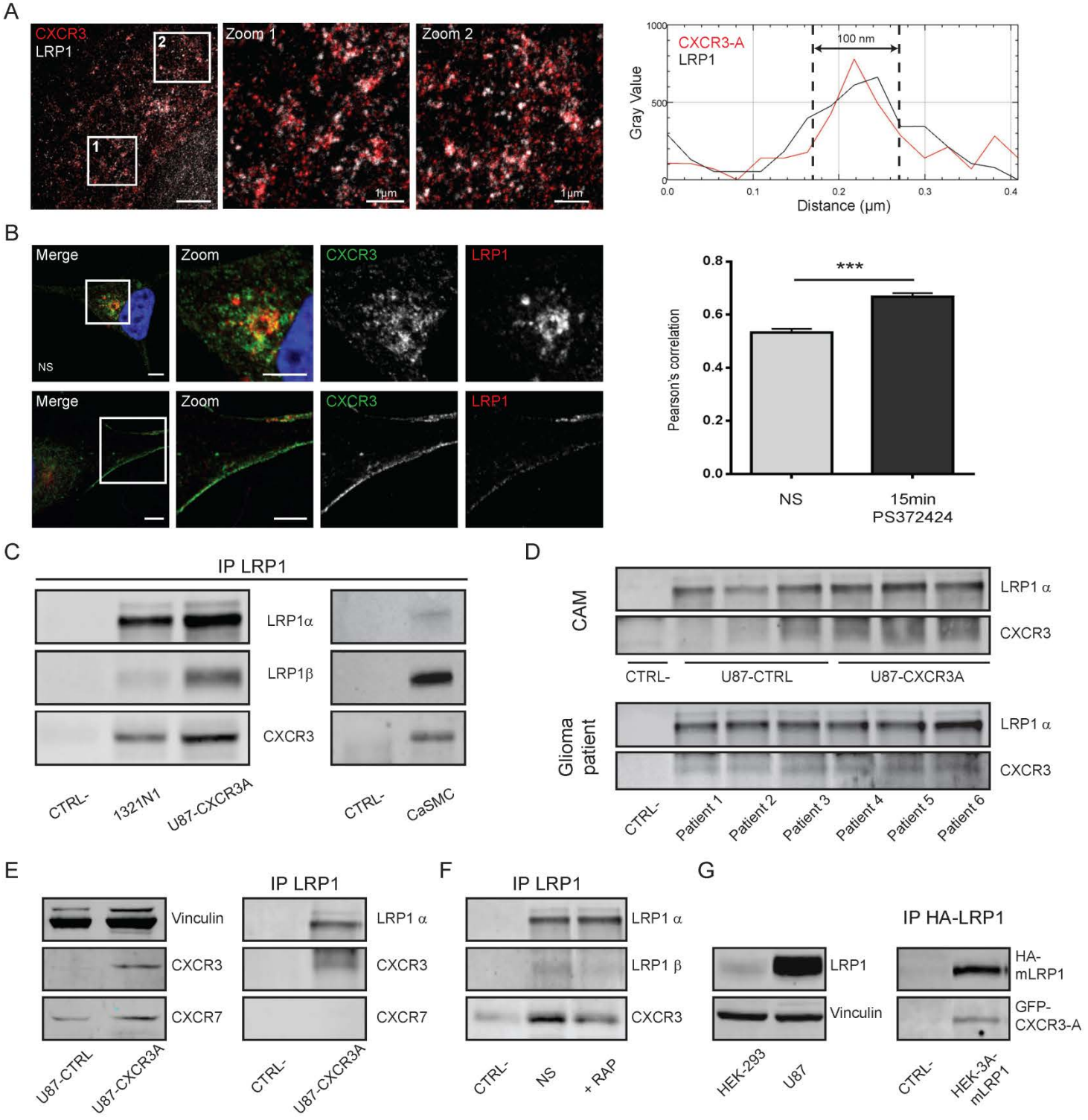

A
CXCR3
LRP1
2
1
Zoom 1
Zoom 2
1µm
1µm
CXCR3-A
LRP1
100 nm
Gray Value
Distance (µm)
B
Merge
Zoom
CXCR3
LRP1
NS
Merge
Zoom
CXCR3
LRP1
***
Pearson's correlation
NS
15min
PS372424
C
IP LRP1
LRP1α
LRP1β
CXCR3
CTRL-
1321N1
U87-CXCR3A
CTRL-
CaSMC
D
CAM
LRP1 α
CXCR3
CTRL-
U87-CTRL
U87-CXCR3A
Glioma patient
LRP1 α
CXCR3
CTRL-
Patient 1
Patient 2
Patient 3
Patient 4
Patient 5
Patient 6
E
Vinculin
CXCR3
CXCR7
U87-CTRL
U87-CXCR3A
IP LRP1
LRP1 α
CXCR3
CXCR7
CTRL-
U87-CXCR3A
F
IP LRP1
LRP1 α
LRP1 β
CXCR3
CTRL-
NS
+ RAP
G
LRP1
Vinculin
HEK-293
U87
IP HA-LRP1
HA-mLRP1
GFP-CXCR3-A
CTRL-
HEK-3A-mLRP1

Figure 4: CXCR3-A physically interact with the endocytic receptor LRP1

(A) Super resolution microscopy (STED) was performed at the Bordeaux Imaging Center (BIC) on U87-CXCR3-A cells, and showed a very high interaction of CXCR3 (λ=594nm) and LRP1 (λ=647nm) in the optical STED resolution space. Each fluorophore colocalize in a space of 100nm. Scale : 5µm and 1µm (zoom). Section were observed at 1000× magnification under a Leica SP8-STED microscope. (B) Colocalization of CXCR3 and LRP1 was also shown by confocal microscopy (CXCR3 λ =488nm, LRP1 λ=547nm) on U87-CXCR3A cells. Nuclei were stained with DAPI (blue). In zoomed images, colocalization of CXCR3 and LRP1 is shown close to the nucleus (NS: non-stimulated condition) or at the cell membrane (15 min agonist: stimulated condition). Scale: 5 µm. Sections were observed at 630× magnification under a confocal laser-scanning microscope (Nikon eclipse Ti). Pearson's correlations were obtained using NIS-Element AR 64-Bit software. The results from three independent experiments were combined to calculate mean and SEM (n=30), *** P<0.001. (C) Interaction between CXCR3 and LRP1 was shown by immunoprecipitation using antibodies against LRP1. CTRL- : beads with IgG negative control, CaSMC: coronary artery smooth muscle cells. (D) Immunoprecipitation between LRP1 and CXCR3 was performed in the U87-CTRL and U87-CXCR3A implanted in the CAM model (upper panel), but also in several cell lines derived from patient with glioblastoma. (E) Immunoprecipitation against LRP1 and revealed with different CXC chemokine receptor (CXCR3 and CXCR7). the interaction was seen only seen between LRP1 and CXCR3. (F) immunoprecipitation against LRP1 when cells are pre-treated or not with CXCR3 antagonist (SCH546738) or LRP1 antagonist (RAP). The interaction decreased when cells are treated with RAP. (G) HEK-CXCR3A were transfected with mini-LRP1 vectors (LRP1 containing domain 4 only) and recapitulate the interaction between CXCR3-A and LRP1

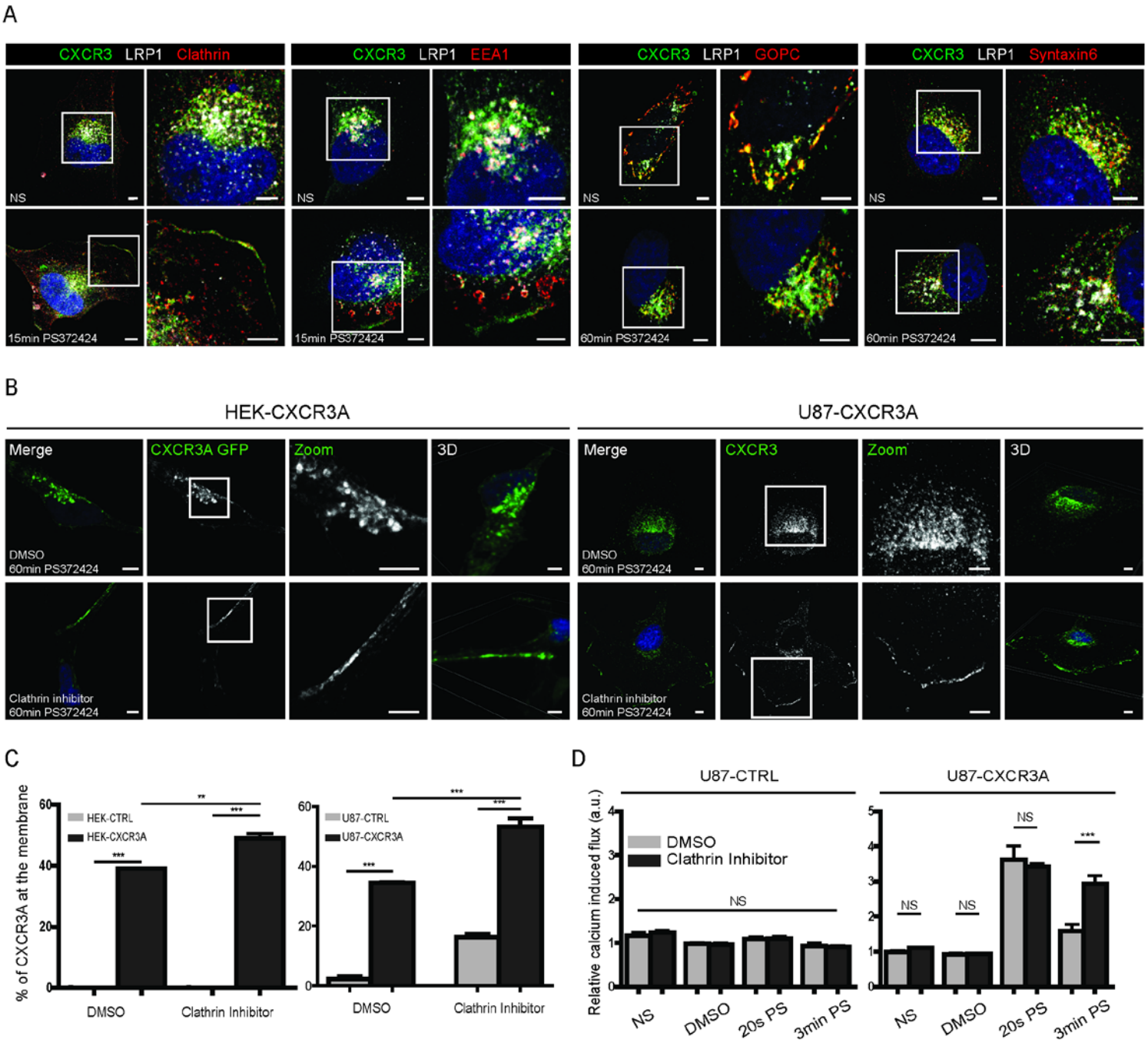


Figure 5: Clathrin-dependant internalization and recycling of CXCR3-A.

(A) Membrane or perinuclear localization of CXCR3 (λ=488nm) and colocalization with LRP1 (λ=647nm) were shown in non-stimulated (NS) U87-CXCR3A cells and upon stimulation with PS372424 at 15 and 60 minutes. Internalization and recycling of CXCR3 were studied by immunostaining for clathrin, EEA1, GOPC or Syntaxin6 (for each marker λ=547nm). Nuclei were stained with DAPI (λ=405nm). Scale: 5 µm. (B) Clathrin-dependant internalization of CXCR3-A. Cells were preincubated 15 min with the clathrin inhibitor Pitstop 2tm (30µM) as previously described (von Kleist et al, 2011). All sections were observed by immunofluorescence at 630× magnification under confocal laser-scanning microscope (Nikon eclipse Ti). Scale: 5 µm. (C) Constitutive internalization of CXCR3-A was shown by FACS analysis in HEK-CTRL / HEK-CXCR3A (left panel) and in U87-CTRL / U87-CXCR3A (right panel) cells. (D) Cells were preincubated 15min with the clathrin inhibitor Pitstop 2tm (30 µM) and relative calcium flux was then assessed in U87-CTRL or in U87-CXCR3A cells. NS: non stimulated condition, DMSO: negative control, 20s PS: 20secondes Post Stimulation, 3min PS: 3minutes Post Stimulation, a.u. for arbitrary unit. The results from three independent experiments were used to calculate mean and SEM. *** P<0.001, ** P<0.002.

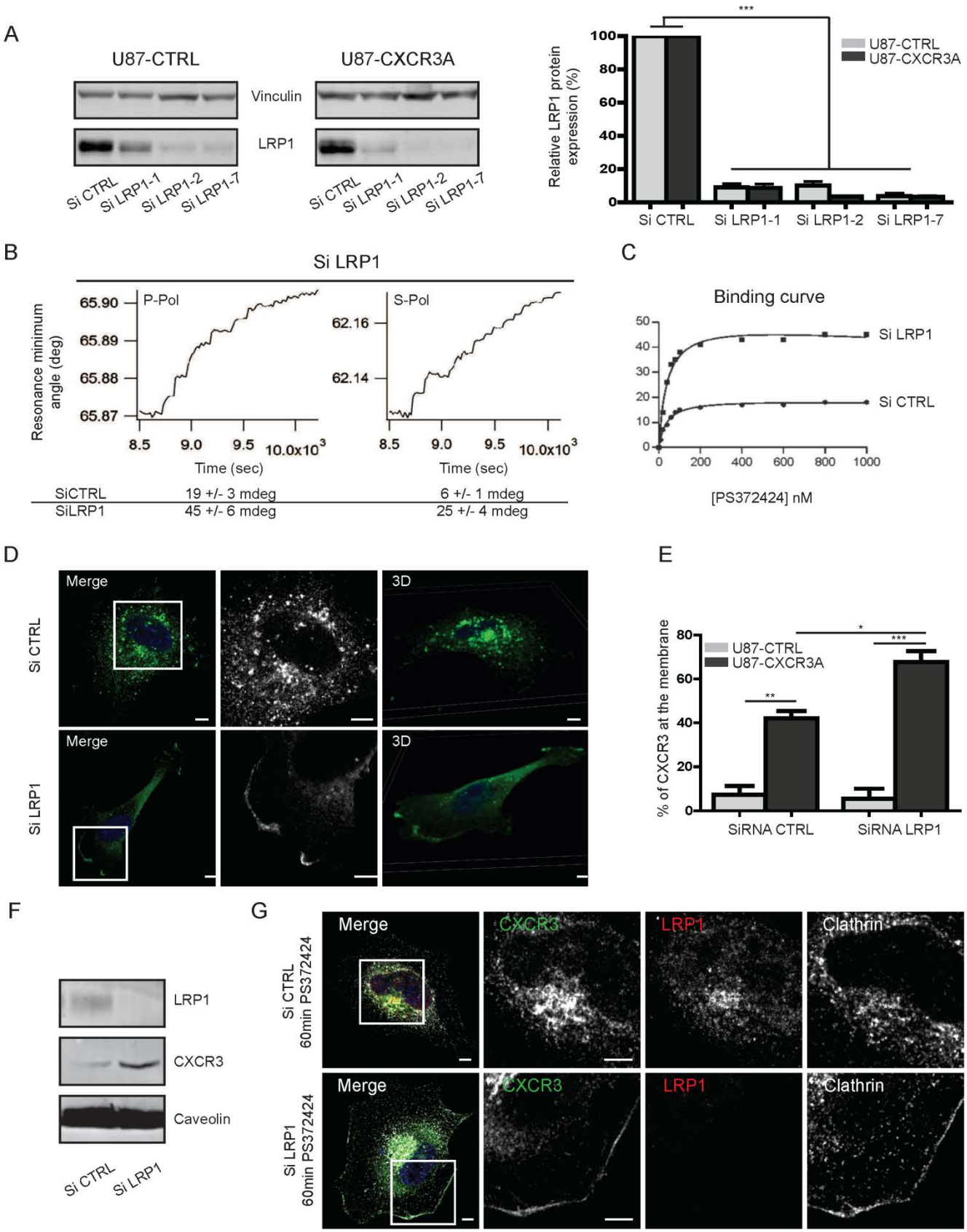

A
U87-CTRL
U87-CXCR3A
Vinculin
LRP1
Si CTRL
Si LRP1-1
Si LRP1-2
Si LRP1-7
Relative LRP1 protein expression (%)
U87-CTRL
U87-CXCR3A
***
B
Si LRP1
P-Pol
S-Pol
Resonance minimum angle (deg)
Time (sec)
SiCTRL 19 +/- 3 mdeg 6 +/- 1 mdeg
SiLRP1 45 +/- 6 mdeg 25 +/- 4 mdeg
C
Binding curve
Si LRP1
Si CTRL
[PS372424] nM
D
Merge
3D
Si CTRL
Si LRP1
E
% of CXCR3 at the membrane
U87-CTRL
U87-CXCR3A
SiRNA CTRL
SiRNA LRP1
F
LRP1
CXCR3
Caveolin
Si CTRL
Si LRP1
G
Merge
CXCR3
LRP1
Clathrin
Si CTRL 60min PS372424
Si LRP1 60min PS372424

Figure 6: LRP1 is necessary for CXCR3-A internalization and modulate his conformational change

(A) 3 different siRNA against human LRP1 were used in control U87 (U87-CTRL) and U87-CXCR3A (U87-3A). Western blot using antibodies against LRP1 was performed in these cell extracts. Vinculin was used as a loading control. (B) Changes in the minimum resonance position following incremental addition of PS372424 to the cell fragments from U87-CXCR3A, as a function of time and following SiRNA CTRL or SiRNA LRP1 treatment obtained with p-polarization and s-polarization light. (C) Binding curve for PS372424 interaction with the CXCR3-A following siRNA CTRL (•) and siRNA LRP1 treatment (•) (KD values are provided Figure S7). (D) CXCR3 immnostaining was performed in U87-CXCR3A with control SiRNA (upper panel) or with SiRNA LRP1 (lower panel). Membrane relocalization of CXCR3-A (λ=488nm) when LRP1 is downregulated is shown. Scale: 5 µm. (E) The percentage of CXCR3-A at the cell membrane was assessed by FACS after control SiRNA or SiRNA against LRP1. (F) The amount of CXCR3-A at the membrane was assessed by Western blot for LRP1 and CXCR3 on cell membrane extract obtained after subcellular fractionation. Caveolin was used as a loading control for cell membrane. (G) CXCR3-A (λ=488nm), LRP1 (λ =547nm) and clathrin (λ=647nm) immunostainings were performed in U87-CXCR3A cells to assess the colocalization of CXCR3-A and clathrin upon stimulation (PS372424, 100 ng/ml, 60 minutes), with or without LRP1. All sections were observed at 630× magnification under confocal laser-scanning microscope (Nikon eclipse Ti). Scale: 5 µm. All the results from three independent experiments were combined to calculate mean and SEM, and values were normalized to those obtained for the control condition. *** $P<0.001$, ** $P<0.005$, * $P<0.005$.

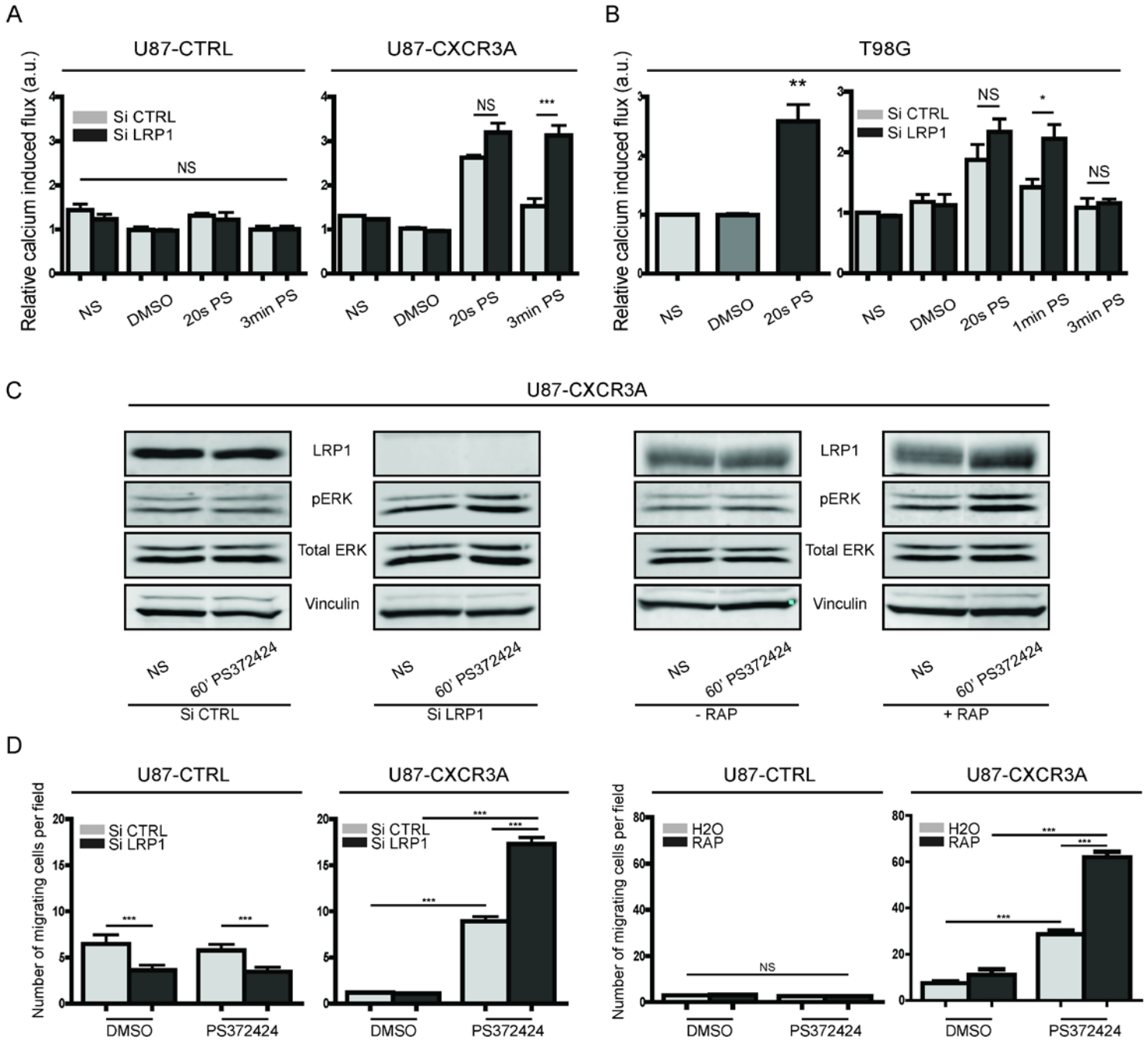


Figure 7: Role of LRP1 in CXCR3-A downstream pathways.

(A) Calcium flux was assessed by FACS analysis in U87-CTRL and U87-CXCR3A cells after control SiRNA or SiRNA against LRP1. SiRNA LRP1 leads to sustained activity of CXCR3-A. (B) Calcium flux was also assessed in T98G cells (lower panel) which express endogenous level of CXCR3-A. (C) Phosphorylation of ERK1/2 was performed by western blot of U87-CXCR3A cell extract after silencing of LRP1 (left panel) or inhibition of LRP1 using RAP (pretreatment of 24h, 5µM, right panel) after 60 minutes of stimulation (PS243737, 100ng/ml). Vinculin and total ERK were used as loading controls. (D) Migration assays on U87-CTRL or U87-CXCR3A cells were performed after silencing of LRP1 (left panel) or inhibition of LRP1 using with RAP (pretreatment of 24h, 5µM, right panel). Downregulation of LRP1 leads to a sustained activity of CXCR3-A. NS: non-stimulated condition, DMSO: negative control, 20s PS: 20secondes Post Stimulation, 3min PS: 3minutes Post Stimulation, a.u. for arbitrary unit, PS372424: CXCR3 agonist 100 ng/ml. All the results from three independent experiments were combined to calculate mean and SEM, and values were normalized to those obtained for the control condition. *** P<0.001.

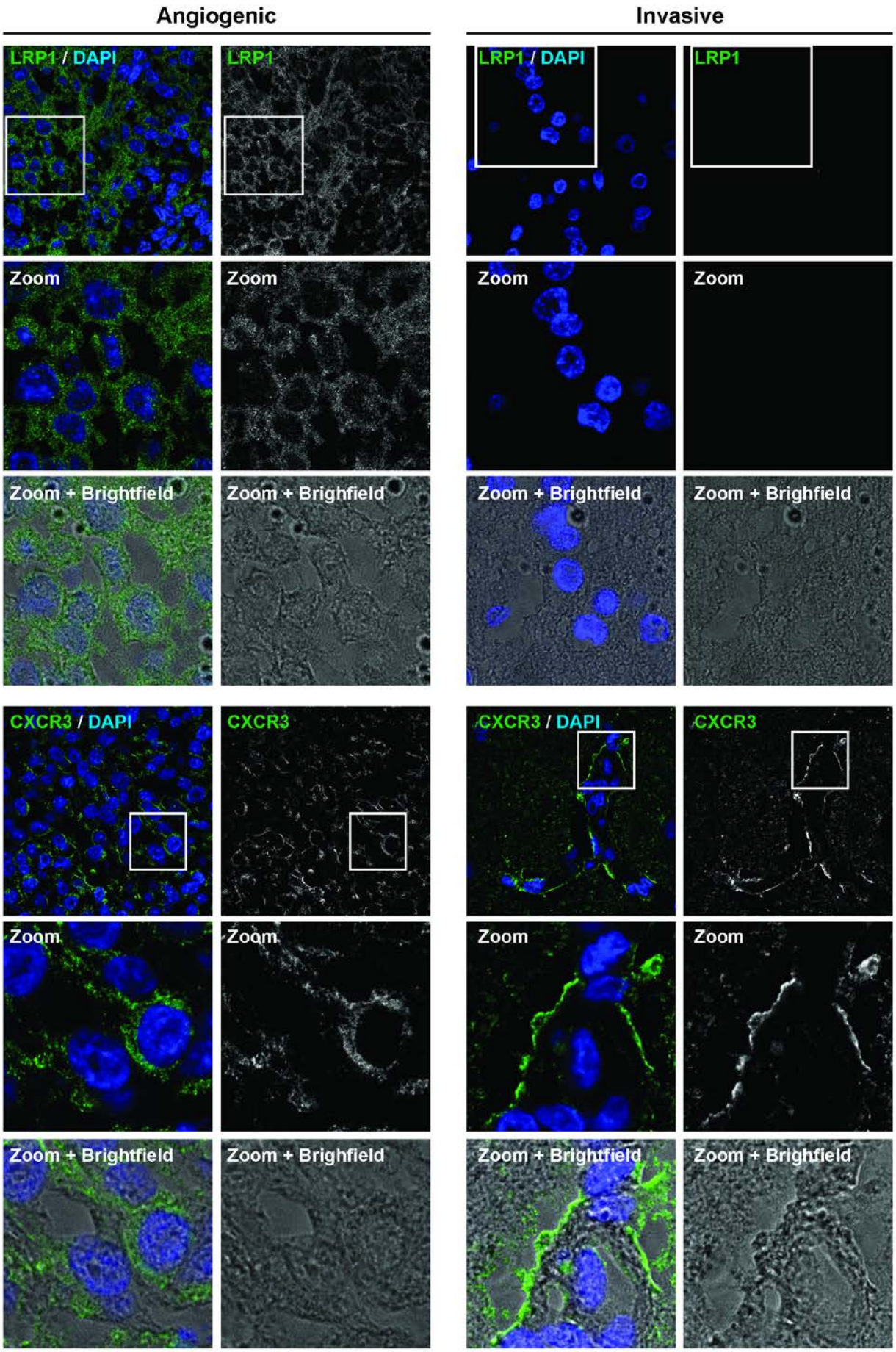

Angiogenic
Invasive
LRP1 / DAPI
LRP1
Zoom
Zoom + Brightfield
Zoom + Brighfield
CXCR3 / DAPI
CXCR3

Figure 8: CXCR3 and LRP1 expression in glioblastoma samples from patients

CXCR3 and LRP1 expression were assessed by immunofluorescence on glioblastoma samples from patient. For each patients, LRP1 and CXCR3 were detected on the angiogenic part (left panel) or the invasive part (right panel) of the tumor. Membrane or perinuclear localization of CXCR3 and LRP1 were observed with a high magnification with brightfield. All sections were observed by immunofluorescence at 630× magnification under confocal laser-scanning microscope (Nikon eclipse Ti). These results were from three different patient.

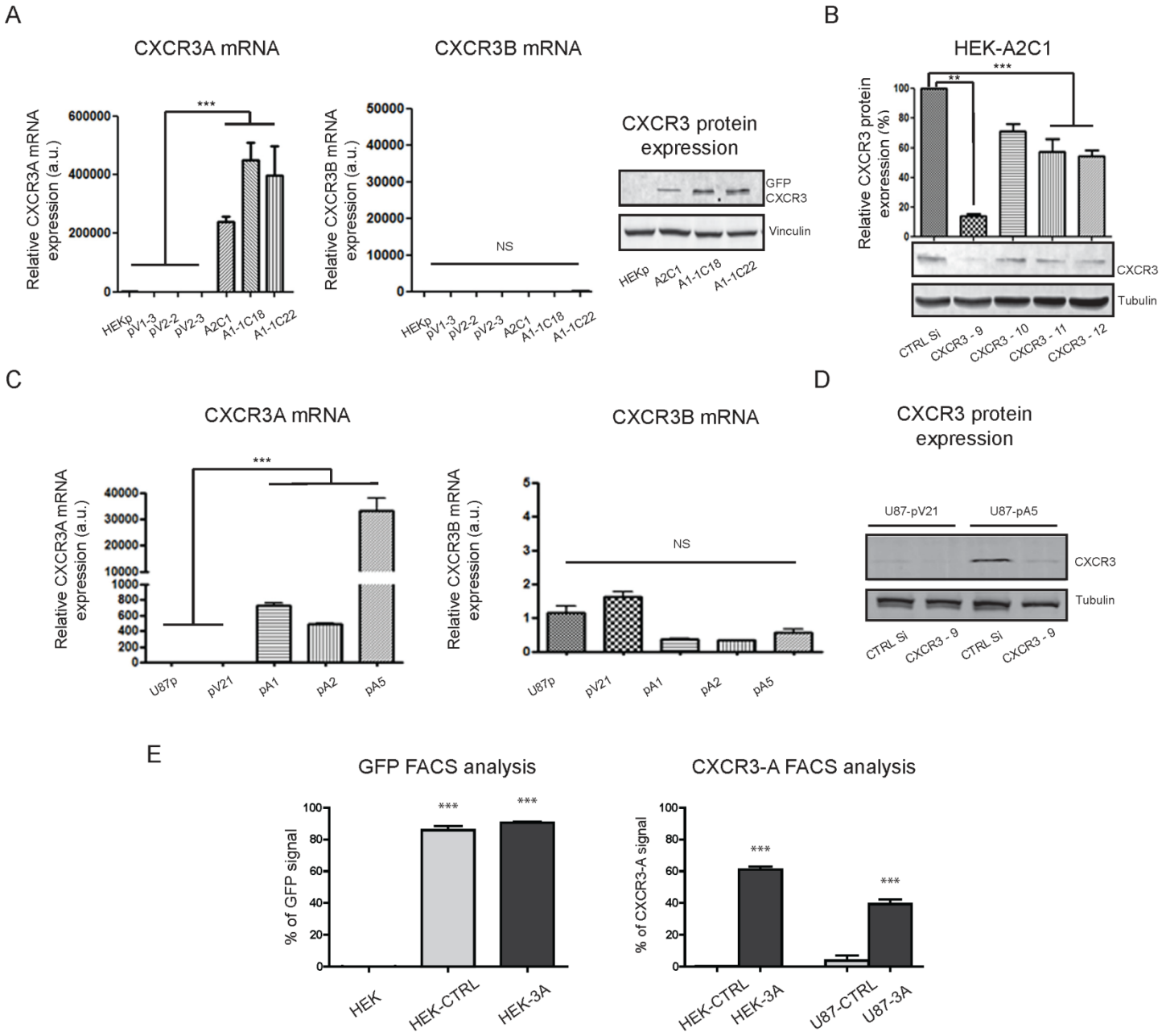
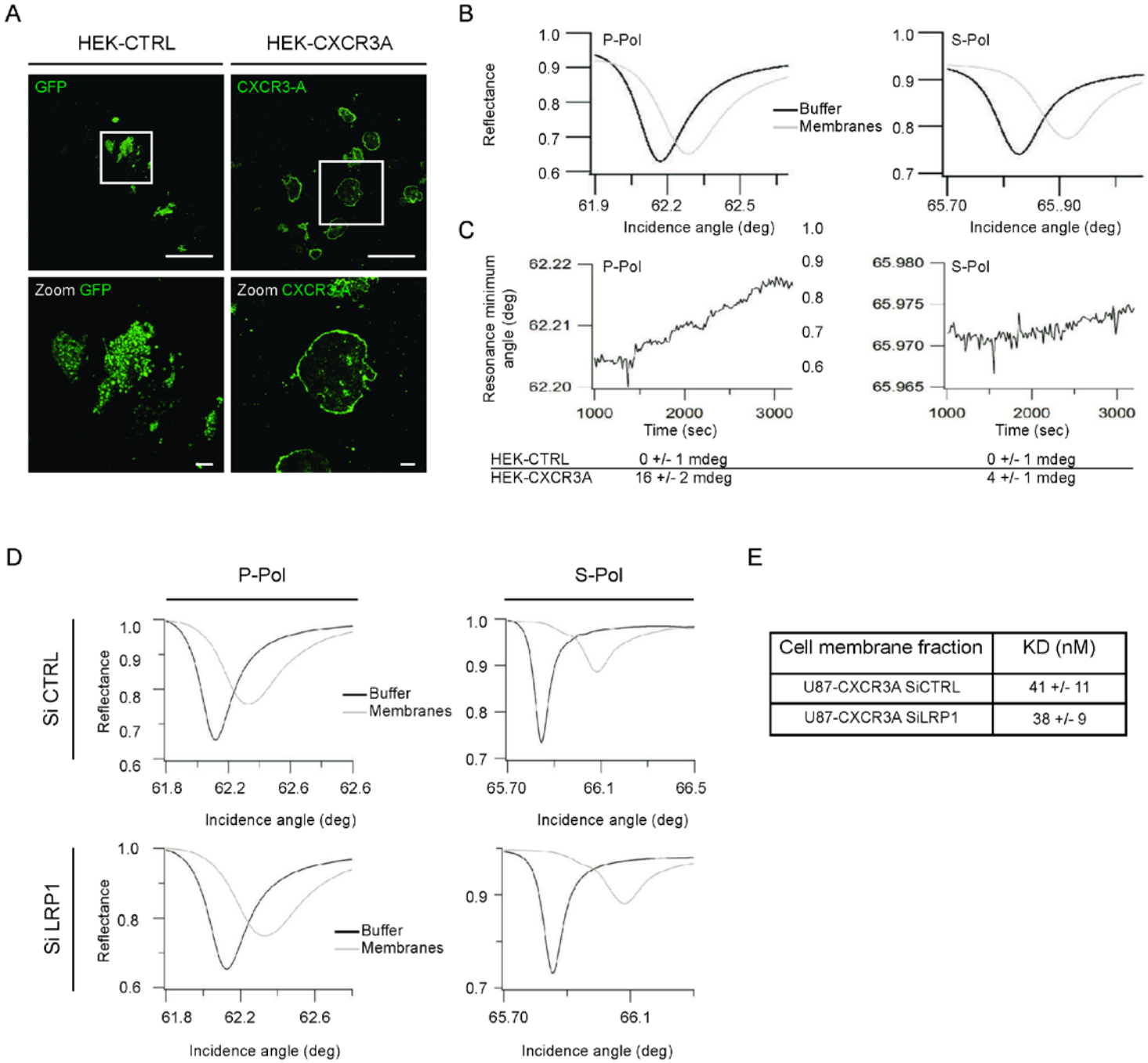


Figure S1: CXCR3-A expression in stably transfected HEK-293-CXCR3A and U87-CXCR3A cell lines.

(A) Analyses of CXCR3-A (left panel) and CXCR3-B (middle panel) mRNA expression were performed by real time PCR in parental HEK-293 cells (Hekp), in HEK-CTRL (clones pV1-3, pV2-2 and pV2-3) and in HEK-CXCR3A (clones A2C1, A1-1C18 and A1-1C22). Values were normalized to the reference gene. CXCR3-A protein expression (right panel) was performed in parental HEK-293 and HEK-CXCR3A clones by western blot using GFP antibodies. Vinculin was used as a loading control. (B) Silencing of CXCR3 in HEK-CXCR3A cells using 4 different siRNA against human CXCR3 (siCXCR3-9, -10, -11 and -12). Tubulin was used as a loading control. (C) Analyses of relative mRNA expression of CXCR3-A (left panel) and of CXCR3-B (right panel) were assessed by real time PCR in parental U87 cells, U87-CTRL cells (U87 pv21) and U87-CXCR3A (U87 pA1, pA2 and pA5). Values were normalized to the reference gene. (D) CXCR3 protein expression was performed by Western blot for CXCR3 in cell extracts from U87-pV21 and U87 pA5. Silencing of CXCR3 expression was performed using the most efficient siRNA for human CXCR3 (siCXCR3-9). Tubulin was used as a loading control. (E) FACS analysis were performed to measure GFP intensity (left panel) or CXCR3 intensity at the cell membrane (right panel) in control cells with empty vectors (HEK-CTRL and U87-CTRL) or in cells with CXCR3A vectors (HEK-CXCR3A and U87-CXCR3A). All the results from three independent experiments were combined to calculate mean and SEM, and values were normalized to those obtained for the control, *** P<0.001, ** P<0.002. a.u. for arbitrary unit.



Cell membrane fraction	KD (nM)
U87-CXCR3A SiCTRL	41 +/- 11
U87-CXCR3A SiLRP1	38 +/- 9

Figure S2: Conformational and dynamic properties of CXCR3-A in Hek-293-CXCR3A cells.

(A) Caption on the PWR prism of Hek-293 cell fragments containing CXCR3-A. Sections were observed at 630× magnification under a confocal laser-scanning microscope (Nikon eclipse Ti) and images were acquired with the NIS Image browser software. Scale: 5µm. (B) PWR spectra for the PWR sensor before and after immobilization of the cell membrane fragments obtained with p- (left panel) and s- (right panel) polarized light. (C) Changes in the minimum resonance position following incremental addition of PS372424 to the cell fragments, as a function of time obtained with p-polarized (left panel) or s-polarized (right panel) light. (D) Spectral shifts observed after deposition of U87-CXCR3A cell fragments pre-treated with SiRNA CTRL (upper panel) and SiRNA LRP1 (lower panel) on the PWR sensor before and after immobilization of the cell membrane fragments.

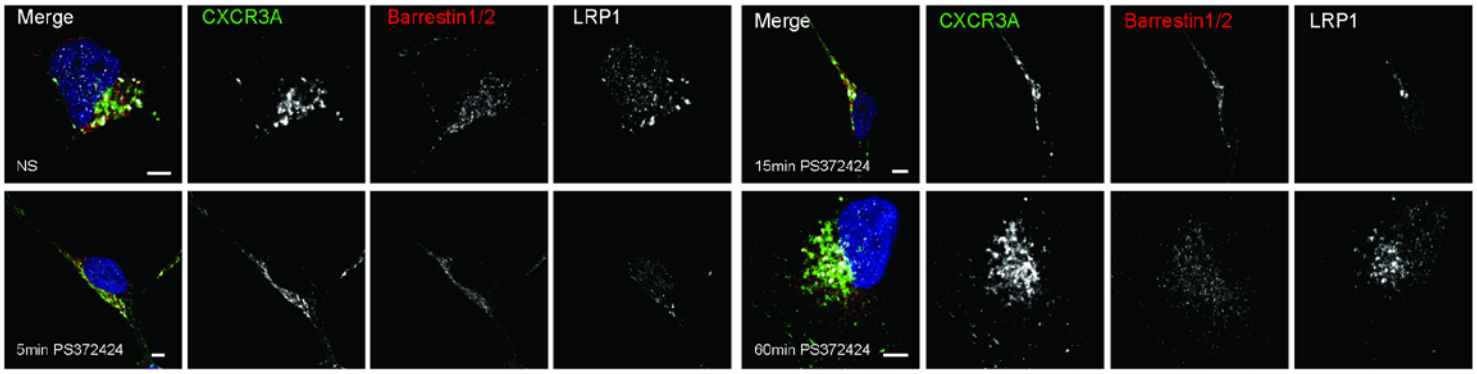
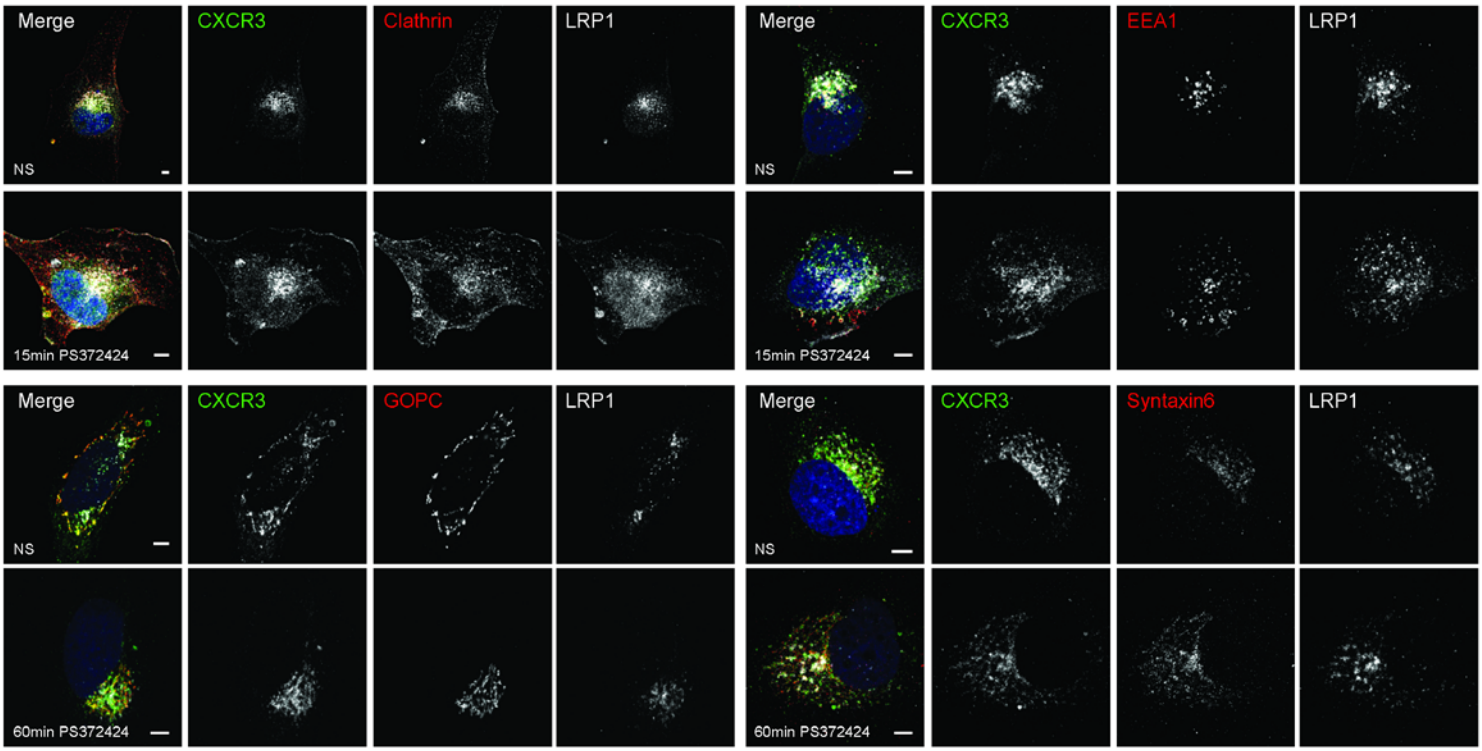


Figure S3: β-arrestin recruitment and CXCR3-A desensitization.

Membrane or perinuclear localization of CXCR3 (λ=488nm) and colocalization with β-arrestin1/2 (λ=547nm) were shown in non stimulated (NS) HEK293-CXCR3A cells and upon stimulation at 5, 15 and 60 minutes. LRP1 immunostaining (λ=647nm).

A



B

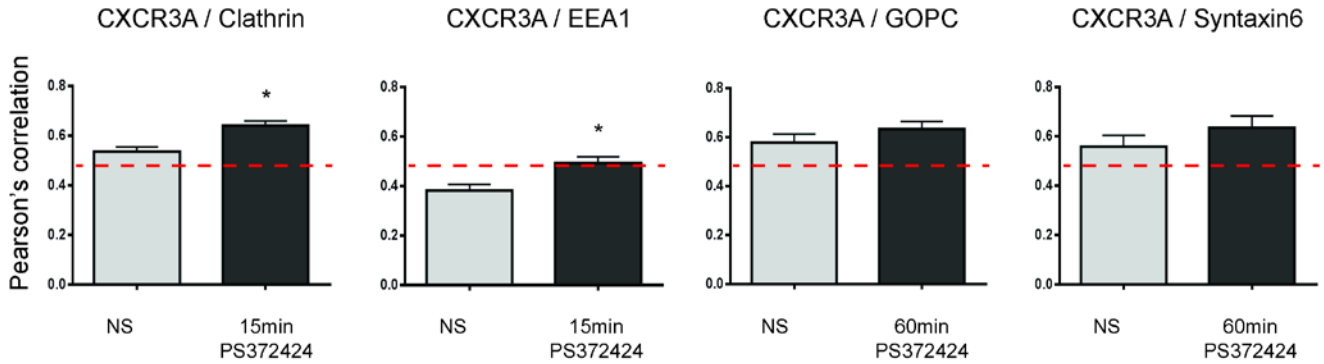
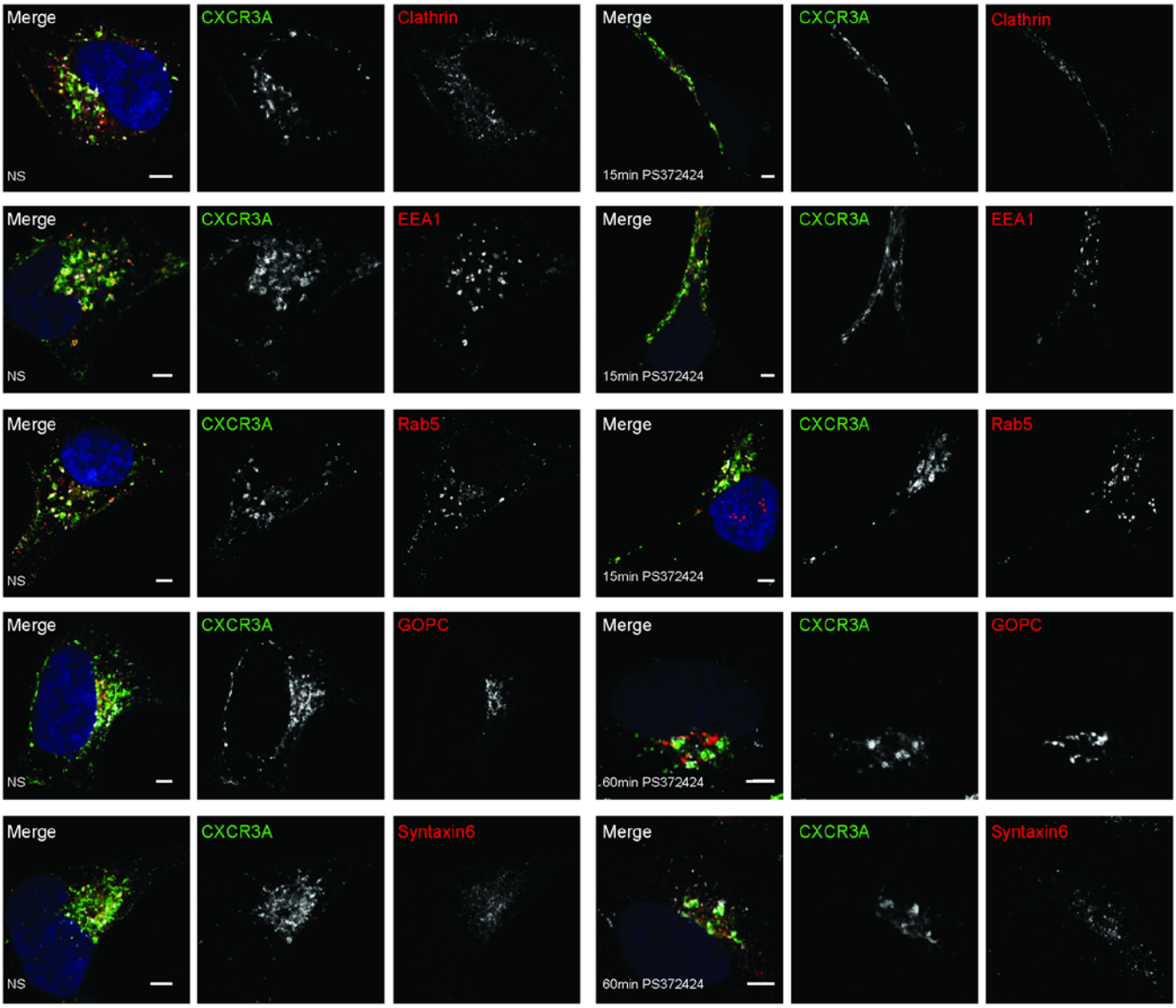


Figure S4: CXCR3-A internalization and trafficking in U87-CXCR3A cells.

(A) Membrane or perinuclear localization of CXCR3 (λ=488nm) and colocalization with LRP1 (λ=647nm) were shown in non-stimulated (NS) cells and upon stimulation with CXCR3 agonist at 15 and 60 minutes. Internalization and recycling of CXCR3 were studied by immunostaining using antibodies against clathrin, EEA1, GOPC or Syntaxin6 (for each marker λ=547nm). Scale: 5µm. Sections were observed at 630× magnification under a confocal laser-scanning microscope (Nikon eclipse Ti) and images were acquired with the NIS Image browser software. (B) Colocalizations were performed using NIS-Element AR 64-Bit software to calculate the Pearson's correlation. The results from three independent experiments were combined to calculate mean and SEM (n=30), *** P<0.001, ** P<0.002, * P<0.005.

A


Merge
CXCR3A
Clathrin
NS
15min PS372424
EEA1
Rab5
GOPC
60min PS372424
Syntaxin6

B

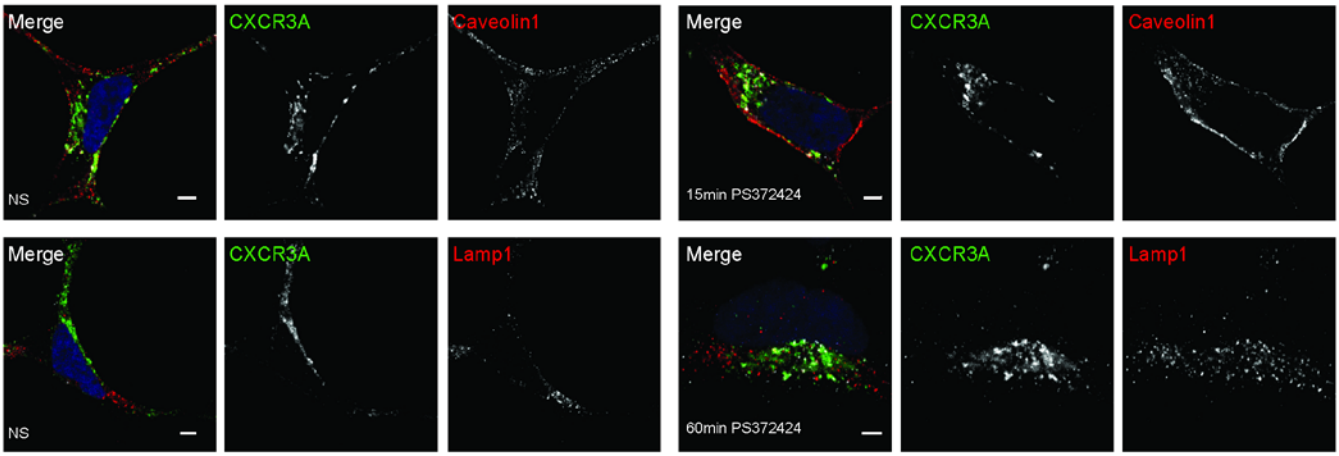

Merge
CXCR3A
Caveolin1
NS
15min PS372424
Lamp1
60min PS372424

Figure S5 : CXCR3A internalization and trafficking in HEK-CXCR3A cells.

(A) Membrane or perinuclear localization of CXCR3 (λ=488nm) and colocalization with LRP1 (λ=647nm) were shown in non-stimulated (NS) cells and upon stimulation with CXCR3 agonist at 15 and 60 minutes. Internalization and recycling of CXCR3 were studied by immunostaining using antibodies against clathrin, EEA1, GOPC or Syntaxin6 (for each marker λ=547nm). Scale: 5µm. Sections were observed at 630× magnification under a confocal laser-scanning microscope (Nikon eclipse Ti) and images were acquired with the NIS Image browser software. (B) CXCR3-A internalization into early endosome is caveolin-independant and is not degraded in lysosomes. No colocalization was seen between CXCR3-A and caveolin1 in non-stimulated or at 15min of stimulation in HEK-CXCR3A cells, showing the specificity of the clathrin-dependant internalization of CXCR3-A. No colocalization was seen between CXCR3-A and Lamp-1 in non-stimulated or at 60 min of stimulation in HEK-CXCR3A cells, showing the specificity of the recycling pathways. Sections were observed at 630× magnification under a confocal laser-scanning microscope (Nikon eclipse Ti). Scale: 5 µm.

III. Matériels et méthodes supplémentaires

La plupart des matériels et méthodes ont été expliqués dans l'article I « *New insight into the internalization, recycling and activity of the CXC Receptor-3: Role of LRP1* ». Tous les matériels et méthodes supplémentaires sont décrits ci-dessous.

A. Réactifs

Total AKT a été acheté chez Ozyme (Ref: 4685S), p-AKT provient de chez Cell Signaling Technology (PathScan Multiplex Western Cocktail I, ref: 5301S) et l'anticorps 3F10 anti-HA provient de chez Roche (Sigma Aldrich, ref: 11867423001). La lectine biotynilée provient de chez Eurobio (« *Sambucus nigra* lectin, isolated from elderberry bark », ref: B-1305). La vimentine provient de chez SantaCruz (ref: sc6260). Les anticorps ont été utilisés comme indiqués dans leur fiche technique. La solution de gélatine pour zymographie provient de Pan Biotech (Gelatin-Solution 2% in PBS, ref : P06-25200). Les amorces utilisées pour les qPCR sont détaillées en table 7

Cible	Amorce sens	Amorce antisens
MMP2	ccgtccccatcatcaa	aggtattgcactgccaactcttt
MMP9	cattcagggagacgccca	aaccacgacgcccttgc
uPA	cttaactccaacacgcaagggg	agcttgtgccaaactggggatc

Table 7: Séquences des amorces utilisées

L'inhibition de la voie PI3K/AKT a été réalisée par utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de la sous-unité P110α de la PI3K, le PI-103 (AbCam, ab141361). Ce dernier permet de cibler différents composants de la voie PI3K suivant la concentration d'utilisation (IC_{50} : 8 nM pour p110α). Le PI-103 a été utilisé *in vitro* à une concentration de 10nM pendant 1h à 37°C sur nos cellules.

B. La membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet

Les œufs de poulet ont été livrés à 4°C (Couvoir de Cerveloup, Vourey, France) et ont été placés 24h à température ambiante. Ils ont ensuite été lavés avec des cotons humidifiés et placés dans un incubateur à 37°C et 65 % d'humidité sur un système rotatif de 25° toutes les 4h pendant 72h. Les œufs ont été ouverts 3 jours après incubation (=J3). Une incision sur la partie latérale de l'œuf a été effectuée afin de retirer 5 à 6ml de vitellus et de décoller l'embryon de la partie supérieure de l'œuf. Une seconde incision a par la suite été effectuée sur la partie supérieure de l'œuf afin de pouvoir créer une zone de travail, et pour visualiser le cœur de l'embryon. L'implantation des cellules tumorales a été réalisée 10 jours après incubation (=J10). Pour ce faire, un anneau délimitant la zone d'implantation a préalablement été posé sur la surface de la membrane chorio-allantoide (CAM) de l'embryon de poulet. La CAM a par la suite subit une légère abrasion à l'aide d'un scalpel pour favoriser l'implantation des cellules tumorales. Un volume maximun de 30 µl contenant 3 millions de cellules a été déposé dans l'anneau et le développement tumoral a été suivi pendant 7jours (J17). Pour cette expérience deux groupes (de 50 œufs) ont été implantés, celui des cellules U87 contrôles (U87-CTRL) et celui des cellules U87 surexprimant le CXCR3-A (U87-CXCR3A). Des photos de la croissance tumorale ont été effectuées tous les jours. L'expérience a été arrêtée à J17 et les CAM / tumeurs contenues dans l'anneau ont été prélevées et incluses en OCT (« *Optimum Cutting Temperature* »), ou directement congelées dans l'azote afin d'en extraire les ARNs et protéines. Les échantillons ont été conservés à -80°C.

C. Immunofluorescence sur CAM

Les tumeurs incluses en O.C.T. ont été coupées à -20°C avec un cryostat. Les coupes de 10µm ont été déposées sur des lames gélatinisées et ont été conservées à -80°C après séchage. Les coupes ont été mises à température ambiante pendant 10 minutes pour permettre l'évaporation de l'eau. Les coupes ont été fixées au paraformaldehyde (PFA) 4% pendant 10minutes. Après 2 rinçages au PBS, les coupes ont été perméabilisées 15 minutes à température ambiante avec une solution

de PBS 0,1% Triton X-100. Par la suite, les coupes ont été saturées pendant 1h avec du PBS 0,1% Triton X-100 et 5% BSA. Les anticorps ont été utilisés au 1/400 dans du PBS 0.1%Triton X-100 et 0.1% BSA et laissé toute la nuit sur les coupes à 4°C. Après 3 lavages au PBS, les anticorps secondaires ont été dilués au 1/400 et utilisés pendant 1h à température ambiante sur les coupes. Enfin, après 3 lavages au PBS, les coupes ont été montées avec du Fluoroshield contenant du DAPI (« *Fluoroshield mounting medium with DAPI* », F6057-20ml Sigma). Les observations ont été faites sous un microscope confocal Nikon Eclipse Ti avec des objectifs 10x, 20x et 40x.

D. Zymographie

Après extraction protéique des tumeurs, l'étude des MMPs ou de uPA a été réalisée par zymographie sur gel. Pour visualiser les MMPs gélatinases (MMP2 et 9), nous avons réalisés une électrophorèse sur gel d'acrylamide classique supplémenté de 1% de gélatine. Pour étudier la protéase uPA, le gel de séparation fut supplémenté avec 0,96% de plasminogène et de 0,1% de caséine. 100µg de chaque échantillon ont été repris au 1/4 dans une solution tampon (250mM Tris-HCl pH6.8, 40% glycérol, 8% SDS, 0.01% bleu de bromophénol), puis déposés dans les gels de zymographie. Après électrophorèse, les gels ont été récupérés et incubés 30 min à température ambiante dans 100ml de solution de renaturation (2.5% Triton X-100). Après 3 lavages à l'eau, les gels ont été incubés 30min à température ambiante, puis 16h à 37°C, dans 100ml de solution d'activation des MMPs renaturées (500mM Tris-HCl pH7,8, 2M NaCl, 50mM CaCl2, 0,2% Brij35). Le lendemain, une coloration des gels a été réalisée pendant 1h à température ambiante au bleu de coomassie (0.5w/v bleu de coomassie R-250, 10% acide acétique, 5% méthanol). Enfin, les gels ont été décolorés avec de l'eau, le temps que les bandes de dégradation de la gélatine ou de la caséine apparaissent.

IV. Implication de CXCR3-A dans l'invasion tumorale

A. Impact de CXCR3-A sur la voie PI3K/AKT

CXCR3-A mobilisant principalement des protéines Galpha-i/o ou Galpha-q, l'augmentation des flux calciques intracellulaires ainsi que les voies des MAPK/ERK ne sont pas les uniques voies de signalisations modulées par la surexpression de CXCR3. En effet, il a été montré que CXCR3 pouvait également réguler la voie PI3K/AKT (Bonacchi et al., 2001; Maru et al., 2008). La PI3K est un hétèrodimère à activité kinase impliquée dans la croissance, la prolifération et l'invasion tumorale (Vanhaesebroeck et al., 1997a, 2010). Il existe de nombreuses isoformes différentes pour la PI3K. Lorsque ces isoformes sont activées par un récepteur à activité tyrosine kinase ou un GPCR, on parle de PI3K de classe 1A ou 1B. Les hétérodimères de classe 1A sont constitués d'une sous-unité catalytique de 110kDa (p110) et d'une sous-unité régulatrice (p85) qui va recruter la sous-unité p110 (Backer, 2010; Tzenaki and Papakonstanti, 2013; Vanhaesebroeck et al., 1997b). Chez les mammifères, il existe 3 classes de sous-unité catalytique : p110-α, p110-β ou p110-δ (Vanhaesebroeck et al., 1997b, 2010). Il a été montré que p110-α est un acteur de la progression tumorale du glioblastome et que son inhibition semble être une interessante stratégie anti-tumorale (Guerreiro et al., 2008; Höland et al., 2014; Iqbal et al., 2016).

Dans les différentes lignées cellulaires surexprimant le CXCR3-A, nous avons mis en évidence l'activation constitutive de la voie PI3K/AKT. L'utilisation d'un inhibiteur spécifique de la sous-unité p110α du complexe PI3K, le PI-103 (IC50 : 8nM), nous a permis d'observer l'inhibition totale de la phosphorylation de AKT. Ainsi, la surexpression de CXCR3-A permet l'activation directe ou indirecte d'autres voies de signalisation pro-tumorales via la voie de signalisation PI3K/AKT et, plus particulièrement, de l'activation de la sous-unité catalytique p110-α (Figure 29).

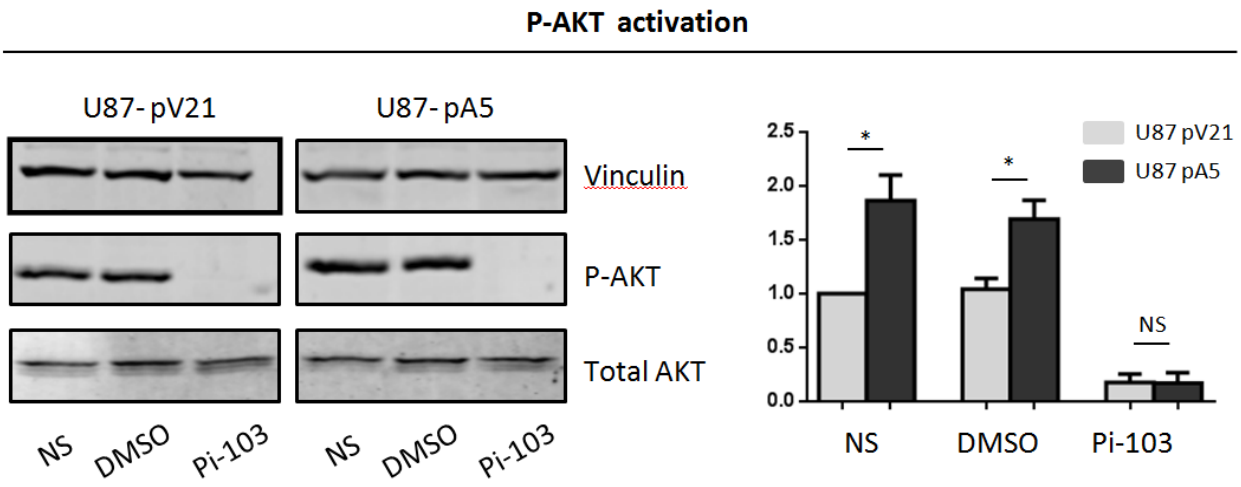


Figure 29: Impact de la surexpression de CXCR3-A et de LRP1 sur la phosphorylation de AKT

B. Le modèle de la CAM pour l'étude de l'invasion tumorale

Le modèle de la CAM est très utilisé pour les études concernant le développement embryonnaire du fait de l'accessibilité aisée de l'embryon de poulet, autant pour la visualisation que pour les manipulations. Cependant, il s'agit aussi d'un très bon modèle pour l'étude du développement et de l'angiogenese tumorale, ainsi que des processus de migration et d'invasion tumorales (Ribatti, 2014). Le developpement de l'embryon dure 21 jours avant éclosion. Le système immunitaire n'étant pas mature pendant le développement embryonnaire du poulet, les implantations de tumeurs se font généralement sans rejet. Au cours du développement de l'embryon, 3 membranes extra-embryonnaires se forment : le sac vitellin, l'amnios et la CAM. La CAM se forme dès les premiers jours du développement (jours 4 à 5) et possède un réseau vasculaire très riche permettant l'irrigation de l'embryon. Les cellules sont implantées au 7ième jour du developpement, une fois que la CAM c'est totalement formée. Le réseau vasculaire de cette dernière entrainera la formation de vaisseaux tumoraux autour du 4ième jour après implantation (11ième jours de developpement de l'embryon) (Figure 30).

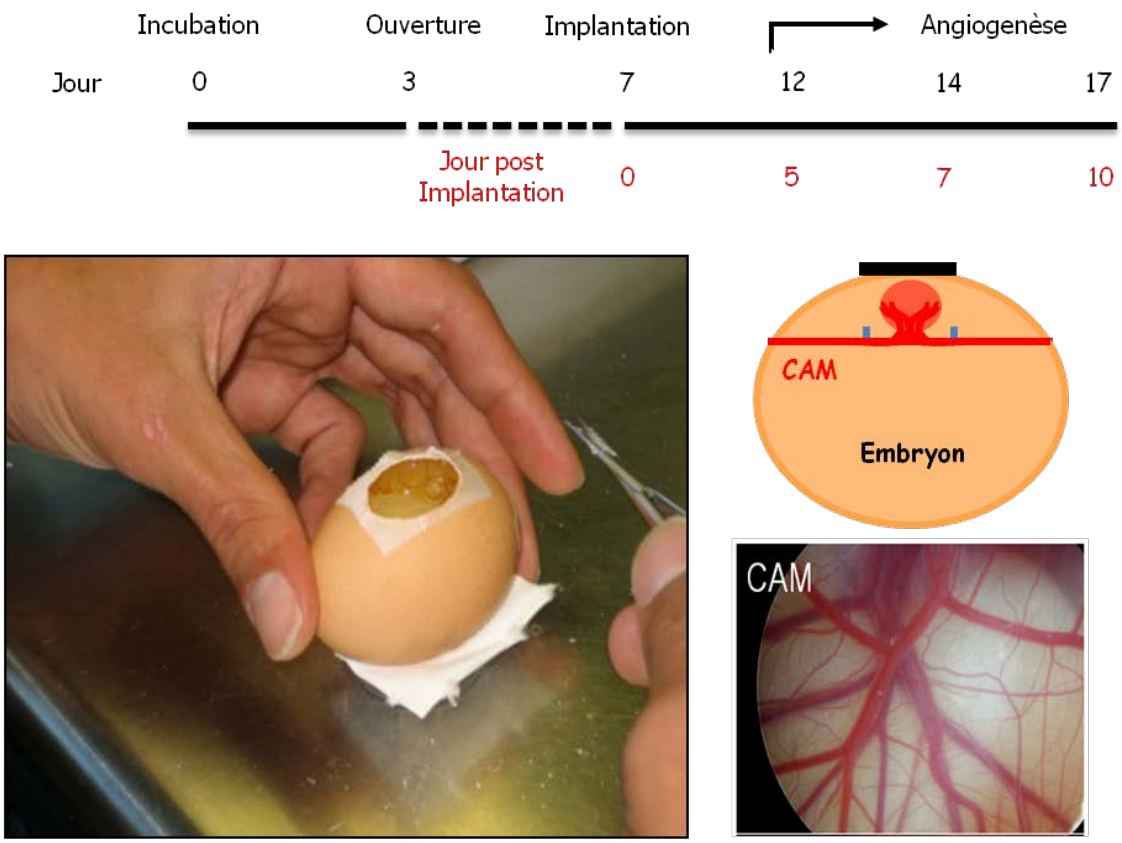


Figure 30: Modèle de la CAM

C. Phénotype des tumeurs

Le phénotype des tumeurs et du microenvironnement tumoral ont été suivis tout au long du développement embryonnaire. En fonction de la surexpression ou non de CXCR3-A, nous avons pu mettre en évidence certaines différences phénotypiques. Premièrement, les tumeurs surexprimant CXCR3-A ont montré un retard dans l'angiogenèse tumorale. En effet, en regardant les tumeurs à J10, avant de récupérer les échantillons, nous avons pu visualiser la formation de vaisseaux sanguins. L'angiogenèse tumorale dans les conditions contrôle commence vers le 4ième jour après implantation, en accord avec des études préalables au laboratoire montrant le switch angiogenique dans les premiers jours après implantation (Hagedorn et al., 2005). L'angiogenèse tumorale des tumeurs surexprimant CXCR3-A débute vers le 6ième jour après implantation. De plus, ces tumeurs restent peu vascularisées, même 10 jours après implantation (Figure 31).

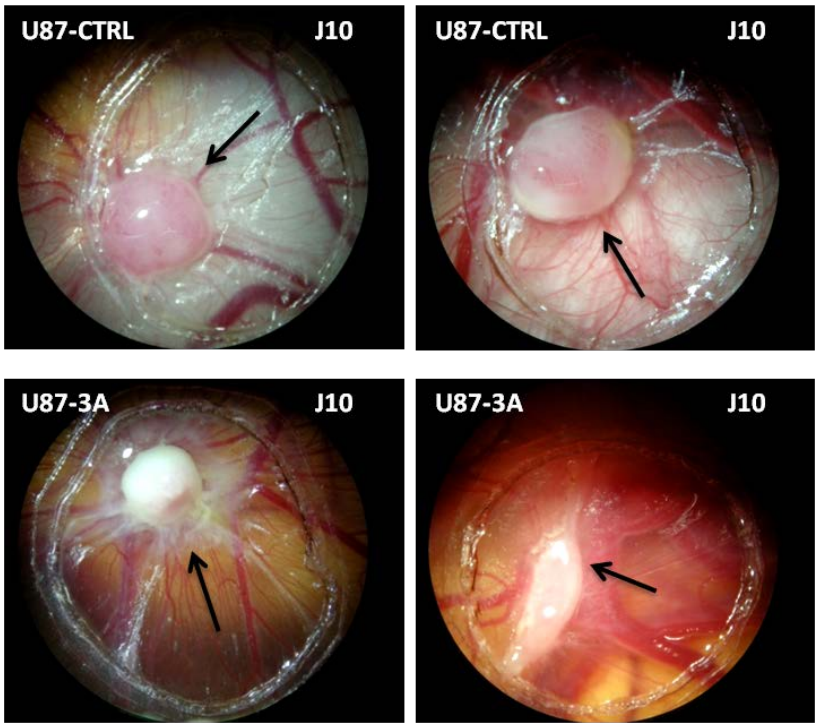


Figure 31: Visualisation de l'angiogenèse tumorale (J10)

Bien que les tumeurs U87-CTRL (vecteur vide) présentent les mêmes caractéristiques que les tumeurs U87, nous avons observé que les tumeurs U87-CXCR3A possèdent un phénotype hautement infiltratif. Ceci se traduit par la présence de nombreuses extensions partant de la tumeur primaire, voir même la formation de tumeur secondaire. De ce fait, nous avons effectué une analyse phénotypique plus approfondie à chaque jour du développement pour chaque tumeur (Figure 32). Dans les tumeurs contrôles, nous avons observé que l'angiogenèse tumorale débutait vers le 4ième jour après implantation, contrairement aux tumeurs CXCR3-A où nous avons observé un retard d'angiogenèse caractéristique de ces tumeurs. De plus, la mise en place de mécanismes invasifs à pu être visualisée dés les premiers jours après implantation des tumeurs (J2 après implantation), et ceci uniquement dans les tumeurs surexprimant le CXCR3-A. Nous avons retrouvé ce phénotype infiltratif dans 90% des tumeurs CXCR3-A, alors que pour les tumeurs contrôles, seulement 30 à 35% des échantillons présentaient de légères franges invasives.

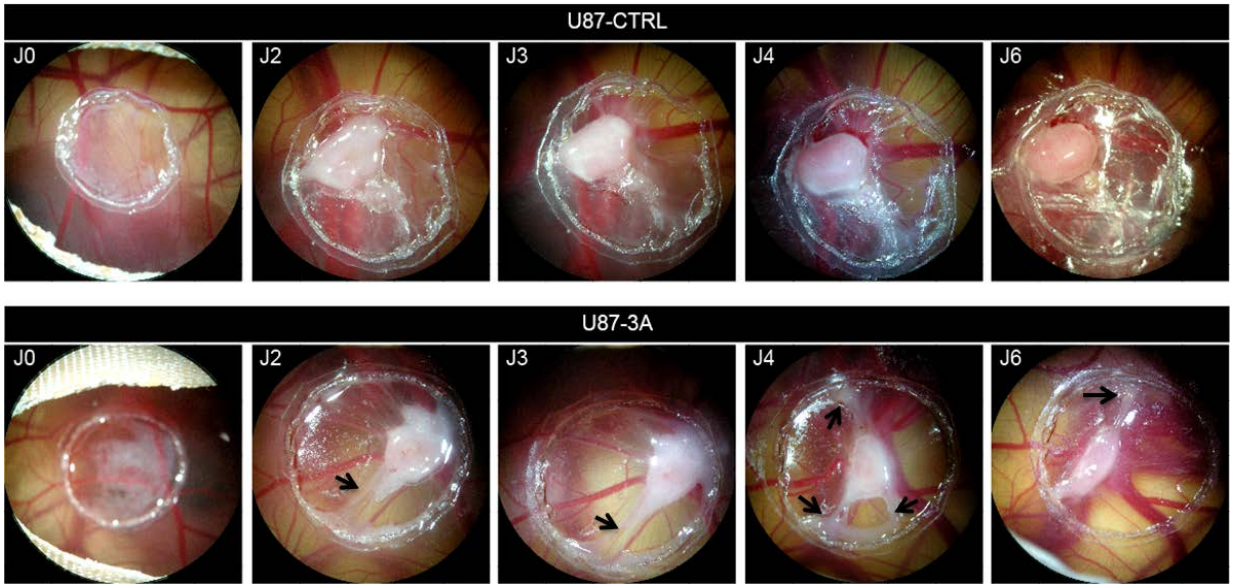


Figure 32: Observation journalière de chaque tumeur.

D. Caractérisation des tumeurs

1. Impact de CXCR3-A sur le phénotype infiltratif

Afin de compléter ces observations, nous avons extrait l'ARN et les protéines des échantillons de tumeurs, mais aussi réalisé différents marquages sur des coupes de CAM / tumeur. Tout d'abord, pour vérifier la surexpression du CXCR3-A humain, nous avons réalisé des qPCR sur les extraits d'ARN des différents échantillons. Nous avons constaté que la surexpression de CXCR3-A dans les cellules U87 *in vitro* est toujours présente *in vivo*. En effet, les tumeurs CXCR3-A expriment ce récepteur 1000 fois plus que les tumeurs contrôles (Figure 33).

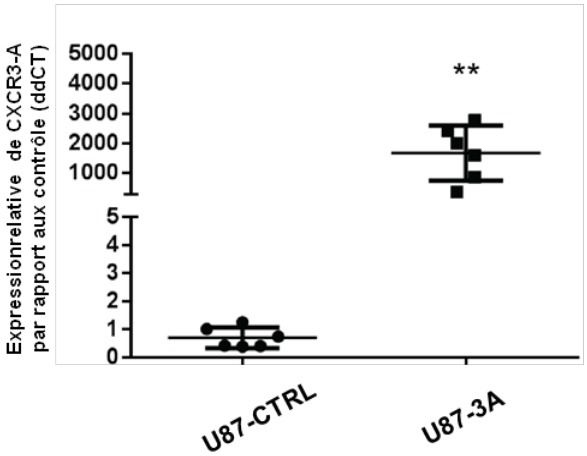


*Figure 33: Expression relative de CXCR3-A dans les tumeurs, rapportée aux tumeurs contrôles. ** = P-value < 0.002*

Nous avons également effectué des coupes de tumeur afin d'étudier la structure des tissus tumoraux. Les marquages H/E nous ont permis de voir que les tumeurs surexprimant CXCR3-A ont une structure tissulaire totalement désorganisée par rapport aux tumeurs contrôles denses (Figure 34 A et Figure 1 de l'article I). De plus, leurs tailles sont environ 2 fois plus petites (Figure 34 B). Le phénotype invasif a pu être retrouvé dans ces tumeurs avec l'observation des marquages H/E. En effet, on observe l'invasion des cellules tumorales dans la CAM, contrairement aux tumeurs contrôles (Figure 34 A et C).

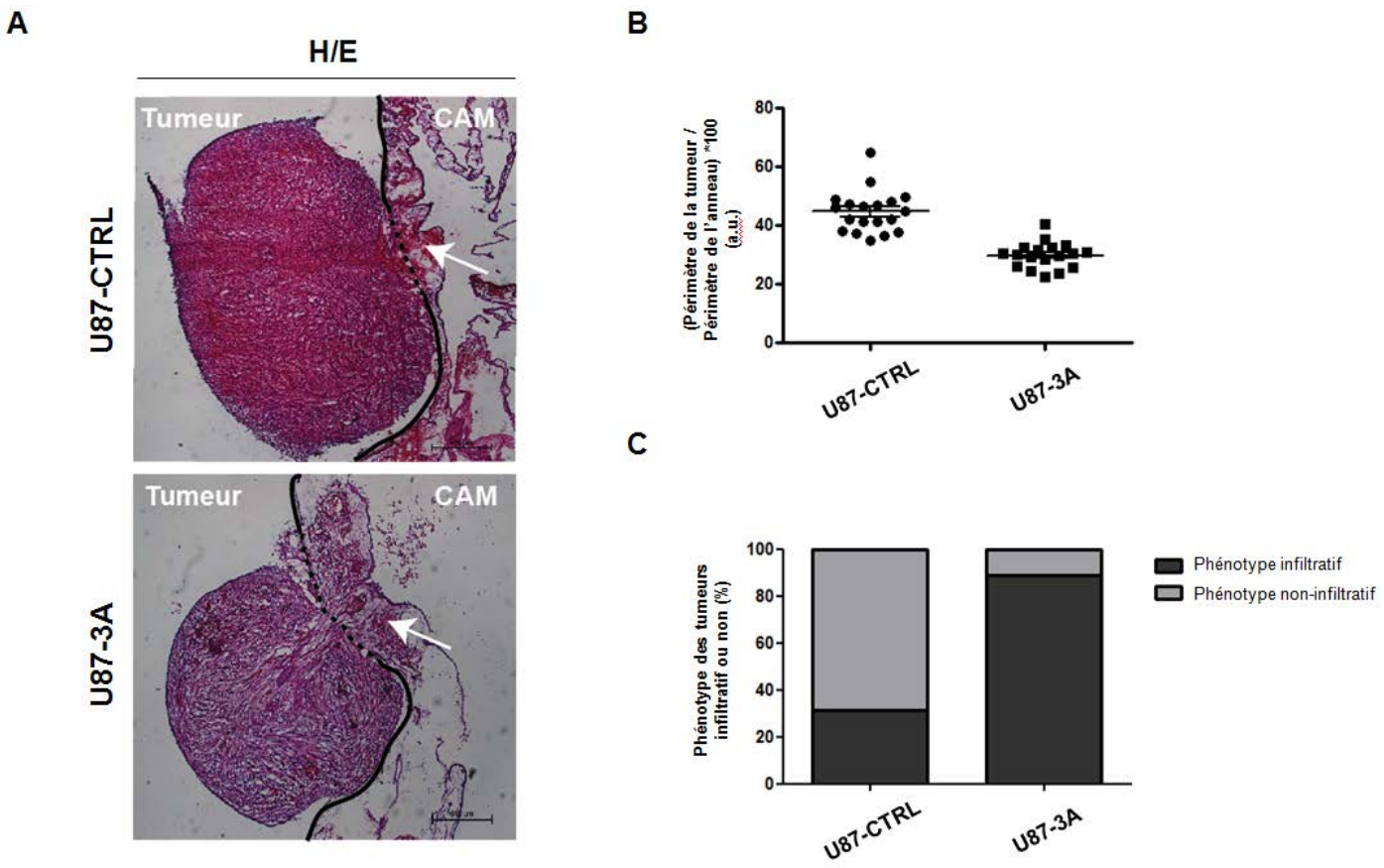


Figure 34: Analyse histologique des coupes de tumeurs

Nous avons par la suite réalisé des co-marquages avec un marqueur des cellules tumorales, la vimentine (Figure 35). Les résultats montrent clairement l'invasion des cellules tumorale dans la CAM dans les tumeurs U87-CXCR3A. Au contraire, la tumeur est extrêmement bien délimitée dans les tumeurs U87-CTRL. Ces résultats reflétent le phénotype infiltratif et invasif observé avec l'implantation

des tumeurs surexprimant le CXCR3A. On peut également observer l'aspect fusiforme des noyaux cellulaires, caractéristique de la migration cellulaire (Figure 35).

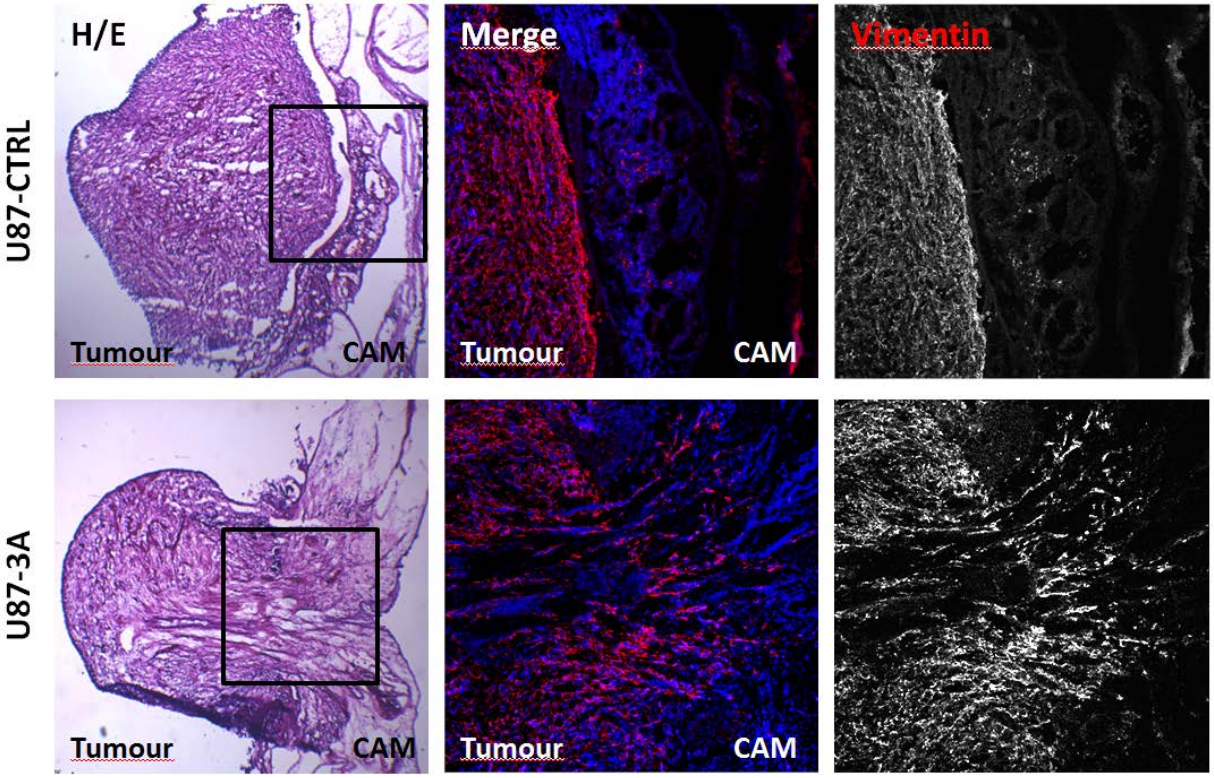


Figure 35: Marquage vimentine sur les coupes de tumeur implantées dans la CAM

En plus du phenotype infiltratif des tumeurs surexprimant le CXCR3-A, nous avons clairement pu observer un retard de l'angiogenèse tumorale. Les lectines sont des protéines capables d'interagir spécifiquement avec des saccharides pour former des liaisons non covalentes. Il a été montré qu'elles pouvaient fixer et marquer de manière spécifique les cellules endothéliales de l'embryon de poulet, ainsi que de la CAM elle-même (Jilani et al., 2003). De ce fait, nous avons réalisé des marquages lectines (*Sambucus nigra*) sur les coupes de tumeurs, afin de visualiser les vaisseaux sanguins tumoraux (Figure 36). Les premiers résultats montrent des changements dans l'organisation des vaisseaux sanguins et des cellules tumorales.

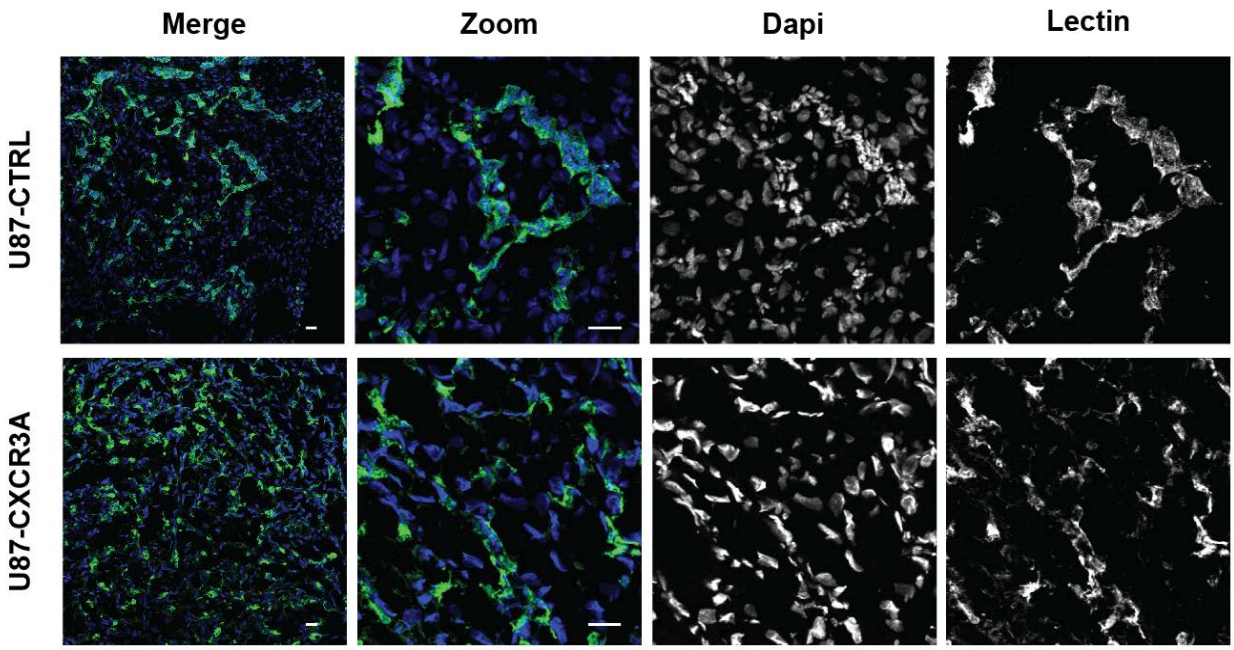


Figure 36: Marquage lectine sur coupe de tumeur implantée dans la CAM. Echelle : 50µm

Les noyaux des cellules tumorales, marqués par le Dapi, sont fusiformes lors de la surexpression du CXCR3-A contrairement aux cellules contrôles. Ceci est en accord avec le caractère migratoire et infiltratif observé précédemment après surexpression du CXCR3-A. Dans les tumeurs contrôles, les vaisseaux marqués par la lectine forment des través et les noyaux cellulaires y sont regroupés en amas. Au contraire, dans les tumeurs de U87-CXCR3A, bien que le marquage lectine soit de même intensité, les vaisseaux semblent moins définis, moins organisés et de plus petites tailles. Bien qu'il s'agisse de résultats préliminaires, on peut penser que le retard d'angiogenèse tumorale dans les tumeurs CXCR3-A pourrait être lié à la formation de vaisseaux de plus petites tailles, voir de vaisseaux non fonctionnels.

2. Impact de CXCR3-A sur l'expression des protéases

Au vu des résultats originaux sur le phénotype invasif des tumeurs U87-CXCR3A, nous nous sommes intéressés à l'expression des protéases telles que les MMPs, ou le système uPA. L'expression a été étudiée par qPCR sur les extraits membranaires, et leurs capacités protéolytiques ont été réalisées par gel de zymographie. Nous avons observé que les tumeurs U87-CXCR3A exprimaient deux

fois plus de MMP2 que les tumeurs contrôles, permettant d'expliquer leurs capacités invasives exacerbées (Figure 37 A). De manière intéressante, l'expression de MMP9 est au contraire bien plus élevé dans les tumeurs contrôles (de 20 fois), et se trouve presque absente dans les tumeurs U87-CXCR3A (Figure 37 A). La MMP9 est un composant essentiel du switch angiogènique dans les tumeurs, ce qui pourrait expliquer les différences de vascularisation des tumeurs (Bergers et al., 2000; Nakamura et al., 2007). Concernant uPA, nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression d'un facteur 2 dans les tumeurs U87-CXCR3A, comme pour la MMP2 (Figure 37 B). Ainsi, la surexpression de CXCR3-A permet de moduler l'expression de certaines protéases dans les tumeurs *in vivo*, pouvant expliquer les différences de phénotypes invasifs et angiogéniques observées.

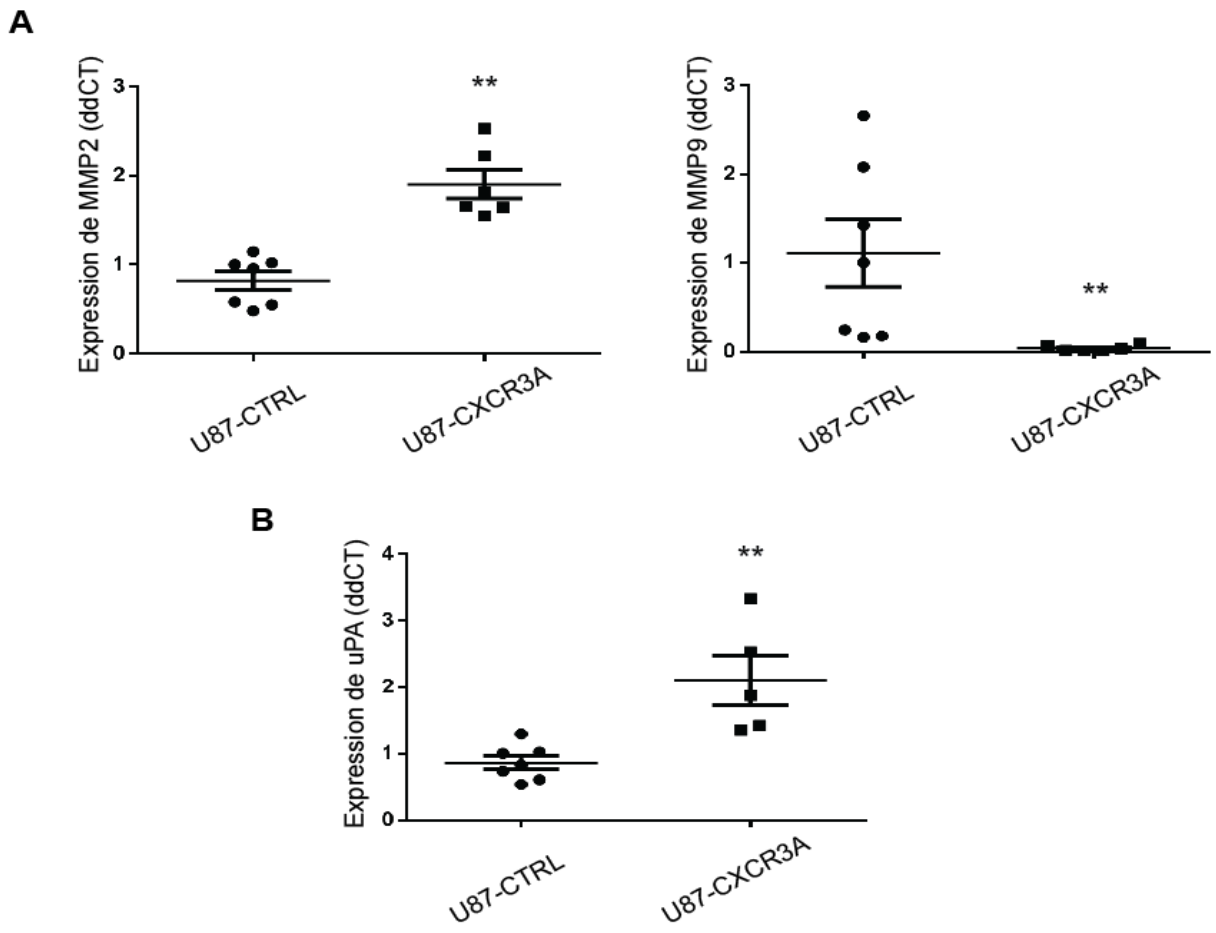


*Figure 37: Expression relative des protéases MMP2, MMP9 et uPA rapportées aux tumeurs contrôles. *** p-value < 0.002*

En plus de leurs expressions, nous avons regardé l'activité des différentes MMPs. Puisque les MMP2 et 9 sont des protéases de type gélatinase, nous avons effectué des zymographies sur gel de gélatine et analysé les bandes de dégradation de la gélatine en fonction des échantillons tumoraux. Nous avons pu confirmer l'absence d'activité de MMP9 dans les tumeurs U87-3A en comparaison aux tumeurs contrôles (Figure 38). De plus, l'activité de dégradation de la gélatine liée à la MMP2 active est plus importante dans les tumeurs U87-3A, ce qui corrèle bien avec les résultats sur l'expression des protéases.

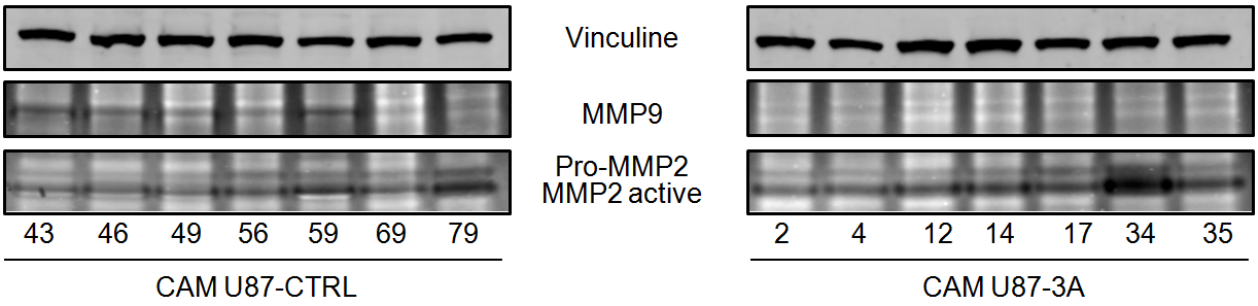


Figure 38: Zymographie de gélatine sur les tumeurs U87-CTRL et U87-CXCR3A implantées dans la CAM

L'augmentation de l'expression d'uPA et de la MMP2 observée dans les tumeurs surexprimant CXCR3-A favorise la migration et l'invasion tumorales. Nous avons également observé la formation de macro-métastases, uniquement dans les tumeurs U87-CXCR3A. Ces métastases se forment à des temps variables du développement, entre le 3ième jour et le 7ième jour après implantation et traduisent de l'activation des mécanismes d'invasions tumorales suite à la surexpression du CXCR3-A dans les tumeurs (Figure 39). Nous avons déterminé que sur les 23 échantillons totaux pour chaque condition, 31,81% des tumeurs U87-CTRL formaient des macro-métastases, contre 65,21% des tumeurs U87-CXR3A.

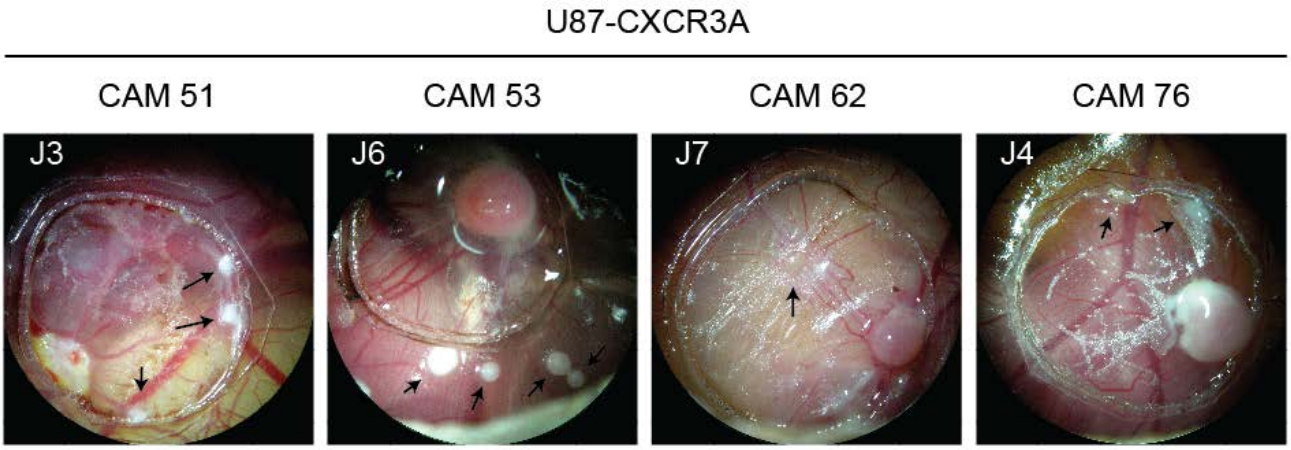


Figure 39: Formation de macrométastases dans les tumeurs U87-CXCR3A, à différents jours du developpement

V. Conclusions et perspectives

Nous avons montré que la surexpression de CXCR3-A induit une activation constitutive de la voie PI3K/AKT dans les lignées étudiées. Cette amplification de la phosphorylation d'AKT se fait même lorsque CXCR3 n'est pas actif suggérant qu'une autre protéine, ou un autre récepteur capable d'activer p110α, soit mis en jeu via le CXCR3-A. Cependant, cet intermédiaire de réaction n'est pas encore caractérisé. Nous savons qu'une des mutations fréquentes dans les glioblastomes (Omuro et al., 2007; Smith et al., 2001) est l'amplification du récepteur EGFR, et de son variant EGFR vIII. Ces mutations, non établies dans la lignée U87, sont spécifiques des glioblastomes *de novo*, et non des glioblastomes secondaires et entrainent une activation de la voie PI3K/AKT. De plus, le variant vIII induit une activation constitutive de la PI3K (Eskilsson et al., 2016; Sugawa et al., 1990). L'amplification de la phosphorylation d'AKT dans les cellules surexprimant le CXCR3-A pourrait donc être liée à une activation directe ou indirecte de l'EGFR. Nous nous sommes intéréssés à l'activation de la classe 1A de la PI3K car il est montré que la sous-unité p110α est dérégulée dans les glioblastomes ((Guerreiro et al., 2008; Höland et al., 2014; Iqbal et al., 2016). Cependant, l'activation de la classe 1B de la PI3K se fait spécifiquemennt par les GPCR. De ce fait, l'activation de la sous-unité p110γ, spécifique de la classe 1B de la PI3K, pourrait également être une cible expliquant

l'augmentation de la voie PI3K/AKT. Une autre hypothèse est que via son interaction avec le CXCR3-A surexprimé, la biodisponibilité cellulaire de LRP1 diminue, et sa capacité à fixer d'autres ligands s'en trouve impactée. Ainsi, la diminution de la biodisponibilité de LRP1 peut entrainer une dysfonction dans son rôle d'endocytose et de la dégradation des protéases telle que uPA, ce qui peut expliquer l'augmentation de la voie PI3K/AKT.

L'impact de l'expression de CXCR3-A a aussi été étudié *in vivo* sur le modèle de la CAM. Nous avons pu observer d'important changements phénotypiques suivant le niveau d'expression de CXCR3-A. Les expressions d'uPA et de MMP2, amplifiées dans les tumeurs U87-CXCR3A, corrèlent fortement avec le caractère pro invasif de ces dernières. De manière intéressante, il a été montré que la MMP9 est un composant essentiel du switch angiogénique dans les tumeurs (Bergers et al., 2000; Nakamura et al., 2007). Ainsi, la grande diminution de l'expression de MMP9 et son absence d'activité dans les tumeurs U87-CXCR3A pourraient expliquer le retard du switch angiogénique au sein de ces tumeurs, contrairement aux tumeurs contrôles qui expriment fortement MMP9. De ce fait, en modulant la balance d'expression de certaines protéases, la surexpression de CXCR3-A est impliquée dans l'angiogenèse et l'invasion tumorale. Via l'augmentation de l'expression de la MMP2 et de uPA, la surexpression de CXCR3-A apparait comme un inducteur des mécanismes d'invasion tumorale *in vivo.* De plus, via la diminution de l'expression de la MMP9, la surexpression de CXCR3-A semble être un régulateur négatif du switch angiogenique.

Nous avons pu vérifier la formation du complexe CXCR3/LRP1 *in vivo* (Article I), ce qui laisse penser au vue des résultats que LRP1 régule l'activité et le recyclage de CXCR3 dans le modèle de la CAM. Des expériences d'extinction de l'expression de LRP1 par utilisation de ShARN LRP1 sont en cours au laboratoire et vont nous permettre très prochainement d'effectuer une expérience in vivo avec les cellules U87-CTRL et U87-CXCR3A transfectées par des ShARN CTRL ou ShARN LRP1. LRP1 étant un acteur essentiel de la desensibilisation de CXCR3-A, son inhibition devrait entrainer une amplification de l'effet pro-tumoral de CXCR3-A, et qui devrait

se retrouver au niveau de l'expression des MMPs, d’uPA ou encore du phénotype invasif des tumeurs surexprimant le CXCR3-A.

Chapitre II : Différences d'activation des isoformes CXCR3-A et CXCR3-B, cas du CXCL4 et CXCL4L1

I. Objectif de l'étude

Bien que de nombreuses études, dont la nôtre, caractérise CXCR3-A dans la progression tumorale, l'implication de l'isoforme CXCR3-B se révèle aussi importante. En effet, chez l'humain, CXCR3-B est le principal récepteur par lequel les chimiokines ELR- exercent leurs activités angiostatiques. Malgré l'importance du type cellulaire et du microenvironnement dans lequel les isoformes sont exprimées, CXCR3-A est caractérisé comme pro-tumoral, alors que CXCR3-B serait plutôt anti-tumoral. La balance d'expression de ces deux isoformes est une donnée essentielle pour la progression et le développement tumoral. Ne différant que par leurs extrémités N-terminal, le recrutement des protéines G lié à l'activation des récepteurs est variable. CXCR3-A recrute les protéines Gi/o ou Gq et induit des voies pro-tumorales (Maru et al., 2008; Wu et al., 2012), alors que CXCR3-B recrute les protéines Gs, induit les voies pro-apoptotiques et inhibe la survie cellulaire (Kim et al., 2002). Via la formation du complexe agoniste / récepteur, le changement de conformation du GPCR permet le recrutement et l'activation spécifique de la protéine G qui sera associée.

L'objectif de cette étude est de caractériser les différences de conformation et d'activation des isoformes de CXCR3. Ceci afin de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents expliquant les fonctions opposées de ces isoformes. Pour ceci, une partie de l'étude a consisté à caractériser les différences de fixation et d'activation des isoformes de CXCR3 par les techniques biophysiques de PWR et de SPR

Comme expliqué dans l'article I, le PWR est une technique biophysique qui permet d'étudier en temps réel les interactions récepteurs / ligands, et les changements de conformation de ces récepteurs. Un laser va stimuler de manière continue des oscillations électromagnétiques. Ceci va s'effectuer dans un résonateur constitué d'une fine couche d'argent, sous une couche de silice plus épaisse, et fixée sur un prisme optique. Lorsqu'un laser polarisé illumine une interface entre deux

milieux d'indices de réfraction différents, une partie de l'onde est réfléchie (onde réfléchie) et l'autre est réfractée à travers la surface et va former une onde évanescente électromagnétique qui va décroitre et se disperser de manière exponentielle au niveau de l'interface silice/milieu extérieur. La résonance électromagnétique dépend de l'angle d'incidence du laser passant à travers le prisme. Les molécules fixées sur la face externe de la couche de silice vont entrer en interaction avec les ondes évanescentes et changer la résonance électromagnétique via des modifications de son amplitude, position et profondeur, on parle de spectre PWR (Figure 40). Contrairement à d'autres méthodes de résonance plasmonique comme la résonance plasmonique de surface (SPR), le PWR permet d'induire une résonance via une onde perpendiculaire à la surface d'argent/silice (onde P-polarisée), ou une onde parallèle à la surface d'argent/silice (onde S-polarisée). Ceci permet la caractérisation de l'orientation et des propriétés d'anisotropie des molécules, ainsi que les changements de conformation de ces dernières. De plus, le PWR permet de garder une grande sensibilité ainsi qu'une bonne résolution spectrale. Enfin, la silice permet de mettre en place de nombreuses stratégies de fixation de molécules sur le prisme.

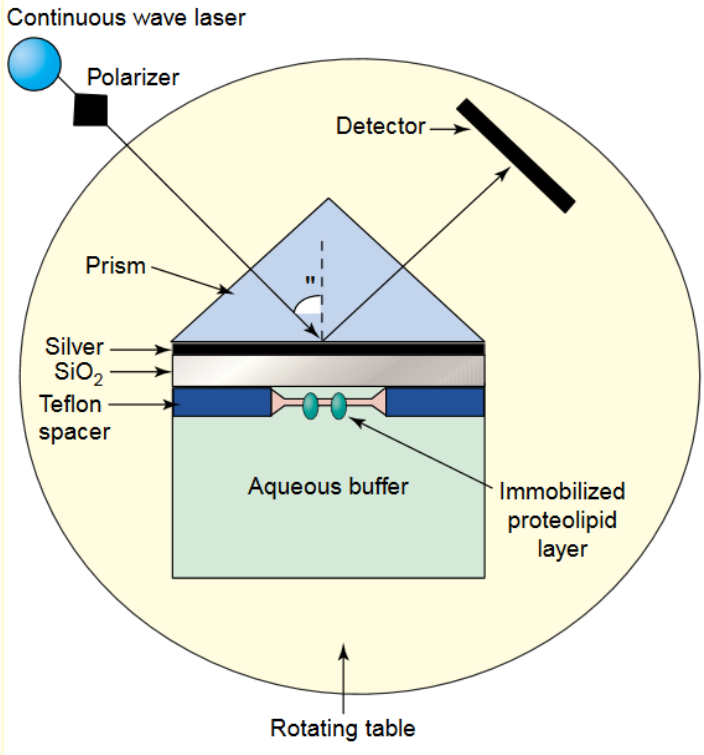


Figure 40: Principe du PWR, d'après Tolli G et al. 2003

SiO_2 : dioxyde de silicium

La résonance plasmonique de surface (SPR), pour sa part, est une technique biophysique permettant d'analyser et de quantifier des interactions entre deux protéines comme entre un ligand et son récepteur. Comme pour le PWR, lorsqu'une onde lumineuse monochromatique (onde incidente) illumine une interface entre deux milieux d'indices de réfraction différents, une partie de l'onde est réfléchie (onde réfléchie) et l'autre est réfractée à travers la surface (onde évanescente). Au niveau de cette interface, une fine couche d'or riche en électrons, elle-même recouverte d'une puce de dextran carboxyméthylé, a été déposée. Lors de la formation de l'onde évanescente, les photons vont entrer en résonance avec les électrons de la couche d'or et ceci se traduit par une diminution de l'intensité de l'onde réfléchie. Cette diminution induit un changement de l'angle de réfraction, appelé angle de résonance. Des interactions entre protéines présentes sur la puce de dextran et protéines présentes en solution provoquent un changement de masse et induisent un angle de résonance différent, ce qui est analysable et quantifiable.

II. Matériels et méthodes complémentaires

La plupart des matériels et méthodes ont été expliqués dans l'article I « *New insight into the internalization, recycling and activity of the CXC Receptor-3: Role of LRP1* ». Tous les matériels et méthodes supplémentaires sont décrits ci-dessous.

A. Marquage fluorescent des chimiokines

Le marquage a été réalisé avec le kit « Alexa Fluor® 546 Protein Labeling Kit » (Fisher Scientific, A10237) selon le protocole commercial. Le fluorophore contient un groupement d'ester de succinimidyl réagissant avec les amines primaires des protéines. Ceci permet la formation de complexes stable protéines / fluorophores. Les chimiokines ont été diluées à une concentration de 2mg/ml dans du PBS avec 0.1M de bicarbonate de sodium. Dans 500µL de cette solution, nous avons rajouté 50µL à 1M de bicarbonate de sodium afin d'élever le pH à des valeurs idéales pour le couplage avec l'ester de succinimidyl (pH 7,5 - 8,5). La solution protéique a alors été

ajoutée à la solution de fluorophore et mise sous agitation pendant 1h à température ambiante afin de favoriser le couplage entre les protéines et l'ester de succinimidyl. Par la suite, les protéines ont été purifié par centrifugation (1000g, 2 minutes) sur colone de résine (Thermo Fisher Scientific, 89890). Les protéines marquées ont été par la suite protégées de la lumière.

La concentration protéique a été determinée selon les instructions du kit « Alexa Fluor® 546 Protein Labeling Kit », en utilisant la formule suivante pour chaque chimiokine : Concentration = [(A_{280} - (A_{554} x 0,12)) x facteur de dilution] / (Coefficient d'extinction molaire de la protéine). A_{280} et A_{554} correspondant aux absorbances de la solution finale, 0,12 étant le facteur de correction correspondant à l'absorption du dye à 280nm, et le facteur de dilution étant necessaire si la solution de protéines fluorescente a été diluée avant de mesurer les absorbances. Le degrée de marquage des protéines par le fluorophore a aussi été determiné par la formule suivante : Mole (fluorophore) par mole (protéine) = (A554 x facteur de dilution) / (104000 x concentration protéique). 104000 correspondant au coefficient d'extinction molaire de l'Alexa Fuor® 546.

B. Etude par « time-lapse » microscopie

Les courtes microscopies « time-lapse » ont été réalisées sur un microscope confocale de type Nikon Ti Eclipse. Pour cela, les cellules ont été ensemmencées sur des boites de pétri de 35mm avec un fond en verre (MatTeck Corporation, P35G-1.5-14-C) et laissées 24h à 37°C et 5% CO_2. Les cellules ont par la suite été observées au microscope et des acquisitions de 5 minutes ont été réalisées. Les chimiokines marquées par l'Alexa 546 ont été injéctées directement dans le milieu de culture pendant les acquisitions à des concentrations de 100ng/ml pour le CXCL4L1 ou de 2µg/ml pour le CXCL4.

C. SPR

Les experiences de SPR ont été réalisées dans le laboratoire de Pr. Shih Che Sue à Taiwan (« *National Tsing Hua University* ») avec l'aide de Ya-Ping Chen. Les expériences ont été effectuées sur un appareil de type BIAcore 3000 (GE Healthcare). Les chimiokines CXCL4 et CXCL4L1 ont été fixées sur une puce de dextran carboxyméthylé (puce CM5, GE Healthcare). Pour cela, un couplage des résidus amines des lysines en N-terminale des chimiokines sur les groupements carboxyl de la puce de dextran (Figure 41).

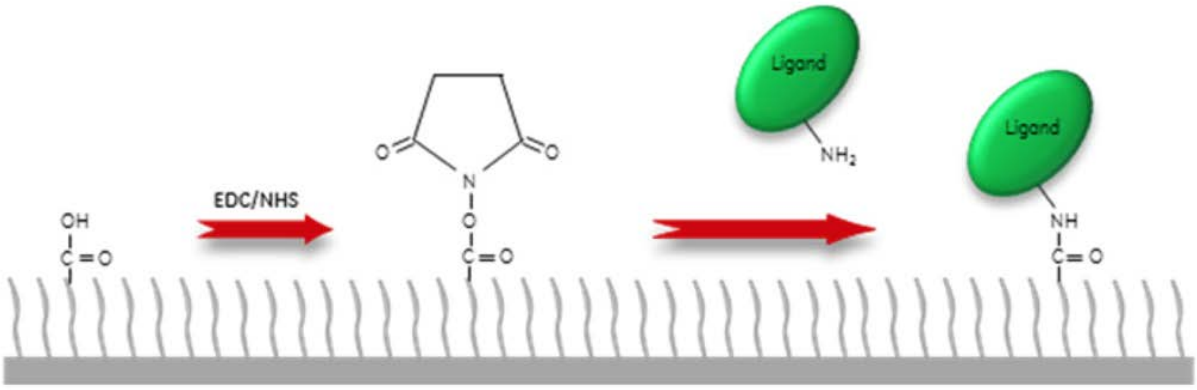


Figure 41: Couplage des chimiokines sur la puce de dextran carboxyméthylé

La puce de dextran carboxyméthylée sans fixation de chimiokine a été utilisée comme contrôle pour déterminer la fixation non spécifique des échantillons sur la puce. Différentes concentrations d'extraits cellulaires ont par la suite été injectées, via le BIAcore 3000, sur les puces présentant les chimiokines. L'injection a été effectuée à une vitesse de 3µL par minute dans une solution de PBS 3mM EDTA, afin de visualiser avec précision la fixation des extraits cellulaires sur les chimiokines CXCL4 ou CXCL4L1. Par la suite, la dissociation des complexes chimiokines / récepteurs à été réalisée par injection de PBS 3mM EDTA et 0,4% SDS à une vitesse de 100µL/min. La totale régénération des puces a été observée 5 minutes après injection de la solution de dissociation.

D. Mutagenèse dirigée du CXCL4

CXCL4 et ses différents mutants ont été clonés dans le vecteur pET-43.1a dans le laboratoire du Pr. Shih Che Sue à Taiwan (« *National Tsing Hua University* »). CXCL4-E28C a été généré en utilisant des amorces dans lesquelles le codon correspondant au glutamate 28 a été remplacé par une cystéine. Le monomère CXCL4-282931 (pour CXCL4 E28K V29P K31P) a été formé en substituant le glutamate 28 par une lysine, la valine 29 par une proline et la lysine 31 par une proline. Le monomère CXCL4-1-67 (pour CXCL4-E28K (1-67)) a été généré en introduisant un codon stop après le résidue 67 dans la séquence du mutant CXCL4-E28K. Les PCR ont été réalisées avec le kit de mutagenèse dirigé Quick Change (QuikChange Site-directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies).

CXCL4 et ses mutants ont été exprimés dans la bactérie Escherichia Coli (souche BL21, DE3), cultivée dans du milieu LB (Luria Bertani) avec 100 µg/ml d'ampicilline et à 37°C. Après 4h d'induction par 1mM d'IPTG (Isopropyl-thio-β-galactopyranoside), les bactéries ont été récoltées par centrifugation (6 000g, 20 min, 4°C) et conservées à -20°C, puis remises en suspension dans un tampon de lyse (50 mM de Tris-HCl pH 8,0, 0,5M NaCl). La lyse a été effectuée par pression mécanique (15 000 psi). Après centrifugation (16 000g, 30min, 4°C), le culot protéique a été repris dans un tampon de dénaturation (6M chlorhydrate de guanidine, 50mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl et 10 mM DTT) et mis sous agitation pendant 2h à température ambiante. La renaturation protéique a été effectuée par dialyse avec un tampon de renaturation (0,9 M chlorure de guanidine, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,5 M NaCl, 5 mM de cysteine et methionine), puis un tampon de fixation (50mM Tris-HCl pH 8,0 et 0,5M NaCl). Les aggrégats protéiques ont été éliminés par centrifugation et utilisation de seringue à filtre (0,22µm). La solution de protéine a été injectée dans une colonne d'affinité à l'héparine (système ÄKTA FPLC, GE Healthcare), équilibrée avec le tampon de fixation. Les protéines ont par la suite été éluée avec un tampon de 0,8 à 1,6M de NaCl, puis injectées dans une colonne de purification Séphacryl S-100 (ÄKTA, FPLC). La protéine éluée a été purifiée par HPLC (Beckman Coulter Inc.) sur colonne en phase inverse C18 (Phenomenex Inc.). Le poids moléculaire des protéines ont été vérifié par SDS-PAGE, et la pureté par spéctrométrie de masse MALDI-TOF.

III. Etude de fixation des chimiokines sur CXCR3 par PWR (« plasmon wavelength resonance »)

1. Fixation des extraits membranaires sur le prisme

Le senseur PWR (prisme BK7 fixé avec 50nm d'argent sous 460nm de silice) fut incubé 30minutes avec de la polylysine (0.1mg/ml) afin de favoriser la fixation d'extraits membranaires. Les fragments membranaires ont été fixés par pression mécanique et vérifiés par microscopie confocale (Figure 42). De manière logique, les fragments observés sont de taille plus petite que celle des cellules entières. La présence d'une couche d'argent sur le prisme empêche de visualiser l'adhésion des fragments membranaires. Afin de suivre la fixation des fragments membranaires sur le senseur PWR, la résonance de la lumière polarisée, ainsi que l'angle d'incidence de cette dernière ont été enregistrées avant et après fixation des fragments membranaires sur le prisme. Après fixation, on peut voir une diminution de la résonance minimale pour les deux polarisations S-pol et P-pol, traduisant d'une augmentation de masse liée à la fixation des extraits membranaires (Figure 42).

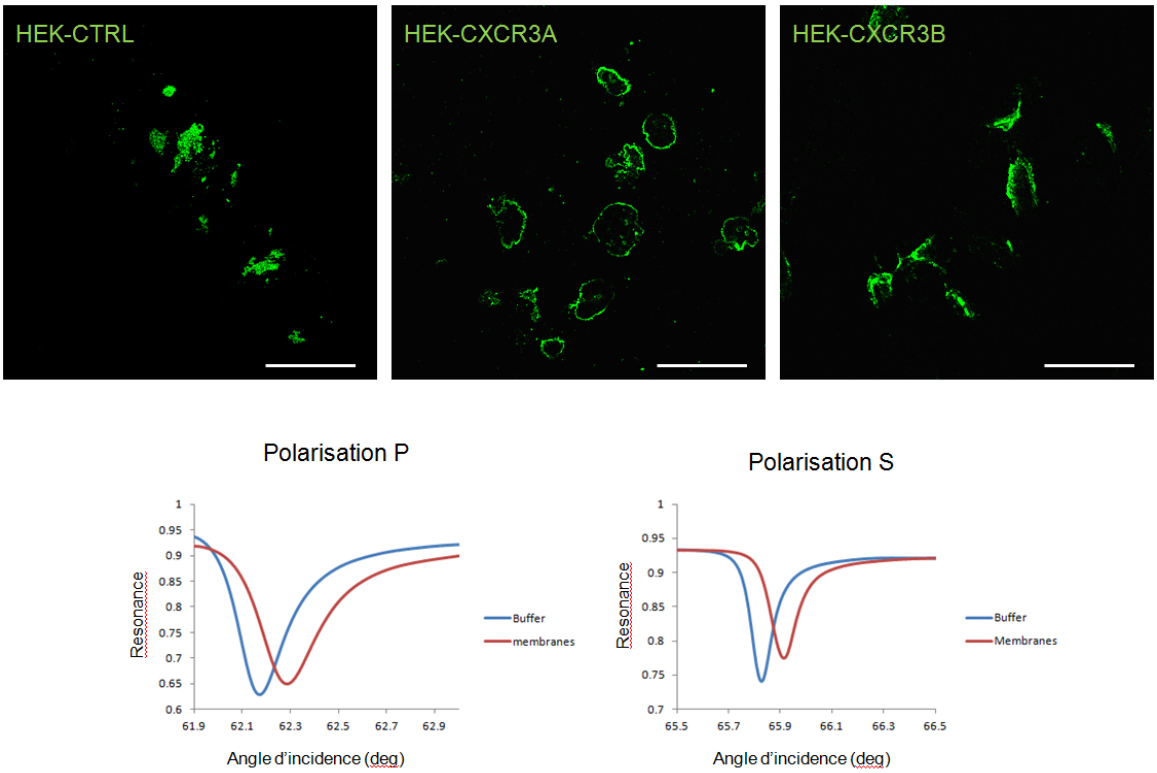


Figure 42: Fixation des extraits membranaires sur le prisme de PWR, visualisée par microscopie confocale ou par changement de masse PWR. Echelle : 50µm

2. Intéraction des chimiokines sur les isoformes de CXCR3

Des expériences de PWR ont été réalisées sur des extraits membranaires des cellules HEK-CTRL, HEK-CXCR3A ou HEK-CXCR3B fixées sur le prisme. L'ajout de l'agoniste commercial PS372424 sur les extraits membranaires des HEK-CXCR3A provoque des changements spectraux dans les deux polarisations S-pol et P-pol. Ces changements ont été bien plus marqués dans les différences de polarisation P-pol indiquant que la fixation du ligand sur le récepteur induit une réponse conformationnelle principalement selon l'axe perpendiculaire à la membrane (Figure 43, Table 8). De ce fait, nous avons calculé l'affinité de liaison du ligand au récepteur selon cet axe P-pol. Un KD d'environ 40nM a ainsi pu être déterminé pour l'interaction du PS372424 avec le CXCR3-A (Table 8).

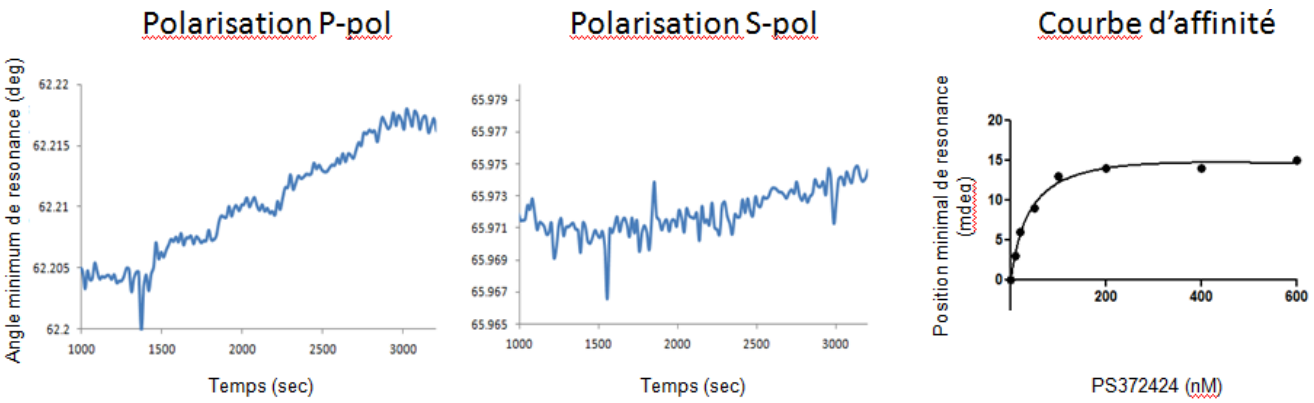


Figure 43: Changement de polarisation et affinité du PS372424 pour CXCR3-A

Fragment de membrane cellulaire	Changement P-pol (mdeg)	Changement S-pol (mdeg)	KD
HEK-CXCR3A	16 ± 2	4 ± 1	40 ± 10
HEK-CXCR3B	- 5 ± 1	-4 ± 1	450 ± 150
HEK-CTRL	0 ± 1	0 ± 1	No binding

Table 8: Changement de polarisation selon l'isoforme du CXCR3, et KD associée à la fixation du PS372424

L'ajout du PS372424 sur les extraits membranaires provenant des cellules HEK-CXCR3B induit, pour sa part, des changements spectraux totalement opposés à ceux observés avec les HEK-CXCR3A, en termes de résonance et de magnitude. En effet, pour les deux types de polarisation, des changements spectraux négatifs et

une faible magnitude ont pu être observés. Ces résultats indiquent que les changements de conformation de ce récepteur sont opposés à ceux de CXCR3-A suite à la fixation d'un même ligand. L'affinité entre le PS372424 et le CXCR3-B a été calculée selon les changements de polarisation des deux axes S-Pol et P-Pol, et se trouve être 10 fois inferieur à celle du CXCR3-A, avec un KD de environ 400nM (Figure 44, Table 8).

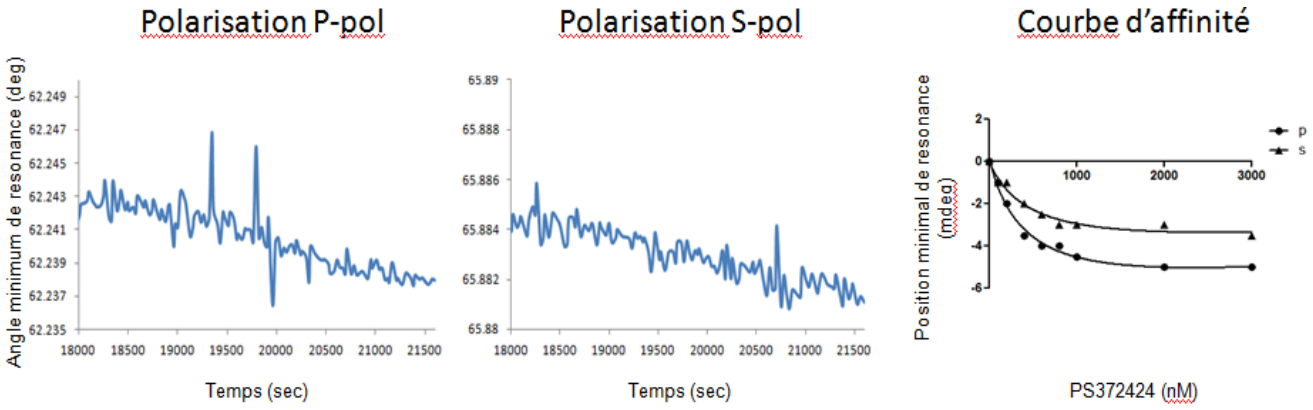


Figure 44: Changement de polarisation et affinité du PS372424 pour CXCR3-B

Enfin, l'ajout du PS372424 sur les extraits provenant des cellules HEK-CTRL, ne surexprimant pas le CXCR3, a permis de déterminer la fixation non-spécifique du ligand sur les membranes cellulaires. Les changements spectraux suivant l'ajout du ligand furent négligeables et en dessous de la résolution de l'appareil, nous permettant de conclure qu'aucune fixation ne se faisait dans cette lignée cellulaire contrôle (Figure 45, Table 8).

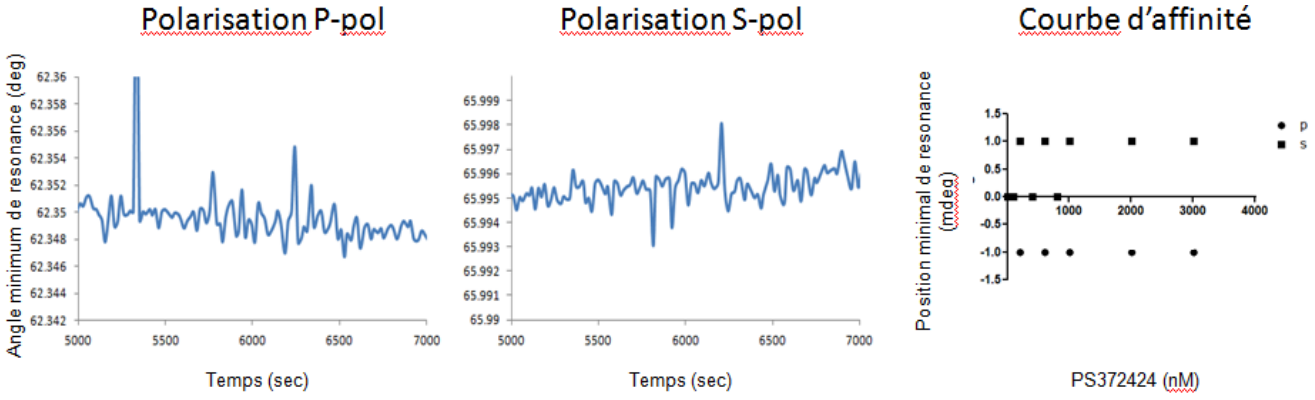


Figure 45: Changement de polarisation et affinité du PS372424 pour la lignée HEK-CTRL

Les polarisations P-Pol et S-Pol rendent compte des changements de conformation des récepteurs selon les axes perpendiculaire (P-Pol) ou parallèle (S-Pol) à la membrane. Ainsi, il est correct, dans le cadre de notre étude, de redéfinir ses polarisations en termes d'« allongement » du récepteur (onde P-Pol) et en termes d'« étalement » du recepteur (onde S-Pol) (Figure 46). De ce fait, nos resultats montrent que suite à une stimulation du récepteur par le PS372424, le CXCR3-A s'allonge sur la membrane (augmentation de la polarisation P-Pol), alors que le CXCR3-B se rétracte en diminuant son étalement et son allongement (diminution de P-Pol et S-Pol).

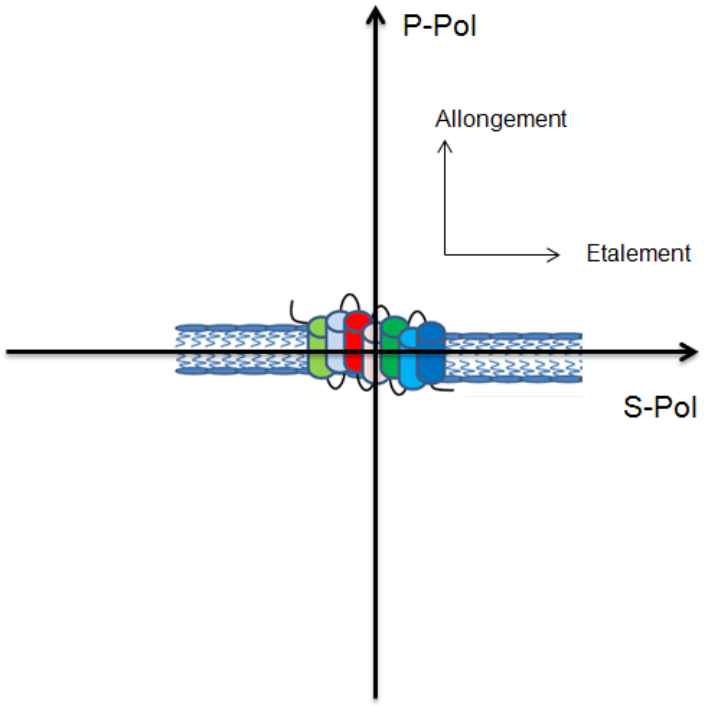


Figure 46: Notion d'étalement ou d'allongement de CXCR3 en fonction de l'onde polarisée PWR

IV. Les chimiokines CXCL4 et CXCL4L1

L'étude de la fixation des chimiokines ELR- sur le CXCR3-B a permis une meilleure compréhension de la façon dont ces chimiokines, et notamment CXCL4, exercent leurs effets angiostatiques sur les cellules endothéliales (Lasagni et al., 2003; Romagnani et al., 2001). Découvert plus récemment, la caractérisation du CXCL4L1 reste toujours incomplète. Les différences d'affinité pour l'héparine et les glycosaminoglycanes à la surface des cellules, ainsi que la biodisponibilité de ces

deux chimiokines (Dubrac et al., 2010) entrainent des effets angiostatiques bien plus importants pour le CXCL4L1 en comparaison au CXCL4. Les différences de présentation du CXCL4L1 sur les isoformes CXCR3-A ou CXCR3-B pourraient expliquer les différences fonctionnelles de ces deux chimiokines.

Les chimiokines sont capables de s'oligomériser afin de former des structures dimériques ou encore tétramériques. Bien que la forme monomérique est celle qui se lie aux récepteurs afin d'activer des voies de signalisation spécifiques et d'entrainer la migration cellulaire (Paavola et al., 1998), l'oligomérisation des chimiokines est essentielle *in vivo* pour maintenir les fonctions des chimiokines (Proudfoot et al., 2003). Cette oligomérisation pourrait notamment avoir un rôle important pour la circulation des chimiokines dans le sang ou pour leurs fixations aux glycosaminoglycanes (Dyer et al., 2015; Liang et al., 2016). Les interactions entre chimiokines et glycosaminoglycanes permettent de fixer et de présenter les chimiokines à leurs récepteurs. De plus, cette interaction pourrait elle-même favoriser l'oligomérisation des chimiokines par modification de leur orientation *in vivo* (Hoogewerf et al., 1997). Les glycosaminoglycanes, en fixant les chimiokines ou autres protéines du milieu extracellulaire, ont aussi un rôle de stockage et de préservation de ces protéines contre les protéases (Sadir et al., 2004). Les différences de fixation liées à l'état d'oligomérisation des chimiokines pourraient contribuer, en partie, aux interactions spécifiques de certains couples GPCR / chimiokine.

A. Intéraction préférentielle du CXCL4L1 avec l'isoforme CXCR3-A

La suite des résultats de ce chapitre font partie d'un papier en collaboration avec l'équipe du Pr. Shih Che Sue à Taiwan (« *National Tsing Hua University* »). L'article sera soumit courant Novembre 2016 dans « *The Journal of Biological Chemistry* »

1. Etude par vidéomicroscopie

Les chimiokines CXCL4 et CXCL4L1 furent produites, purifiées et couplées à un fluochrome (λ: 546nm) comme indiqué dans la partie matériels et méthodes. Des expériences de vidéomicroscopie et de "*time-lapse"* en microscopie confocale ont par la suite été réalisées sur les cellules HEK-CXCR3A (possédant le CXCR3-A couplé à la GFP, λ: 488nm) stimulées par les chimiokines CXCL4 ou CXCL4L1 fluorescentes. Aucune fixation entre le CXCL4 et le CXCR3-A n'a pu être observée sur les différentes expériences, en accord avec la littérature décrivant le CXCL4 comme ligand majoritaire du CXCR3-B (Lasagni et al., 2003; Romagnani et al., 2005) (Figure 47). Cependant, lors de l'ajout du CXCL4L1 sur ces cellules, nous avons pu mettre en évidence l'interaction entre le CXCL4L1 et le CXCR3-A dés les premières secondes de stimulation. Nous avons également observé le début de l'internalisation de certains complexes ligand/récepteur, sur le plan focal étudié, à partir de 3minutes de stimulation (Figure 47). Ceci est en accord avec nos résultats précédents, indiqués dans l'article I, où le CXCL4L1 active le CXCR3-A lors d'une stimulation de 5minutes.

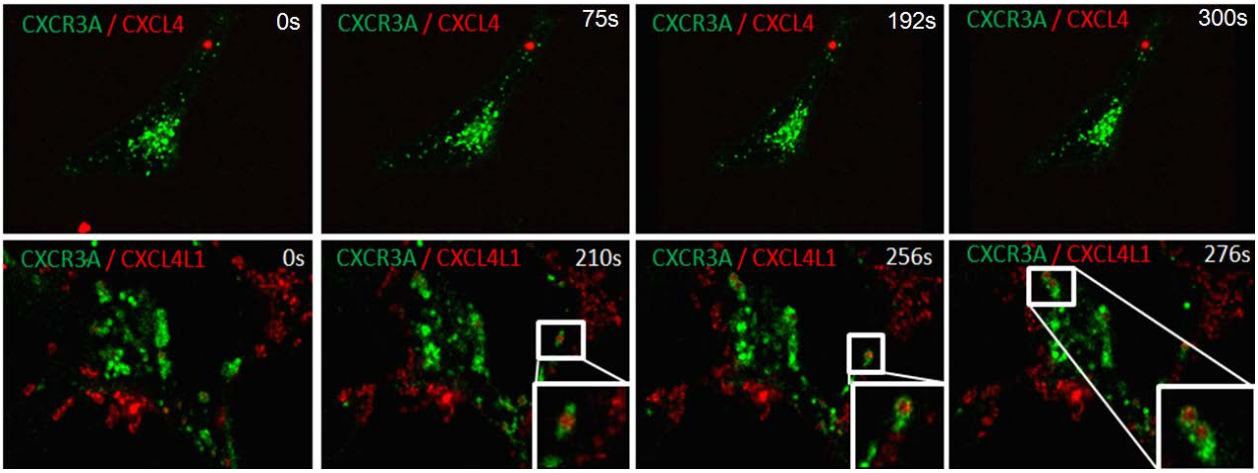


Figure 47: Vidéomicroscopie montrant l'interaction du CXCR3-A avec le CXCL4L1. CXCR3-A: 488nm; CXCL4 / CXCL4L1: 547nm

2. Etude par résonance plasmonique de surface

Nous avons réalisé la fixation de CXCL4 ou de CXCL4L1 sur la puce de SPR au laboratoire du Pr. Shih-Che Sue à Taiwan (Hsinchu) et des extraits membranaires des lignées surexprimant ou non le CXCR3-A ont été injectés en solution sur cette

puce. Nous avons injecté différentes concentrations cellulaires, et une très faible fixation a pu être mise en évidence dans la lignée HEK-CTRL, correspondant à la fixation non spécifique des extraits membranaires sur les couches d'or composées de CXCL4 ou de CXCL4L1 (Figure 48).

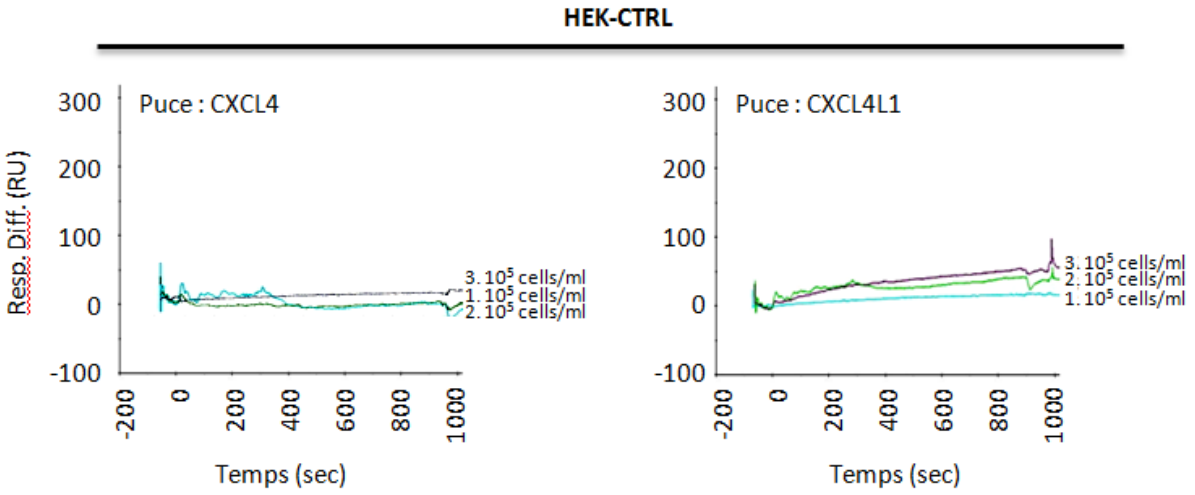


Figure 48: Etude de la fixation du CXCL4 et du CXCL4L1 sur les HEK-CTRL par SPR

Des injections d'extraits membranaires de la lignée HEK-CXCR3A sur cette même couche d'or ont également été réalisées. Seules les injections avec le CXCL4L1 sont capables d'induire des changements d'angles de résonance qui sont dépendants du nombre de cellules injectées (Figure 49). Ceci traduit donc la formation du complexe CXCL4L1 / CXCR3-A. De plus, l'absence de fixation du CXCL4 sur les extraits membranaires de HEK-CXCR3A laisse à penser que le CXCL4, caractérisé comme ligand du CXCR3-B, ne se fixe pas sur le CXCR3-A.

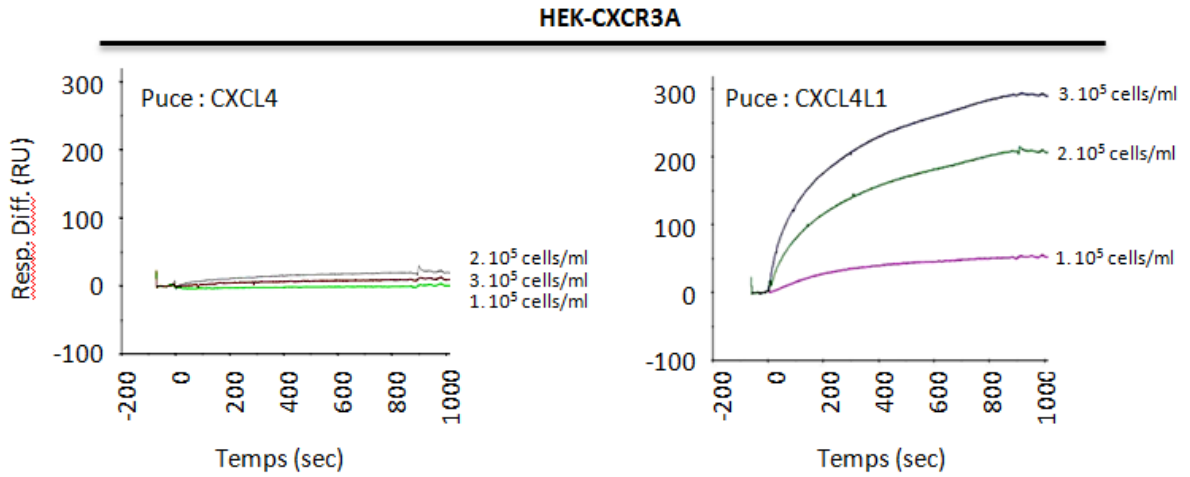


Figure 49: Etude de la fixation du CXCL4 et du CXCL4L1 sur les HEK-CXCR3A par SPR

Ces résultats démontrent la fixation du CXCL4L1 au CXCR3-A, contrairement au CXCL4 qui ne s'y fixe pas. Les expériences ont été répétées sur les lignées cellulaires U87-CTRL ou U87-CXCR3A. Les mêmes résultats ont ainsi pu être reproduits sur ces lignées tumorales, confirmant la fixation de la chimiokine CXCL4L1 sur l'isoforme CXCR3-A (Figure 50 et 51). Ainsi, nos experiences suggèrent que CXCL4 ne se fixe pas au CXCR3-A dans les deux lignées, contrairement au CXCL4L1 où la fixation avec CXCR3-A a pu être observée. Ceci est en accord avec nos résultats de vidéomicroscopie préalablement présentés, et suggère des différences d'affinité ou de présentation de ces deux chimiokines avec les différentes isoformes de CXCR3.

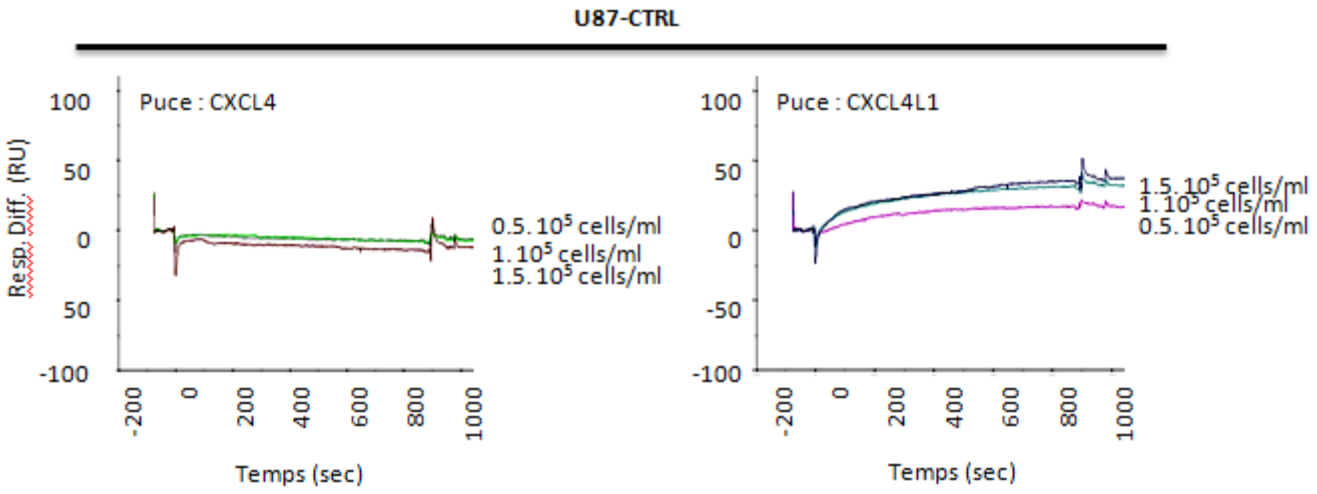


Figure 50: Etude de la fixation du CXCL4 et du CXCL4L1 sur les U87-CTRL par SPR

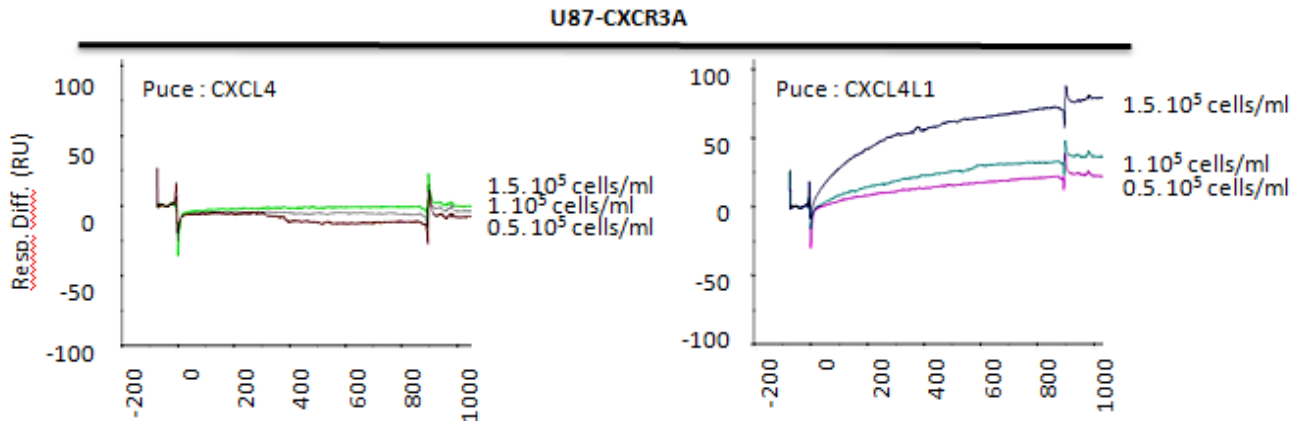


Figure 51: Etude de la fixation du CXCL4 et du CXCL4L1 sur les U87-CXCR3A par SPR

B. Activation de CXCR3-A par CXCL4 et CXCL4L1

Suite à nos différents résultats, nous avons voulu approfondir nos connaissances sur l'activation de CXCR3 par le CXCL4 et le CXCL4L1. Par expérience de SPR, nous avons démontré que le CXCL4L1 se fixait sur le CXCR3-A, contrairement au CXCL4. De ce fait, des western-blots de la voie des MAPK/ERK ont été réalisés dans les lignées surxprimant le CXCR3-A afin d'étudier l'activation de CXCR3-A (Figure 52).

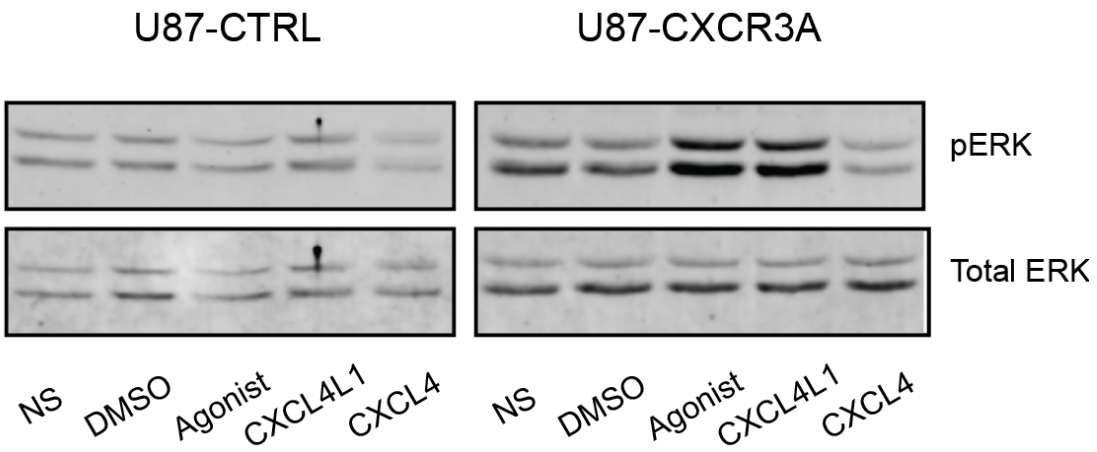


Figure 52: Impact de la stimulation par différentes chimiokines sur les lignées surexprimant ou non le CXCR3-A Stimulation de 5 minutes pour chaque condition.

Après 5 minutes de stimulation avec l'agoniste de CXCR3, nous avons observé la phosphorylation des MAPK/ERKs uniquement pour les lignées surexprimant CXCR3-A, ce qui est en accord avec nos résultats de l'article I. CXCL4L1 est capable de stimuler fortement l'activité du CXCR3-A. CXCL4, pour sa part, n'entraine pas de stimulation du récepteur dans les lignées. Ainsi, en plus de se fixer à l'isoforme CXCR3-A, le CXCL4L1 permet d'activer ce récepteur et d'induire les voies de signalisation spécifiques de ce dernier. Au contraire, le CXCL4, ne se fixant pas sur le CXCR3-A n'induit pas l'activation de cette voie de signalisation.

C. Impact de l'oligomerisation des chimiokines sur l'activation des récepteurs

1. Changement d'oligomérisation du CXCL4 par mutation

Comme expliqué en introduction de ce chapitre, l'état d'oligomérisation des chimiokines est un phénomène important pour la fixation des chimiokines aux glycosaminoglycanes et pour l'activation de leurs récepteurs. En collaboration avec l'équipe de Pr. Shih-Che Sue à Hsinchu (Taiwan), des mutants pour l'état d'oligomérisation du CXCL4 ont été générés. L'équipe a montré que l'acide glutamique 28 (E28) était essentiel pour l'oligomérisation du CXCL4. Ainsi, différentes mutations de cette acide aminé ont été effectuées et ont aboutit à la formation de CXCL4 stabilisé sous différents états d'oligomérisation: tétramère, dimère ou monomère (Table 9).

Chimiokines	Nom	Oligomerisartion
CXCL4	CXCL4	Tetramère
CXCL4 E28C	E28C	Dimère
CXCL4 E28K	E28K	Monomère
CXCL4 E28K-V29P-K31P	282931	Monomère
CXCL4 E28K (1-67aa)	1 67	Monomère

Table 9: Mutation du CXCL4 et changement de l'état d'oligomérisation en solution

2. Impact des mutants CXCL4 sur l'activation du CXCR3-A

Nous avons testé l'activité de ces différents mutants sur les lignées cellulaires. Premièrement sur les lignées U87, nous avons réussi à mettre en évidence que la stabilisation du CXCL4 sous forme monomère entrainait une stimulation de la voie MAPK/ERK, contrairement à sa forme sauvage, tétramérique. Certains mutants de CXCL4 sous forme monomère parviennent à une augmentation de la phosphorylation des ERKs comme celle obtenue avec le CXCL4L1 (Figure 53). Les mutations du CXCL4 permettant de le maintenir sous un état de monomère entrainent donc un changement dans possiblement la fixation et donc l'activation du

CXCR3-A. Ces résultats montrent que la forme monomérique du CXCL4 est capable de stimuler l'activité du CXCR3-A, et suggère que le CXCL4 monomérique se comporterait comme le CXCL4L1 en se fixant sur le CXCR3-A (Figure 53).

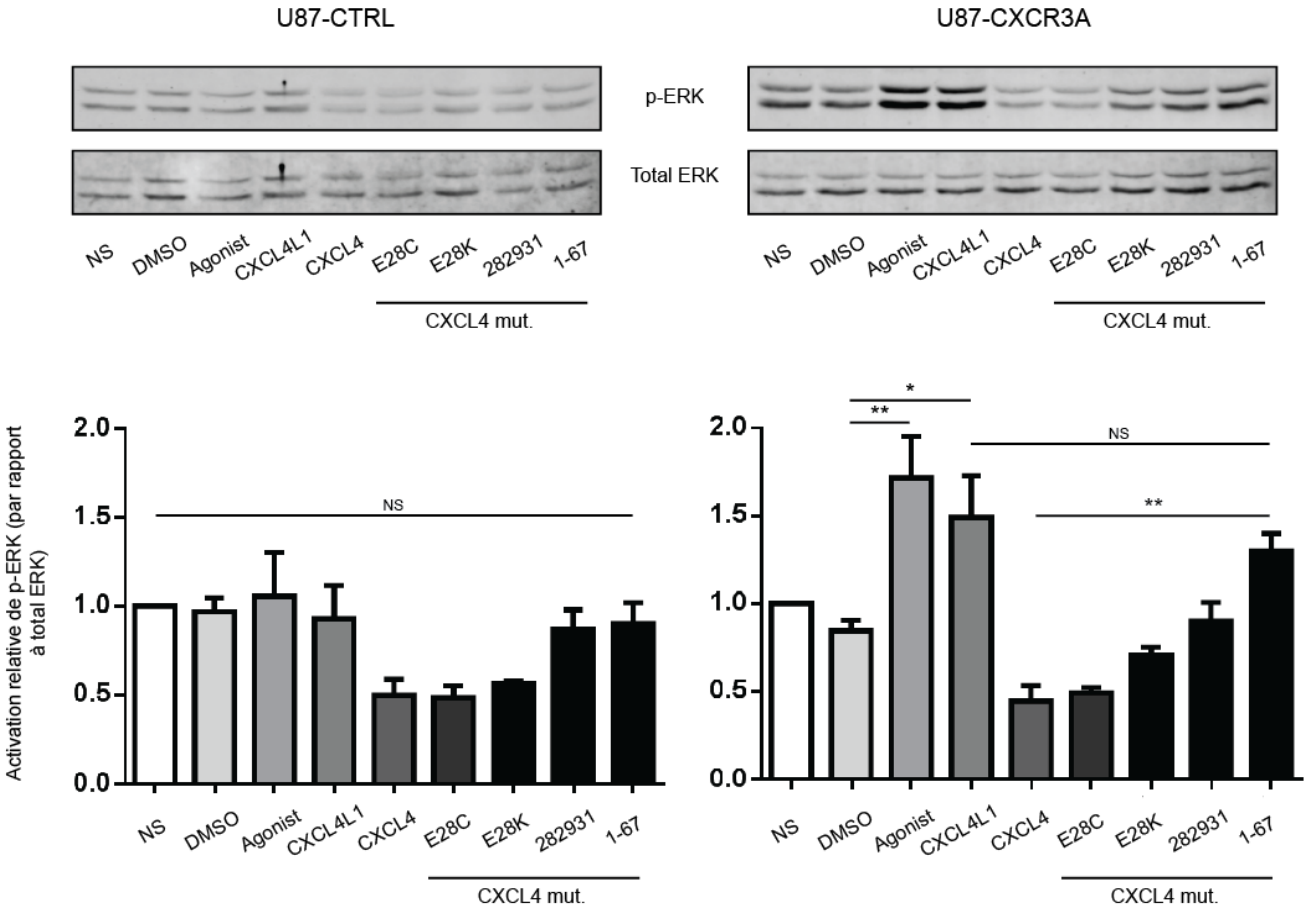


Figure 53: Impact du changement d'oligomérisation du CXCL4 sur l'activation de CXCR3-A. Stimulation de 5 minutes pour chaque condition.

D. Activation du CXCR3-B par CXCL4 et CXCL4L1

Aucune fixation entre le CXCL4 et le CXCR3-A n'a pu être mise en évidence ni par vidéomicroscopie, ni par SPR, et n'entraine pas de stimulation des voies de signalisation de cette isoforme. Cette chimiokine ayant été caractérisée pour fixer le CXCR3-B, nous avons fait des expériences de stimulation de l'isoforme CXCR3-B pour vérifier l'activité du CXCL4. L'isoforme CXCR3-B induisant des signaux

apoptotiques et anti-prolifératifs (Datta et al., 2010; Petrai et al., 2008), le clonage de cette isoforme n'a pas encore aboutit au laboratoire dans la lignée U87. Nous avons donc réalisé les expériences de stimulation par le CXCL4 sur les lignées HEK-CXCR3B. Nous avons pu mettre en évidence que la surexpression de CXCR3-B entrainait une stimulation constitutive de la voie pro-apoptotique MAPK/P38 (Figure 54). Nous avons montré que la stimulation au CXCL4 active la phosphorylation de P38 (Figure 54). Ceci est en accord avec des études montrant que l'effet angiostatique de CXCR3-B est liée à l'activation de la voie MAPK/P38 (Petrai et al., 2008). De manière intéressante, la stimulation de ces cellules par le CXCL4L1 n'a pas aboutit à l'activation de la voie P38. Nos expériences suggèrent donc que le CXCL4 serait un activateur spécifique du CXCR3-B, alors que CXCL4L1 serait un activateur spécifique du CXCR3-A.

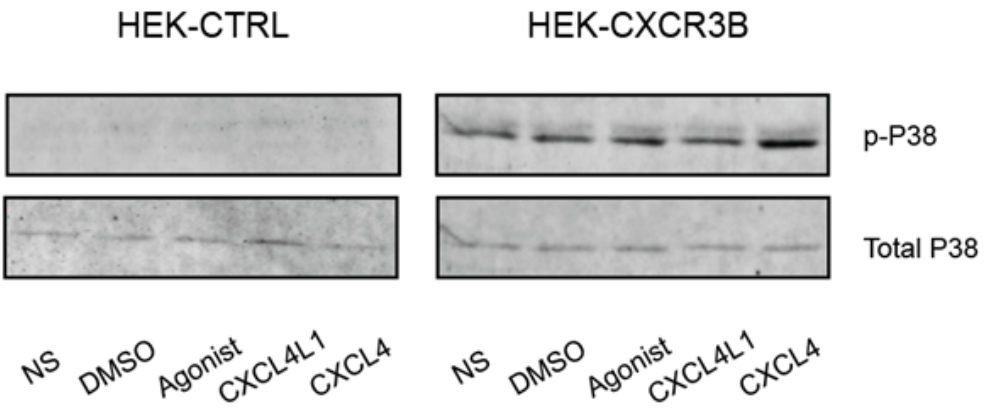


Figure 54: Impact de la stimulation par différentes chimiokines sur les lignées surexprimant ou non le CXCR3-B. Stimulation de 5 minutes pour chaque condition

Suite à ces résultats suggérant des intéractions préférentielles entres le CXCL4 et son variant CXCL4L1 avec les deux isoformes CXCR3-A et CXCR3-B, nous avons étudié l'impact de ces différents mutants de CXCL4 sur le CXCR3-B (Figure 55). Les premiers résultats suggèrent que les mutants activent moins efficacement le CXCR3-B, notamment pour certains mutants monomériques du CXCL4.

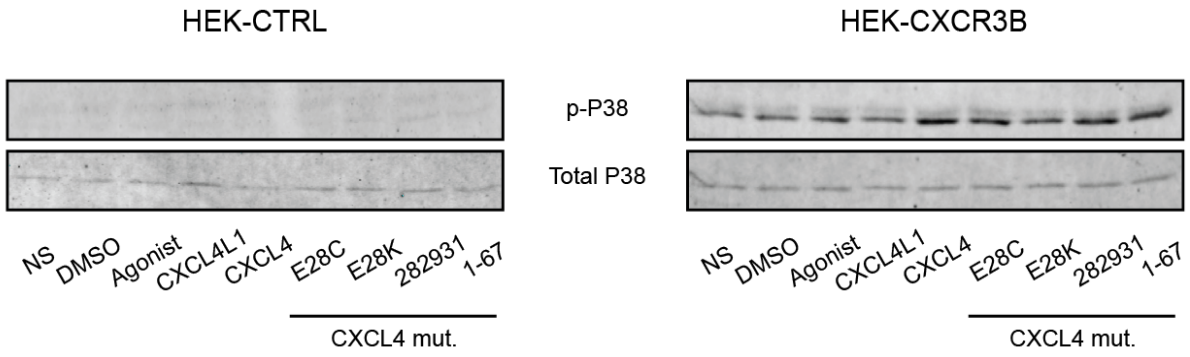


Figure 55: Impact du changement d'oligomérisation du CXCL4 sur l'activation de CXCR3-A. Stimulation de 5 minutes pour chaque condition

V. Conclusions et perspectives

Les différentes collaborations mises en place dans notre groupe nous ont permis de mieux caractériser les propriétés biophysiques et les différences d'activations des isoformes CXCR3-A et CXCR3-B. Nous avons montré que les agonistes de CXCR3 pouvaient se fixer avec des affinités différentes sur les récepteurs. Notamment l'agoniste commercial de CXCR3, le PS573434, se fixe préférentiellement sur le CXCR3-A, mais aussi sur le CXCR3-B avec une affinité 10 fois inférieure. La mise en place du PWR sur extraits membranaires nous a permis d'étudier spécifiquement les changements de conformation des deux isoformes. De manière extrêmement intéressante, en plus des différences d'affinités, le PS573434 n'induit pas les mêmes changements conformationnels selon les isoformes du CXCR3, ces changements se trouvent même être opposés dans les spectres PWR. De tels changements dans les réponses des isoformes traduisent des différences déjà reconnues dans la réponse des isoformes après fixation du ligand. Ceci peut notamment expliquer le recrutement differentiel de protéines G entre CXCR3-A et CXCR3-B, et ainsi l'activation de voies de signalisation opposées.

De manière générale, le CXCR3 fixe les chimiokines ELR- que sont CXCL4, CXCL4L1, CXCL9, CXCL10 et CXCL11. L'étude est complexe du fait de la présence des isoformes d'épissage CXCR3-A et CXCR3-B possédant des voies de

signalisation opposées. Nos résultats PWR mettent en évidence que les mêmes ligands vont agir avec des affinités différentes sur les isoformes, et surtout que la réponse du ligand sera différente selon l'isoforme présente dans la cellule. L'agoniste PS573434 stimule le CXCR3-A et ainsi active les voies pro-tumorales et pro-prolifératives, via le recrutement des protéines Gα-i/o ou Gα-q. Nous savons désormais que l'agoniste peut aussi stimuler le CXCR3-B et ainsi activer ces voies de signalisation anti-tumorales et anti-angiogeniques, via le recrutement des protéines Gα-s. Il serait important de tester tous les ligands de CXCR3 en PWR pour déterminer leurs Kd avec chaque isoforme de CXCR3, et d'étudier les différences de conformation et d'activation de ces isoformes.

Contrairement au CXCL4, l'isoforme de CXCR3 activée lors d'une stimulation au CXCL4L1 est peu caractérisée. Les expériences de vidéomicroscopie et de SPR réalisées à Taiwan nous ont permis de conclure que le CXCL4L1 interagit avec CXCR3-A. Une interaction suivie d'une internalisation du complexe ligand/récepteur a pu être visualisée par vidéomicroscopie. De manière logique, nous avons montré que CXCL4L1 stimule des voies de signalisation du CXCR3-A associées aux MAPK/ERK. Au contraire, CXCL4 ne se fixe pas et n'active pas CXCR3-A. Nous avons pu vérifier que le CXCL4 entrainait une stimulation des voies liées au CXCR3-B comme la voie MAPK/P38. L'oligomérisation des chimiokines étant un processus essentiel pour leur activité, des mutants du CXCL4 présentant des défauts dans leur tétramérisation ont été réalisés nous permettant d'obtenir du CXCL4 sous forme de dimère ou de monomère en solution. Lors des stimulations des isoformes de CXCR3, nous avons observé que certains des mutants sous forme de monomère de CXCL4 entrainaient une stimulation des voies de signalisation MAPK/ERK du CXCR3-A, se comportant ainsi comme le CXCL4L1. En vérifiant l'activation de la voie MAPK/P38, les premiers résultats montrent que les mutants stimulent cette voie via le CXCR3-B par rapport aux conditions contrôles, mais de manière moins importante que par rapport au CXCL4 tétramérique. Le changement d'oligomérisation du CXCL4 permettrait donc de changer les affinités de fixation de cette chimiokine sur les isoformes CXCR3-A ou CXCR3-B. Des mutations du CXCL4L1 sont actuellement en cours de préparation et de caractérisation. Il sera très intéressant de voir si les changements d'oligomérisation du CXCL4L1 entrainent des modifications dans la

fixation et les affinités avec les deux isoformes de CXCR3. De plus, des expériences de SPR, voir même de PWR avec les différentes chimiokines et mutants nous permettraient de déterminer précisément leurs constantes d'affinités avec le CXCR3-A ou CXCR3-B.

Chapitre III : CXCR3-A et CXCL4L1 comme potentielles cibles thérapeutiques

I. Introduction et objectifs de l'étude

De part leurs différentes fonctions comme le recrutement leucocytaire sur le site tumoral, l'angiogenèse tumorale ainsi que les fonctions biologiques liées à la prolifération, la survie cellulaire et l'invasion, les chimiokines jouent un rôle important dans le développement tumoral.

La dualité des isoformes de CXCR3 font de lui un récepteur de plus en plus étudié. En effet, bien que CXCL4 et CXCL4L1 soient largement décrits comme angiostatiques, anti-prolifératifs et pro-apoptotiques (Maione et al., 1990; Struyf et al., 2004, 2007; Van Raemdonck et al., 2014; Vandercappellen et al., 2010), l'étude du rôle et des fonctions de CXCR3-A mettent à jour les propriétés pro-tumorales que peuvent avoir ces chimiokines. De ce fait, le profil et la balance d'expression de ces isoformes modulent grandement la réponse de leurs ligands sur le développement tumoral. Au vu des résultats originaux obtenus et présentés précédemment, l'inhibition de CXCR3-A ou de ses ligands spécifiques comme le CXCL4L1 pourrait jouer un rôle déterminant dans la progression tumorale.

De nos jours, le cancer du pancréas fait partie des cancers les plus meurtriers et les plus agressifs. Le pancréas est une glande amphicrine composé de deux grands types de tissu, exocrine et endocrine. Le tissu exocrine, composé de cellules regroupées en unité fonctionnelle appellée acini, contribue à la synthése et à la libération du suc pancréatique, riche en protéases et autres enzymes aux fonctions digestives. Le tissu endocrine est, pour sa part, composé de cellules formant les îlots de Langherans qui synthétisent et libérent les hormones essentielles pour l'homéostasie glucidique.

Du fait de la nature amphicrine du pancréas, on distingue deux grands types de cancer : les tumeurs exocrines qui représentent 85% des cancers du pancreas, et les tumeurs endocrines qui représentent 15% des cancers du pancréas. Parmi les

85% des tumeurs exocrines, l'adénocarcinome pancréatique canalaire, ou PDAC (« *Pancreatic Ductal AdenoCarcinoma* »), constitut 90% des cancers du pancréas. Selon l'Institut National contre le Cancer (INCA), en plus d'être les cancers du pancréas les plus représentées, les PDAC sont aussi les plus meurtiers, faisant d'eux la 4ième cause de décès par cancer dans les pays industrialisés. En effet, le taux de mortalité des PDAC étant très élevé, la survie à 1 an est de l'ordre de 20/25% des patients, et la survie à 5 ans est d'environ 5%. L'opération chirurgicale n'est envisagée que si la taille, la localisation et l'état général du patient le permettent et induit une amélioration du taux de survie à 5 ans à environ 20% (Koorstra et al., 2008). Deux médicaments servent actuellement au traitement du cancer du pancréas, la gemcitabine (Gemzar®) et l'erlotinib (Tarceva). Bien que ces traitements puissent entraîner des effets bénéfiques pour certains patients, ils ne sont pas considérés comme curatifs. La recherche de biomarqueur se trouve être, comme pour le cas des glioblastomes, primordiale afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques, ou pour faciliter un dépistage précoce de ce cancer.

CXCL4L1 présente une activité inhibitrice sur la croissance des vaisseaux beaucoup plus élevée que celle du CXCL4 (Struyf et al., 2004). Comme pour CXCR3, l'implication de cette chimiokine dans la progression tumorale et les mécanismes d'actions de cette dernière sont encore peu connus. Cependant, une inhibition du développement tumoral de mélanome ou de cancer du poumon sur modèle murin ont pu être observés lors d'un traitement avec une protéine recombinante de CXCL4L1 (Struyf et al., 2007). CXCL4L1 apparait comme une nouvelle cible potentielle dont les rôles dans l'angiogenèse et l'invasion tumorale sont à caractériser.

Plusieurs études ont été effectuées dans notre groupe de travail, et sont toujours en cours de réalisation. Notamment, le rôle du CXCL4L1 dans le cancer du pancréas est un travail auquel j'ai pu grandement contribuer, et qui a été récemment accepté pour publication dans le journal "Cancer Research". Nous sommes également en collaboration avec une équipe de chimistes, dirigée par le Pr. Lecommandoux (Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques LCPO,

UMR5629). Notre projet consiste à créer des nanoparticules ciblant et inhibant spécifiquement le CXCR3, afin de développer une stratégie thérapeutique ciblée prometteuse.

II. Rôles des chimiokines CXCL4 et CXCL4L1 dans le cancer du pancréas

Les résultats présentés dans cette partie ont été acceptés dans le journal "Cancer Research". Une partie des résultats obtenus et que j'ai réalisée sur le CXCL4L1 et le CXCR3-A va être présentée de façon plus détaillée ici. Le reste des résultats, ainsi que les matériels et méthodes, seront expliqués dans l'annexe V : « *Dual roles for CXCL4 chemokines and CXCR3 in angiogenesis and invasion of pancreatic cancer?* »

A. Régulation de l'expression de CXCL4L1 dans les adénocarcinomes pancréatiques

Afin de déterminer le rôle de CXCL4L1 dans le développement du cancer du pancréas, trois lignées cellulaires de PDAC ont été utilisées : les BxPC3, les Panc-1 et les Mia PaCa-2. L'expression de CXCL4L1 a été précédemment caractérisée au laboratoire par qPCR *in vitro* et *in vivo* dans le modèle de la CAM mais aussi après injection de cellules tumorales en sous-cutanée dans des souris RAG-γ/c. Une nette augmentation de l'expression du CXCL4L1 a pu ainsi être mise en évidence *in vivo* dans les lignées BxPC3 et Panc-1 soulignant l'effet du microenvironnement tumoral sur les cellules, en induisant la synthèse du CXCL4L1. Pour la lignée Mia-PaCa2, l'expression du CXCL4 se trouve aussi augmentée *in vivo* et le CXCL4L1 devient détectable (Figure 56).

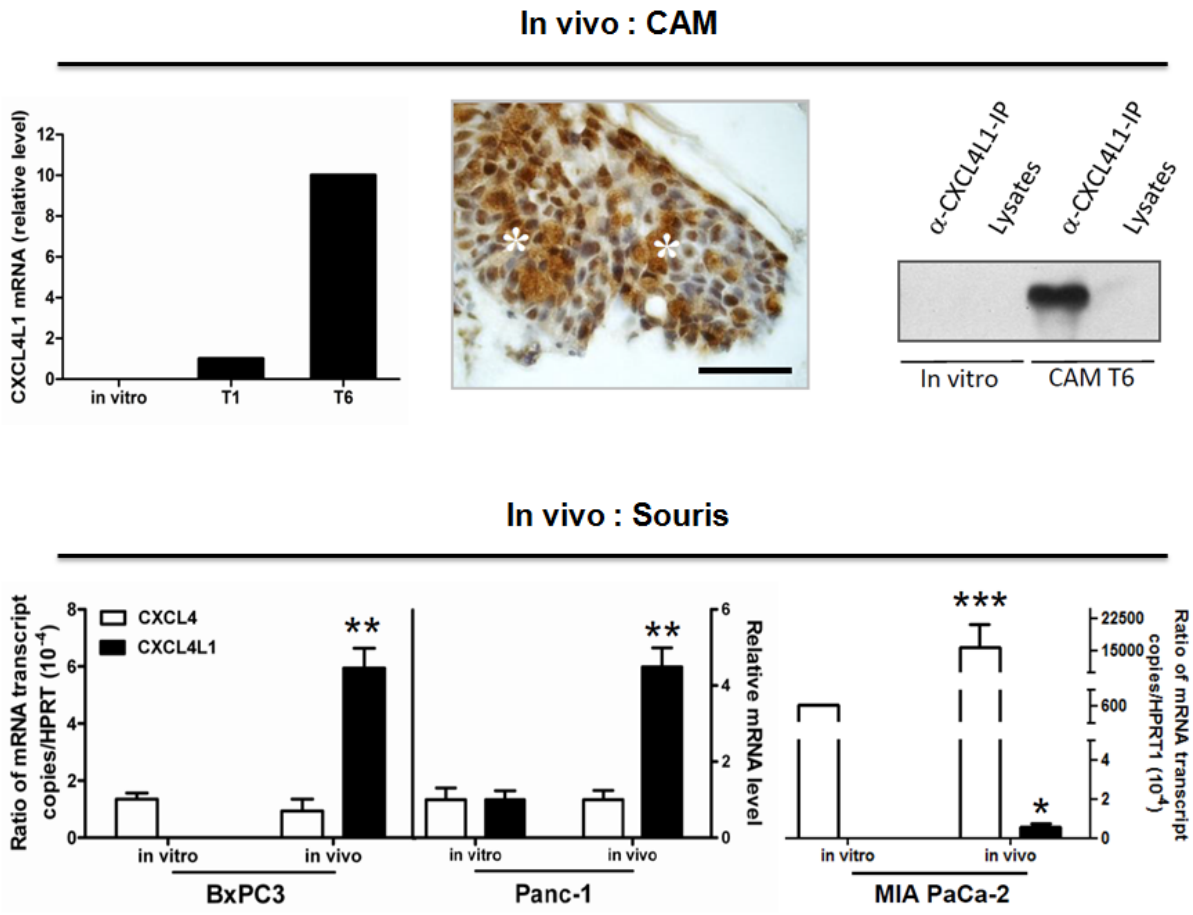


Figure 56: Expression du CXCL4L1 dans les lignées de PDAC

Il est desormais admis que le microenvironnement extracellulaire est capable de moduler le caractère invasif des cancers, on parle de microenvironnement tumoral. Les fibroblastes sont les cellules les plus représentées dans ce microenvironnement et sont grandement responsable des composants de la matrice extracellulaire. Dans un stroma soumis à certains processus physiologiques ou inflammatoires, les fibroblastes subissent une modification de leurs phénotypes se traduisant par l'apparition de certains marqueurs comme l'α-SMA, la vimentine ou encore la protéine FAP (« *Fibroblast Activation Protein* »). On parle alors de myofibroblastes (Garin-Chesa et al., 1990). Dans le cadre d'un cancer, on parle de CAF (« *Cancer Associated Fibroblast* »)

L'hypothèse de l'impact du microenvironnement tumoral sur la production du CXCL4L1 a pu être vérifié *in vitro* en réalisant des co-cultures entre les cellules de PDAC et des cellules du microenvironnement comme des cellules endothéliales

(HUVEC pour « *Human Umbilical Vein Endothelial Cells* », HUAEC pour « *Human Umbilical Artery Endothelial Cells* »), des cellules musculaires lisses ou encore des myofibroblastes (MF) hépatiques humains (donné par le Pr. Jean Rosenbaum, (Gillibert-Duplantier et al., 2010)). Nous avons en premier lieu caractérisé les MF utilisés dans l'étude en contrôlant l'expression de marqueurs connus pour les CAFs comme FAP, FSP1, ou encore la vimentine (Figure 57). Nous avons pu démontrer que les MF utilisés en co-culture exprimés fortement certains de ces marqueurs comme FAP et la vimentine, mais qu'une faible expression de FSP1 était détectée. Ceci suggére que les MF expriment et se comportent, du moins en partie, comme les CAFs.

Myofibroblast					
HPRT1	CXCL4	CXCL4L1	FSP1	FAP	VIM
23.24	28.54	28.52	33.47	23.68	16.48
22.87	28.31	28.61	33.34	23.52	16.30
22.29	28.35	28.42	33.27	23.69	16.14
22.86	27.74	28.59	32.55	22.97	16.46

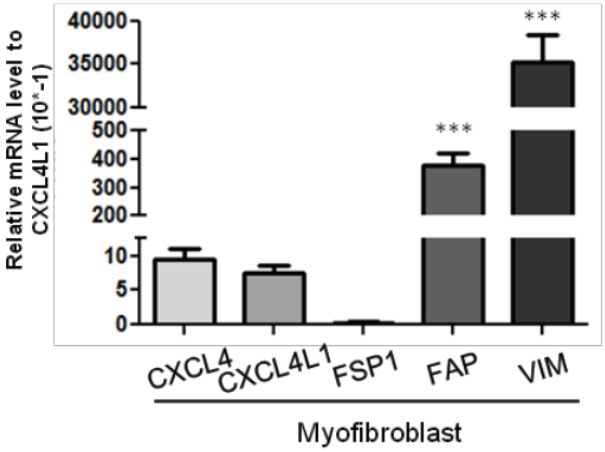
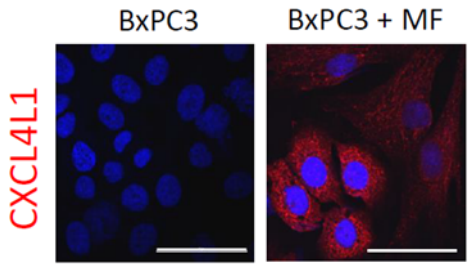


Figure 57: Expression de certains marqueurs de CAF par les MF

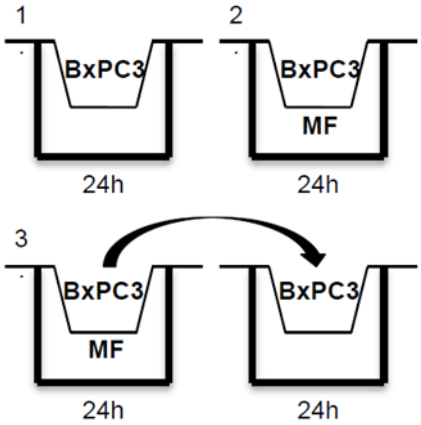
De toutes les co-cultures réalisées, uniquement celles avec les MF nous ont permis d'obtenir une augmentation de l'expression du CXCL4L1 par les cellules tumorales. La mise en place de co-culture où les cellules sont séparées par une membrane, dont les pores ne laissent passer que le milieu de culture et les facteurs sécrétés, nous a permis d'étudier l'expression du CXCL4L1 des cellules de PDAC avant et après co-culture avec les MF (Figure 58). Pour les BxPC3 qui n'expriment pas de CXCL4L1 *in vitro*, leur co-culture avec les MF permet l'induction de cette chimiokine (Figure 58 A) et ceci est réversible si les MF sont enlevés de la co-culture (Figure 58 B). Ces résultats soulignent le rôle essentiel des MF du microenvironnement tumoral dans l'induction de l'expression du CXCL4L1 par les cellules tumorales.

A



BxPC3		cocultured BxPC3		
HPRT1	CXCL4L1	HPRT1	CXCL4L1	αSMA
26.3 ± 1.02	No CT	19.41 ± 3.23	25.85 ± 1.48	No CT
11.4 ± 0.56	No CT	21.74 ± 5.58	31.63 ± 5.08	No CT
17.57 ± 2.24	No CT	23.05 ± 3.84	30.25 ± 3.54	No CT

B



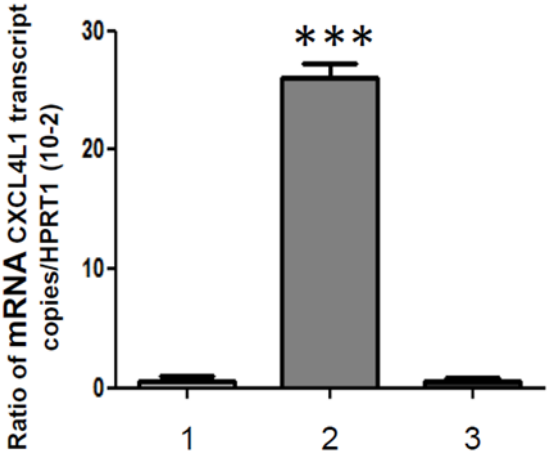


Figure 58: Impact de la co-culture des BxPC3 sur la production du CXCL4L1

De manière intéressante, la co-culture des MF avec la lignée Panc-1, qui exprime du CXCL4L1 de manière endogène, ne permet pas l'augmentation de l'expression de cette chimiokine (Figure 59). Ces résultats soulignent le rôle des MF dans l'initiation de l'expression du CXCL4L1, mais pas dans son amplification. Il se peut que la production d'autres facteurs, issus des autres cellules du microenvironnement tumoral, soient nécessaires à cette amplification.

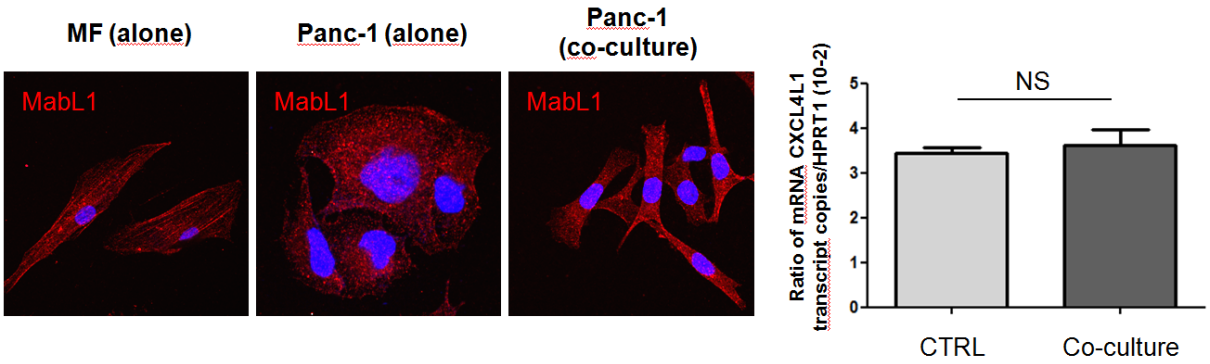


Figure 59: Rôle des MF dans la production du CXCL4L1 par la lignée Panc-1. MabL1 : Anticorps du CXCL4L1

B. Rôle de CXCR3 dans le développement de l'adénocarcinome pancréatique

Au vu des résultats obtenus sur l'expression du CXCL4L1, l'expression du récepteur CXCR3 dans ces lignées de PDAC a alors été étudiée. Peu de CXCR3-B a pu être détecté par qPCR *in vitro* dans les trois lignées, et uniquement la lignée Panc-1 présente une forte expression de CXCR3-A (Figure 60 A et C). Après implantation *in vivo* dans la souris, les niveaux d'expression de CXCR3-A dans les cellules Panc-1 et de CXCR3-B dans les cellules Mia PaCa-2 sont augmentés (Figure 60 B).

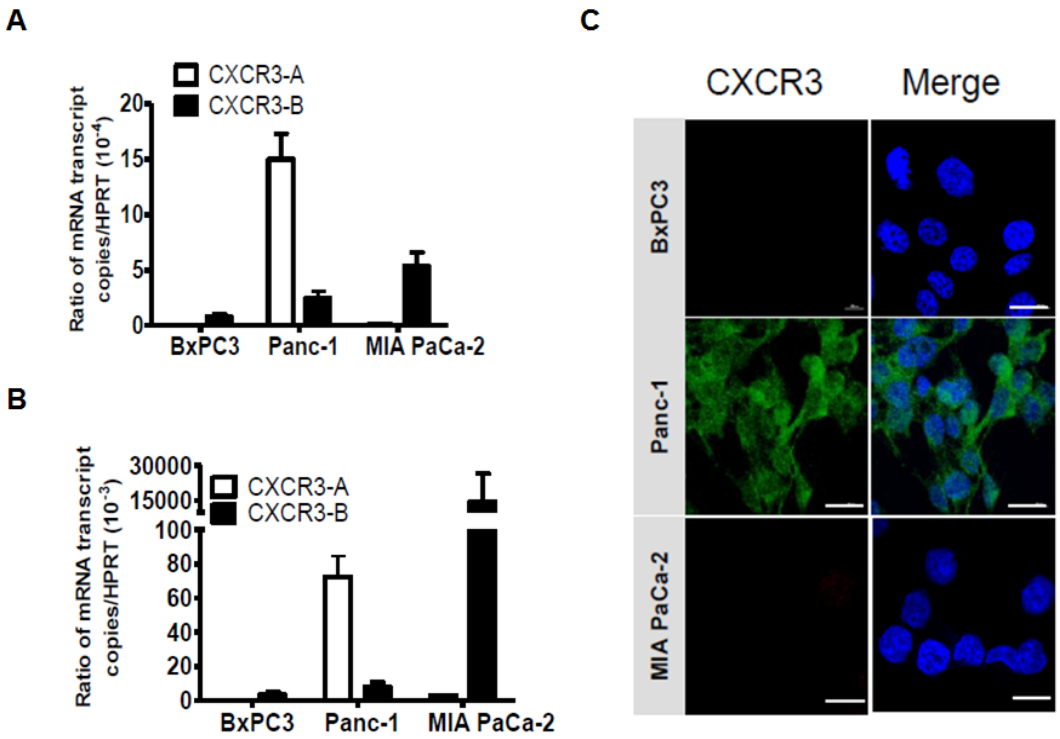


Figure 60: Expression de CXCR3-A et CXCR3-B dans les lignées de PDAC

La stimulation *in vitro* des cellules BxPC3 et Panc-1 par le CXCL4L1 a donné des résultats différents, qui ont pu être expliqués par la présence ou non de CXCR3 dans ces cellules. En effet, les BxPC3 n'exprimant pas CXCR3 *in vitro*, le CXCL4L1 n'induit aucun changement dans la prolifération ou l'invasion des cellules (Voir résultats Annexe V, Figure 5B). Au contraire, les Panc-1 synthétisent de manière

endogène du CXCL4L1 mais aussi du CXCR3-A. L'utilisation de siARN inhibant le CXCL4L1 ou de l'anticorps bloquant spécifique du CXCL4L1 préalablement élaboré et caractérisé au laboratoire, le MabL1 (Dubrac et al., 2010), entraîne une diminution de la prolifération cellulaire. Ces résultats suggèrent que le CXCL4L1 favorise la prolifération tumorale via l'activation du CXCR3-A présent dans les Panc-1 (Figure 61 A). Comme dans le chapître I des résultats, nous avons donc vérifié la voie de signalisation des MAPK/ERK suite à la stimulation du CXCL4L1. Nous avons pu observer une augmentation de p-ERK, qui est inhibée en pré-traitant les cellules avec le U0126, un inhibiteur spécifique de la voie des MAPK (Figure 61 B).

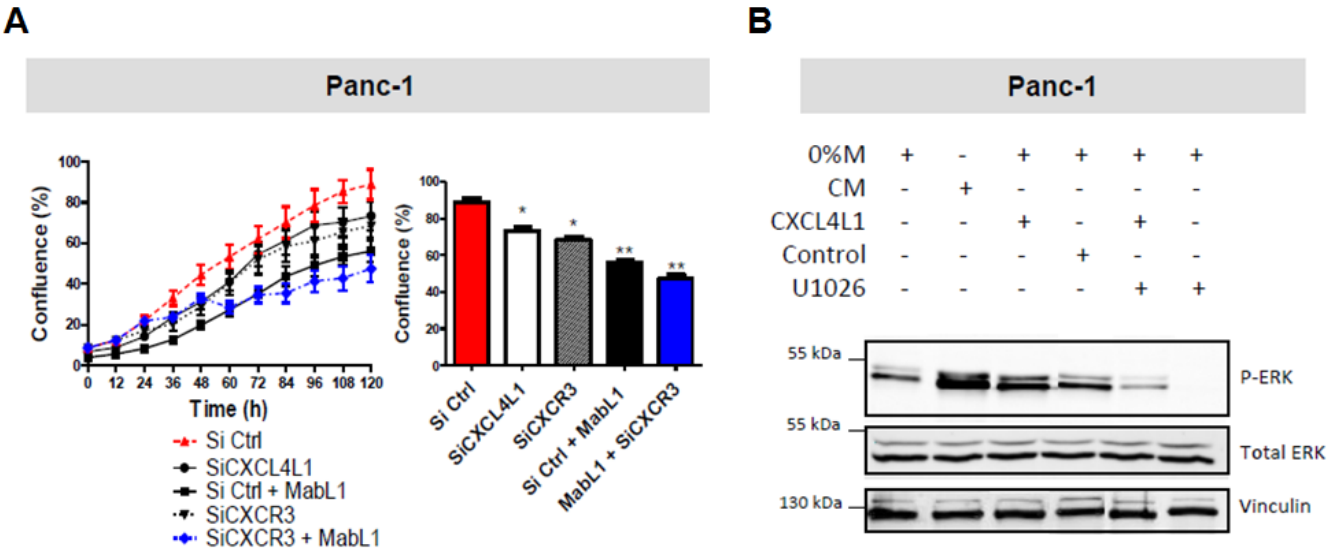


Figure 61: Impact de la modulation de l'activité du couple CXCR3 / CXCL4L1 dans la prolifération des cellules Panc-1.

Afin d'étudier le rôle de la stimulation du CXCR3-A par le CXCL4L1, un clônage stable du CXCR3-A a été réalisé au laboratoire. Au vu de la faible efficacité de transfection, couplée à la forte mortalité des cellules BxPC3, nous avons réalisé le clônage sur la lignée Mia PaCa-2 qui, comme les BxPC3, ne présente pas d'expression endogène de CXCR3-A. Le vecteur utilisé est le même vecteur que celui utilisé pour les HEK-CXCR3A dans le chapître I (le pEGFPN2+CXCR3-A) et les cellules ont été nommées les Mia PaCa-2-R3 (Voir résultats Annexe V, Figure S8A et S8B). Nous avons étudié l'impact d'une stimulation chronique du CXCL4L1 sur ces cellules par co-culture avec une lignée de HEK surexprimant et sécrétant le

CXCL4L1 (les HEK-V1, lignée établie précédemment au laboratoire, voir materiel et méthode de l'annexe V). Nous avons observé que la présence chronique de CXCL4L1 dans le microenvironnement permet d'augmenter la prolifération des Mia PaCa-2-R3, contrairement aux cellules contrôles Mia PaCa 2. (Figure 62 A et B).

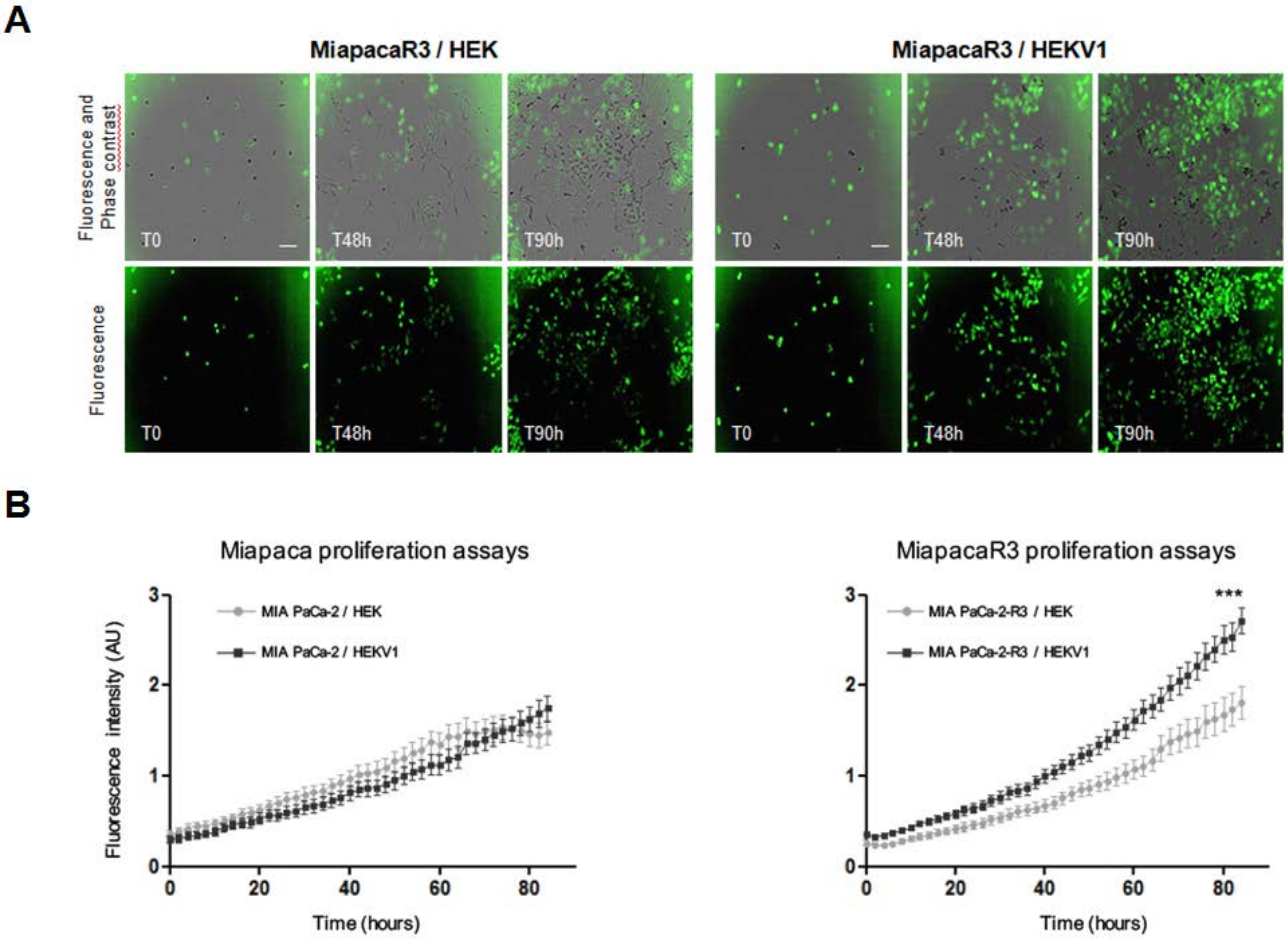


Figure 62: Effet d'une stimulation chronique du CXCR3-A par le CXCL4L1

Des co-cultures contrôles avec des cellules HEK-293 parentales ont été réalisées, et ne modifient pas la prolifération des Mia PaCa-2-R3 et Mia PACA-2. Nos résultats nous permettent de conclure que CXCL4L1 active CXCR3-A, ce qui induit la prolifération des Mia Paca-2-R3. Pour confirmer ceci, nous avons réalisé les co-cultures en présence ou en absence du MabL1 ou du SCH546738 (antagoniste du CXCR3, précédemment utilisé dans l'article I du chapître I). Nous avons montré

que l'augmentation de la prolifération liée à la co-culture avec les HEK-V1 était inhibée lorsque l'on bloquait soit le CXCL4L1 par le MabL1, soit le CXCR3-A par le SCH546738 (Figure 63 A). Ces résultats confirment que les différences fonctionnelles observées précédemment sont liées à la formation du complexe CXCL4L1 / CXCR3-A. De plus, nous avons confirmé que la stimulation de 5 minutes au CXCL4L1 permet d'induire l'activation de la voie MAPK/ERK via l'augmentation p-ERK (Figure 63 B).

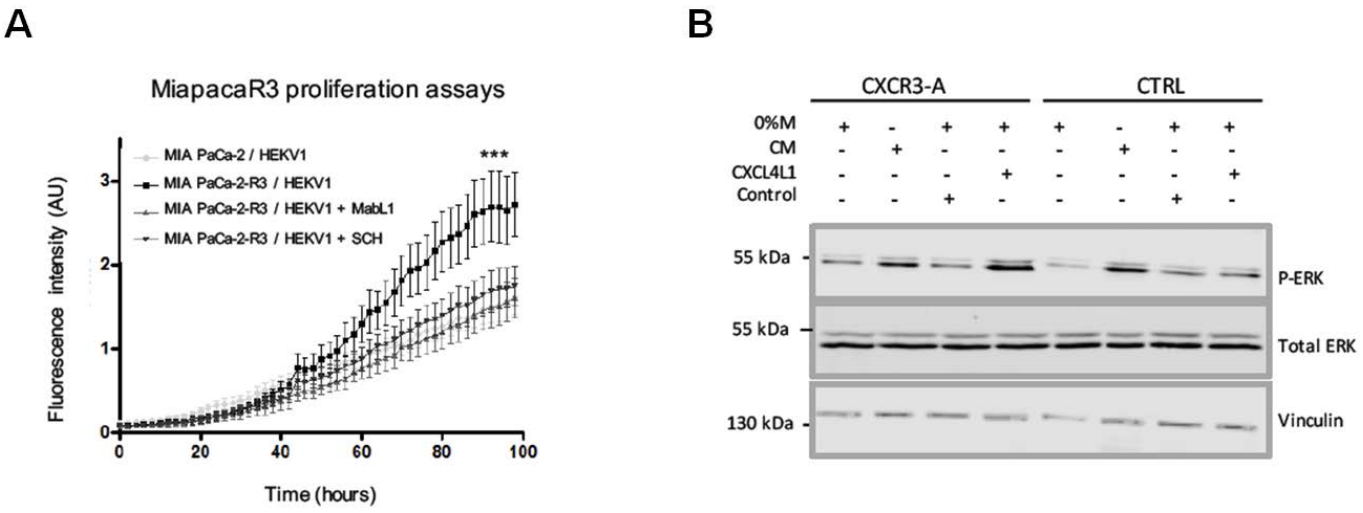


Figure 63 : Impact de la stimulation du CXCR3-A par le CXCL4L1 avec ou sans traitement au MabL1 ou au SCH546738

C. Le couple CXCL4L1 / CXCR3-A comme cible thérapeutique

Afin de déterminer l'impact thérapeutique du MabL1, les souris implantées avec des cellules tumorales BxPC3 ou Panc-1 ont été traitées ou non *in vivo*, 2 fois par semaine, avec le MabL1 (25µg pendant 2 mois). L'inhibition de CXCL4L1 par le MabL1 a induit l'augmentation du volume tumoral par 2, et du poids par 1,5, des tumeurs BxPC3 (cellules injectées en sous-cutané). L'angiogenèse tumorale a été observée suite aux traitements par le MabL1. L'augmentation de la formation des vaisseaux sanguins a pu être quantifiée dans les tumeurs BxPC3, via l'inhibition du CXCL4L1, puissant facteur angiostatique (Figure 64 A). Au contraire, pour les tumeurs Panc-1, le MabL1 a entrainé une diminution du volume et du poids des tumeurs (cellules injectées en orthotopique ou en sous-cutané) (Figure 64 B).

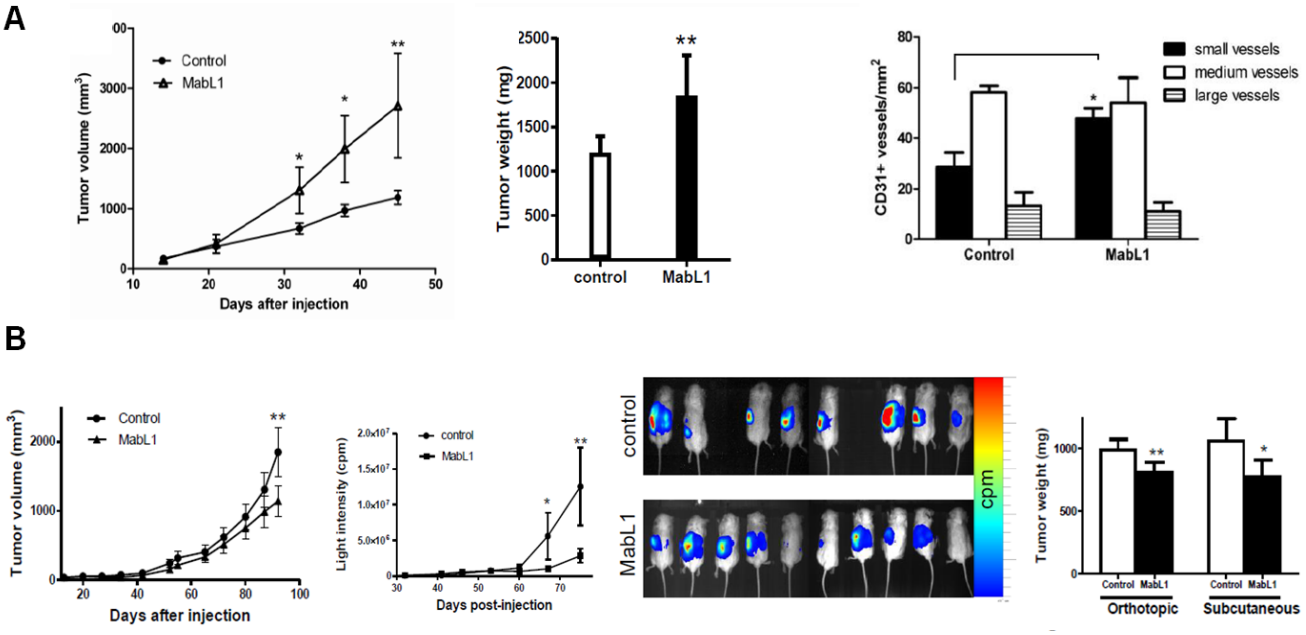


Figure 64: Traitement au MabL1 des tumeurs PDAC exprimant ou non le CXCR3 : BxPC3 ou Panc-1

En parallèle, il a été montré dans les Panc-1 injectées en orthotopique que la formation de métastases aux poumons et la prolifération cellulaire étaient diminuées lors du traitement MabL1 sur les tumeurs, mais que la formation de vaisseaux sanguins n'était pas affectée (Voir annexe V, figure 7I J K et L). Les effets opposés du CXCL4L1 observés via le traitement au MabL1 dans les différentes lignées peuvent s'expliquer par la présence ou l'absence du récepteur CXCR3 dans les deux lignées cellulaires. Dans les tumeurs BxPC3 ne présentant pas le CXCR3, l'effet du CXCL4L1 se fait probablement sur les cellules endothéliales ou d'autres cellules du microenvironnement tumoral. Dans ce modèle, CXCL4L1 inhibe la progression tumorale indirectement probablement via son rôle angiostatique. Au contraire, pour les tumeurs Panc-1 exprimant du CXCR3-A endogène, CXCL4L1 va activer ce récepteur et ainsi induire la mise en place de plusieurs voies de signalisation pro-tumorales.

Afin de confirmer l'effet *in vivo* du CXCL4L1 sur la formation des vaisseaux, nous avons réalisé des qPCR sur les tumeurs Panc-1 et Mia PaCa-2. Nous avons pu confirmer que les tumeurs Panc-1 expriment du CXCL4L1 contrairement aux tumeurs Mia PaCa-2. De plus, nous avons pu démontrer que ceci était inversement proportionnel à l'expression du marqueur des vaisseaux sanguin PECAM1 (6,16 fois plus d'expression dans les Mia PaCa-2 par rapport au Panc-1) (Figure 65).

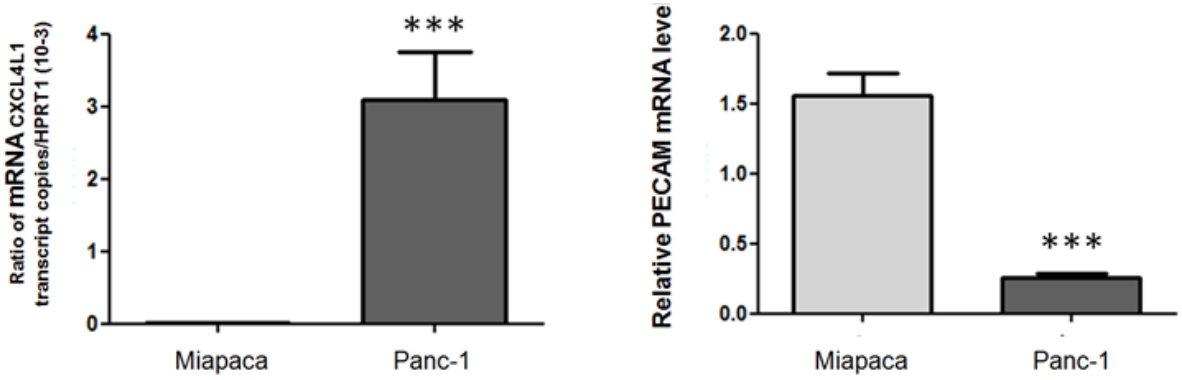


Figure 65: Corrélation entre l'expression du CXCL4L1 et la formation des vaisseaux sanguins

III. L'utilisation de nanoparticules ciblant CXCR3 comme outil thérapeutique

Après les études sur la caractérisation de CXCR3, et de son implication dans la progression tumorale, effectuées au cours de ma thèse (modèle de glioblastome, mais aussi via la chimiokine CXCL4L1 dans le modèle d'adénocarcinome pancréatique), nous avons souhaité développer une nouvelle stratégie thérapeutique ciblée contre ce récepteur. Pour ceci, nous avons élaboré une collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques (LCPO, UMR5629, Bordeaux, France) avec l'équipe de Pr. Sébastien Lecommandoux et ayant pour but la formation de nanoparticules associée à l'antagoniste de CXCR3.

A. Principe et historique des nanoparticules

Les nanoparticules, ou nanovecteurs, sont des composées de taille inférieure à 1µm (Faraji and Wipf, 2009) afin d'être du même ordre de grandeur que les virus et protéines (Figure 66). Elles ont de nombreuses applications comme le ciblage biologique, l'amélioration ou encore l'administration d'agents thérapeutiques.

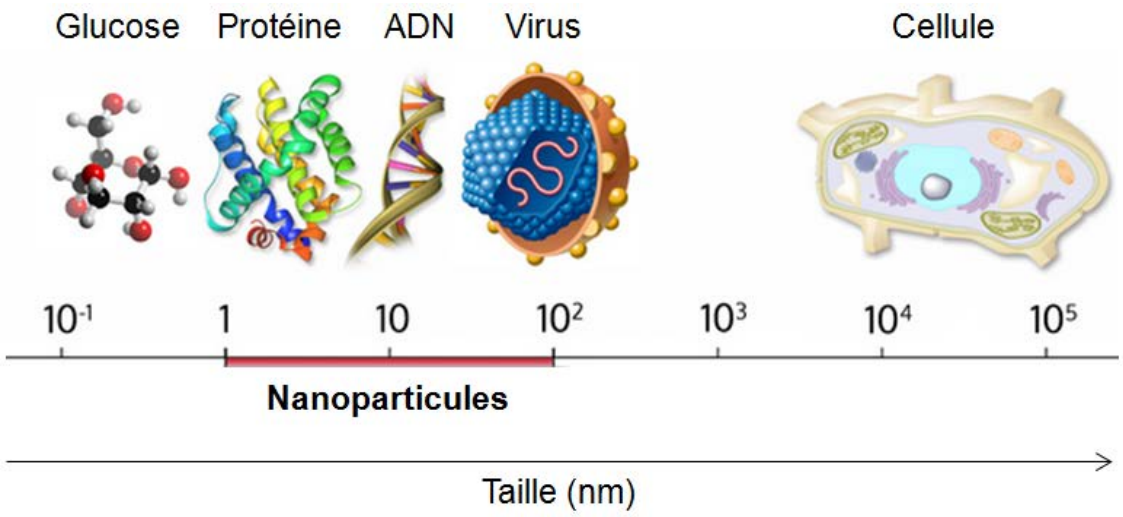


Figure 66: Echelle de taille des nanoparticules

Les nanoparticules sont désormais considérées comme une nouvelle génération d'immunothérapie avec de grands avantages par rapport à des anticorps conventionnels comme leur taille, leur stabilité, leur solubilité et la reconnaissance d'épitopes masqués.

De nos jours, nous sommes à la troisième génération de nanoparticules. En effet, les premières générations permettent uniquement l'encapsulation d'un composé chimique autour d'une couche ou bicouche lipidique. La nanoparticule sera rapidement détectée par l'organisme et dégradée par les macrophages, libérant ainsi le composé chimique. Du fait du faible temps de vie de la nanoparticule, la seconde génération a été développée afin d'augmenter la demi-vie des nanoparticules dans le sang. Pour se faire, un composé très hydrophile a été rajouté aux nanoparticules afin

d’augmenter leur solubilité et diminuer leur dégradation par le système immunitaire, on parle de vecteurs furtifs. Dans la plupart des cas, le polyéthylène glycol (PEG), est le polymère greffé à la nanoparticule. Afin de pouvoir cibler un tissu ou une protéine donnée, la troisième génération de nanoparticule a été élaborée. La surface des nanoparticules de seconde génération a été modifiée afin d’y introduire des composés biologiques comme des ligands, des peptides ou même des anticorps (Cai et al., 2006; Tada et al., 2007).

B. L’utilisation des nanoparticules dans le cancer

La mise en place des nanoparticules offre de grandes possibilités dans le cadre du traitement contre le cancer. Premièrement, on distingue le ciblage passif du ciblage actif. L’angiogenèse tumorale, comme énoncée en introduction, est constituée de vaisseaux sanguins tortueux et perméables, permettant le passage de nombreux composés vers la tumeur. Détourner ce phénomène de perméabilité des vaisseaux sanguins pour introduire un agent thérapeutique dans la tumeur constitue ce qu’on appelle le ciblage passif des nanoparticules. Pour ceci, il faut que la nanoparticule soit furtive et circule suffisamment longtemps afin d’arriver au niveau des vaisseaux sanguins tumoraux. A ce stade, il faudra que la nanoparticule soit plus petite que les pores se trouvant dans les vaisseaux sanguins afin de parvenir à la tumeur. Il s’agit d’une stratégie très importante pour délivrer au sein de la tumeur des agents thérapeutiques de petites tailles et contenus dans la nanoparticule (Hashizume et al., 2000; Hobbs et al., 1998). Le ciblage actif, pour sa part, nécessite des nanoparticules de troisième génération. En effet, il se base sur le principe de reconnaissance entre une cible spécifique de la tumeur (surexpression d’un récepteur par exemple) et la molécule reconnaissant la cible, qui sera greffée sur la nanoparticule (le ligand d’un récepteur par exemple). En plus d’être spécifique de la tumeur, la cible doit être aussi accessible par la nanoparticule, donc à la surface membranaire. Une fois fixée, la nanoparticule peut agir en bloquant les voies de signalisation issue de la cible, ou encore libérer des composés cytotoxiques contre les cellules tumorales.

D'autres applications issues de ces nanotechnologies sont possibles en plus des ciblages actifs ou passifs, par exemple pour le diagnostic médical. En effet, elles peuvent être utilisées pour le développement de dispositifs extrêmement sensibles et pour la détection de certaines cibles moléculaires associées au développement tumoral. Par exemple, elles peuvent être utilisées pour reconnaître la présence dans le sang de protéines ou de peptides associés au cancer. Les nanoparticules peuvent aussi être utilisées en imagerie médicale afin d'améliorer la localisation mais aussi le diagnostique de la tumeur. Le ciblage spécifique de facteurs cancéreux par les nanoparticules est un grand avantage pour l'imagerie de la tumeur. De plus, il est possible d'ajuster les propriétés optiques des nanoparticules en fonction de leurs tailles, permettant la détection de plusieurs biomarqueurs simultanément. Des nanoparticules de type « *Quantum Dots* » (Points Quantiques, ou QD) ont ainsi été développé, et se comportent comme des fluorophores dont la longueur d'onde est dépendante de la taille du vecteur. Ceci permet d'obtenir un très large spectre possible pour l'imagerie médicale.

C. Les nanoparticules associées à l'antagoniste de CXCR3

1. Principe et objectifs

En collaboration avec l'équipe du Pr. Sebastien Lecommandoux, nous étudions le ciblage de CXCR3 par des nanoparticules polymères de troisième génération. L'équipe de chimie travaille sur la formation des nanoparticules présentant à leur surface l'antagoniste du CXCR3 : le SCH546738 (Figure 67).

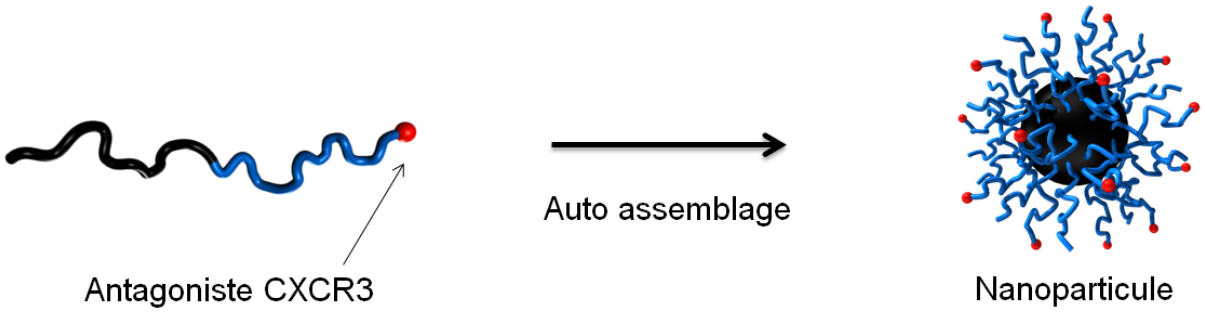


Figure 67: Formation des nanoparticules couplée à l'antagoniste de CXCR3

La formation de nanoparticules ciblant CXCR3 peut avoir plusieurs impacts en terme de stratégie thérapeutique. Premièrement, il peut s'agir d'un ciblage du récepteur dans les cellules cancéreuses afin d'en limiter son activation, jouant ainsi comme une nanoparticule bloquante de l'activité de CXCR3. La nanoparticule peut alors présenter des avantages par rapport au SCH546738 classique, comme une augmentation de la solubilité et de la distribution de la molécule. La nanoparticule peut, de même, présenter l'avantage de concentrer de nombreuses molécules SCH546738 dans un espace restreint. Ceci peut créer un effet zone et ainsi mieux fixer le CXCR3. La nanoparticule peut aussi agir en temps qu'outil d'imagerie des zones de la tumeur exprimant le CXCR3, ou encore comme outil cytotoxique en entrainant la dégradation des cellules tumorales exprimant CXCR3.

2. Modification chimique du SCH546738

Pour des raisons de conflit d'intérêt et de propriétés intellectuelles, les modifications chimiques, les conditions de réactions et la composition des blocs amphiphiles réalisés par l'équipe de chimiste du LCPO de Bordeaux ne seront pas révélées. Afin de pouvoir former des nanoparticules en solution, ces blocs amphiphiles doivent contenir deux parties essentielles: une hydrophile permettant de solubiliser le SCH546738 et une hydrophobe permettant l'assemblage des nanoparticules (Figure 68).

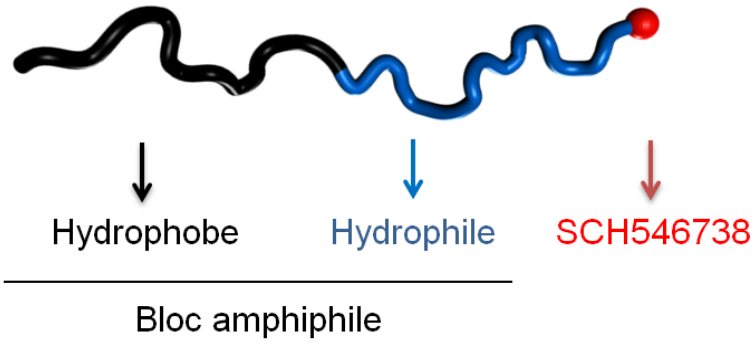


Figure 68: composition du bloc amphiphile couplé au SCH546738

Différentes modifications chimiques ont été réalisées sur le SCH546738 afin de pouvoir le coupler au copolymère à bloc amphiphile et former par co-assemblage les nanoparticules. Cette approche présente l'avantage de pouvoir moduler le

nombre de ligands à la surface de la nanoparticule afin de déterminer le ratio optimal pour l'efficacité du ciblage et celle de l'effet biologique souhaité. De plus, la modulation des propriétés pharmacologiques du SCH546738 permet une augmentation de la durée de vie et du temps de circulation, ainsi que sa solubilité via les groupements amphiphiles couplés.

Les copolymères à blocs amphiphiles ont été obtenus au LCPO par Laura Rodriguez (doctorante de l'université de bordeaux) par polymérisation à ouverture de cycle (« *Ring Opening Polymerisation* », ROP), la réaction se déroulant sous atmosphère inerte. Le temps de réaction (plusieurs heures à plusieurs semaines) ou la proportion des réactifs, sont des paramètres permettant d'avoir un contrôle sur le degré de polymérisation du bloc amphiphile. Obtenir une large gamme de copolymères à blocs de différentes fractions hydrophiles, va permettre une étude de l'auto-assemblage de ces amphiphiles, et de déterminer celui ou ceux pouvant former spontanément des vésicules. Ainsi, l'équipe de chimiste a pu générer plusieurs copolymères à blocs. Ces polymères ont été caractérisés par RMN 1H pour vérifier leur structure chimique, par chromatographie d'exclusion stérique (SEC) pour mesurer leur polydispersité, par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) pour déterminer les transitions de phases (enthalpie de fusion, de cristallisation et température de transition vitreuse) et par analyse thermogravimétrique (ATG) pour vérifier la pureté de l'échantillon.

3. Etude de la modification du SCH546738 sur son activité

Après modifications chimiques, nous avons vérifié que l'activité du SCH546738 était toujours la même. Nous avons réalisé sur les lignées HEK-CTRL et HEK-CXCR3A des stimulations avec le PS372424 après pré-traitement au SCH546738 ou SCH-modifié. Nous avons effectué différentes conditions afin de trouver la dose minimale optimale permettant de bloquer l'activité du CXCR3-A. Pour se faire, nous avons réalisé une cinétique de pré-traitement des deux molécules SCH546738, tout en se basant sur la concentration de 2,2nM préalablement publiée (Jenh et al., 2012) (Figure 69).

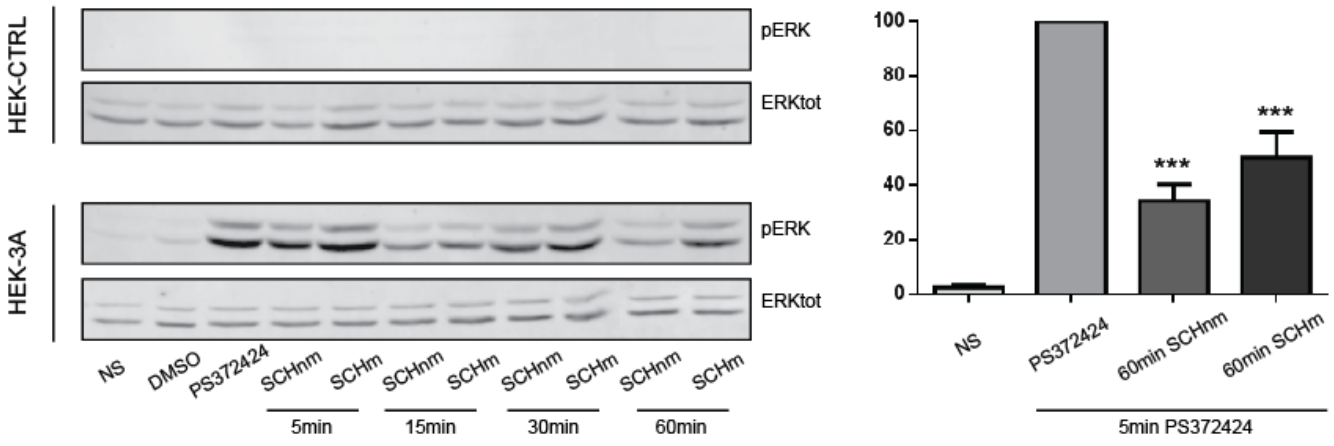


Figure 69: Impact du traitement au SCHnm ou SCHm sur la stimulation de CXCR3-A nm: non modifié, m : modifié

Nous avons ainsi montré que pré-traiter les cellules 60 minutes avec 2,2nM de SCH546738 non modifié ou modifié permet d'inhiber de façon optimale l'activation du récepteur CXCR3-A. Il n'y a pas de différence significative d'activité avec la molécule modifiée ou non. Ces résultats permettent de conclure que la modification chimique apportée au SCH546738, pour le coupler aux blocs amphiphiles, n'affecte pas son activité inhibitrice sur le CXCR3-A. Suite à la modification chimique, le SCH546738 a pu être récemment couplé à la partie hydrophile des blocs amphiphiles. Les tests d'activités biologiques sont toujours en cours de réalisation au laboratoire, mais les résultats suggèrent que le couplage ne modifie pas l'activité du SCH546738. Une fois fini, la partie hydrophobe sera couplée et nous aurons l'intégralité de la molécule SCH546738 couplée au bloc amphiphile. Il faudra alors les mettre en solution pour avoir la formation, par auto-assemblage, de nanoparticules associées au SCH546738.

IV. Conclusions et perspectives

Les données présentées dans ce dernier chapitre mettent en évidence l'importance de la chimiokine CXCL4L1 dans le développement de l'adénocarcinome pancréatique, via la fixation sur son récepteur CXCR3-A. Nous avons montré que les

cellules tumorales de PDAC surexpriment le CXCL4L1 grâce au microenvironnement tumoral. En effet, les MF sont capables de secréter un facteur soluble induisant l'expression du CXCL4L1 dans les cellules tumorales. D'autres facteurs provenant du microenvironnement tumoral doivent surement être impliqués dans cette régulation, mais n’ont pu être déterminés à ce jour.

Le CXCL4L1 induit ses effets biologiques via la fixation sur le CXCR3-A. Ainsi, la stimulation exogène du CXCL4L1 sur les BxPC3 ou les Mia-PaCa2 n'a pas d'effet puisque les cellules n’expriment pas le CXCR3. Au contraire, pour la lignée Panc-1 exprimant de façon endogène CXCR3-A, la stimulation par le CXCL4L1 permet l'activation de la voie MAPK/ERK. La mise en place de clônes stables surexprimant le CXCR3-A sur la lignée Mia PaCa2 nous a permis de démontrer que CXL4L1 active la voie des MAPK/ERK et induit une augmentation de la prolifération cellulaire. De manière intéressante, nous avons réussi à bloquer ces effets par utilisation d’anticorps bloquant le CXCL4L1 (MabL1), mais aussi via l'utilisation de l'antagoniste de CXCR3 : le SCH546738. Ceci prouve que c'est la formation du couple CXCL4L1 / CXCR3-A qui entraîne les effets biologiques pro-tumoraux.

Le CXCL4L1, en plus de son rôle angiostatique, possède un rôle novateur dans la progression tumorale. Via sa fixation sur son récepteur CXCR3-A, il favorise les mécanismes de prolifération et migration des cellules tumorales. Le microenvironnement tumoral joue un rôle essentiel dans l'induction de l'expression du CXCL4L1 par les cellules tumorales de PDAC. La modulation du ligand, ou du récepteur, via l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou d'anticorps bloquant, apparait donc comme une stratégie thérapeutique prometteuse dans le traitement des adénocarcinomes pancréatiques. Bien que les MF puissent permettre l'induction *in vivo* du CXCL4L1, d'autres facteurs peuvent aussi intervenir. La recherche approfondie de ces molécules ainsi que celle des cellules impliquées permettrait de compléter l'étude afin de mieux comprendre les mécanismes d'initiation et d'augmentation de l'expression du CXCL4L1.

Nous avons établi une collaboration avec le Laboratoire de Chimie des Polymères Organiques afin de développer une nouvelle technique ciblant le CXCR3, pour inhiber ses effets dans la progression tumorale. Pour se faire, nous avons dû modifier le SCH546738 afin de pouvoir le coupler à un polymère amphiphile et permettre la formation de nanoparticules de troisième génération, présentant le SCH546738 sur toute leur surface. La modification chimique du SCH546738, ainsi que son couplage avec la partie hydrophile du bloc amphiphile, ont pu être réalisée au cours des deux dernières années. Aucune modification de l'activité inhibitrice n'a été détectée dans les différentes molécules (contrôles, modifiées ou couplées). Une fois la partie hydrophobe couplée, nous serons en mesure de former les nanoparticules. Pouvoir cibler le CXCR3 *in vivo* et étudier l'effet de ces nanoparticules dans la progression tumorale sera alors possible. La question de la spécificité du ciblage demeure cependant présente. En effet, la nanoparticule sera tout aussi capable d'inhiber le CXCR3 tumorale, que le CXCR3 physiologique (notamment dans les cellules endothéliales). De ce fait, on peut supposer que les effets pro-tumoraux du CXCR3-A pourront être inhibés via la fixation des nanoparticules au sein de la tumeur, mais que les effets biologiques du CXCR3 dans la régulation de l'angiogenèse seront aussi inhibés. Notamment, l'inhibition du CXCR3-B, angiostatique, dans ces cellules pourrait amplifier les phénomènes d'angiogenèse tumorale. Des stratégies de ciblage spécifique de l'isoforme CXCR3-A devront alors être réalisées afin d’inhiber principalement ses fonctions pro-tumorales.

Une telle stratégie ciblée permet la formation de nanoparticules avec un nombre définie de SCH546738 à leur surface. Ainsi, il sera possible d'étudier le nombre minimal de SCH546738 requis pour inhiber les fonctions de CXCR3, tout en limitant toute toxicité et effets secondaires liés à un traitement chronique avec ces nanoparticules. Les études *in vivo* sur modèle murin et sur le modèle de la CAM permettront d’optimiser tous ces paramètres pour aboutir à la formation de nanoparticules ciblant le CXCR3 efficaces.

Discussion générale et perspectives

L'embryogenèse, l'angiogenèse, l'inflammation et le cancer sont des phénomènes physiologiques ou pathologiques pour lesquels les chimiokines ont un rôle fondamental (Krieg and Boyman, 2009). Notamment, elles régulent des fonctions essentielles à la formation tumorale telles que la chimiotaxie leucocytaire sur le site tumoral, l'angiogenèse tumorale ainsi que la prolifération, la survie cellulaire et l'invasion (Bergers and Benjamin, 2003; Hanahan and Folkman, 1996; Krieg and Boyman, 2009; Mantovani et al., 2004). Au cours de ces trois année de thèse, je me suis concentré sur l'étude des chimiokines CXCL4 et CXCL4L1 et du rôle de leur récepteur CXCR3 dans la progression tumorale, et notamment des mécanismes d'actions par lesquels l'isoforme CXCR3-A induit ces effets pro-tumoraux.

I. CXCL4L1, une nouvelle cible thérapeutique ?

Découverte plus récemment que le CXCL4, le variant CXCL4L1 présente une activité angiostastique plus important que celle du CXCL4 (Struyf et al., 2004). Dans la plupart des études où l'expression de CXCL4 fait de lui un biomarqueur de la progression tumorale, la distinction entre les deux variants n'est pas réalisée. De ce fait, CXCL4 et potentiellement CXCL4L1 constituent des marqueurs pour le diagnostic et le pronostic de certains cancers chez l'homme. Depuis sa découverte, de plus en plus d'études cherchent à caractériser les effets du CXCL4L1 dans la progression tumorale. Notamment, l'équipe de Sofie Struyf a largement contribué à la caractérisation des effets anti-tumoraux de cette chimiokine dans de nombreux cancers comme celui du poumon, de la peau ou encore du sein (Struyf et al., 2007; Van Raemdonck et al., 2014; Vandercappellen et al., 2010). De manière générale, ces études décrivent CXCL4L1 comme régulateur négatif de l'angiogenèse tumorale ce qui induit indirectement une inhibition de la progression tumorale. Accepté récemment (Septembre 2016), notre équipe a montré le rôle novateur et direct du CXCL4L1 dans la progression de l'adénocarcinome pancréatique. Nous avons mis en évidence l'importance du microenvironnement tumoral en tant que puissant inducteur de l'expression du CXCL4L1 dans les cellules tumorales. Le facteur soluble responsable de cet effet reste toujours à déterminer. Contre toute attente, les effets du CXCL4L1 sur la progression tumorale des cellules issus de PDAC furent

dépendants du type cellulaire mis en jeu. Dans les tumeurs BxPC3, le CXCL4L1 induit une inhibition de la progression tumorale via un effet angiostatique, en accord avec l'effet anti-tumoral indirect du CXCL4L1. Cependant, pour les tumeurs Panc-1, le CXCL4L1 induit la croissance tumorale et l'activation de voies pro-tumorales. Dans ces mêmes tumeurs, CXCL4L1 inhibe toujours la formation des vaisseaux sanguins. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que les effets opposés du CXCL4L1 observés dans les différentes lignées pouvaient s'expliquer par la présence ou l'absence du récepteur au CXCL4L1, CXCR3, dans les cellules tumorales. En effet, nous avons démontré que les tumeurs Panc-1, contrairement aux tumeurs BxPC3, expriment le CXCR3-A de manière endogène. La surexpression de CXCR3-A dans une autre lignée de PDAC, n'exprimant pas CXCR3 (les Mia PaCa-2), nous a permis de confirmer cette hypothèse. Ainsi, les effets du CXCL4L1 dans ces tumeurs s'expliquent par l'activation de CXCR3-A et l'induction de voies de signalisation pro-tumorales. Nous avons de plus montré *in vitro* que l'inhibition de l'intéraction de CXCL4L1 avec CXCR3-A par utilisation de l'anticorps bloquant MabL1 ou de l'antagoniste du CXCR3 (SCH546738), supprimait l'activation de la voie MAPK/ERK, ainsi que la migration cellulaire induite par le CXCL4L1. Ainsi, en plus du rôle angiostatique de CXCL4L1, notre étude met à jour une fonction pro-tumorale via la fixation directe du CXCL4L1 sur CXCR3-A dans les cellules tumorales.

Depuis plus de 20 ans, les chimiokines CXC sont décrites pour leur rôle dans la chimiotaxie des cellules endothéliales et donc dans l'angiogenèse, en fonction de la présence ou non du motif ELR dans leurs séquences (Strieter et al., 1995, 2005). La plupart des chimiokines ELR- sont induites par l' IFNγ et inhibent l'angiogenèse induite par des facteurs de croissance comme le FGF-2 ou le VEGF (Farber, 1993). Au niveau tumoral, du fait de l'expression dérégulée des facteurs pro-angiogèniques, la couverture péricytaire n'est souvent que partielle et le vaisseau n'est jamais totalement stabilisé, entrainant la formation d'un réseau vasculaire irrégulier, perméable et tortueux (Baluk et al., 2005). Le switch angiogénique est finement régulé par les molécules pro- ou anti-angiogeniques, faisant des chimiokines des cibles intéressantes en terme de stratégie thérapeutique (Bergers and Benjamin, 2003; Hanahan and Folkman, 1996). Les fonctions angiostatiques du CXCL4 et du CXCL4L1 sur les cellules endothéliales ont fait de ces chimiokines de prometteuses

molécules aux propriétés anti-tumorales. Cependant, l'étude plus approfondie du CXCL4 a pu montrer que son expression est soit augmentée soit diminuée selon les cancers, pointant du doigt le caractére bivalent de cette chimiokine (Cervi et al., 2008). Désormais, le schéma global apparait bien plus complexe au vu des effets différents induits par leur récepteur CXCR3 sur les cellules endothéliales, ou directement sur les cellules tumorales.

II. CXCR3, un récepteur à double tranchant

Fixant les chimiokines CXCL4, CXCL4L1, CXCL9, CXCL10 et CXCL11, CXCR3 est le principal récepteur des chimiokines ELR-. Bien que CXCR3 soit reconnu comme le récepteur fonctionnel des activités angiostatiques, et donc indirectement anti-tumorales, de ces chimiokines, la présence des isoformes CXCR3-A, CXCR3-B et CXCR3-ALT au sein même des cellules tumorales complexifie le modèle. Les travaux de Paola Romagnani et Laura Lasagni ont mis en évidence que les effets angiostatiques et anti-prolifératifs des chimiokines ERL- se font à travers l'isoforme CXCR3-B, principalement exprimé dans les cellules endothéliales (Lasagni et al., 2003; Romagnani et al., 2001). Au contraire, induisant la prolifération, la migration et la survie cellulaire, l'isoforme CXCR3-A est caractérisé comme un récepteur pro-tumoral (Wu et al., 2012). L'equipe d'Alan Wells décrit la balance d'expression entre le CXCR3-A et le CXCR3-B comme régulatrice de la progression tumorale, et parle de « *Stop and Go signal* ». Si la balance d'expression est en faveur du CXCR3-A, les voies pro-tumorales liées à la migration et l'invasion sont activées et on obtient le signal « *Go* » de la progression tumorale. Au contraire, si la balance est en faveur du CXCR3-B, les voies propres à la migration et l'invasion tumorale sont inhibées et on obtient le signal « *Stop* » de la progression tumorale (Wu et al., 2012). Le rôle de la troisième isoforme CXCR3-ALT n'est que trés peu connu du fait de sa faible expression *in vivo*. Toutefois, il a été rapporté que sa stimulation active les voies de MAPK/ERK, la phosphorylation d'AKT, et induit des effets chimiotactiques suite à la fixation du CXCL11 (Ehlert et al., 2004; Korniejewska et al., 2011). Ainsi, bien que le CXCL4 et le CXCL4L1 induisent des effets

angiostatiques via le CXCR3B présent entre autres sur les cellules endothéliales, la balance d'expression entre les deux isoformes de CXCR3 dans les cellules tumorales determine le signal « *Go* » ou « *Stop* ». Suite aux résultats obtenus avec CXCL4 et CXCL4L1, l'étude des mécanismes d'activation, du trafic vésiculaire intracellulaire et des voies de signalisation mises en jeu par les isoformes CXCR3-A et CXCR3-B ont constitué la grande majorité de mon travail de thèse.

Des études ont prouvé que le recrutement des protéines G des deux isoformes était différent, ce qui induit l'activation de voies de signalisation et des effets biologiques opposés. L'activation de CXCR3-B provoque le recrutement des protéines Gα-S activant l'adénylate cyclase, la formation d'AMPc et la stimulation de la protéine kinase A (PKA). Cette dernière est un puissant angiostatique inhibant la prolifération cellulaire des cellules endothéliales et activant leur apoptose, notamment via la voie MAPK/P38 (Kim et al., 2002; Petrai et al., 2008). Au contraire, l'activation de CXCR3-A induit la mobilisation des protéines Gα-i/o ou Gα-q activant des voies pro-tumorales (Phospholipase C, PI3K/AKT, MAPK/ERK, MAPK/JNK). Ceci induit la prolifération, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, notamment dans les cellules de glioblastomes (Maru et al., 2008; Wu et al., 2012). L'angiogenèse tumorale est un critère très important pour la progression des glioblastomes, mais les traitements anti-angiogèniques, comme celui du Bevacuzimab, restent à ce jour très controversés. La nécessité de trouver de nouveau marqueur en tant que cible tumorale dans les glioblastomes reste cruciale. CXCR3-A semble impliqué dans la progression tumorale du glioblastome, comme décrit par l'équipe de Jeffrey K. Harrison. Ce dernier montre qu'une forte expression tumorale de CXCR3 est un facteur de mauvais pronostique pour les patients atteints d'un glioblastome (Liu et al., 2011). De plus, l'étude sur modèle de glioblastome murin (cellules GL261) montrent que l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de CXCR3, le NBI-74330, induit une diminution de la progression tumorale et une augmentation du temps de survie des souris (Liu et al., 2011). Au vu de l'intérêt croissant de CXCR3 dans la progression tumorale, nous nous sommes, en plus de notre étude sur l'adenocarcinome pancreatique, intéressés aux rôles de CXCR3-A dans la progression du glioblastome.

Nous avons démontré que l'activation de CXCR3-A par fixation de ses ligands permet l'induction de voie de signalisations pro-tumorales (MAPK/ERK), en accord avec les études de Seema V. Maru (Maru et al., 2008). Nous avons démontré que CXCR3-A induit la migration des cellules de glioblastomes et provoque la mise en place d'un phénotype pro-invasif de ces tumeurs, ce qui est en accord avec l'étude de Chiu Liu montrant que l'expression de CXCR3 est un facteur de mauvais pronostique dans les glioblastomes (Liu et al., 2011). Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence de lien entre l'expression de la protéine CXCR3 et le grade des cellules issues de gliomes étudiés. Ceci est en opposition avec des études caractérisant l'expression de CXCR3 comme corrélée avec le grade des tumeurs gliales (Maru et al., 2008; Sharma et al., 2016). Cependant, aucune distinction entre les isoformes de CXCR3 n'est faite dans la plupart des études caractérisant l'expression de CXCR3 avec l'évolution des glioblastomes. Au vu des effets tumoraux opposés induits par CXCR3-A et CXCR3-B, le développement d'anticorps dirigés spécifiquement contre ces isoformes apparait nécessaire. L'expression et l'activation de CXCR3 étant deux paramètres distincts, CXCR3 pourrait être un biomarqueur de la progression du glioblastome via le maintien de son activation et donc de la régulation de sa localisation ou présence à la membrane.

III. Corrélation entre l'expression de CXCR3 et la mutation IDH1

Nous avons démontré *in vitro* le rôle de CXCR3-A et de LRP1 dans la progression tumorale du glioblastome. Nous avons aussi réalisé des études bioinformatiques sur différentes bases de données dont celle du *« Cancer Genome Atlas (TCGA) »* afin de voir la pertinence de nos données chez les patients. Nous avons réalisé des courbes de survie en fonction de l'expression de CXCR3, et ceci dans les différents grades de gliome. Bien que l'expression de CXCR3 ne soit pas un facteur de risque dans les gliomes de grade IV, nous voyons un fort impact de l'expression de cette protéine dans les gliomes de grade II ou III. En effet, plus l'expression de CXCR3 est forte, plus la survie des patients sera faible, faisant de CXCR3 un bon marqueur de l'agressivité de ce bas grade de gliomes (Figure 70).

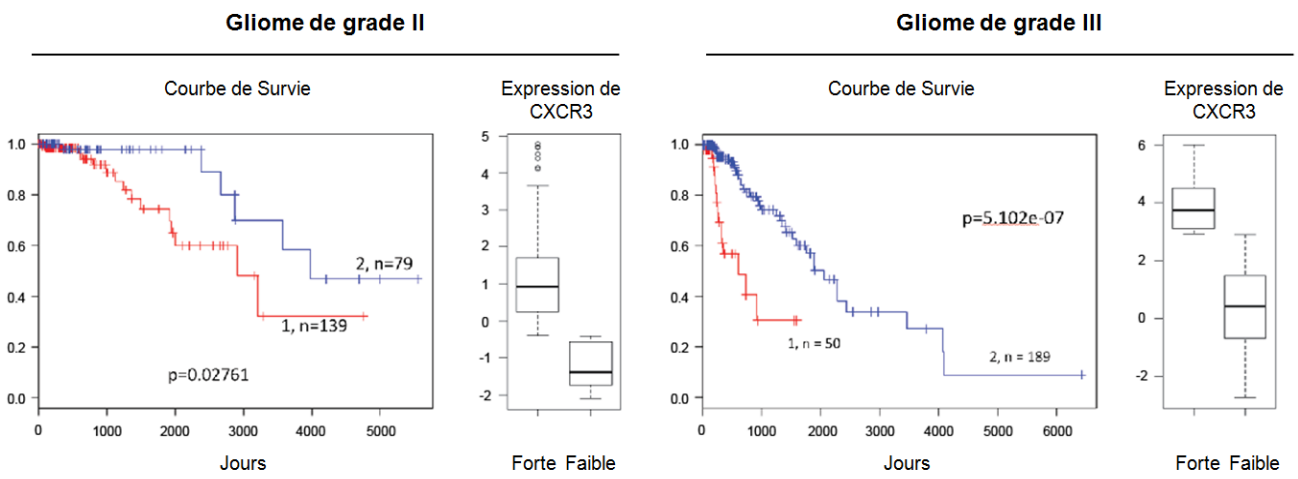
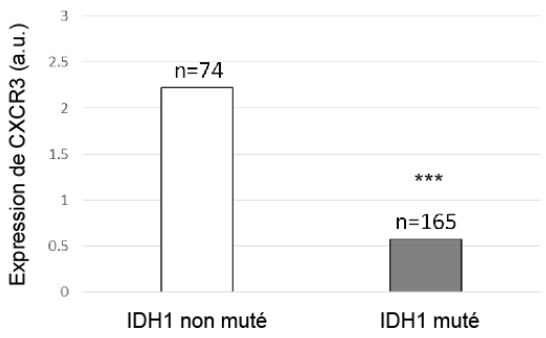


Figure 70: Analyse de survie des patients en fonction de l'expression de CXCR3

Nous avons par la suite regardé les corrélations entre l'expression de CXCR3 et d'autres facteurs pronostics, et de manière très intéressante, nous avons pu mettre en évidence une forte corrélation entre l'expression de CXCR3 et la mutation IDH1. En effet, en analysant l'expression de CXCR3 dans des gliomes de grade III présentant des mutations IDH1 ou non, nous avons observé que l'expression de CXCR3 était supérieure d'un facteur de 4 dans les gliomes non mutés pour IDH1. Cette mutation étant un facteur de bon pronostique, la corrélation de cette dernière avec la faible expression de CXCR3 se trouve être très intéressante. De la même manière, nous somme retourné sur les données de survie dans les différents grades de gliomes, et nous avons regardé la présence des mutations IDH1. Dans les gliomes de grade III, où CXCR3 est un bon facteur pronostique, nous avons pu voir que seulement 36% des patients possèdent la mutation IDH1 lorsque l'expression de CXCR3 est élevé et où la survie est la plus faible. Au contraire, lorsque l'expression de CXCR3 est faible et que la survie globale des patients augmente, 78% des patients possèdent la mutation IDH1. Les facteurs pronostiques « Expression de CXCR3 » et « Mutation IDH1 » sont donc très fortement corrélé, et renforce le fait que CXCR3 soit un marqueur de la progression du glioblastome (Figure 71). Du fait du faible nombre de gliomes secondaires mutés pour IDH1 évoluant en glioblastome, les analyses de survie en fonction de la mutation IDH1 et de l'expression de CXCR3 n'ont pas encore pu être effectuées.



Gliomes grade III		
	Haut risque	Bas risque
Expression de CXCR3	Forte	Faible
Nombre de patients	50	189
IDH1 non muté	32	42
IDH1 muté	18	147
% de patients avec mutation	36	77.8

Test Fisher : p-value < 0.0001

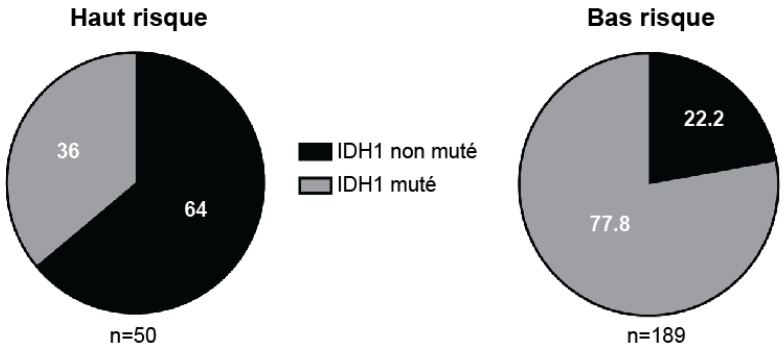


Figure 71: Corrélation de l'expression de CXCR3 avec la mutation IDH1

IV. LRP1 comme régulateur essentiel de l'activité pro-tumorale de CXCR3-A.

Nos résultats démontrent clairement que CXCR3-A est régulé par le récepteur d'endocytose LRP1. Ce dernier interagit physiquement avec CXCR3-A et permet son internalisation clathrine-dépendante. LRP1 est une protéine multifonctionnelle aux nombreux ligands, impliqué dans l'internalisation et la dégradation de nombreuses protéines plasmatiques (Strickland and Ranganathan, 2003), dans l'intégrité vasculaire (Boucher et al., 2003; Zhou et al., 2009), dans la perméabilité de la BHE (Yepes et al., 2003), mais aussi dans la progression tumorale en régulant notamment les adhérences cellulaires et l'invasion tumorale (Dedieu et al., 2008; Langlois et al., 2010). L'expression de LRP1 est augmentée dans les astrocytomes malins, et particulièrement dans les glioblastomes, suggérant un rôle important dans la progression tumorale des glioblastomes (Yamamoto et al., 1997). Plus récemment, l'équipe de Petra May a démontré le rôle de LRP1 comme un intégrateur indirect de

la voie de signalisation du S1P via la modulation de l'activation de la protéine Gαi (Nakajima et al., 2014). De manière extrêmement intéressante, LRP1 n'interagit pas avec les récepteurs au S1P qui sont des GPCR. Notre étude est la première montrant une telle interaction et ouvre la porte sur un tout nouveau rôle de LRP1, comme partenaire et régulateur « direct » de l'activité de certains GPCR. Par exemple, Manuel Yepes a montré que LRP1 fixe le t-PA et transduit ses effets protéolytiques dans la régulation de la perméabilité de la BHE (Yepes et al., 2003). Une hypothèse est que LRP1, en plus de fixer le t-PA, puisse intéragir avec un des substrats de ce dernier et ainsi faire le lien physique entre le t-PA et son substrat. On pourrait ainsi supposer qu'un GPCR de la famille PAR (récepteur de la thrombine par exemple) soit un substrat du t-PA et que son intéraction avec LRP1 favorise son clivage responsable de l'augmentation de la perméabilité de la BHE.

Des travaux ont montré le mécanisme d'internalisation de CXCR3-A dans les lymphocytes T comme étant indépendant de la clathrine, et conduisant à la dégradation lysosomale de CXCR3 (Meiser et al., 2008). Au contraire, nous avons montré dans les cellules tumorales de glioblastomes que l'internalisation du CXCR3-A était dépendante de la clathrine, et que le récepteur était recyclé à la membrane par la voie du trans-Golgi. Cette voie de recyclage a été mise en évidence pour plusieurs recepteurs, et se caractérise par un recyclage lent des récepteurs à la membrane (Bonifacino and Rojas, 2006; Koliwer et al., 2015; Shewan et al., 2003). Elle permet également de former des vésicules de stockage stables, protégeant les récepteurs de la dégradation lysosomale (Shewan et al., 2003). Nos résultats sur le trafic vésiculaire du CXCR3-A sont en accord avec des études sur le CXCR7 dans le cancer du sein, où l'internalisation est clathrine dépendante, pour un recyclage à la membrane du récepteur (Luker et al., 2010). De plus, cette étude montre clairement l'internalisation constitutive de CXCR7, même sans présence de son ligand (CXCL12), ce qui est en total accord avec nos résultats sur le CXCR3. La différence de trafic vésiculaire de CXCR3-A avec celui mis en évidence dans les lymphocytes T suggère que ce mécanisme est dépendant du type cellulaire. L'intéraction avec LRP1 pourrait être le signal initiateur d'une telle voie de recyclage, protégeant CXCR3-A de la dégradation lysosomale et de son *« turn-over »* (Figure 72).

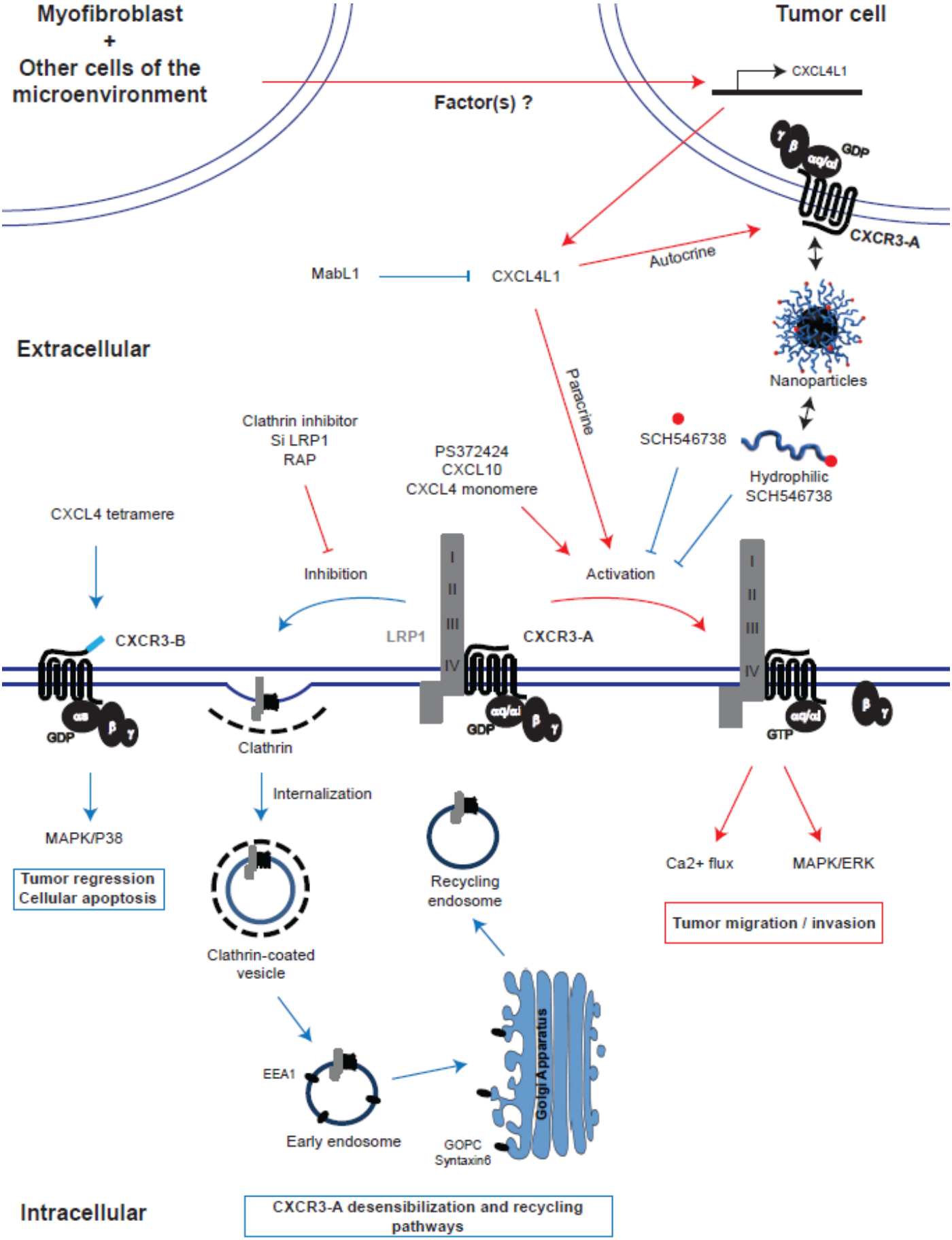


Figure 72: Modèle

D’autres récepteurs aux chimiokines de type CXCR ont déjà été caractérisés dans les tumeurs gliales. En 1998, Anil Sehgal a montré que CXCR4 était surexprimé dans les glioblastomes, et qu’il était nécessaire pour la prolifération tumorale (Sehgal et al., 1998). Différentes études ont confirmé l’expression de CXCR4 dans les cellules de glioblastomes, et ont montrées que son expression est corrélée avec un mauvais pronostic des patients (Bian et al., 2007; Zhou, 2002). CXCR7 a aussi été caractérisé comme étant exprimé dans les cellules de glioblastomes et pouvant fixer les mêmes ligands que CXCR4 : le CXCL11 et CXCL12 (Calatozzolo et al., 2011). CXCR3, CXCR4 et CXCR7 apparaissent comme les principaux GPCRs impliqués dans la progression des glioblastomes. Ainsi, dans nos modèles cellulaires de glioblastomes surexprimant CXCR3-A (et où LRP1 module ses mécanismes d’activations), nous avons regardé si l'interaction avec LRP1 était spécifique de CXCR3, ou si LRP1 pouvait aussi intéragir avec CXCR4 et CXCR7. Nous n’avons jamais pu voir d’interaction physique entre LRP1 et CXCR7 dans les cellules de glioblastome utilisées dans notre étude. Par contre, ces cellules n’exprimant pas de CXCR4, il nous a été impossible de savoir si LRP1 interagit avec CXCR4 ou non. Il serait donc intéressant de réaliser de telles expériences afin de pouvoir dire si CXCR3 est un CXCR spécifiquement ciblé par LRP1. En parallèle, nous avons également montré que ces deux récepteurs intéragissent dans le modèle *in vivo* de la CAM, mais aussi dans des lignées cellulaires issues de patient atteints de glioblastome. De plus, l’intéraction est également présente dans d’autres types cellulaires non tumoraux comme dans les cellules musculaires lisses, les CaSMC. L'intéraction CXCR3-A / LRP1 ouvre une nouvelle dimension d'étude dans les processus où ces deux protéines sont exprimées. Notament dans le domaine vasculaire, et particuliérement dans les CML, où CXCR3 ainsi que LRP1 sont impliqués dans des processus pathologiques comme l'athérosclérose.

V. Implication du couple CXCR3-A / LRP1 dans d'autres pathologies? Exemple de l'athérosclerose

En plus de son expression et de son rôle dans les cellules endothéliales, il est reconnu que CXCR3 est exprimé dans les CML, notamment dans les zones associées avec la formation de plaque d'athérome, faisant de son expression un facteur de risque dans le cadre de l'athérosclérose (Goldberg et al., 2001). LRP1, pour sa part, est aussi fortement exprimé dans les CML, et la génération de souris KO pour LRP1 dans les CML induit des défauts au niveau de la paroi vasculaire, et ainsi la formation de plaque d'athérome (Boucher et al., 2003). Il a été montré que LRP1 avait un rôle vasculo-protecteur via l'internalisation du complexe PDGFbb-PDGFRβ, lui permettant de contrôler ainsi l'hyperplasie vasculaire (Boucher et al., 2003; Loukinova, 2002; Zhou et al., 2009). Cependant, les travaux d'Eva J.A. van Wanrooij ont pu montrer dans les modèles murins que le nombre de plaques d'athéromes liées aux KO global des récepteurs aux LDL était diminué lors d'un traitement avec un antagoniste du CXCR3, réduisant ainsi le processus d'athérosclérose (van Wanrooij et al., 2007). Bien que l'implication spécifique de CXCR3-A ou CXCR3-B dans l'athérosclérose ne soit pas encore connu, cette étude suggère que la diminution des récepteurs aux LDL provoque la formation des plaques d'athéromes par un mécanisme lié à CXCR3. Adapté à notre étude, on peut penser que dans les souris KO pour LRP1, en plus de la suractivité de la voie du PDGFRβ, l'activité de CXCR3-A soit amplifiée dans les cellules musculaires lisses. Ceci pourrait contribuer à l'hyperprolifération et l'induction des plaques d'athéromes. Nos résultats préliminaires sur les CaSMC montrant l'interaction physique entre LRP1 et CXCR3 soutiennent cette hypothèse.

VI. La spécificité d'intéraction chimiokine / récepteur

La fixation des ligands sur les différentes isoformes de CXCR3 n'est pas encore complètement caractérisée. Notamment, nous avons pu montrer des intéractions préférentielles du CXCL4 pour le CXCR3-B et du CXCL4L1 pour CXCR3-A. Les changements de conformation, ainsi que l'oligomérisation des chimiokines sont des processus essentiels pour la fixation à leurs récepteurs respectifs, ainsi qu'au maintien de leurs fonctions (Paavola et al., 1998; Proudfoot et al., 2003). De récentes études montrent que l'état d'oligomérisation des chimiokines induit des changements de fixation aux glycosaminoglycanes et module ainsi leur présentation à leur récepteur (Dyer et al., 2015; Liang et al., 2016). Ceci est en accord avec nos travaux de mutation du CXCL4 montrant que sous forme tétramerique il se fixe au CXCR3-B alors que sous forme monomérique il se fixe au CXCR3-A. Ces résultats suggérent un changement de présentation ou d'affinité du CXCL4 sur les isoformes CXCR3-A ou CXCR3-B. De manière toute aussi intéressante, nous avons regardé par PWR la fixation de l'agoniste commercial PS372424 (fragment actif du CXCL10) et son impact sur la conformation des récepteurs CXCR3-A ou CXCR3-B. Le CXCL10 se fixe principalement sur le CXCR3-A avec un Kd 10 fois supérieur à celui obtenu avec le CXCR3-B. Cependant, nous observons tout de même une fixation sur les deux isoformes, et les conformations induites sont diamétralement opposées. En effet, nous pouvons dire que suite à une stimulation du récepteur par le PS372424, le CXCR3-A augmente son allongement sur la membrane (augmentation de la polarisation P-Pol), alors que le CXCR3-B se rétracte en diminuant son étalement et son allongement (diminution de P-Pol et de S-Pol). Les travaux sur les conformations de ces récepteurs, en collaboration avec le Dr. Isabel Alves, sont encore en cours, notamment avec l'utilisation d'autres ligands de CXCR3 (CXCL4, CXCL4L1, CXCL9, CXCL11). Ces premiers résultats suggèrent que les ligands induisent des changements de conformation de CXCR3 différents. Ceci peut se traduire par des protéines G recrutées différentes, et des voies de signalisation activées différentes. Ceci est en accord avec toute la bibliographie sur CXCR3-A et CXCR3-B présentée au cours de cette thèse décrivant les voies de signalisation et effets biologiques des deux isoformes (Datta et al., 2010; Hu et al., 2015; Kim et al., 2002; Lasagni et al., 2003; Maru et al., 2008; Romagnani et al.,

2001; Wu et al., 2012). De plus, LRP1 semble impliqué dans ces changements de conformation puisque la diminution de LRP1, en plus de maintenir l'activité de CXCR3-A, entraine une grande augmentation du critère allongement, et induit une augmentation de l'étalement de ce récepteur.

VII. Bilan général

L'objectif de ces trois dernières années, était d'entreprendre l'étude de CXCR3 sous deux grands angles : l'étude de ses ligands et des deux principales isoformes de CXCR3 : CXCR3-A et CXCR3-B. Nous avons réussi grâce à l'utilisation d'outils biologiques à comprendre les mécanismes d'action de CXCR3-A et de ses ligands dans la progression tumorale, mais aussi le rôle essentielle de LRP1 comme régulateur de cette activation. L'utilisation d'outils biophysiques et moléculaires nous ont permis de comprendre certaines interactions préférentielles entre les ligands et les deux isoformes, et notamment que l'état d'oligomérisation de ces chimiokines est important pour la fixation sur l'une ou l'autre isoforme. Enfin, l'utilisation d'outils chimiques nous permettra de développer une future stratégie thérapeutique ciblant le CXCR3 dans les cellules tumorales (Figure 72).

Ce projet s'inscrit dans une dynamique globale réalisée par l'équipe «Chimiokine» du laboratoire. De nombreux projets ont pu émerger suite aux travaux présentés précédemment, et ce dans différents domaines d'études (biologie cellulaire, physique et chimie) dans lesquelles je participe pleinement. Ainsi, plusieurs travaux sont actuellement en cours dans notre groupe de recherche. Parmi eux, la nature exacte du complexe CXCR3-A / LRP1 et les domaines d'intéractions (notamment au niveau du CXCR3-A) devraient apporter de nombreuses informations sur les processus d'internalisation du CXCR3-A induite par LRP1. De plus, bien que cette intéraction semble spécifique de CXCR3, nous ne pouvons toujours pas affirmer si LRP1 est aussi capable d'intéragir avec CXCR3-B ou non. LRP1 pourrait être un régulateur global des isoformes de CXCR3, entrainant leur internalisation et

donc leur désensibilisation. L'intéraction potentielle entre LRP1 et CXCR3-B est toujours en cours de caractérisation au laboratoire. La stratégie thérapeutique serait complètement opposée si une telle intéraction pouvait être vérifiée. En effet, dans le cas de l'isoforme CXCR3-A, l'intéraction avec LRP1 permet de diminuer les effets pro-tumoraux de CXCR3-A et la stratégie consisterait à cibler et inhiber spécifiquement le récepteur (notament avec les nanoparticules de SCH546738). Au contraire, CXCR3-B étant une isoforme anti-tumorale et angiostatique dans de nombreux cancers, la stratégie serait cette fois ci de déstabiliser l'intéraction avec LRP1 pour maintenir l'activation de CXCR3-B. Nous avons montré qu'il était possible de déstabiliser cette interaction par traitement exogène, par exemple avec la protéine chaperonne RAP. Cependant, il est possible que si une telle interaction entre CXCR3-B et LRP1 soit réelle, les effets induits par LRP1 demeurent différents.

En plus de LRP1, les ligands de CXCR3 sont aussi capables de modifier la réponse de ce dernier, et notamment nous avons pu montrer que l'état d'oligomérisation des chimiokines joue un rôle important dans la spécificité d'activation des deux isoformes CXCR3-A et CXCR3-B. L'étude de la liaison des chimiokines aux GAGs devrait répondre à de nombreuses questions concernant la présentation de ces chimiokines aux isoformes de CXCR3. Après avoir caractérisé le rôle de CXCR3-A dans la progression tumorale dans le glioblastome ainsi que dans les tumeurs de PDAC, l'élaboration des nanoparticules couplées à l'antagoniste de CXCR3 et capables d'inhiber l'activité du CXCR3 présent à la surface membranaire, représente le début d'une stratégie thérapeutique ciblée prometteuse. Comme toutes les nouvelles stratégies en développement, la formation et l'action de ces nanoparticules vont s'accompagner de plusieurs études. Une fois que leur action aura pu être caractérisée *in vivo*, l'un des critères les plus importants sera probablement de réussir à cibler spécifiquement le CXCR3-A dans les cellules tumorales, et non pas le CXCR3-B anti-tumoral se trouvant soit dans les cellules composant la tumeur, mais aussi dans le microenvironnement tumoral et sain. En conclusion, CXCR3 est dans plusieurs cancers un des acteurs majeurs de la progression tumorale. Continuer et approfondir l'étude de ces mécanismes d'actions et de ses partenaires nous permettraient de mieux appréhender la régulation de son activité et de ses fonctions biologiques.

Bibliographie

Adams, D.H., and Lloyd, A.R. (1997). Chemokines: leucocyte recruitment and activation cytokines. Lancet Lond. Engl. *349*, 490–495.

Adams, D.H., and Shaw, S. (1994). Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. The Lancet *343*, 831–836.

Aldape, K., Burger, P.C., and Perry, A. (2007). Clinicopathologic aspects of 1p/19q loss and the diagnosis of oligodendroglioma. Arch. Pathol. Lab. Med. *131*, 242–251.

Backer, J.M. (2010). The regulation of class IA PI 3-kinases by inter-subunit interactions. Curr. Top. Microbiol. Immunol. *346*, 87–114.

Bajou, K., Masson, V., Gerard, R.D., Schmitt, P.M., Albert, V., Praus, M., Lund, L.R., Frandsen, T.L., Brunner, N., Dano, K., et al. (2001). The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies. J. Cell Biol. *152*, 777–784.

Baker, A.H., Edwards, D.R., and Murphy, G. (2002). Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. J. Cell Sci. *115*, 3719–3727.

Balkwill, F., and Mantovani, A. (2001). Inflammation and cancer: back to Virchow? The Lancet *357*, 539–545.

Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D.M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. Curr. Opin. Genet. Dev. *15*, 102–111.

Barnes, H., Larsen, B., Tyers, M., and van Der Geer, P. (2001). Tyrosine-phosphorylated low density lipoprotein receptor-related protein 1 (Lrp1) associates with the adaptor protein SHC in SRC-transformed cells. J. Biol. Chem. *276*, 19119–19125.

Beffert, U. (2003). Functions of lipoprotein receptors in neurons. J. Lipid Res. *45*, 403–409.

Belperio, J.A., Keane, M.P., Arenberg, D.A., Addison, C.L., Ehlert, J.E., Burdick, M.D., and Strieter, R.M. (2000). CXC chemokines in angiogenesis. J. Leukoc. Biol. *68*, 1–8.

Berger, E.A., Murphy, P.M., and Farber, J.M. (1999). Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. Annu. Rev. Immunol. *17*, 657–700.

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

Bergers, G., and Coussens, L.M. (2000). Extrinsic regulators of epithelial tumor progression: metalloproteinases. Curr. Opin. Genet. Dev. *10*, 120–127.

Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T.H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z., et al. (2000). Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. Nat. Cell Biol. *2*, 737–744.

Bestebroer, J., de Haas, C.J.C., and van Strijp, J.A.G. (2010). How microorganisms avoid phagocyte attraction. FEMS Microbiol. Rev. *34*, 395–414.

Bian, X., Yang, S., Chen, J., Ping, Y., Zhou, X., Wang, Q., Jiang, X., Gong, W., Xiao, H., Du, L., et al. (2007). Preferential expression of chemokine receptor CXCR4 by highly malignant human gliomas and its association with poor patient survival. Neurosurgery *61*, 570-578-579.

Billottet, C., Quemener, C., and Bikfalvi, A. (2013). CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis. Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer *1836*, 287–295.

Bonacchi, A., Romagnani, P., Romanelli, R.G., Efsen, E., Annunziato, F., Lasagni, L., Francalanci, M., Serio, M., Laffi, G., Pinzani, M., et al. (2001). Signal transduction by the chemokine receptor CXCR3: activation of Ras/ERK, Src, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt controls cell migration and proliferation in human vascular pericytes. J. Biol. Chem. *276*, 9945–9954.

Bonifacino, J.S., and Rojas, R. (2006). Retrograde transport from endosomes to the trans-Golgi network. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *7*, 568–579.

Boucher, P., Gotthardt, M., Li, W.-P., Anderson, R.G.W., and Herz, J. (2003). LRP: role in vascular wall integrity and protection from atherosclerosis. Science *300*, 329–332.

Brandes, A.A., Tosoni, A., Cavallo, G., Reni, M., Franceschi, E., Bonaldi, L., Bertorelle, R., Gardiman, M., Ghimenton, C., Iuzzolino, P., et al. (2006). Correlations Between O6-Methylguanine DNA Methyltransferase Promoter Methylation Status, 1p and 19q Deletions, and Response to Temozolomide in Anaplastic and Recurrent Oligodendroglioma: A Prospective GICNO Study. J. Clin. Oncol. *24*, 4746–4753.

Brem, H., Piantadosi, S., Burger, P.C., Walker, M., Selker, R., Vick, N.A., Black, K., Sisti, M., Brem, S., and Mohr, G. (1995). Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. Lancet Lond. Engl. *345*, 1008–1012.

Brightling, C.E., Ammit, A.J., Kaur, D., Black, J.L., Wardlaw, A.J., Hughes, J.M., and Bradding, P. (2005). The CXCL10/CXCR3 Axis Mediates Human Lung Mast Cell Migration to Asthmatic Airway Smooth Muscle. Am. J. Respir. Crit. Care Med. *171*, 1103–1108.

Bu, G., Geuze, H.J., Strous, G.J., and Schwartz, A.L. (1995). 39 kDa receptor-associated protein is an ER resident protein and molecular chaperone for LDL receptor-related protein. EMBO J. *14*, 2269–2280.

Cai, W., Shin, D.-W., Chen, K., Gheysens, O., Cao, Q., Wang, S.X., Gambhir, S.S., and Chen, X. (2006). Peptide-Labeled Near-Infrared Quantum Dots for Imaging Tumor Vasculature in Living Subjects. Nano Lett. *6*, 669–676.

Cairncross, J.G., Ueki, K., Zlatescu, M.C., Lisle, D.K., Finkelstein, D.M., Hammond, R.R., Silver, J.S., Stark, P.C., Macdonald, D.R., Ino, Y., et al. (1998). Specific genetic

predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. J. Natl. Cancer Inst. *90*, 1473–1479.

Calatozzolo, C., Canazza, A., Pollo, B., Di Pierro, E., Ciusani, E., Maderna, E., Salce, E., Sponza, V., Frigerio, S., Di Meco, F., et al. (2011). Expression of the new CXCL12 receptor, CXCR7, in gliomas. Cancer Biol. Ther. *11*, 242–253.

Cambien, B., Karimdjee, B.F., Richard-Fiardo, P., Bziouech, H., Barthel, R., Millet, M.A., Martini, V., Birnbaum, D., Scoazec, J.Y., Abello, J., et al. (2009). Organ-specific inhibition of metastatic colon carcinoma by CXCR3 antagonism. Br. J. Cancer *100*, 1755–1764.

Cervi, D., Yip, T.-T., Bhattacharya, N., Podust, V.N., Peterson, J., Abou-Slaybi, A., Naumov, G.N., Bender, E., Almog, N., Italiano, J.E., et al. (2007). Platelet-associated PF-4 as a biomarker of early tumor growth. Blood *111*, 1201–1207.

Chang, C., and Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. Trends Cell Biol. *11*, S37-43.

Clapham, D.E., and Neer, E.J. (1997). G protein βγ subunits. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *37*, 167–203.

Cohen, M.H., Shen, Y.L., Keegan, P., and Pazdur, R. (2009). FDA Drug Approval Summary: Bevacizumab (Avastin(R)) as Treatment of Recurrent Glioblastoma Multiforme. The Oncologist *14*, 1131–1138.

Colvin, R.A., Campanella, G.S.V., Sun, J., and Luster, A.D. (2004). Intracellular domains of CXCR3 that mediate CXCL9, CXCL10, and CXCL11 function. J. Biol. Chem. *279*, 30219–30227.

Colvin, R.A., Campanella, G.S.V., Manice, L.A., and Luster, A.D. (2006). CXCR3 requires tyrosine sulfation for ligand binding and a second extracellular loop arginine residue for ligand-induced chemotaxis. Mol. Cell. Biol. *26*, 5838–5849.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (1996). Matrix metalloproteinases and the development of cancer. Chem. Biol. *3*, 895–904.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. Nature *420*, 860–867.

Danø, K., Rømer, J., Nielsen, B.S., Bjørn, S., Pyke, C., Rygaard, J., and Lund, L.R. (1999). Cancer invasion and tissue remodeling--cooperation of protease systems and cell types. APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. *107*, 120–127.

D'Arcangelo, G. (2005). Apoer2: a reelin receptor to remember. Neuron *47*, 471–473.

Darchen, F., and Goud, B. (2000). Multiple aspects of Rab protein action in the secretory pathway: focus on Rab3 and Rab6. Biochimie *82*, 375–384.

Datta, D., Contreras, A.G., Grimm, M., Waaga-Gasser, A.M., Briscoe, D.M., and Pal, S. (2008). Calcineurin inhibitors modulate CXCR3 splice variant expression and mediate renal cancer progression. J. Am. Soc. Nephrol. JASN *19*, 2437–2446.

Datta, D., Banerjee, P., Gasser, M., Waaga-Gasser, A.M., and Pal, S. (2010). CXCR3-B Can Mediate Growth-inhibitory Signals in Human Renal Cancer Cells by Down-regulating the Expression of Heme Oxygenase-1. J. Biol. Chem. *285*, 36842–36848.

Daumas-Duport, C., Varlet, P., Tucker, M.L., Beuvon, F., Cervera, P., and Chodkiewicz, J.P. (1997a). Oligodendrogliomas. Part I: Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations: a study of 153 cases. J. Neurooncol. *34*, 37–59.

Daumas-Duport, C., Tucker, M.L., Kolles, H., Cervera, P., Beuvon, F., Varlet, P., Udo, N., Koziak, M., and Chodkiewicz, J.P. (1997b). Oligodendrogliomas. Part II: A new grading system based on morphological and imaging criteria. J. Neurooncol. *34*, 61–78.

Davis, C.G., Goldstein, J.L., Südhof, T.C., Anderson, R.G., Russell, D.W., and Brown, M.S. (1987). Acid-dependent ligand dissociation and recycling of LDL receptor mediated by growth factor homology region. Nature *326*, 760–765.

Dedieu, S., Langlois, B., Devy, J., Sid, B., Henriet, P., Sartelet, H., Bellon, G., Emonard, H., and Martiny, L. (2008). LRP-1 Silencing Prevents Malignant Cell Invasion despite Increased Pericellular Proteolytic Activities. Mol. Cell. Biol. *28*, 2980–2995.

Dehmer, G.J., Fisher, M., Tate, D.A., Teo, S., and Bonnem, E.M. (1995). Reversal of heparin anticoagulation by recombinant platelet factor 4 in humans. Circulation *91*, 2188–2194.

Denny, B.J., Wheelhouse, R.T., Stevens, M.F., Tsang, L.L., and Slack, J.A. (1994). NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. Biochemistry (Mosc.) *33*, 9045–9051.

Dolecek, T.A., Propp, J.M., Stroup, N.E., and Kruchko, C. (2012). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2005–2009. Neuro-Oncol. *14*, v1–v49.

Donoso, M., Cancino, J., Lee, J., van Kerkhof, P., Retamal, C., Bu, G., Gonzalez, A., Cáceres, A., and Marzolo, M.-P. (2009). Polarized traffic of LRP1 involves AP1B and SNX17 operating on Y-dependent sorting motifs in different pathways. Mol. Biol. Cell *20*, 481–497.

Dresemann, G. (2005). Imatinib and hydroxyurea in pretreated progressive glioblastoma multiforme: a patient series. Ann. Oncol. *16*, 1702–1708.

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

Dyer, D.P., Salanga, C.L., Volkman, B.F., Kawamura, T., and Handel, T.M. (2015). The dependence of chemokine–glycosaminoglycan interactions on chemokine oligomerization. Glycobiology cwv100.

Egeblad, M., and Werb, Z. (2002). New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nat. Rev. Cancer *2*, 161–174.

Ehlert, J.E., Addison, C.A., Burdick, M.D., Kunkel, S.L., and Strieter, R.M. (2004). Identification and Partial Characterization of a Variant of Human CXCR3 Generated by Posttranscriptional Exon Skipping. J. Immunol. *173*, 6234–6240.

Ellis, V., and Danø, K. (1993). Potentiation of plasminogen activation by an anti-urokinase monoclonal antibody due to ternary complex formation. A mechanistic model for receptor-mediated plasminogen activation. J. Biol. Chem. *268*, 4806–4813.

Eskilsson, E., Rosland, G.V., Talasila, K.M., Knappskog, S., Keunen, O., Sottoriva, A., Foerster, S., Solecki, G., Taxt, T., Jirik, R., et al. (2016). EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogenous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. Neuro-Oncol.

Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S.N., Hidalgo, O.F., Vanaclocha, V., Baylin, S.B., and Herman, J.G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. N. Engl. J. Med. *343*, 1350–1354.

Faraji, A.H., and Wipf, P. (2009). Nanoparticles in cellular drug delivery. Bioorg. Med. Chem. *17*, 2950–2962.

Farber, J.M. (1993). HuMig: a new human member of the chemokine family of cytokines. Biochem. Biophys. Res. Commun. *192*, 223–230.

Fay, P.J., and Jenkins, P.V. (2005). Mutating factor VIII: lessons from structure to function. Blood Rev. *19*, 15–27.

Ferguson, S.S. (2001). Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. Pharmacol. Rev. *53*, 1–24.

Ferns, G.A., Raines, E.W., Sprugel, K.H., Motani, A.S., Reidy, M.A., and Ross, R. (1991). Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. Science *253*, 1129–1132.

Ferrara, N. (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. Nat. Rev. Cancer *2*, 795–803.

Fischer, I., Gagner, J.-P., Law, M., Newcomb, E.W., and Zagzag, D. (2005). Angiogenesis in gliomas: biology and molecular pathophysiology. Brain Pathol. Zurich Switz. *15*, 297–310.

Flintoft, L. (2004). Going for the double. Nat. Rev. Cancer *4*, 172–172.

Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. N. Engl. J. Med. *285*, 1182–1186.

Folkman, J. (1974). Tumor angiogenesis. Adv. Cancer Res. *19*, 331–358.

Folkman, J. (2007). Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? Nat. Rev. Drug Discov. *6*, 273–286.

Folkman, J., Merler, E., Abernathy, C., and Williams, G. (1971). Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. J. Exp. Med. *133*, 275–288.

Friedman, H.S., Kerby, T., and Calvert, H. (2000). Temozolomide and treatment of malignant glioma. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *6*, 2585–2597.

Fu, Y., Zheng, S., Zheng, Y., Huang, R., An, N., Liang, A., and Hu, C. (2012). Glioma derived isocitrate dehydrogenase-2 mutations induced up-regulation of HIF-1α and β-catenin signaling: Possible impact on glioma cell metastasis and chemo-resistance. Int. J. Biochem. Cell Biol. *44*, 770–775.

Garin-Chesa, P., Old, L.J., and Rettig, W.J. (1990). Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. *87*, 7235–7239.

Gerson, S.L. (2004). MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. Nat. Rev. Cancer *4*, 296–307.

Gettins, P.G.W., and Dolmer, K. (2016). The High Affinity Binding Site on Plasminogen Activator Inhibitor-1 (PAI-1) for the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP1) Is Composed of Four Basic Residues. J. Biol. Chem. *291*, 800–812.

Gillibert-Duplantier, J., Rullier, A., Neaud, V., Kisiel, W., and Rosenbaum, J. (2010). Liver myofibroblasts activate protein C and respond to activated protein C. World J. Gastroenterol. *16*, 210–216.

Gillitzer, R., and Goebeler, M. (2001). Chemokines in cutaneous wound healing. J. Leukoc. Biol. *69*, 513–521.

Goldberg, S.H., van der Meer, P., Hesselgesser, J., Jaffer, S., Kolson, D.L., Albright, A.V., González-Scarano, F., and Lavi, E. (2001). CXCR3 expression in human central nervous system diseases. Neuropathol. Appl. Neurobiol. *27*, 127–138.

Gomez, D.E., Alonso, D.F., Yoshiji, H., and Thorgeirsson, U.P. (1997). Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. Eur. J. Cell Biol. *74*, 111–122.

Gonias, S.L., and Campana, W.M. (2014). LDL receptor-related protein-1: a regulator of inflammation in atherosclerosis, cancer, and injury to the nervous system. Am. J. Pathol. *184*, 18–27.

Gopal, U., Bohonowych, J.E., Lema-Tome, C., Liu, A., Garrett-Mayer, E., Wang, B., and Isaacs, J.S. (2011). A Novel Extracellular Hsp90 Mediated Co-Receptor Function for LRP1 Regulates EphA2 Dependent Glioblastoma Cell Invasion. PLoS ONE *6*, e17649.

Goparaju, S.K., Jolly, P.S., Watterson, K.R., Bektas, M., Alvarez, S., Sarkar, S., Mel, L., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S., et al. (2005). The S1P2 Receptor Negatively

Regulates Platelet-Derived Growth Factor-Induced Motility and Proliferation. Mol. Cell. Biol. *25*, 4237–4249.

Guerreiro, A.S., Fattet, S., Fischer, B., Shalaby, T., Jackson, S.P., Schoenwaelder, S.M., Grotzer, M.A., Delattre, O., and Arcaro, A. (2008). Targeting the PI3K p110alpha isoform inhibits medulloblastoma proliferation, chemoresistance, and migration. Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res. *14*, 6761–6769.

Gusella, G.L., Musso, T., Bosco, M.C., Espinoza-Delgado, I., Matsushima, K., and Varesio, L. (1993). IL-2 up-regulates but IFN-gamma suppresses IL-8 expression in human monocytes. J. Immunol. *151*, 2725–2732.

Hagedorn, M., Javerzat, S., Gilges, D., Meyre, A., de Lafarge, B., Eichmann, A., and Bikfalvi, A. (2005). Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *102*, 1643–1648.

Hahn-Dantona, E., Ruiz, J.F., Bornstein, P., and Strickland, D.K. (2001). The Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Modulates Levels of Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) by Mediating Its Cellular Catabolism. J. Biol. Chem. *276*, 15498–15503.

Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell *86*, 353–364.

Hardee, M.E., and Zagzag, D. (2012). Mechanisms of Glioma-Associated Neovascularization. Am. J. Pathol. *181*, 1126–1141.

Hashizume, H., Baluk, P., Morikawa, S., McLean, J.W., Thurston, G., Roberge, S., Jain, R.K., and McDonald, D.M. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. Am. J. Pathol. *156*, 1363–1380.

Hellström, M., Kalén, M., Lindahl, P., Abramsson, A., and Betsholtz, C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. Dev. Camb. Engl. *126*, 3047–3055.

Herz, J., and Strickland, D.K. (2001). LRP: a multifunctional scavenger and signaling receptor. J. Clin. Invest. *108*, 779–784.

Herz, J., Clouthier, D.E., and Hammer, R.E. (1992). LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. Cell *71*, 411–421.

Hobbs, S.K., Monsky, W.L., Yuan, F., Roberts, W.G., Griffith, L., Torchilin, V.P., and Jain, R.K. (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *95*, 4607–4612.

Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Barak, L.S., Olivera, A., Poulton, S., Caron, M.G., Milstien, S., and Spiegel, S. (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. Science *291*, 1800–1803.

Hofer, S., and Merlo, A. (2002). Options thérapeutiques pour les gliomes malins de degré III et IV OMS. Forum Med Suisse *No 32/33 14 août 2002*, 748–755.

Höland, K., Boller, D., Hagel, C., Dolski, S., Treszl, A., Pardo, O.E., Cwiek, P., Salm, F., Leni, Z., Shepherd, P.R., et al. (2014). Targeting class IA PI3K isoforms selectively impairs cell growth, survival, and migration in glioblastoma. PloS One *9*, e94132.

Holash, J., Maisonpierre, P.C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C.R., Zagzag, D., Yancopoulos, G.D., and Wiegand, S.J. (1999). Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. Science *284*, 1994–1998.

Hoogewerf, A.J., Kuschert, G.S., Proudfoot, A.E., Borlat, F., Clark-Lewis, I., Power, C.A., and Wells, T.N. (1997). Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. Biochemistry (Mosc.) *36*, 13570–13578.

Hu, M., Li, K., Maskey, N., Xu, Z., Yu, F., Peng, C., Li, Y., and Yang, G. (2015). Overexpression of the chemokine receptor CXCR3 and its correlation with favorable prognosis in gastric cancer. Hum. Pathol. *46*, 1872–1880.

Huang, Y., Snuderl, M., and Jain, R.K. (2011). Polarization of Tumor-Associated Macrophages: A Novel Strategy for Vascular Normalization and Antitumor Immunity. Cancer Cell *19*, 1–2.

Humphrey, P.A., Wong, A.J., Vogelstein, B., Friedman, H.S., Werner, M.H., Bigner, D.D., and Bigner, S.H. (1988). Amplification and expression of the epidermal growth factor receptor gene in human glioma xenografts. Cancer Res. *48*, 2231–2238.

Hutagalung, A.H., and Novick, P.J. (2011). Role of Rab GTPases in Membrane Traffic and Cell Physiology. Physiol. Rev. *91*, 119–149.

Ichinose, A., Fujikawa, K., and Suyama, T. (1986). The activation of pro-urokinase by plasma kallikrein and its inactivation by thrombin. J. Biol. Chem. *261*, 3486–3489.

Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402, Cairncross, G., Berkey, B., Shaw, E., Jenkins, R., Scheithauer, B., Brachman, D., Buckner, J., Fink, K., Souhami, L., et al. (2006). Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *24*, 2707–2714.

Iqbal, A., Eckerdt, F., Bell, J., Nakano, I., Giles, F.J., Cheng, S.-Y., Lulla, R.R., Goldman, S., and Platanias, L.C. (2016). Targeting of glioblastoma cell lines and glioma stem cells by combined PIM kinase and PI3K-p110α inhibition. Oncotarget *7*, 33192–33201.

Jenh, C.-H., Cox, M.A., Cui, L., Reich, E.-P., Sullivan, L., Chen, S.-C., Kinsley, D., Qian, S., Kim, S.H., Rosenblum, S., et al. (2012). A selective and potent CXCR3 antagonist SCH 546738 attenuates the development of autoimmune diseases and delays graft rejection. BMC Immunol. *13*, 2.

Jensen, J.K., Dolmer, K., Schar, C., and Gettins, P.G.W. (2009). Receptor-associated protein (RAP) has two high-affinity binding sites for the low-density lipoprotein receptor-related protein (LRP): consequences for the chaperone functions of RAP. Biochem. J. *421*, 273–282.

Jilani, S.M., Murphy, T.J., Thai, S.N.M., Eichmann, A., Alva, J.A., and Iruela-Arispe, M.L. (2003). Selective binding of lectins to embryonic chicken vasculature. J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc. *51*, 597–604.

Johnson, E.B. (2005). Abnormal development of the apical ectodermal ridge and polysyndactyly in Megf7-deficient mice. Hum. Mol. Genet. *14*, 3523–3538.

Jones, D.T.W., Kocialkowski, S., Liu, L., Pearson, D.M., Backlund, L.M., Ichimura, K., and Collins, V.P. (2008). Tandem Duplication Producing a Novel Oncogenic BRAF Fusion Gene Defines the Majority of Pilocytic Astrocytomas. Cancer Res. *68*, 8673–8677.

Karnik, S., Gogonea, C., Patil, S., Saad, Y., and Takezako, T. (2003). Activation of G-protein-coupled receptors: a common molecular mechanism. Trends Endocrinol. Metab. *14*, 431–437.

Katz, A., Wu, D., and Simon, M.I. (1992). Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of phospholipase C. Nature *360*, 686–689.

Kawada, K., Sonoshita, M., Sakashita, H., Takabayashi, A., Yamaoka, Y., Manabe, T., Inaba, K., Minato, N., Oshima, M., and Taketo, M.M. (2004). Pivotal role of CXCR3 in melanoma cell metastasis to lymph nodes. Cancer Res. *64*, 4010–4017.

Kim, S., Bakre, M., Yin, H., and Varner, J.A. (2002). Inhibition of endothelial cell survival and angiogenesis by protein kinase A. J. Clin. Invest. *110*, 933–941.

Kioi, M., Vogel, H., Schultz, G., Hoffman, R.M., Harsh, G.R., and Brown, J.M. (2010). Inhibition of vasculogenesis, but not angiogenesis, prevents the recurrence of glioblastoma after irradiation in mice. J. Clin. Invest. *120*, 694–705.

Kleihues, P., and Ohgaki, H. (1999). Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. Neuro-Oncol. *1*, 44–51.

Kleihues, P., and Sobin, L.H. (2000). World Health Organization classification of tumors. Cancer *88*, 2887.

Kleihues, P., Burger, P.C., and Scheithauer, B.W. (1993). The new WHO classification of brain tumours. Brain Pathol. Zurich Switz. *3*, 255–268.

Kobayashi, H., Schmitt, M., Goretzki, L., Chucholowski, N., Calvete, J., Kramer, M., Günzler, W.A., Jänicke, F., and Graeff, H. (1991). Cathepsin B efficiently activates the soluble and the tumor cell receptor-bound form of the proenzyme urokinase-type plasminogen activator (Pro-uPA). J. Biol. Chem. *266*, 5147–5152.

Koliwer, J., Park, M., Bauch, C., von Zastrow, M., and Kreienkamp, H.-J. (2015). The Golgi-associated PDZ Domain Protein PIST/GOPC Stabilizes the β1-Adrenergic

Receptor in Intracellular Compartments after Internalization. J. Biol. Chem. *290*, 6120–6129.

Koorstra, J.-B.M., Hustinx, S.R., Offerhaus, G.J.A., and Maitra, A. (2008). Pancreatic carcinogenesis. Pancreatol. Off. J. Int. Assoc. Pancreatol. IAP Al *8*, 110–125.

Korniejewska, A., McKnight, A.J., Johnson, Z., Watson, M.L., and Ward, S.G. (2011). Expression and agonist responsiveness of CXCR3 variants in human T lymphocytes: CXCR3 variants in human T lymphocytes. Immunology *132*, 503–515.

Kounnas, M.Z., Moir, R.D., Rebeck, G.W., Bush, A.I., Argraves, W.S., Tanzi, R.E., Hyman, B.T., and Strickland, D.K. (1995). LDL receptor-related protein, a multifunctional ApoE receptor, binds secreted beta-amyloid precursor protein and mediates its degradation. Cell *82*, 331–340.

Krieg, C., and Boyman, O. (2009). The role of chemokines in cancer immune surveillance by the adaptive immune system. Semin. Cancer Biol. *19*, 76–83.

Kuschert, G.S.V., Coulin, F., Power, C.A., Proudfoot, A.E.I., Hubbard, R.E., Hoogewerf, A.J., and Wells, T.N.C. (1999). Glycosaminoglycans Interact Selectively with Chemokines and Modulate Receptor Binding and Cellular Responses. Biochemistry (Mosc.) *38*, 12959–12968.

Lambert, M.P., Wang, Y., Bdeir, K.H., Nguyen, Y., Kowalska, M.A., and Poncz, M. (2009). Platelet factor 4 regulates megakaryopoiesis through low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) on megakaryocytes. Blood *114*, 2290–2298.

Langlois, B., Perrot, G., Schneider, C., Henriet, P., Emonard, H., Martiny, L., and Dedieu, S. (2010). LRP-1 Promotes Cancer Cell Invasion by Supporting ERK and Inhibiting JNK Signaling Pathways. PLoS ONE *5*, e11584.

Lasagni, L., Francalanci, M., Annunziato, F., Lazzeri, E., Giannini, S., Cosmi, L., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Orlando, C., Maggi, E., et al. (2003). An Alternatively Spliced Variant of CXCR3 Mediates the Inhibition of Endothelial Cell Growth Induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and Acts as Functional Receptor for Platelet Factor 4. J. Exp. Med. *197*, 1537–1549.

Lasagni, L., Grepin, R., Mazzinghi, B., Lazzeri, E., Meini, C., Sagrinati, C., Liotta, F., Frosali, F., Ronconi, E., Alain-Courtois, N., et al. (2007). PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. Blood *109*, 4127–4134.

Lee, D., Walsh, J.D., Mikhailenko, I., Yu, P., Migliorini, M., Wu, Y., Krueger, S., Curtis, J.E., Harris, B., Lockett, S., et al. (2006). RAP Uses a Histidine Switch to Regulate Its Interaction with LRP in the ER and Golgi. Mol. Cell *22*, 423–430.

Lee, D., Walsh, J.D., Migliorini, M., Yu, P., Cai, T., Schwieters, C.D., Krueger, S., Strickland, D.K., and Wang, Y.-X. (2007). The structure of receptor-associated protein (RAP). Protein Sci. *16*, 1628–1640.

Li, J., Ning, Y., Hedley, W., Saunders, B., Chen, Y., Tindill, N., Hannay, T., and Subramaniam, S. (2002). The molecule pages database. Nature *420*, 716–717.

Li, Y., Flores, R., Yu, A., Okcu, M.F., Murray, J., Chintagumpala, M., Hicks, J., Lau, C.C., and Man, T.-K. (2011). Elevated expression of CXC chemokines in pediatric osteosarcoma patients. Cancer *117*, 207–217.

Liang, W.G., Triandafillou, C.G., Huang, T.-Y., Zulueta, M.M.L., Banerjee, S., Dinner, A.R., Hung, S.-C., and Tang, W.-J. (2016). Structural basis for oligomerization and glycosaminoglycan binding of CCL5 and CCL3. Proc. Natl. Acad. Sci. *113*, 5000–5005.

Lillis, A.P., Van Duyn, L.B., Murphy-Ullrich, J.E., and Strickland, D.K. (2008). LDL Receptor-Related Protein 1: Unique Tissue-Specific Functions Revealed by Selective Gene Knockout Studies. Physiol. Rev. *88*, 887–918.

Liu, C., Luo, D., Reynolds, B.A., Meher, G., Katritzky, A.R., Lu, B., Gerard, C.J., Bhadha, C.P., and Harrison, J.K. (2011). Chemokine receptor CXCR3 promotes growth of glioma. Carcinogenesis *32*, 129–137.

Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C.-X., Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Nava, V.E., Chae, S.-S., Lee, M.-J., et al. (2000). Edg-1, the G protein–coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. J. Clin. Invest. *106*, 951–961.

Loetscher, P., Pellegrino, A., Gong, J.-H., Mattioli, I., Loetscher, M., Bardi, G., Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (2001). The Ligands of CXC Chemokine Receptor 3, I-TAC, Mig, and IP10, Are Natural Antagonists for CCR3. J. Biol. Chem. *276*, 2986–2991.

Loskutoff, D.J., Curriden, S.A., Hu, G., and Deng, G. (1999). Regulation of cell adhesion by PAI-1. APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. *107*, 54–61.

Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvet, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. Acta Neuropathol. (Berl.) *114*, 97–109.

Louis, D.N., Perry, A., Reifenberger, G., von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W.K., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Kleihues, P., and Ellison, D.W. (2016). The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol. (Berl.) *131*, 803–820.

Loukinova, E. (2002). Platelet-derived Growth Factor (PDGF)-induced Tyrosine Phosphorylation of the Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein (LRP). EVIDENCE FOR INTEGRATED CO-RECEPTOR FUNCTION BETWEEN LRP AND THE PDGF. J. Biol. Chem. *277*, 15499–15506.

Luker, K.E., Steele, J.M., Mihalko, L.A., Ray, P., and Luker, G.D. (2010). Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. Oncogene *29*, 4599–4610.

Lusso, P. (2006). HIV and the chemokine system: 10 years later. EMBO J. *25*, 447–456.

Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., et al. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. Nat. Med. *7*, 1194–1201.

Ma, X., Norsworthy, K., Kundu, N., Rodgers, W.H., Gimotty, P.A., Goloubeva, O., Lipsky, M., Li, Y., Holt, D., and Fulton, A. (2009). CXCR3 expression is associated with poor survival in breast cancer and promotes metastasis in a murine model. Mol. Cancer Ther. *8*, 490–498.

Maghazachi, A.A., and Al-aoukaty, A. (1998). Chemokines activate natural killer cells through heterotrimeric G-proteins: implications for the treatment of AIDS and cancer. FASEB J. *12*, 913–924.

Maione, T.E., Gray, G.S., Petro, J., Hunt, A.J., Donner, A.L., Bauer, S.I., Carson, H.F., and Sharpe, R.J. (1990). Inhibition of angiogenesis by recombinant human platelet factor-4 and related peptides. Science *247*, 77–79.

Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. Trends Immunol. *25*, 677–686.

Mantovani, A., Bonecchi, R., and Locati, M. (2006). Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. Nat. Rev. Immunol. *6*, 907–918.

Mao, H., LeBrun, D.G., Yang, J., Zhu, V.F., and Li, M. (2012). Deregulated Signaling Pathways in Glioblastoma Multiforme: Molecular Mechanisms and Therapeutic Targets. Cancer Invest. *30*, 48–56.

Maru, S.V., Holloway, K.A., Flynn, G., Lancashire, C.L., Loughlin, A.J., Male, D.K., and Romero, I.A. (2008). Chemokine production and chemokine receptor expression by human glioma cells: Role of CXCL10 in tumour cell proliferation. J. Neuroimmunol. *199*, 35–45.

May, P. (2002). Proteolytic Processing of Low Density Lipoprotein Receptor-related Protein Mediates Regulated Release of Its Intracellular Domain. J. Biol. Chem. *277*, 18736–18743.

May, P., Woldt, E., Matz, R.L., and Boucher, P. (2007). The LDL receptor-related protein (LRP) family: An old family of proteins with new physiological functions. Ann. Med. *39*, 219–228.

Meiser, A., Mueller, A., Wise, E.L., McDonagh, E.M., Petit, S.J., Saran, N., Clark, P.C., Williams, T.J., and Pease, J.E. (2008). The chemokine receptor CXCR3 is degraded following internalization and is replenished at the cell surface by de novo synthesis of receptor. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *180*, 6713–6724.

Murakami, T., Kawada, K., Iwamoto, M., Akagami, M., Hida, K., Nakanishi, Y., Kanda, K., Kawada, M., Seno, H., Taketo, M.M., et al. (2013). The role of CXCR3 and CXCR4 in colorectal cancer metastasis. Int. J. Cancer *132*, 276–287.

Murphy, P.M. (2002). International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. Pharmacol. Rev. *54*, 227–229.

Murphy, P.M., Baggiolini, M., Charo, I.F., Hébert, C.A., Horuk, R., Matsushima, K., Miller, L.H., Oppenheim, J.J., and Power, C.A. (2000). International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. Pharmacol. Rev. *52*, 145–176.

Nagpal, S., Harsh, G., and Recht, L. (2011). Bevacizumab Improves Quality of Life in Patients with Recurrent Glioblastoma. Chemother. Res. Pract. *2011*, 1–6.

Nakajima, C., Haffner, P., Goerke, S.M., Zurhove, K., Adelmann, G., Frotscher, M., Herz, J., Bock, H.H., and May, P. (2014). The lipoprotein receptor LRP1 modulates sphingosine-1-phosphate signaling and is essential for vascular development. Development *141*, 4513–4525.

Nakamura, T., Kuwai, T., Kim, J.-S., Fan, D., Kim, S.-J., and Fidler, I.J. (2007). Stromal Metalloproteinase-9 Is Essential to Angiogenesis and Progressive Growth of Orthotopic Human Pancreatic Cancer in Parabiont Nude Mice. Neoplasia *9*, 979–986.

Neel, N.F., Schutyser, E., Sai, J., Fan, G.-H., and Richmond, A. (2005). Chemokine receptor internalization and intracellular trafficking. Cytokine Growth Factor Rev. *16*, 637–658.

Neels, J.G., van Den Berg, B.M., Lookene, A., Olivecrona, G., Pannekoek, H., and van Zonneveld, A.J. (1999). The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties. J. Biol. Chem. *274*, 31305–31311.

Nichols, B.J. (2002). A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. Nat. Cell Biol.

Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009). IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas. Clin. Cancer Res. *15*, 6002–6007.

Nör, J.E., Christensen, J., Liu, J., Peters, M., Mooney, D.J., Strieter, R.M., and Polverini, P.J. (2001). Up-Regulation of Bcl-2 in microvascular endothelial cells enhances intratumoral angiogenesis and accelerates tumor growth. Cancer Res. *61*, 2183–2188.

Norden, A.D., Drappatz, J., and Wen, P.Y. (2009). Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. Nat. Rev. Neurol. *5*, 610–620.

Nykjaer, A., Conese, M., Christensen, E.I., Olson, D., Cremona, O., Gliemann, J., and Blasi, F. (1997). Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes. EMBO J. *16*, 2610–2620.

Obermoeller-McCormick, L.M., Li, Y., Osaka, H., FitzGerald, D.J., Schwartz, A.L., and Bu, G. (2001). Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein. J. Cell Sci. *114*, 899–908.

Okamoto, H., Takuwa, N., Yokomizo, T., Sugimoto, N., Sakurada, S., Shigematsu, H., and Takuwa, Y. (2000). Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3. Mol. Cell. Biol. *20*, 9247–9261.

Omuro, A.M.P., Faivre, S., and Raymond, E. (2007). Lessons learned in the development of targeted therapy for malignant gliomas. Mol. Cancer Ther. *6*, 1909–1919.

Orr, A.W., Pallero, M.A., Xiong, W.-C., and Murphy-Ullrich, J.E. (2004). Thrombospondin Induces RhoA Inactivation through FAK-dependent Signaling to Stimulate Focal Adhesion Disassembly. J. Biol. Chem. *279*, 48983–48992.

Paavola, C.D., Hemmerich, S., Grunberger, D., Polsky, I., Bloom, A., Freedman, R., Mulkins, M., Bhakta, S., McCarley, D., Wiesent, L., et al. (1998). Monomeric monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) binds and activates the MCP-1 receptor CCR2B. J. Biol. Chem. *273*, 33157–33165.

Pease, J.E. (2006). Asthma, allergy and chemokines. Curr. Drug Targets *7*, 3–12.

Perrot, G., Langlois, B., Devy, J., Jeanne, A., Verzeaux, L., Almagro, S., Sartelet, H., Hachet, C., Schneider, C., Sick, E., et al. (2012). LRP-1--CD44, a new cell surface complex regulating tumor cell adhesion. Mol. Cell. Biol. *32*, 3293–3307.

Petersen, L.C., Lund, L.R., Nielsen, L.S., Danø, K., and Skriver, L. (1988). One-chain urokinase-type plasminogen activator from human sarcoma cells is a proenzyme with little or no intrinsic activity. J. Biol. Chem. *263*, 11189–11195.

Petrai, I., Rombouts, K., Lasagni, L., Annunziato, F., Cosmi, L., Romanelli, R.G., Sagrinati, C., Mazzinghi, B., Pinzani, M., Romagnani, S., et al. (2008). Activation of p38(MAPK) mediates the angiostatic effect of the chemokine receptor CXCR3-B. Int. J. Biochem. Cell Biol. *40*, 1764–1774.

Pierce, K.L., and Lefkowitz, R.J. (2001). Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. Nat. Rev. Neurosci. *2*, 727–733.

Poncz, M., Surrey, S., LaRocco, P., Weiss, M.J., Rappaport, E.F., Conway, T.M., and Schwartz, E. (1987). Cloning and characterization of platelet factor 4 cDNA derived from a human erythroleukemic cell line. Blood *69*, 219–223.

Posti, J.P., Bori, M., Kauko, T., Sankinen, M., Nordberg, J., Rahi, M., Frantzén, J., Vuorinen, V., and Sipilä, J.O.T. (2015). Presenting symptoms of glioma in adults. Acta Neurol. Scand. *131*, 88–93.

Pradelli, E., Karimdjee-Soilihi, B., Michiels, J.-F., Ricci, J.-E., Millet, M.-A., Vandenbos, F., Sullivan, T.J., Collins, T.L., Johnson, M.G., Medina, J.C., et al. (2009). Antagonism of chemokine receptor CXCR3 inhibits osteosarcoma metastasis to lungs. Int. J. Cancer *125*, 2586–2594.

Proudfoot, A.E.I., Handel, T.M., Johnson, Z., Lau, E.K., LiWang, P., Clark-Lewis, I., Borlat, F., Wells, T.N.C., and Kosco-Vilbois, M.H. (2003). Glycosaminoglycan binding

and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *100*, 1885–1890.

Pu, Y., Li, S., Zhang, C., Bao, Z., Yang, Z., and Sun, L. (2015). High expression of CXCR3 is an independent prognostic factor in glioblastoma patients that promotes an invasive phenotype. J. Neurooncol. *122*, 43–51.

Qian, B.-Z., and Pollard, J.W. (2010). Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. Cell *141*, 39–51.

Qian, X.C., and Brent, T.P. (1997). Methylation hot spots in the 5' flanking region denote silencing of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene. Cancer Res. *57*, 3672–3677.

Quinn, K.A., Grimsley, P.G., Dai, Y.P., Tapner, M., Chesterman, C.N., and Owensby, D.A. (1997). Soluble low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) circulates in human plasma. J. Biol. Chem. *272*, 23946–23951.

Rabiej, V.K., Pflanzner, T., Wagner, T., Goetze, K., Storck, S.E., Eble, J.A., Weggen, S., Mueller-Klieser, W., and Pietrzik, C.U. (2016). Low density lipoprotein receptor-related protein 1 mediated endocytosis of β1-integrin influences cell adhesion and cell migration. Exp. Cell Res. *340*, 102–115.

Raizer, J.J. (2005). HER1/EGFR tyrosine kinase inhibitors for the treatment of glioblastoma multiforme. J. Neurooncol. *74*, 77–86.

Raman, D., Sobolik-Delmaire, T., and Richmond, A. (2011). Chemokines in health and disease. Exp. Cell Res. *317*, 575–589.

Rao, J.S. (2003). Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. Nat. Rev. Cancer *3*, 489–501.

Reardon, D.A., Dresemann, G., Taillibert, S., Campone, M., van den Bent, M., Clement, P., Blomquist, E., Gordower, L., Schultz, H., Raizer, J., et al. (2009). Multicentre phase II studies evaluating imatinib plus hydroxyurea in patients with progressive glioblastoma. Br. J. Cancer *101*, 1995–2004.

Ribatti, D. (2014). The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. Exp. Cell Res. *328*, 314–324.

Rolny, C., Mazzone, M., Tugues, S., Laoui, D., Johansson, I., Coulon, C., Squadrito, M.L., Segura, I., Li, X., Knevels, E., et al. (2011). HRG Inhibits Tumor Growth and Metastasis by Inducing Macrophage Polarization and Vessel Normalization through Downregulation of PlGF. Cancer Cell *19*, 31–44.

Romagnani, P., Annunziato, F., Lasagni, L., Lazzeri, E., Beltrame, C., Francalanci, M., Uguccioni, M., Galli, G., Cosmi, L., Maurenzig, L., et al. (2001). Cell cycle–dependent expression of CXC chemokine receptor 3 by endothelial cells mediates angiostatic activity. J. Clin. Invest. *107*, 53–63.

Romagnani, P., Maggi, L., Mazzinghi, B., Cosmi, L., Lasagni, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Angeli, R., Rotondi, M., and Fili, L. (2005). CXCR3-mediated opposite effects of

CXCL10 and CXCL4 on T1 or T2 cytokine production. J. Allergy Clin. Immunol. *116*, 1372–1379.

Rossi, D., and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. Annu. Rev. Immunol. *18*, 217–242.

Rubenstein, J.L., Kim, J., Ozawa, T., Zhang, M., Westphal, M., Deen, D.F., and Shuman, M.A. (2000). Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. Neoplasia N. Y. N *2*, 306–314.

Sadir, R., Imberty, A., Baleux, F., and Lortat-Jacob, H. (2004). Heparan Sulfate/Heparin Oligosaccharides Protect Stromal Cell-derived Factor-1 (SDF-1)/CXCL12 against Proteolysis Induced by CD26/Dipeptidyl Peptidase IV. J. Biol. Chem. *279*, 43854–43860.

Saenko, E.L., Yakhyaev, A.V., Mikhailenko, I., Strickland, D.K., and Sarafanov, A.G. (1999). Role of the low density lipoprotein-related protein receptor in mediation of factor VIII catabolism. J. Biol. Chem. *274*, 37685–37692.

Salcedo, R., and Oppenheim, J.J. (2010). Role of Chemokines in Angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 Interaction, a Key Regulator of Endothelial Cell Responses. Microcirculation *10*, 359–370.

Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., et al. (2009). Isocitrate Dehydrogenase 1 Codon 132 Mutation Is an Important Prognostic Biomarker in Gliomas. J. Clin. Oncol. *27*, 4150–4154.

Schaerli, P., and Moser, B. (2005). Chemokines: control of primary and memory T-cell traffic. Immunol. Res. *31*, 57–74.

Schnyder-Candrian, S., Strieter, R.M., Kunkel, S.L., and Walz, A. (1995). Interferon-alpha and interferon-gamma down-regulate the production of interleukin-8 and ENA-78 in human monocytes. J. Leukoc. Biol. *57*, 929–935.

Sehgal, A., Keener, C., Boynton, A.L., Warrick, J., and Murphy, G.P. (1998). CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. J. Surg. Oncol. *69*, 99–104.

Selkoe, D.J. (1999). Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. Nature *399*, A23-31.

Seystahl, K., Wick, W., and Weller, M. (2016). Therapeutic options in recurrent glioblastoma—An update. Crit. Rev. Oncol. Hematol. *99*, 389–408.

Shahabuddin, S., Ji, R., Wang, P., Brailoiu, E., Dun, N., Yang, Y., Aksoy, M.O., and Kelsen, S.G. (2006). CXCR3 chemokine receptor-induced chemotaxis in human airway epithelial cells: role of p38 MAPK and PI3K signaling pathways. Am. J. Physiol. - Cell Physiol. *291*, C34–C39.

Sharma, I., Siraj, F., Sharma, K.C., and Singh, A. (2016). Immunohistochemical expression of chemokine receptor CXCR3 and its ligand CXCL10 in low-grade

astrocytomas and glioblastoma multiforme: A tissue microarray-based comparison. J. Cancer Res. Ther. *12*, 793–797.

Shellenberger, T.D., Wang, M., Gujrati, M., Jayakumar, A., Strieter, R.M., Burdick, M.D., Ioannides, C.G., Efferson, C.L., El-Naggar, A.K., Roberts, D., et al. (2004). BRAK/CXCL14 is a potent inhibitor of angiogenesis and a chemotactic factor for immature dendritic cells. Cancer Res. *64*, 8262–8270.

Shewan, A.M., van Dam, E.M., Martin, S., Luen, T.B., Hong, W., Bryant, N.J., and James, D.E. (2003). GLUT4 recycles via a trans-Golgi network (TGN) subdomain enriched in Syntaxins 6 and 16 but not TGN38: involvement of an acidic targeting motif. Mol. Biol. Cell *14*, 973–986.

Smith, J.S., Tachibana, I., Passe, S.M., Huntley, B.K., Borell, T.J., Iturria, N., O'Fallon, J.R., Schaefer, P.L., Scheithauer, B.W., James, C.D., et al. (2001). PTEN mutation, EGFR amplification, and outcome in patients with anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme. J. Natl. Cancer Inst. *93*, 1246–1256.

Solinas, G., Germano, G., Mantovani, A., and Allavena, P. (2009). Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. J. Leukoc. Biol. *86*, 1065–1073.

Song, H., Li, Y., Lee, J., Schwartz, A.L., and Bu, G. (2009). Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 1 Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Inducing the Expression of Matrix Metalloproteinases 2 and 9. Cancer Res. *69*, 879–886.

Sottrup-Jensen, L. (1989). Alpha-macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. J. Biol. Chem. *264*, 11539–11542.

Strickland, D.K., and Ranganathan, S. (2003). Diverse role of LDL receptor-related protein in the clearance of proteases and in signaling. J. Thromb. Haemost. JTH *1*, 1663–1670.

Strickland, D.K., Ashcom, J.D., Williams, S., Burgess, W.H., Migliorini, M., and Argraves, W.S. (1990). Sequence identity between the alpha 2-macroglobulin receptor and low density lipoprotein receptor-related protein suggests that this molecule is a multifunctional receptor. J. Biol. Chem. *265*, 17401–17404.

Strieter, R.M., Polverini, P.J., Kunkel, S.L., Arenberg, D.A., Burdick, M.D., Kasper, J., Dzuiba, J., Van Damme, J., Walz, A., Marriott, D., et al. (1995). The functional role of the ELR motif in CXC chemokine-mediated angiogenesis. J. Biol. Chem. *270*, 27348–27357.

Strieter, R.M., Burdick, M.D., Gomperts, B.N., Belperio, J.A., and Keane, M.P. (2005). CXC chemokines in angiogenesis. Cytokine Growth Factor Rev. *16*, 593–609.

Strieter, R.M., Burdick, M.D., Mestas, J., Gomperts, B., Keane, M.P., and Belperio, J.A. (2006). Cancer CXC chemokine networks and tumour angiogenesis. Eur. J. Cancer *42*, 768–778.

Struyf, S., Burdick, M.D., Proost, P., Van Damme, J., and Strieter, R.M. (2004). Platelets release CXCL4L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet factor-4/CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis. Circ. Res. *95*, 855–857.

Struyf, S., Burdick, M.D., Peeters, E., Van den Broeck, K., Dillen, C., Proost, P., Van Damme, J., and Strieter, R.M. (2007). Platelet Factor-4 Variant Chemokine CXCL4L1 Inhibits Melanoma and Lung Carcinoma Growth and Metastasis by Preventing Angiogenesis. Cancer Res. *67*, 5940–5948.

Stummer, W., Pichlmeier, U., Meinel, T., Wiestler, O.D., Zanella, F., Reulen, H.-J., and ALA-Glioma Study Group (2006). Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial. Lancet Oncol. *7*, 392–401.

Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. N. Engl. J. Med. *352*, 987–996.

Stupp, R., Hegi, M.E., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Taphoorn, M.J.B., Janzer, R.C., Ludwin, S.K., Allgeier, A., Fisher, B., Belanger, K., et al. (2009). Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. Lancet Oncol. *10*, 459–466.

Sugawa, N., Ekstrand, A.J., James, C.D., and Collins, V.P. (1990). Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *87*, 8602–8606.

Tabouret, E., Labussière, M., Alentorn, A., Schmitt, Y., Marie, Y., and Sanson, M. (2015). LRP1B deletion is associated with poor outcome for glioblastoma patients. J. Neurol. Sci. *358*, 440–443.

Tada, H., Higuchi, H., Wanatabe, T.M., and Ohuchi, N. (2007). In vivo Real-time Tracking of Single Quantum Dots Conjugated with Monoclonal Anti-HER2 Antibody in Tumors of Mice. Cancer Res. *67*, 1138–1144.

Taub, D.D. (1996). Chemokine-leukocyte interactions. The voodoo that they do so well. Cytokine Growth Factor Rev. *7*, 355–376.

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group (1995). Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. N. Engl. J. Med. *333*, 1581–1587.

Thevenard, J., Verzeaux, L., Devy, J., Etique, N., Jeanne, A., Schneider, C., Hachet, C., Ferracci, G., David, M., Martiny, L., et al. (2014). Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 mediates endocytic clearance of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and promotes its cytokine-like activities. PloS One *9*, e103839.

Trommsdorff, M., Borg, J.P., Margolis, B., and Herz, J. (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. J. Biol. Chem. *273*, 33556–33560.

Tzenaki, N., and Papakonstanti, E.A. (2013). p110δ PI3 kinase pathway: emerging roles in cancer. Front. Oncol. *3*.

Ulery, P.G., and Strickland, D.K. (2000). LRP in Alzheimer's disease: friend or foe? J. Clin. Invest. *106*, 1077–1079.

Van Raemdonck, K., Berghmans, N., Vanheule, V., Bugatti, A., Proost, P., Opdenakker, G., Presta, M., Van Damme, J., and Struyf, S. (2014). Angiostatic, tumor inflammatory and anti-tumor effects of CXCL447-70 and CXCL4L147-70 in an EGF-dependent breast cancer model. Oncotarget *5*, 10916–10933.

Vandercappellen, J., Liekens, S., Bronckaers, A., Noppen, S., Ronsse, I., Dillen, C., Belleri, M., Mitola, S., Proost, P., Presta, M., et al. (2010). The COOH-Terminal Peptide of Platelet Factor-4 Variant (CXCL4L1/PF-4var47-70) Strongly Inhibits Angiogenesis and Suppresses B16 Melanoma Growth In vivo. Mol. Cancer Res. *8*, 322–334.

Vanhaesebroeck, B., Leevers, S.J., Panayotou, G., and Waterfield, M.D. (1997a). Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. Trends Biochem. Sci. *22*, 267–272.

Vanhaesebroeck, B., Welham, M.J., Kotani, K., Stein, R., Warne, P.H., Zvelebil, M.J., Higashi, K., Volinia, S., Downward, J., and Waterfield, M.D. (1997b). P110delta, a novel phosphoinositide 3-kinase in leukocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *94*, 4330–4335.

Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. *11*, 329–341.

Verhoeff, J.J., van Tellingen, O., Claes, A., Stalpers, L.J., van Linde, M.E., Richel, D.J., Leenders, W.P., and van Furth, W.R. (2009). Concerns about anti-angiogenic treatment in patients with glioblastoma multiforme. BMC Cancer *9*.

Walser, T.C., Rifat, S., Ma, X., Kundu, N., Ward, C., Goloubeva, O., Johnson, M.G., Medina, J.C., Collins, T.L., and Fulton, A.M. (2006). Antagonism of CXCR3 inhibits lung metastasis in a murine model of metastatic breast cancer. Cancer Res. *66*, 7701–7707.

Wang, L.-F., Fokas, E., Bieker, M., Rose, F., Rexin, P., Zhu, Y., Pagenstecher, A., Engenhart-Cabillic, R., and An, H.-X. (2008). Increased expression of EphA2 correlates with adverse outcome in primary and recurrent glioblastoma multiforme patients. Oncol. Rep. *19*, 151–156.

van Wanrooij, E.J.A., de Jager, S.C.A., van Es, T., de Vos, P., Birch, H.L., Owen, D.A., Watson, R.J., Biessen, E.A.L., Chapman, G.A., van Berkel, T.J.C., et al. (2007). CXCR3 Antagonist NBI-74330 Attenuates Atherosclerotic Plaque Formation in LDL Receptor-Deficient Mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *28*, 251–257.

Wick, W., Weller, M., van den Bent, M., and Stupp, R. (2010). Bevacizumab and recurrent malignant gliomas: a European perspective. J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol. *28*, e188-189-192.

Wiesner, C., El Azzouzi, K., and Linder, S. (2013). A specific subset of RabGTPases controls cell surface exposure of MT1-MMP, extracellular matrix degradation and three-dimensional invasion of macrophages. J. Cell Sci. *126*, 2820–2833.

Willnow, T.E., Orth, K., and Herz, J. (1994). Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein. J. Biol. Chem. *269*, 15827–15832.

Willnow, T.E., Armstrong, S.A., Hammer, R.E., and Herz, J. (1995). Functional expression of low density lipoprotein receptor-related protein is controlled by receptor-associated protein in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *92*, 4537–4541.

Wu, Q., Dhir, R., and Wells, A. (2012). Altered CXCR3 isoform expression regulates prostate cancer cell migration and invasion. Mol. Cancer *11*, 3.

Wu, Y., Migliorini, M., Walsh, J., Yu, P., Strickland, D.K., and Wang, Y.-X. (2004). NMR structural studies of domain 1 of receptor-associated protein. J. Biomol. NMR *29*, 271–279.

Wykosky, J. (2005). EphA2 as a Novel Molecular Marker and Target in Glioblastoma Multiforme. Mol. Cancer Res. *3*, 541–551.

Yamamoto, M., Ikeda, K., Ohshima, K., Tsugu, H., Kimura, H., and Tomonaga, M. (1997). Increased expression of low density lipoprotein receptor-related protein/alpha2-macroglobulin receptor in human malignant astrocytomas. Cancer Res. *57*, 2799–2805.

Yang, Z., Strickland, D.K., and Bornstein, P. (2001). Extracellular Matrix Metalloproteinase 2 Levels Are Regulated by the Low Density Lipoprotein-related Scavenger Receptor and Thrombospondin 2. J. Biol. Chem. *276*, 8403–8408.

Yepes, M., Sandkvist, M., Moore, E.G., Bugge, T.H., Strickland, D.K., and Lawrence, D.A. (2003). Tissue-type plasminogen activator induces opening of the blood-brain barrier via the LDL receptor–related protein. J. Clin. Invest. *112*, 1533–1540.

Yu, G., Rux, A.H., Ma, P., Bdeir, K., and Sachais, B.S. (2005). Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-kappaB-dependent manner. Blood *105*, 3545–3551.

Zhang, S., Laurent, M., Lopez-Alemany, R., Mazar, A., Henkin, J., Ronne, E., and Burtin, P. (1993). Comparative localization of receptors for plasmin and for urokinase on MCF 7 cells. Exp. Cell Res. *207*, 290–299.

Zhou, Y. (2002). CXCR4 Is a Major Chemokine Receptor on Glioma Cells and Mediates Their Survival. J. Biol. Chem. *277*, 49481–49487.

Zhou, L., Takayama, Y., Boucher, P., Tallquist, M.D., and Herz, J. (2009). LRP1 Regulates Architecture of the Vascular Wall by Controlling PDGFRβ-Dependent Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation. PLoS ONE *4*, e6922.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. Immunity *12*, 121–127.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2012). The Chemokine Superfamily Revisited. Immunity *36*, 705–716.

Zou, Z., Chung, B., Nguyen, T., Mentone, S., Thomson, B., and Biemesderfer, D. (2004). Linking Receptor-mediated Endocytosis and Cell Signaling: EVIDENCE FOR REGULATED INTRAMEMBRANE PROTEOLYSIS OF MEGALIN IN PROXIMAL TUBULE. J. Biol. Chem. *279*, 34302–34310.

Zülch, K.J. (1979). Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization, Geneva.

Zurhove, K., Nakajima, C., Herz, J., Bock, H.H., and May, P. (2008). Gamma-secretase limits the inflammatory response through the processing of LRP1. Sci. Signal. *1*, ra15.

Annexe I: Liste des publications

New insight into the internalization, recycling and activity of the CXC Receptor-3: Role of LRP1. The Journal of Cell Biology, submitted

Kevin Boyé, Nadège Pujol, Ya-Ping Chen, Isabel Alves, Thomas Daubon, Marion Constantin, Lorenzo Bello, Shih-Che Sue, Andreas Bikfalvi and Clotilde Billottet

Dual roles for CXCL4 chemokines and CXCR3 in angiogenesis and invasion of pancreatic cancer. Cancer Research 2016

Quemener C, Baud J, **Boyé K**, Dubrac A, Billottet C, Soulet F, Darlot F, Dumartin L, Sire M, Grepin R, Daubon T, Rayne F, Wodrich H, Couvelard A, Pineau R, Schilling M, Castronovo V, Sue SC, Clarke K, Lomri A, Khatib AM, Hagedorn M, Prats H, Bikfalvi A

The anti-angiogenic chemokine CXCL4 in different oligomerization states modulates CXCR3 receptor binding. The Journal of Biological Chemistry, in preparation.

Author list to defined

TGF-b promotes linear invadosome formation in hepatocellular carcinoma cells, through DDR1 up-regulation and collagen I cross-linking. European Journal of Cell Biology 2016

Zakaria Ezzoukhry, Elodie Henriet, Léo Piquet, **Kevin Boyé**, Paulette Bioulac-Sage, Charles Balabaud, Jessica Zucman-Rossi, Violaine Moreau and Frédéric Saltel

Annexe II: Liste des communications

COMMUNICATIONS ORALES

Communications scientifiques nationales :

- Journée Jeune chercheur de la FR TransBioMed, Bordeaux, France, 2015
- Journée nationale de la Ligue contre le Cancer, La Rochelle, France, 2015

Communications ou séminaires scientifiques internationales :

- Yale Cardiovascular Research Center, New Haven, USA, 2016
- Research and Practical Training in Taiwan, Taipei, Taiwan, 2015
- College of Life Science, Hsinchu, Taiwan, 2014

COMMUNICATIONS ECRITES

- Targeting Cancer Symposium, Cold Spring Harbor Laboratory, USA, 2016
- Journée de l'Ecole Doctorale, Arcachon, France, 2016
- Journée de la Fédération de Recherche TransBioMed, Bordeaux, France, 2015
- Journée de l'Ecole doctorale, Arcachon, France, 2015
- Cancéropôle Grand Sud-Ouest, Bordeaux, France, 2015
- Journée Jeune chercheur de la FR TransBioMed, Bordeaux, France, 2014

Annexe III: Liste des congrès effectués

2016

- Targeting Cancer: 81st Cold Spring Harbor Symposium, Cold Spring Harbor, USA

2015

- Imaging The Cell, 8th Symposium, University of Bordeaux, France
- Canceropole Grand Sud-Ouest, University of Bordeaux, France
- Methodologies and Experimental Strategies in Angiogenesis Research, University of Bordeaux, France

Annexe IV: Liste des financements obtenus

2015

- Bourse du Ministère des Sciences et Technologies de Taiwan (MOST) "Research and Practical Training in Taiwan"

2014

- Bourse PHC (Partenariat Hubert Curien) d'échange Franco-Tawainais "PHC ORCHID 2014"

2013

- Bourse de thèse MRT "Allocations de recherche du Ministère de la Recherche"

Annexe V : Article II

La publication a été accéptée dans le journal Cancer Research en Septembre 2016

Dual roles for CXCL4 chemokines and CXCR3 in angiogenesis and invasion of pancreatic cancer

Cathy Quemener[1,,2], Jessica Baud[1,2], Kevin Boyé[1,2], Alexandre Dubrac[1,2,3], Clotilde Billottet [1,2], Fabienne Soulet[1,2], Florence Darlot[1,2], Laurent Dumartin[1,2], Marie Sire[1,2], Renaud Grepin[1,2], Thomas Daubon[1,2], Fabienne Rayne[2,7], Harald Wodrich[2,7], Anne Couvelard[4], Raphael Pineau[1,2], Martin Schilling[6], Vincent Castronovo[5], Shih-Che Sue[8], Kim Clark[9], Abderrahim Lomri [1,2], Abdel-Majid Khatib[1,2], Martin Hagedorn [1,2], Hervé Prats[3], Andreas Bikfalvi[1,2]

[1]INSERM U1029, Pessac, France; [2]Université Bordeaux, Pessac, France; [3]INSERM U1037 Toulouse, [4]Department of Pathology, Hôpital Bichat, Paris, France,[5]Department of Pathology, University of Liège, Belgium; [6]Department of visceral surgery, University Homburg/Saar, Germany; [7]CNRS UMR 5234, Pessac, France; [8]Department of Life Science NTHU Taiwan; [9]Department of Integrative Biology, University Liverpool

.

Correspondance to:
Andreas Bikfalvi MD PhD
INSERM U1029
University Bordeaux
33 560 Pessac
Phone : (33) 5 40 00 87 03
Fax : (33) 5 40 00 87 05
E-mail : andreas.bikfalvi@u-bordeaux.fr

Financial support : grants from "Agence Nationale de la Recherche ", the "Association de la Recherche sur le Cancer" and the "Ligue Nationale contre Cancer" to A. Bikfalvi, from the "Institut National du Cancer" (INCA) to A.Bikfalvi and H. Prats and from ANR to M. Hagedorn. PhD fellowship from INCA to A. Dubrac and from the "Ministère de la Recherche" and the "Fondation pour la Recherche Médicale" to L. Dumartin.
Disclosures: No conflict of interest to declare. "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript."
Keywords: Angiogenesis, angiogenesis inhibition, tumor invasion, chemokines

Abbreviations: 5'Aza, 5 azacytidine, α-SMA,□α-smooth muscle actin; CAM, chick chorioallantoic membrane; FGF, fibroblast growth factor; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells, IF, immunofluorescence, IHC, immunohistochemistry; IL1, interleukine-1; Luc, Luciferase; MF, myofibroblasts; MabL1, anti-CXCL4L1 monoclonal antibody; PECAM1, Platelet endothelial cell adhesion molecule 1; PDAC, pancreatic ducal carcinoma; TSA, Trichostatine A; VAMP2, vesicle-associated membrane protein 2.

ABSTRACT

The CXCL4 paralog CXCL4L1 is a little studied chemokine that has been suggested to exert an anti-angiogenic function. However, CXCL4L1 is also expressed in patient tumors, tumor cell lines and murine xenografts, prompting a more detailed analysis of its role in cancer pathogenesis. We used genetic and antibody-based approaches to attenuate CXCL4L1 in models of pancreatic adenocarcinoma (PDAC). Mechanisms of expression were assessed in cell co-culture experiments, murine and avian xenotransplants, including through an evaluation of CpG methylation and mutation of critical CpG residues. CXCL4L1 gene expression was increased greatly in primary and metastatic PDAC. We found that myofibroblasts triggered cues in the tumor microenvironment which led to induction of CXCL4L1 in tumor cells. CXCL4L1 expression was also controlled by epigenetic modifications at critical CpG islands which were mapped. CXCL4L1 inhibited vasculogenesis but also affected tumor development more directly depending on the tumor cell type. In vivo administration of a monoclonal antibody against CXCL4L1, we demonstrated a blockade in the growth of tumors positive for CXCR3, a critical receptor for CXCL4 ligands. Our findings define a pro-tumorigenic role in PDAC development for endogenous CXCL4L1, which is independent of its anti-angiogenic function.

INTRODUCTION

A paralog of CXCL4, named platelet factor variant-1 (PF4v1) or CXCL4L1, was identified in 1989, but its role in cancer progression has not yet been investigated (1, 2). CXCL4L1 and CXCL4 exhibit only 34 % differences in the amino-terminus encoding the signal sequence and 4.3 % difference in the mature protein. CXCL4L1 has been shown to be more potent than CXCL4 at inhibiting cell proliferation and migration (2) (3). Furthermore, inhibition of tumor development was observed in tumors derived from implantation of A549, LLC and B16 cells in mice, treated with recombinant CXCL4L1 (1). In addition, the secretion and processing mechanisms of CXCL4L1 and CXCL4 are different (4). However, both chemokines are secreted with similar efficiency (3). CXCL4L1 has much lower glycan binding affinity, better diffusibility *in vitro* and *in vivo* (3). These differences are caused by single amino-acid changes, which confer a unique structure to the molecule (3) (5). CXCL4L1 is not only expressed in the platelet-megacaryocytic lineage but also in immune cells and in other cell types as well such as smooth muscle cells and endothelial cells(4). It has been reported that CXCL4L1 interacts with CXCR3 and that its blockade in vivo using specific anti-CXCR3 monoclonal antibodies abrogates the inhibitory effect of CXCL4L1 on corneal angiogenesis in the mouse (6) (7, 8). CXCR3 is also expressed in a variety of cell types including immune cells, vascular cells and tumor cells. CXCR3 exists as different isoforms including CXCR3A, CXCRB and CXCR3 alt (7). CXCR3A has been implicated in chemotactic activity and is highly expressed in Th1-type CD4+ T cells, effector CD8+ T cells and natural killer (NK) cells and exhibits tumor promoting abilities (9). CXCR3B, which differ from CXCR3A by an amino-terminal extension, is believed to mediate angiostatic activities (7). These findings suggest that CXCL4L1 has regulatory functions in tumor angiogenesis.

While some data have been published on the effect of exogenous full length CXCL4L1 or of a CXCL4L1 C-terminal fragment in subcutaneous tumor models(1, 6, 10-12), nothing is known about its precise role in controlling tumor growth and invasion. We provide herein the first study, to our knowledge, of the regulation of CXCL4L1 expression and the role of endogenous CXCL4L1 in tumor development using PDAC as a tumor model. Furthermore, the results described in this article are also of clinically relevance.

MATERIALS AND METHODS

Cells

Pancreatic tumor cell lines (BxPC3 ATTC CRL-1687^{TM}), Panc-1 ATCC CRL-1469^{TM}, MIA PaCa-2 ATTC CRL-1420^{TM}), human osteosarcoma MG63 cells (ATCC CRL-1427^{TM}), U87 cell line (ATCC-HTB-14^{TM}), human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, Lonza Levallois Perret, France), human coronary artery smooth muscle cells (SMC, Promocell, Heidelberg, GE), NIH3T3 cells (ATCC CRL-1658^{TM}), Hek cells (ATCC CRL-1573^{TM}), human hepatic myofibroblasts (MF, kindly donated by J Rosenbaum, INSERM U 1034, University Bordeaux) were grown as described in **Supplemental Materials and Methods**. The last cell authentification was carried out by PCR-single-locus-technology (Eurofins, GE, date of report: 10/14/2015).

BxPC3 Panc-1 and MIA PaCa-2 tumor cells were transduced with recombinant lentiviral vectors expressing firefly luciferase. Tumor cell implantation in fertilized chicken eggs (*Gallus gallus*) was handled as previously described (13) (14). Tumor nodule isolation, processing for microarrays and subsequent analysis are described in (12) and in **Supplemental Materials and Methods.**

Co-culture experiments

BxPC3 cells or PANC-1 cells were co-cultured with human liver MF, HUVEC, or SMC. BxPC3 cells were co-cultured for 24-96 h with MF on PEN-membrane. Laser Capture Microdissection Analyses (LCM) was performed by using a PALM MicroBeam microdissection system version 4.0–1206 equipped with a P.A.L.M. RoboSoftware (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Zeiss, Germany). Furthermore, co-culture experiments using transwell system (Greiner bio-one< 0.45 µm) with BxPC3 cells and MF were used. These

experiments were conducted in two ways. Tumor cells (2 x 10^5) were place in the upper side of the membrane and MF at the lower side in DMEM containing 20% FBS. Alternatively, MF are removed after 24h and RNA extracted after additional 24 h and CXCL4L1 expression measured. For details see **Supplemental Materials and Methods**.

Isolation of microparticles

Microparticles were isolated from supernatants of MF grown to confluency (T75 at confluency). Centrifugation at 2500 RPM for the elimination of cellular fragments (10 min). The supernatant was centrifugated at 100 000 g for 1 h and the pellet is collected and resuspended in medium before use.

In vivo mouse models

To evidence tumor targeting of MabL1, the antibody was labeled with IRdye and 25µg of labeled antibodies was injected into the tail vein of mice with subcutaneous BxPC3 tumors or with metastasis after spreading of BxPC3 cells through the portal vein following intra-splenic injection according to standard procedures (15). At different times post-injection, animals were imaged with the Odyssey Imaging System (LI-COR®).

For xenograft models, eight weeks old mice were anaesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (150mg/kg) and xylazine (15mg/kg) and xenografted with $3x10^6$, $1x10^6$ and $3.75x10^5$ BxPC3, Panc-1 or MIA PaCa-2 cells stably transfected with a luciferase reporter gene in 100µl serum free medium by subcutaneous, intra-pancreatic and intra-splenic injection respectively. Treatment with MabL1 antibody was carried according to standard procedures (15). Tumor volumes were measured by Caliper or bioluminescence (Photon Imager, Biospace Lab, Paris, France).

For more details see **Supplemental Materials and Methods**.

All other methods are carried out according to standard procedures (references below) and are detailed in the **Supplemental Materials and Methods**. These include: Reagents; Small interfering RNA transfection with lipofectamine (in Vitrogen, manufacture's instructions); Cell proliferation and invasion assay (16); Western blotting and Immunoprecipitation (17, 18); RNA extraction and semi-quantitative and quantitative RT-PCR (18); Histology, immunohistochemistry and tissue microarray (18); *In-Situ* Hybridization (Roche RNA Labeling Kit SP6/T7, manufacturers instructions), Labeling of MabL1 (IRDye 800CW, Protein Labeling Kit–HighMW#928-38040, LI-COR®); Construction of luciferase reporter vectors Luciferase reporter assay (Promega, manufacture's instruction's); *In-vitro* methylation of plasmid DNA and Bisulfite sequencing (New England Biolabs, manufacturer's instructions); Clearance kinetic of MabL1 conjugated to IRDye or Biotin.

In silico and statistical analysis

In silico online research was done on Oncomine (https://www.oncomine.org) and TCGA (cancergenome.nih.gov) data sets.

Experimental data: Results are presented as mean ± the standard error of the mean. Statistical significance was determined by a one-tailed, unpaired Student's *t* test using Prism 5.03 GraphPad Software. For the tissue microarrays, the statistical analysis was performed by using a Kruskal-Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison procedure. P-values <0.05 were considered significant (***, <0.001; **, <0.01; *, <0.05).

Ethical issues

Male RAG-γ/c mice were housed and treated in the animal facility of Bordeaux University ("Animalerie Mutualisée Bordeaux "). All animal procedures have been done according to the institutional guidelines and approved by the local ethics committee.

Fresh human adenocarcinoma samples were provided by Prof Martin Schilling (Klinik für Allgemeine Chirurgie, Viszeral-, Gefäß- und Kinderchirurgie, Homburg, Germany). Fresh tumor tissues were obtained during surgery and directly snap-frozen in liquid nitrogen. Tissue microarrays were provided by Prof Anne Couvelard (Hôpital Bichat, Paris). Patients gave their consent prior tissue analysis according to the clinical guidelines.

RESULTS

Expression of CXCL4L1 or CXCL4 in pancreatic adenocarcinoma

Transcriptomic profiling identifies CXCL4L1 but not CXCL4 in the PDAC-CAM model

Dual transcriptomic analysis using human Affymetrix or chicken Affymetrix microarrays was performed between tumor day 1 (T1) and tumor day 6 (T6) of BxPC3 cells implanted onto the chick chorioallantoic membrane (E11 and E16 of embryonic development)(14). CXCL4L1 was upregulated at T6 compared to T1 (a 14-fold increase) in human affymetrix arrays.

Real-time PCR (Sybr green) revealed significant CXCL4L1 expression in T6 tumors when compared to T1 CAM tumors (9.7-fold). No expression was seen in BxPC3 cells *in vitro* (Fig.1A). When TaqMan for RT-PCR was used, a very small amount of CXCL4 was detected in BxPC3 cells but only at 37 cycles (CT). CXCL4L1 was never detected in BxPC3 cells cultured under these conditions.

A monoclonal antibody (MabL1) specific for CXCL4L1, revealed immunoreactivity in T6 CAM tumors (Fig. 1B), and CXCL4L1 protein was also detected by Western blotting (Fig.1C). *In situ* hybridization demonstrated CXCL4L1 but not CXCL4 expression in T6 CAM tumors (Fig.1D).

Expression analysis in mouse models of pancreatic carcinoma

CXCL4L1 is expressed in BxPC3 tumors grown in mice (Fig.1E, left panel) in the primary tumor and lung metastasis (Fig.1F upper panels). In contrast to BxPC3, some CXCL4L1 expression was already detected in Panc-1 cells in culture. However, similar to BxPC3, expression was further increased (4.49-fold) when cells were implanted into mice

(Fig.1E, middle panel; Fig.1F lower middle panel). The effect of the microenvironment is specific to CXCL4L1, and does not occur for CXCL4. Furthermore, BxPC3 grafts form lung micrometastases (average size: 0.024 mm^2, n=10), whereas Panc-1 grafts form larger metastases (average size: 0.15 mm^2 n= 8).

The situation was different for MIA PaCa-2 another PDAC cell line (Fig.1 E and F right panel). In this case, cells merely express CXCL4, but not CXCL4L1 at significant levels in vitro. In xenografted tumors, CXCL4 was further increased and CXCL4L1 became detectable.

Thus, the expression profile in vitro and in vivo is heterogeneous in these three PDAC cell line.

Expression analysis of CXCL4L1/CXCL4 in human tumor samples

CXCL4L1 is merely expressed in fetal liver, colon, and to some extent in spleen, CXCL4 is highly expressed in spleen (**Fig.S1A**). Normal human pancreas does comparatively not express elevated levels of CXCL4L1 or CXCL4 mRNA.

CXCL4L1 mRNA was overexpressed in 33/33 samples from human PDAC patients (median log_2 of 2.55 corresponding to a median of 5.85) (**Fig.S1B**). CXCL4L1 protein was detected in primary pancreatic tumors and metastasis (**Fig. S1C-E**). CXCL4 was expressed in patient samples, but at lower expression levels than CXCL4L1 (**Fig.S1B right panel**, **Fig.S1F**).

In the tissue microarray (TMA), increased CXCL4L1 immunoreactivity was significantly associated with pancreatic adenocarcinoma ($P<0.001$) (**Fig.S1G-O**). A statistically significant increase was also observed in adenosquamous tumors and chronic pancreatitis ($P< 0.05$).

CXCL4L1 expression is significantly higher in PDAC in comparison to control in the Segara Pancreatic statistics (19). In the Stratford&Yeh data set (GSE21501), survival was significantly linked to CXCL4L1 expression (p value of 0.023). In the TCGA data set *(*cancergenome.nih.gov*)*, statistical significance was > 0.05 probably due to the insufficient amount of patients included in the analysis (**Fig. S2**).

The Ishikawa Pancreas statistics (20)(Left panel) was used to compare CXCL4 gene expression in pancreas or in pancreatic ductal adenocarcinoma. Survival analysis (right panel) did not show a significant link to survival in the TCGA pancreatic cancer cohort (p = 0.096) (**Fig. S2**).

Thus, these data suggest that tumor-derived CXCL4L1 but not CXCL4 is a possible marker for the clinical evolution of PDAC.

Cellular and molecular analysis of CXCL4L1 expression

We focused all of our subsequent analyses on CXCL4L1.

We reasoned that some micro-environmental cues could induce CXCL4L1 expression. We therefore co-cultured BxPC3 cells with endothelial cells (HUVECs, HUACs), human SMCs, NIH 3T3 cells or myofibroblasts (MF). None of the cell types was able to induce CXCL4L1 expression in BxPC3 cells except MF (Fig.2A,B). For VAMP2, co-localization was observed but to a lesser extent (Pearson coefficient 0.67) (Fig.2C).

Co-culturing BxPC3 cells with MF in the transwell system revealed significant induction of CXCL4L1 in tumor cells. Microparticles from the MF conditioned medium (CM) were able to increase CXCL4L1 expression to some extent, albeit much lower than the complete CM (Fig.2D).

These results indicate that a paracrine factor derived from MF is able to increase CXCL4L1 expression in tumor cells. The majority of this factor is soluble and a fraction is also contained in microparticles.

We also demonstrated that expression of CXCL4L1 is reversible in BxPC3 cells after removal of MF from the transwell chamber (Fig 2E). However, co-culturing MF with PANC-1 in the transwell system could not further increase CXCL4L1 expression (**Fig S3A**). Thus, MF may provide the initial trigger for CXCL4L1 expression but additional factors may be required for full stimulation.

Myofibroblasts express, by their own, high levels of vimentin and FAP, low levels of FSP1 and both chemokines (**Fig. S3B**).

We next focused on epigenetic modifications that might be involved in CXCL4L1 expression. CXCL4L1 gene is located within a cluster of chemokines encoded genes (Fig.3A). To determine the expression of these genes and to examine the putative influence of CpG islands methylation, BxPC3 cells were stimulated with 5'-Aza, a potent DNA methyltransferase inhibitor, and with or without the histone deacetylase inhibitor, Trichostatine A (TSA) (Fig.3B). Treatment with 5'Aza or TSA increased the level of CXCL4L1 mRNA in BxPC3 cells (Fig.3B, left panel). In opposite, no changes were observed in CXCL1 and CXCL6 expression with this treatment. This indicates that DNA methylation is involved in the silencing of CXCL4L1 gene in BxPC3 cells.

Using the Methprimer website, one CpG island was found to be located within the first intron (Fig.3C). Bisulfite sequencing indicated that two out of 8 sites (+150, +193, +210, +212, + 214, +227, +250 and +259) were demethylated in the presence of 5`Aza (CpG 6 (+227) and CpG 7 (+250)), the CpG site number referring to the transcription start site (Fig.3D). All 7 sequences from the most hypomethylated lung metastasis showed

hypomethylation of the two CpG sites. Globally, hypomethylation at CpG 6 and 7 was of 58.75 % +/-13.38 SD (n=5 metastasis). In the most hypomethylated subcutaneous primary tumors, the majority of sequences (4 out of 7) showed hypomethylation. However, this was not uniform for all tumors examined and some variability was observed. Globally, hypomethylation was of 25.09 % +/- 4.45 SD (n=8 s.c. tumors). This correlates with the induction of expression of CXCL4L1 (Fig.3D, right panel).

In patients (n=10), for all 8 methylation sites, 69.38 %+/- 4.9 SD hypomethylation was observed (Fig.3D). For CpG 6 (+227) and CpG 7 (+250), this percentage was of 74.60 % +/- 7.3 SD. Thus, the majority of sequences demonstrate hypomethylation at site CpG 6 (+227) and CpG 7 (+250), which is in agreement with results observed with the cell line. It is to emphasize that DNA from the entire tumor tissue was analyzed which also includes tumor stroma and some normal pancreatic tissue.

To determine whether CpG 6 (+227) and CpG 7 (+250), are involved in the induction of CXCL4L1, CpG 6 (+227) and CpG 7 (+250), were mutated (C->T). After in vitro methylation followed by transfection, a Luc reporter assays was performed. The ratio of LucF/LucR was highly increased when CpG 6 (+227) and CpG 7 (+250), were mutated when compared to the non-mutated wild type (Fig.3E).

Short-term stimulation with IL1-β was unable to induce CXCL4L1 expression in BxPC3 cells, in contrast to what was observed in MG63 osteosarcoma cells (see Fig.3B right panel)(10). Long-term stimulation with IL1-β was reported to trigger demethylation (21) but was unable to increase CXCL4L1 in PDAC.

Expression of CXCR3 in pancreatic adenocarcinoma

High expression of CXCR3-A mRNA was seen in Panc-1 cells (Fig.4A and B) but no expression in BXPC3 or MIA PaCa-2 cells. Some CXCR3-B mRNA was detected in Panc-1 cells and low mRNA expression was also seen in BxPC3 and MIA PaCa-2 cells. However, no CXCR3 protein expression was seen in BxPC3 and MIA PaCa-2 cells in vitro in contrast to Panc-1 (Fig. 4B).

When Panc-1 cells were implanted subcutaneously or orthotopically into mice, a strong increase of mRNA expression was observed for CXCR3-A and CXCR-B (50-fold and 35-fold increase respectively, Fig.4A and C). Positive immunoreactivity for CXCR3 was also evidenced in these tumors (Fig.4D). For MIA PaCa-2 cells, after in vivo implantation, CXCR3-B was highly expressed (Fig. 4C and D) and this much higher than in vitro (copy number ratio CXCR3/HPRT in vivo : 14, 687 +/- 0.011 versus 5.39×10^{-4} +/-1.1×10^{-4} in vitro). Metastatic foci were also positive for CXCR3. On the contrary, BxPC3 cells do not significantly express CXCR3-A and B in vivo.

Seventy PDAC samples included in tissue microarrays were then analyzed. The cytoplasmic and nuclear scores ranged from 20 to 300 (median: 175) and from 0 to 300 (median: 175) respectively (Fig.4E). Twenty-two (31%) of tumors presented a membranous staining pattern, some of which had cytoplasmic staining (Fig. 4E). CXCR3 nuclear and membranous expression correlated positively with tumor size ($p=0.02$ and $p=0.06$ respectively). CXCR3 membranous expression correlated with presence of perineural invasion ($p=0.04$).

We furthermore performed an *in silico* analysis of CXCR3 expression using the Ramaswamy multi-cancer set (22) and the Bucholz pancreas dataset (23) (Fig S4). In the Ramaswamy dataset, high expression of CXCR3 could be evidenced in PDAC, a finding that

is further confirmed in the Bucholz data set where expression is also significantly increased in PDAC compared to normal pancreas.

In vitro and in vivo functional studies

In vitro effects of CXCL4L1

CXCL4L1 inhibited endothelial cell but not BXPC3 cell proliferation (Fig. 5A and B, left panels)(3). Invasion of endothelial cells, but not that of BxPC3 cells, was significantly inhibited by CXCL4L1 (Fig. 5A middle panel; Fig.5B, right panels). No effect on apoptosis on either tumor or endothelial cells was seen (**Fig.S5**).

We verified, in addition, CXCR3 expression in HUVECs, which is indeed significantly expressed (Fig 5A right panel).

We next compared the role of CXCL4L1 in another pancreatic cancer cell line, Panc-1 cells, which, in contrast to BxPC3 cells, do express CXCR3 protein (Fig.4C-D). This cell line already expresses CXCL4L1 in cell culture (Fig.1E). Blocking by either CXCL4L1 monoclonal antibody or siRNA against CXCL4L1 as well as CXCR3 led to inhibition of cell proliferation (Fig.5C). Combining blockade by MabL1 and CXCR3 siRNA further decreased cell proliferation. This indicates that CXCL4L1 is a positive regulator of Panc-1 growth and that CXCR3 is also involved in the growth promoting activity.

Since Panc-1 cells express CXCR3, we wanted to investigate whether signaling induced by CXCL4L1 is modulated (Fig.5D). Indeed, ERK phosphorylation was increased after CXCL4L1 treatment. This increase could be blocked by U1026, a specific inhibitor of MAP kinases.

Effect of endogenous CXCL4L1 on tumor development

RAG-γ/c mice were inoculated subcutaneously with BxPC3 or Panc-1 cells and then treated with MabL1 antibody. Prior to the tumor experiments, we characterize the half-life, clearance and tumor targeting of this antibody in mice (**Fig.S6A-E; supplemental Materials and Methods).**

We next investigated whether MabL1 was able to target tumor lesions in mice (**Fig.6 A-F**). BxPC3 cells were injected in the spleen ($1x10^6$ cells) in mice. Tumors usually occurred at 2 months post-injection. Infrared-dye labeled MabL1 antibody was administered by i.v. injection. Imaging of organs revealed targeting of the antibody to metastatic lesions in the lung and kidney.

In BxPC3 tumor xenografts, injection of MabL1 in mice yielded to an increase in tumor growth (Fig.7A). MabL1 (25μg) was injected 2-times a week and tumor growth was monitored during a 2-month period. Forty-eight days after implantation tumor size increased by 2-fold in MabL1 treated animals when compared to non-treated controls (2612 mm^3 in MabL1-treated mice versus 1184 mm^3 in control mice). Tumor weight was also increased after antibody treatment (Fig. 7B). The kinetics of tumor growth in MabL1 treated mice was 81.5 mm^3/day in comparison to 34.9 mm^3/day in untreated controls. An increase in the density of small vessels was observed in treated tumors compatible with an angiogenesis-related effect (Fig.7C,D). The vessel increase in MabL1 treated tumor was not accompanied by variation in NG2+ cell coverage (Fig.7E).

In Panc-1 tumor xenografts, the administration of CXCL4L1 antibody had an opposite effect (Fig.7F,G). Using the same treatment protocol as for BxPC3 cells, administration of the MabL1 antibody led to a reduction of tumor size in both subcutaneously and orthotopically implanted tumors (s.c.implantation: 1140 mm^3 in MabL1-treated mice versus 1845 mm^3 in control mice; orthotopic implantation: 2.8e+06 cpm in MabL1-treated mice versus 1.25e+07

cpm in control mice). Tumor weight was reduced in both orthotopic and subcutaneous tumors in the presence of MabL1 (Fig.7H). Lung metastasis as measured by the presence of hS16 mRNA was significantly reduced in orthotopic tumors (Fig.7I). Furthermore, proliferation measured by hMIB1 expression and Ki67 staining was decreased in orthotopic tumors after MabL1 injection (Fig.7J and L). However, no effect on vessel quantity as measured by PCAM1 expression was seen (Fig.7K and L).

Taken together, these results point to an opposite effect of CXCL4L1 in these two pancreatic tumor cell lines, which correlates with the presence of CXCR3 on tumor cells.

We next performed qPCR analysis for PECAM1 in Panc-1 and MIA PaCa-2 tumor samples (**Fig. S7A**). Panc-1 cells express CXCL4L1 contrary to MIA PaCa-2 cells. **Fig S7A** clearly shows that PECAM1 levels were much reduced in Panc1 in comparison to MIA PaCa-2 cells (6.16 fold) and this was inversely correlated with CXCL4L1 expression. Furthermore, we analyzed mouse CXCR3 expression in both tumor types (**Fig. S7B**). Primers are only detecting stroma-derived CXCR3 but no tumor-derived CXCR3. As seen in the figure, this correlated well with PECAM1 expression and inversely with CXCR3 expression (6.16 fold in both cases). In addition, the figure shows that CXCL4L1 is 11 times more expressed in Panc-1 tumors when compared to healthy control pancreas (**Fig S7B**).

Modulation of CXCR3 in PDAC cells

To study the impact of CXCR3-A, we focused on MIA PaCa-2 cells, since Panc-1 cell knock-down or overexpression was unsuccessful. CXCR3-A was cloned into pGFPN2 vector and stable clones were isolated. Very high expression levels were observed (Copy number 574 943 for CXCR3-A / HPRT) (**Fig. S8A**). Cells were also positive by immunodetection (**Fig. S8B**).

We next investigated the functionality of CXCR3 in the condition of chronic stimulation. (Fig.S8C, Fig.S9A-C). Only, CXCL4L1 produced in Hek cells (Hek-CXCL4L1) stimulated proliferation of MIA PaCa-2-CXCR3 cells. We verified that this effect is dependent on CXCL4L1 and CXCR3 by using respectively MabL1 and SCH546738 a specific high affinity antagonist of CXCR3, which demonstrated that this is indeed the case (Fig.S9B). We also verified the signaling ability and demonstrated that chemokine stimulation induced ERK phosphorylation (Fig.S9C).

Orthotopic implantation of MIA PaCa-2-CXCR3 cells did not show a difference in tumor weight when compared to control vector-transfected MIA PaCa-2 cells at sacrifice (day 34 after implantation) (Fig.S9D). However, the number of lung metastasis was increased (human HPRT-1 / mouse HPRT-1 by qPCR; 3.5+-0.86 (controls) versus 7.3+-1.46 (CXCR3-A overexpressors) (Fig.S9E). Since MIA PaCa-2 cells did not show significant elevation of CXCL4L1 expression when compared to BxPC3 or Panc-1 cells, we did not perform inhibition studies using the blocking antibody (MabL1). Despite the fact that tumor weight was not modified, changes in hypoxia signature and MMP9 were observed (Fig.S9F) in cells that overexpress CXCR3A. This indicates that CXCR3 has in vivo intrinsically, in the absence of CXCL4L1, pro-metastatic abilities in pancreatic tumor cells.

DISCUSSION

Our data show that tumor cells up-regulate CXCL4L1 expression when placed in a suitable microenvironment. Myofibroblasts (MF) mimic the *in vivo* microenvironment and were able to induce expression of CXCL4L1. Among potential factors, IL-1β was reported to induce promoter demethylation after long-term exposure(21). However, IL-1β did not induce CXCL4L1 expression in PDAC cells after short or long-term exposure. Microparticles from MF conditioned medium induced CXCL4L1 expression tumor cells. However, the effect of the microparticle preparation was much less when compared to chronic exposure in the coculture system. This indicates that a yet non-identified soluble factor is involved in the induction of CXCL4L1 expression in PDAC cells.

We demonstrated that epigenetic modifications through methylation play a critical role in the induction of CXCL4L1 in tumor cells similar to what has been reported for some other angiogenic factors, receptors or chemokines such as Maspin (24), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) (25) or CXCL12 (SDF1) (26, 27). We found that human PDAC tumors are usually hypomethylated on all 8 methylation sites of the CpG island identified, of which two are involved in the induction of CXCL4L1 expression. This is in contrast to many genes where methylation follows tumor progression. However, hypomethylation during tumor progression has also been reported for other genes including urokinase-type plasminogen activator (28), maspin (29) or matrix metalloproteinases (30), which is in line with our findings.

It is to emphasize that CXCL4L1 or CXCL4 expression is not uniform for all pancreatic carcinoma cell lines tested. When CXCL4L1 or CXCL4 were analyzed in pancreatic carcinoma cells in vitro or after tumor implantation, two of the cell lines (BxPC3,

Panc-1) expressed increased levels of CXCL4L1 but not of CXCL4 in vivo. On the contrary, another cell line (Mia PaCa-2) overexpressed already in vitro CXCL4 but not CXCL4L1 and this was further increased in tumors generated after implantation in mice. Thus, CXCL4 may also have a role in PDAC physiopathology.

Expression of CXCL4L1 was also evidenced in other tumor types such as colon tumors or esophageal cancer (31). Endometriosis-associated ovarian cancer seem to express decreased levels of CXCL4L1 (and CXCL4) in comparison to normal endometrium and endometriosis lesion, but only in tumor-associated macrophages (32).

Anti-CXCL4L1 antibodies were able to target metastatic lesions. This suggests that CXCL4L1 could be used for tumor targeting. However, mice do not express CXCL4L1 and, in humans, targeting of CXCL4L1 may also affect normal cells, which would not be appropriate for tumor targeting applications. CXCL4L1 diffuses much better than CXCL4 and, therefore, may not stay within the tumor tissue. Thus, further experiments are needed to validate CXCL4L1 for tumor targeting approaches.

Functional data indicate that CXCL4L1 has no effect on proliferation, migration or survival when tumor cells do not express CXCR3 protein, as it is the case for BxPC3. Furthermore, significant effects on endothelial cell proliferation, migration, survival or tube formation and cell signaling were observed after CXCL4L1 stimulation, which is in agreement with previous studies. Endothelial cell-expressed CXCR3 has been proposed to mediate the anti-angiogenic effects of CXCL4 and CXCL4L1 (6, 33). Alternatively, CXCL4L1 may bind to an, as yet, unknown receptor.

We next investigated the role of endogenous CXCL4L1 in PDAC development. Transgenic mice models using conditional expression of mutant K-ras and p53 allele or TGF-β receptor seem to better recapitulate the multistage PDAC developmental process(34, 35) than implant models. However, CXCL4L1 is not present in mice and, thus, experiments aimed at blocking endogenous CXCL4L1 cannot be performed in these models.

In BxPC3 tumor xenografts, which do not express CXCR3 protein, blockade of endogenous CXCL4L1 resulted in an increase in tumor development. This is in agreement with an effect on the tumor stroma. In contrast, in Panc-1 tumor xenografts, which express high levels of CXCR3, the blockade of endogenous CXCL4L1 led to a decreased tumor development. Furthermore, we observed that CXCR3-A is mainly up-regulated in Panc-1 cells *in vivo*. This is reinforced by functional studies that show that CXCR3 knock-down diminishes Panc-1 cell proliferation. This is in line with the observation that tumors cells, which express CXCR3-A, exhibit an increase in tumor cell survival and proliferation and with our clinical data (36). Furthermore, CXCR3 has intrinsically pro-metastatic activity.

All in all, our work establishes CXCL4L1 as a novel regulator of pancreatic tumor development that not only acts on the tumor microenvironment but also directly on tumor cells themselves. Expression of the CXCL4L1 in tumor cells is controlled by stroma-tumor cell interactions and by epigenetic regulations. Further work is required to fully understand the specific micro-environmental and epigenetic mechanisms that regulate CXCL4L1 expression in tumor cells.

REFERENCES

1. Struyf S, Burdick MD, Peeters E, Van den Broeck K, Dillen C, Proost P, et al. Platelet factor-4 variant chemokine CXCL4L1 inhibits melanoma and lung carcinoma growth and metastasis by preventing angiogenesis. Cancer research. 2007;67:5940-8.
2. Struyf S, Burdick MD, Proost P, Van Damme J, Strieter RM. Platelets release CXCL4L1, a nonallelic variant of the chemokine platelet factor-4/CXCL4 and potent inhibitor of angiogenesis. Circ Res. 2004;95:855-7.
3. Dubrac A, Quemener C, Lacazette E, Lopez F, Zanibellato C, Wu WG, et al. Functional divergence between 2 chemokines is conferred by single amino acid change. Blood. 2010;116:4703-11.
4. Lasagni L, Grepin R, Mazzinghi B, Lazzeri E, Meini C, Sagrinati C, et al. PF-4/CXCL4 and CXCL4L1 exhibit distinct subcellular localization and a differentially regulated mechanism of secretion. Blood. 2007;109:4127-34.
5. Kuo JH, Chen YP, Liu JS, Dubrac A, Quemener C, Prats H, et al. Alternative C-Terminal Helix Orientation Alters Chemokine Function: Structure of the Anti-angiogenic Chemokine, CXCL4L1. The Journal of biological chemistry. 2013.
6. Struyf S, Salogni L, Burdick MD, Vandercappellen J, Gouwy M, Noppen S, et al. Angiostatic and chemotactic activities of the CXC chemokine CXCL4L1 (platelet factor-4 variant) are mediated by CXCR3. Blood. 2011;117:480-8.
7. Billottet C, Quemener C, Bikfalvi A. CXCR3, a double-edged sword in tumor progression and angiogenesis. Biochimica et biophysica acta. 2013;1836:287-95.
8. Van Raemdonck K, Van den Steen PE, Liekens S, Van Damme J, Struyf S. CXCR3 ligands in disease and therapy. Cytokine & growth factor reviews. 2015;26:311-27.
9. Karin N, Wildbaum G, Thelen M. Biased signaling pathways via CXCR3 control the development and function of CD4+ T cell subsets. Journal of leukocyte biology. 2015.
10. Vandercappellen J, Noppen S, Verbeke H, Put W, Conings R, Gouwy M, et al. Stimulation of angiostatic platelet factor-4 variant (CXCL4L1/PF-4var) versus inhibition of angiogenic granulocyte chemotactic protein-2 (CXCL6/GCP-2) in normal and tumoral mesenchymal cells. Journal of leukocyte biology. 2007;82:1519-30.
11. Vandercappellen J, Liekens S, Bronckaers A, Noppen S, Ronsse I, Dillen C, et al. The COOH-terminal peptide of platelet factor-4 variant (CXCL4L1/PF-4var47-70) strongly inhibits angiogenesis and suppresses B16 melanoma growth in vivo. Molecular cancer research : MCR. 2010;8:322-34.
12. Van Raemdonck K, Berghmans N, Vanheule V, Bugatti A, Proost P, Opdenakker G, et al. Angiostatic, tumor inflammatory and anti-tumor effects of CXCL4(47-70) and CXCL4L1(47-70) in an EGF-dependent breast cancer model. Oncotarget. 2014;5:10916-33.
13. Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, Eichmann A, et al. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102:1643-8.
14. Dumartin L, Quemener C, Laklai H, Herbert J, Bicknell R, Bousquet C, et al. Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. Gastroenterology. 2010;138:1595-606, 606 e1-8.
15. Hendrich H. The Laboratory Mouse. 2d Edition ed: Elsevier; 2012.
16. Platonova N, Miquel G, Regenfuss B, Taouji S, Cursiefen C, Chevet E, et al. Evidence for the interaction of fibroblast growth factor-2 with the lymphatic endothelial cell marker LYVE-1. Blood. 2013;121:1229-37.

17. Liu ZQ, Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory and trouble shooting. North American journal of medical sciences. 2014;6:160.
18. Clarke K, Daubon T, Turan N, Soulet F, Mohd Zahari M, Ryan KR, et al. Inference of Low and High-Grade Glioma Gene Regulatory Networks Delineates the Role of Rnd3 in Establishing Multiple Hallmarks of Cancer. PLoS genetics. 2015;11:e1005325.
19. Segara D, Biankin AV, Kench JG, Langusch CC, Dawson AC, Skalicky DA, et al. Expression of HOXB2, a retinoic acid signaling target in pancreatic cancer and pancreatic intraepithelial neoplasia. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2005;11:3587-96.
20. Ishikawa M, Yoshida K, Yamashita Y, Ota J, Takada S, Kisanuki H, et al. Experimental trial for diagnosis of pancreatic ductal carcinoma based on gene expression profiles of pancreatic ductal cells. Cancer science. 2005;96:387-93.
21. Hashimoto K, Oreffo RO, Gibson MB, Goldring MB, Roach HI. DNA demethylation at specific CpG sites in the IL1B promoter in response to inflammatory cytokines in human articular chondrocytes. Arthritis and rheumatism. 2009;60:3303-13.
22. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang CH, Angelo M, et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2001;98:15149-54.
23. Buchholz M, Braun M, Heidenblut A, Kestler HA, Kloppel G, Schmiegel W, et al. Transcriptome analysis of microdissected pancreatic intraepithelial neoplastic lesions. Oncogene. 2005;24:6626-36.
24. Beltran AS, Sun X, Lizardi PM, Blancafort P. Reprogramming epigenetic silencing: artificial transcription factors synergize with chromatin remodeling drugs to reactivate the tumor suppressor mammary serine protease inhibitor. Molecular cancer therapeutics. 2008;7:1080-90.
25. Hellebrekers DM, Castermans K, Vire E, Dings RP, Hoebers NT, Mayo KH, et al. Epigenetic regulation of tumor endothelial cell anergy: silencing of intercellular adhesion molecule-1 by histone modifications. Cancer research. 2006;66:10770-7.
26. Seo J, Kim YO, Jo I. Differential expression of stromal cell-derived factor 1 in human brain microvascular endothelial cells and pericytes involves histone modifications. Biochemical and biophysical research communications. 2009;382:519-24.
27. Sowinska A, Jagodzinski PP. RNA interference-mediated knockdown of DNMT1 and DNMT3B induces CXCL12 expression in MCF-7 breast cancer and AsPC1 pancreatic carcinoma cell lines. Cancer letters. 2007;255:153-9.
28. Pakneshan P, Szyf M, Rabbani SA. Methylation and inhibition of expression of uPA by the RAS oncogene: divergence of growth control and invasion in breast cancer cells. Carcinogenesis. 2005;26:557-64.
29. Sato N, Fukushima N, Matsubayashi H, Goggins M. Identification of maspin and S100P as novel hypomethylation targets in pancreatic cancer using global gene expression profiling. Oncogene. 2004;23:1531-8.
30. Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M. Effects of 5-aza-2'-deoxycytidine on matrix metalloproteinase expression and pancreatic cancer cell invasiveness. Journal of the National Cancer Institute. 2003;95:327-30.
31. Verbeke H, De Hertogh G, Li S, Vandercappellen J, Noppen S, Schutyser E, et al. Expression of angiostatic platelet factor-4var/CXCL4L1 counterbalances angiogenic impulses of vascular endothelial growth factor, interleukin-8/CXCL8, and stromal cell-derived factor 1/CXCL12 in esophageal and colorectal cancer. Human pathology. 2010;41:990-1001.
32. Furuya M, Tanaka R, Miyagi E, Kami D, Nagahama K, Miyagi Y, et al. Impaired CXCL4 expression in tumor-associated macrophages (TAMs) of ovarian cancers arising in endometriosis. Cancer biology & therapy. 2012;13:671-80.

33. Lasagni L, Francalanci M, Annunziato F, Lazzeri E, Giannini S, Cosmi L, et al. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. J Exp Med. 2003;197:1537-49.
34. Guerra C, Schuhmacher AJ, Canamero M, Grippo PJ, Verdaguer L, Perez-Gallego L, et al. Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. Cancer cell. 2007;11:291-302.
35. Cook N, Olive KP, Frese K, Tuveson DA. K-Ras-driven pancreatic cancer mouse model for anticancer inhibitor analyses. Methods Enzymol. 2008;439:73-85.
36. Giuliani N, Bonomini S, Romagnani P, Lazzaretti M, Morandi F, Colla S, et al. CXCR3 and its binding chemokines in myeloma cells: expression of isoforms and potential relationships with myeloma cell proliferation and survival. Haematologica. 2006;91:1489-97.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: CXCL4L1 expression in the PDAC-CAM and mouse xenograft model

(A) *CXCL4L1* expression in BxPC3 cells *in vitro* and in the PDAC-CAM model at day 1 (T1) and day 6 (T6), normalized to S16 expression. *CXCL4L1* mRNA at T1 with arbitrary value 1. (B) Immunolabelling on T6 CAM with MabL1. (C) Western blotting for CXCL4L1 from pooled T6 CAM lysates (n=3) or BxPC3 cells lysates with MabL1. The gel is representative of two independent experiments. (D) *In situ* hybridization of T6 PDAC-CAM samples with *CXCL4L1* riboprobes. Tumor nodes (dotted lines), CAM surface (full lines). (E) qRT-PCR from mRNA of BXPC3, Panc-1, MIA PaCa-2 cells in culture (n = 4) or of tumors derived from subcutaneously injected cells (n = 8 tumors; **, $P<0.01$). (F) CXCL4L1 immunolabeling of BxPC3 (subcutaneous), Panc-1 and MIA PaCa-2 tumors (orthotopic) and lung metastasis. Global view (Insert). Scale bars: (primary tumors) 50µm; (lung metastasis) 100µm. Error bars indicate SEM. Asterisk*: positive node.

Figure 2: Coculture of tumor cells with myofibroblasts

(A) Immunofluorescence (IF) staining for CXCL4L1 on BxPC3 cells alone (left) or co-cultured for 4 days with myofibroblasts (MF) (right) DAPI-labeled nuclei are in blue. (B) qRT-PCR from laser micro-dissected BxPC3 cell mRNA. Data as CT value as means ± SD of 5 micro-dissected samples. *HPRT1* as a housekeeping gene and α-*SMA* as a control for contamination by MF. (C) IF staining on co-cultured BxPC3 for CXCL4L1 and VAMP-2. DAPI-labeled nuclei in blue. Merged staining (yellow) revealed areas of co-localization and scatter 2D plots of intensities in red and green immunofluorescence channels (NIS software). (D) BxPC3 cells (2×10^5) were co-cultured using transwell system with MF (2×10^5) for 24 h or with microparticles. mRNA was extracted and analyzed by qPCR for CXCL4L1

expression. Data as copy number / HPRT. Scale bar: (A) 50 µm (C) 10µm. (E) BxPC3 cells (2×10^5) were co-cultured using a transwell system with MF (2×10^5) for 24h. Myofibroblasts were then removed from the transwell chamber for 24h. mRNA was then extracted and analyzed by qPCR for CXCL4L1 expression. Data as copy number / HPRT.

Figure 3: Modulation of *CXCL4L1* expression by DNA methylation

(A) *CXCL4L1* and *CXCL4* genomic organization. (B) RT–PCR analyses of *CXCL4*, *CXCL4L1*, *CXCL1* and *CXCL5* mRNA from BxPC3 cells treated with 5'-Aza and/or TSA (left panel). RT–PCR analyses of *CXCL4* and *CXCL4L1* mRNA from platelets, BxPC3 and MG63 cells treated with IL-1β and 5'-Aza/ TSA (right panel). *GAPDH* as an internal control. (C) Location of CpG sites (vertical bars), bisulfite sequencing primers in the first intron with the Methprimer website. (D) Methylation of *CXCL4L1* in BxPC3 cells treated or not with 5'-Aza, in BxPC3 sub-cutaneous primary tumors and in lung metastasis from mice injected with BxPC3 into the spleen (one representative tumor and metastasis, n=10 tumors/group) (left panel). Filled and open circles represent methylated and unmethylated CpG sites respectively. qRT-PCR of C*XCL4L11* mRNA from 5'-Aza-treated or untreated BxPC3 cells and from subcutaneous tumor and lung metastasis (right panel). *HPRT1,* internal control. (n = 6 samples/group). (E) Characterization of *CXCL4L1* expression. The 1-kb upstream promoter, exon 1 and intron 1 regions of human *CXCL4L1* cloned in front of the *Luciferase* Firefly gene. Wild-type sequence (WT) or mutated sequence in the two CpG sites regulated by the 5'Aza treatment. After *in vitro* methylation and transfection, and the ratio of LucFirefly/LucRenilla was determined (n = 3; **, P<0.01). Error bars, SEM.

Figure 4: Expression of CXCR3 in pancreatic adenocarcinoma

(A) qRT-PCR for CXCR3-A and CXCR3-B. (B) qRT-PCR for *CXCR3*-A and B in primary tumors from BxPC3, PANC-1 and MIA PaCa-2 cells implanted mice (n=12 and 10 tumors/group). (C) Immunofluorescence staining *in vitro*. (D) Immunostaining for human CXCR3 of subcutaneous BxPC3 and orthotopic PANC-1 and MIA PaCa-2 tumors (left panels) and lung metastasis (middle and right panels). (E) Immunohistochemistry for CXCR3 (brown) and hematoxylin counterstaining (blue) of PDAC patients tissue microarray (TMA) showing apical (left upper panel), cytoplasmic (upper middle panel), membrane (upper right panel) and nuclear staining (lower panels). Scale bars: (B) 20 µm, (D, left panels and right lower panel) 100µm, (D, middle panels) 500µm, (D, upper right panel, E) 50µm. Error bars indicate SEM.

Figure 5: Functional studies of CXCL4L1 in pancreatic adenocarcinoma and endothelial cells

(A) Activity of recombinant GST-CXCL4L1 and cleaved CXCL4L1 on HUVEC proliferation after 48 h(left panel). Endothelial cells cultured with FGF2 (20ng/mL) and 50ng/mL of recombinant proteins in presence of MabL1 (10 µg/mL) or of an IgG control antibody. Effect of recombinant CXCL4L1 (GST-CXCL4L1) on FGF2-stimulated (10 ng/ml) proliferation or invasion of HUVECs (proliferation: left panel, invasion: middle panel). CXCR3 protein expression assessed by Western-blot in HUVEC cells (right panel). Vinculin as loading control. (B) BXPC3 cells (proliferation: left panel; invasion: right panel) in the presence of CXCL4L1. (C) Effect of CXCL4L1 and CXCR3 knock-down or antibody treatment on the proliferation of Panc-1 cells. Cells transfected with the specific siRNAs or control siRNAs, grown in complete medium and treated or not with the monoclonal anti-CXCL4L1 antibody over 120 h. Results as average ± SEM of three independent experiments done in triplicates;

** *<0.01*, * *P<0.05*. (D) Effect of CXCL4L1 on signaling in Panc-1 cells. Cells stimulated with minimal medium from CXCL4L1 infected cells (MIA PaCa-2) containing > 300 ng/ml CXCL4L1 and ERK phosphorylation measured by Western Blotting with and without a specific inhibitor of MAP-kinases (U1026, 50µM). 0%M : Serum-free medium. CM : complete medium.

Figure 6: Targeting of monoclonal MabL1 to tumor lesion in mice

Antibodies labeled with IRdye (MabL1-IRdye) and injected into the tail vein in tumor bearing mice. 6 days after Mabl1-IRdye injection, tissues were removed after sacrifice and imaged on the Odyssey Imaging System, frozen, cut into 40 µm sections and imaged again. Lesions targeted by MabL1 are shown in the lung (Figure S7A-C) and kidney (Figure S7D-F) in green. Figure S7C and 7F depict images of frozen sections.

Figure 7: Effect of CXCL4L1 blockade on *in vivo* pancreatic tumor development

(A) Tumor development in subcutaneously implanted BxPC3 cells (n=12/group) and followed by Caliper measurements in MabL1 or control antibody treated animals. Treated tumors were significantly larger (**, P<0.01). (B) On the day of sacrifice, tumors were excised and weighted (**, P<0.01). (C) Immunofluorescence staining for CD31 and NG2 on subcutaneous BxPC3 tumor section from control and MabL1 treated mice. (D) Quantification of vessel density grouped in small (<10 μm^2), medium (10-100 μm^2) or large CD31-positive vessels (>100 μm^2) (n=5 tumors/group, 10 pictures/tumor). MabL1-treated mice have significantly more small-diameter vessels in tumors compared to untreated controls (*, P<0.05). (E) Quantification of smooth muscle cell (SMC) coverage.

(F) Panc-1 cells implanted subcutaneously or orthotopically by direct intra-pancreatic injection in Rag2 γ/c mice and treated with MabL1 or with the control antibody. MabL1

treated mice with subcutaneously implanted cells had significantly smaller tumors (**, P<0,01). (G) Bioluminescent imaging on orthotopic PANC-1-LucFirefly tumors using the Photon Imager (Biospace). Analysis by M3Vision software and represented as total flux measurements in count per minute. (H) Weights recorded from the excised tumors at sacrifice day 75 and 92 for orthotopic and subcutaneous tumors respectively (**, P<0,01; *, P<0.05). (I) Quantification of lung metastasis in subcutaneously and orthotopically implanted mice by qRT-PCR for the human *S16* gene (n = 10 lungs/group) (*, P<0,05). m*HPRT1*, housekeeping gene. (J) qRT-PCR analyses for human *MIB1* and (K) mouse *PECAM1* in tumors (*, P<0.05). (L) Immunofluorescence staining for mouse CD31 and human Ki67 on orthotopic tumor sections. Scale bar: 50µm. Error bars are indicated as SEM.

Figure 1

Quemener et al.

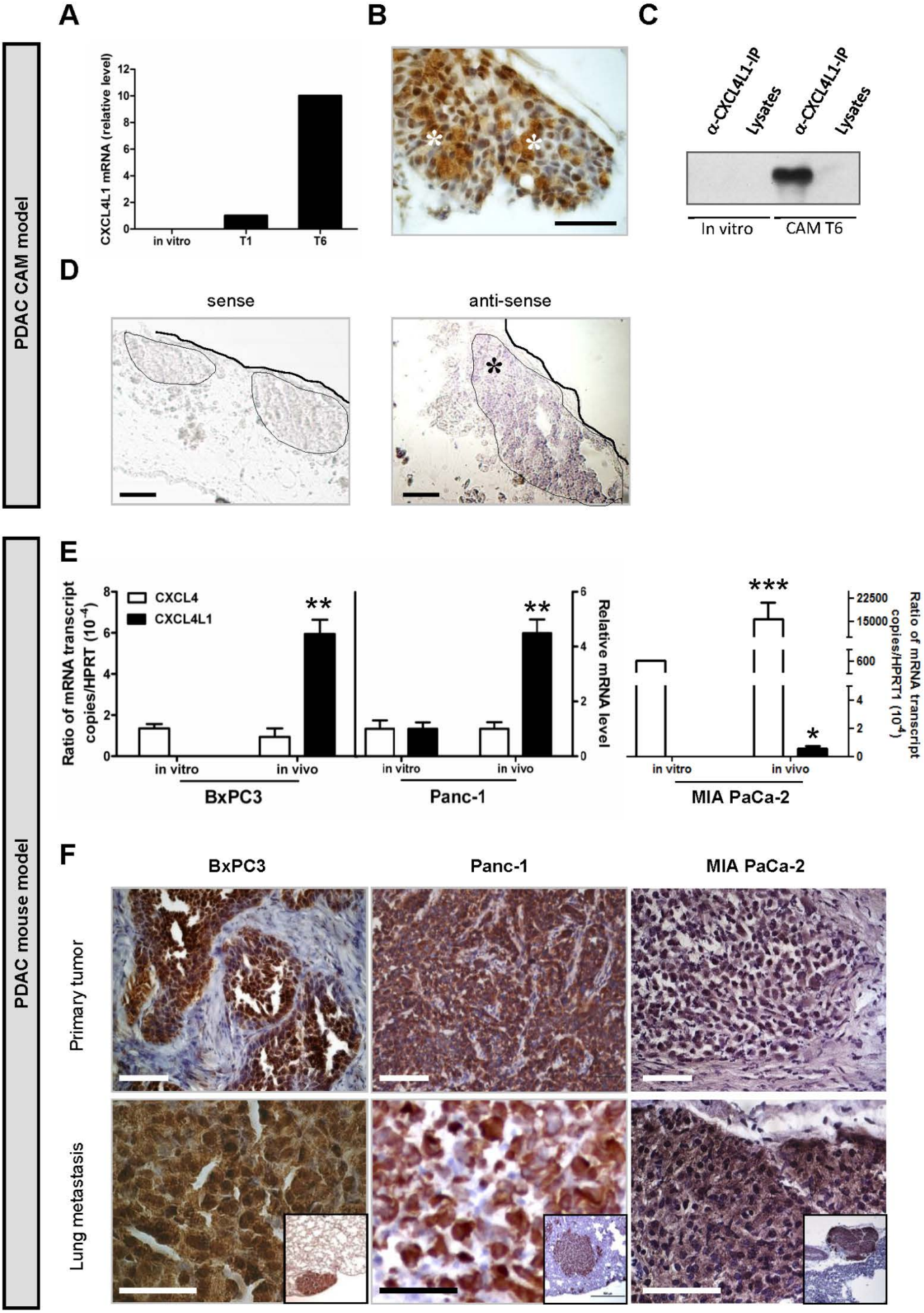
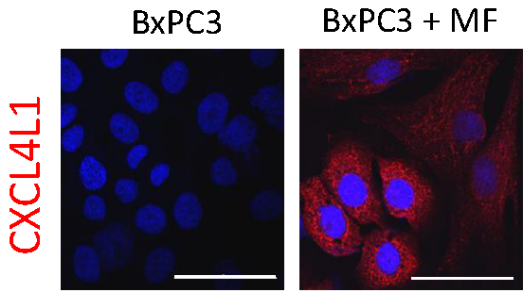


Figure 2 Quemener et al.

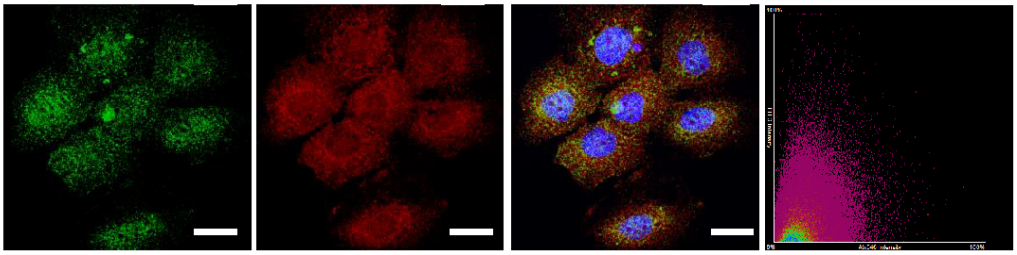
A



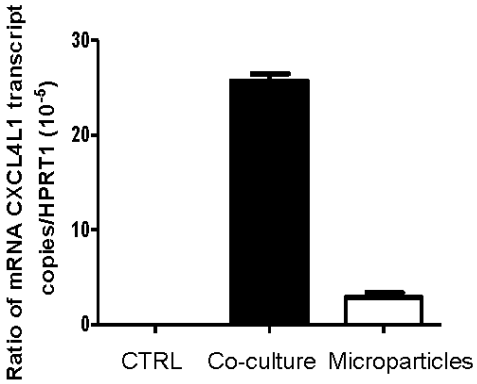
B

BxPC3		cocultured BxPC3		
HPRT1	CXCL4L1	HPRT1	CXCL4L1	αSMA
26.3 ± 1.02	No CT	19.41 ± 3.23	25.85 ± 1.48	No CT
11.4 ± 0.56	No CT	21.74 ± 5.58	31.63 ± 5.08	No CT
17.57 ± 2.24	No CT	23.05 ± 3.84	30.25 ± 3.54	No CT

C



D



E

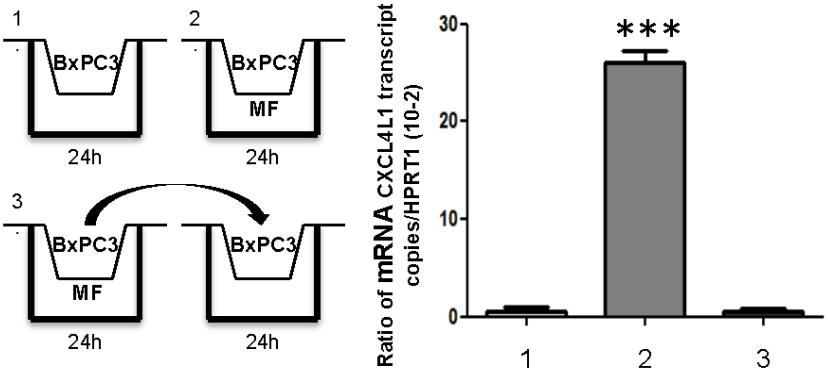
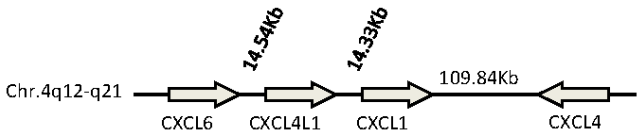
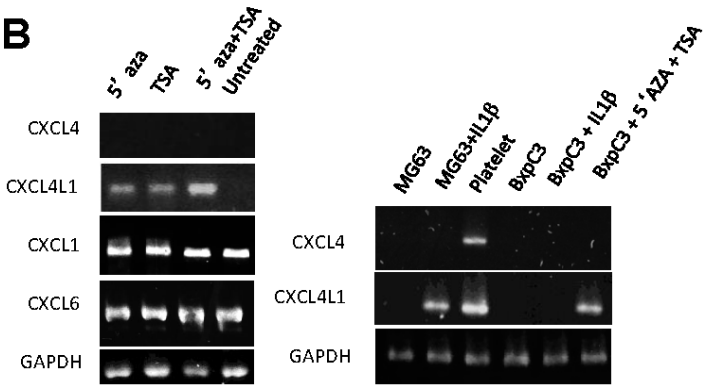
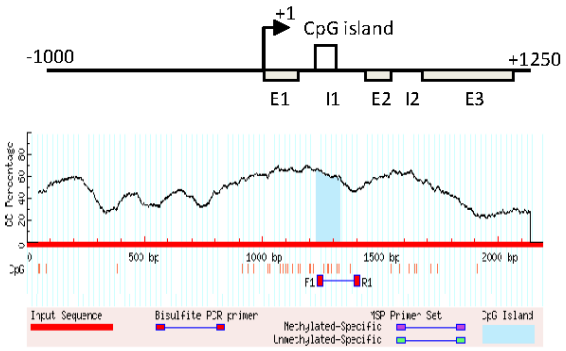


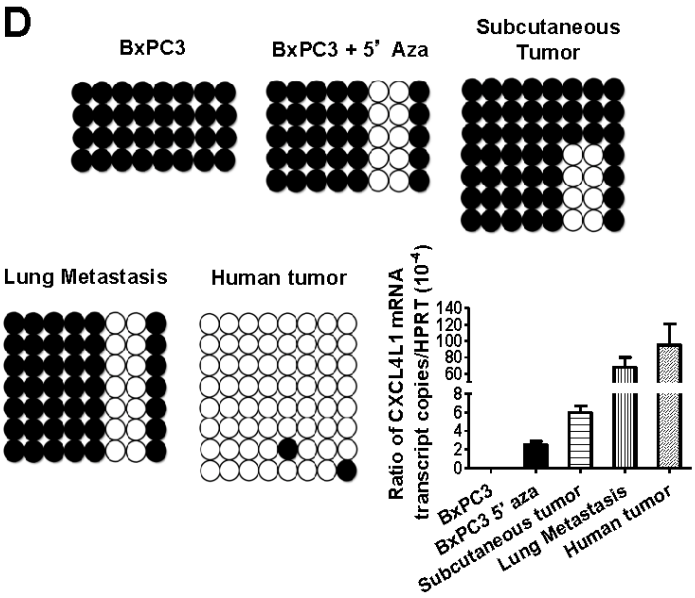
Figure 3

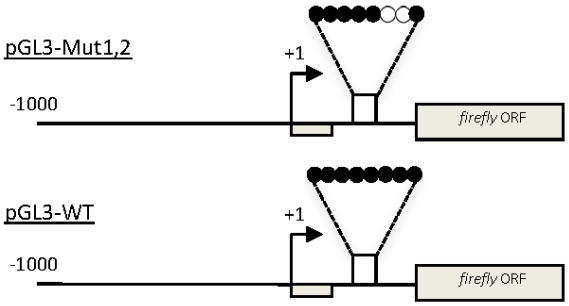
Quemener et al.

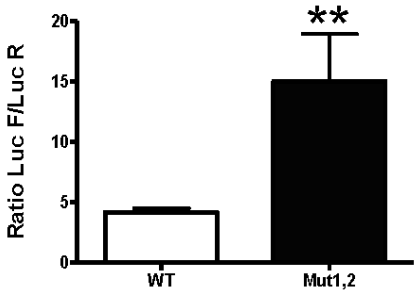


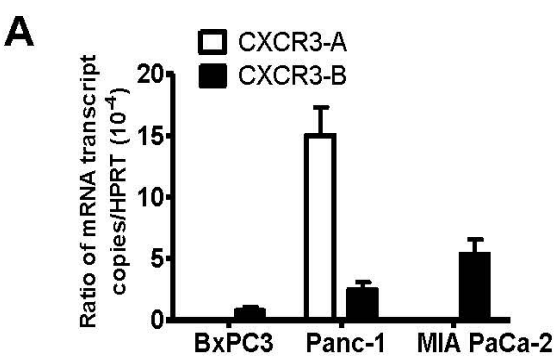


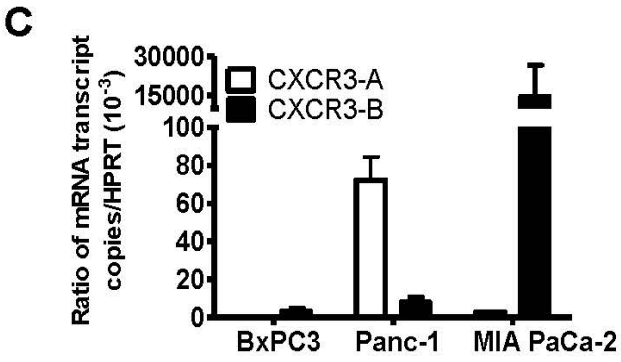


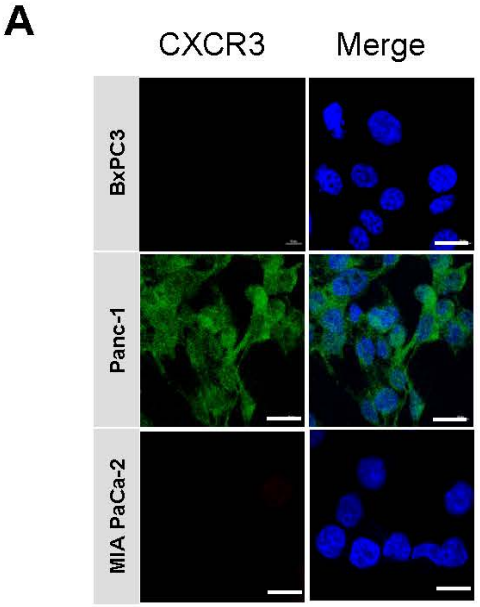


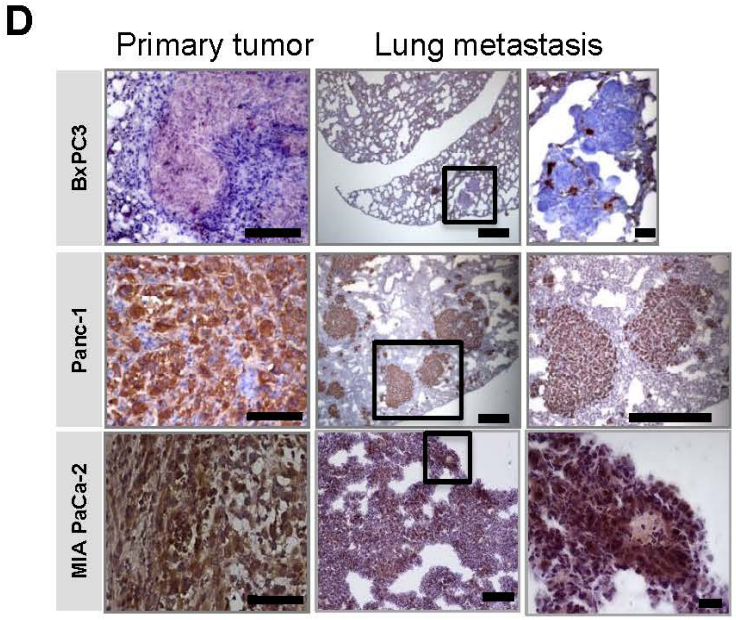


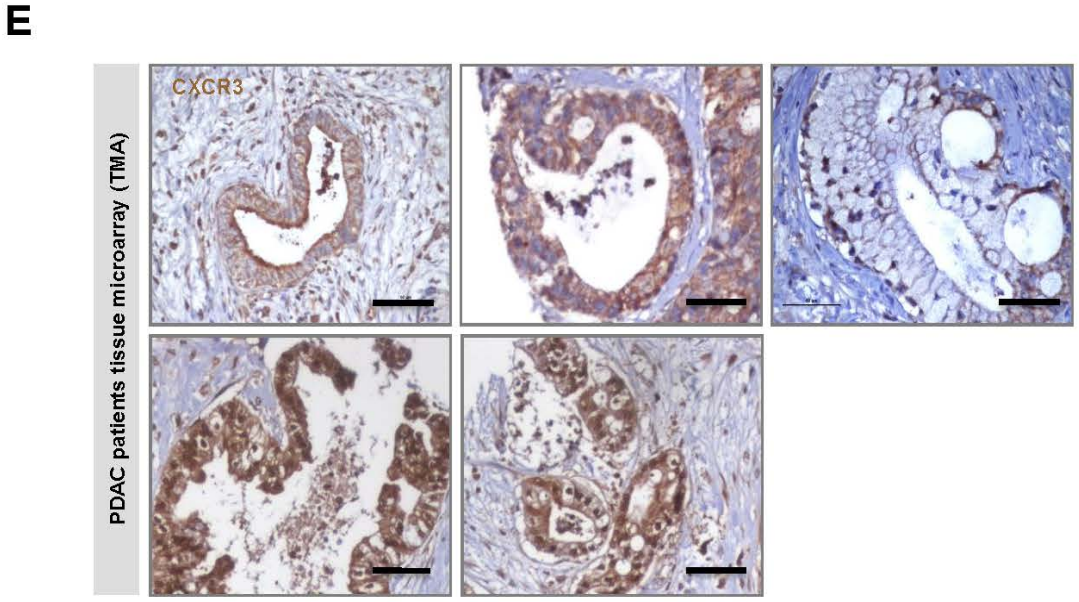



A
CXCR3-A
CXCR3-B
Ratio of mRNA transcript copies/HPRT (10^{-4})
20
15
10
5
0
BxPC3
Panc-1
MIA PaCa-2


C
CXCR3-A
CXCR3-B
Ratio of mRNA transcript copies/HPRT (10^{-3})
30000
15000
100
80
60
40
20
0
BxPC3
Panc-1
MIA PaCa-2


A
CXCR3
Merge
BxPC3
Panc-1
MIA PaCa-2


D
Primary tumor
Lung metastasis
BxPC3
Panc-1
MIA PaCa-2


E
CXCR3
PDAC patients tissue microarray (TMA)

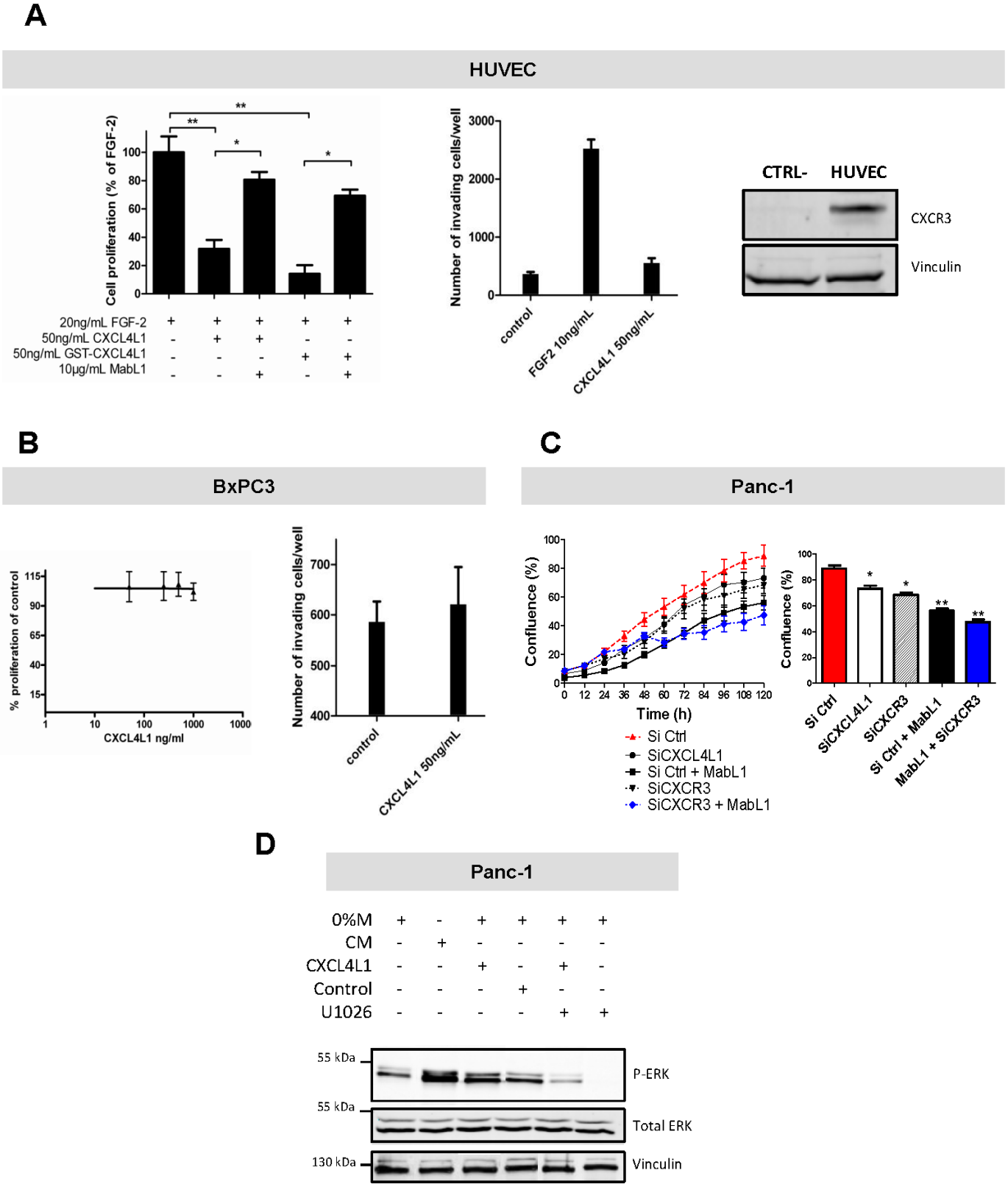

A
HUVEC
Cell proliferation (% of FGF-2)
20ng/mL FGF-2
50ng/mL CXCL4L1
50ng/mL GST-CXCL4L1
10µg/mL MabL1
Number of invading cells/well
control
FGF2 10ng/mL
CXCL4L1 50ng/mL
CTRL-
HUVEC
CXCR3
Vinculin
B
BxPC3
% proliferation of control
CXCL4L1 ng/ml
Number of invading cells/well
control
CXCL4L1 50ng/mL
C
Panc-1
Confluence (%)
Time (h)
Si Ctrl
SiCXCL4L1
Si Ctrl + MabL1
SiCXCR3
SiCXCR3 + MabL1
Confluence (%)
Si Ctrl
SiCXCL4L1
SiCXCR3
Si Ctrl + MabL1
MabL1 + SiCXCR3
D
Panc-1
0%M
CM
CXCL4L1
Control
U1026
55 kDa
P-ERK
55 kDa
Total ERK
130 kDa
Vinculin

Figure 6

Quemener et al.

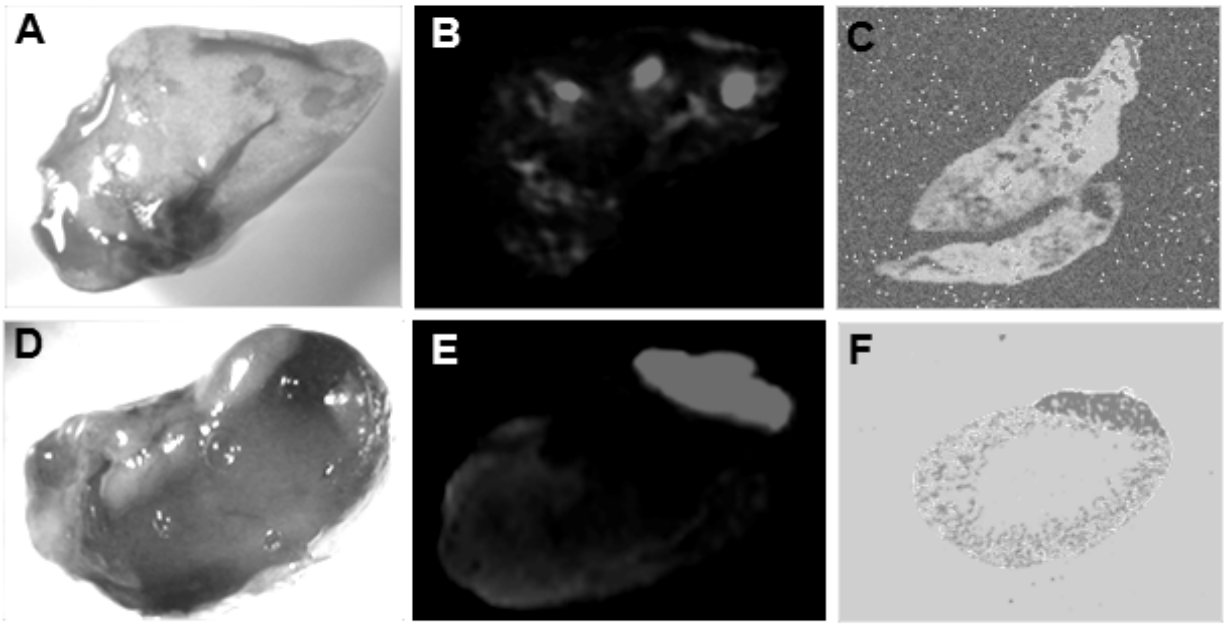
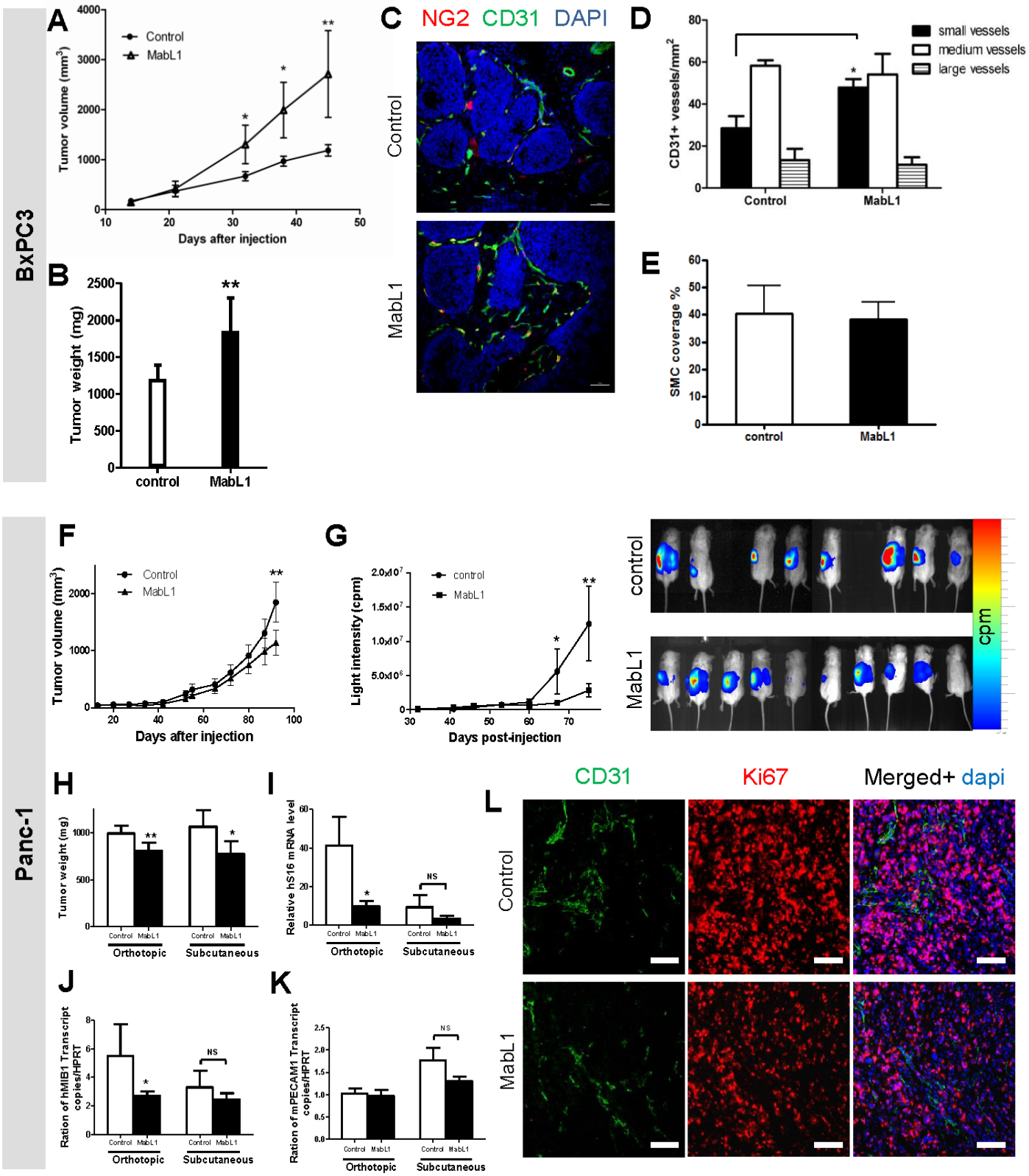


Figure 7

Quemener et al.



SUPPLEMENTAL MATERIALS AND METHODS

Reagents

5'-azacytidine-2'-deoxycytidine (5'-aza-dC) and Trichostatine A (TSA) were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), IL-1β was from R&D systems (R&D Systems, Minneapolis, MN 55413 USA) and U1026 monoethanolate was from Sigma. SCH 546738 was from Chemexpress (Shanghai, P.R.China).

Cell culture, PDAC-CAM model, treatment and transfection

Pancreatic tumor cell lines (MIA PaCa-2, BxPC3, PANC-1) were cultured in DMEM (4.5g/l or 1 g/lglucose) (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Cell line authentication tests were performed on the different cell lines (Eurofins, GE). Pancreatic cell lines were Human osteosarcoma MG63 cells (ATCC CRL-1427) were grown in MEM medium (Life Technologies, Inc. BRL). All media were supplemented with 10% fetal bovine serum, antibiotics (penicillin/streptomycin), and L-glutamine. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC, Lonza, Levallois-Perret, France) were maintained in EBM-2 (Lonza) supplemented with EGM-2 SingleQuots (Lonza), which contain 2% FBS. Human hepatic myofibroblasts werea kind gift from Dr Jean Rosenbaum and grown in DMEM that contained 5% fetal calf serum, 5% pooled human serum and 5 ng/mL epidermal growth factor (EGF)(1). Cultures were incubated at 37°C in 5% $C0_2$.

Fertilized chicken eggs (*Gallus gallus*) were handled as previously described (2). At embryonic day 10 (E10), 4 millions BxPC3 cells diluted in serum free medium in a final volume of 40μl were deposited as a thin layer on the intact CAM surface (3). Transcriptome profiles have been previously described (4) and are accessible at:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo, accession: GSE14509; samples: GSM362328, GSM362337, GSM362338, GSM362341.

Luciferase-tagged BxPC3, PANC-1 and MIA PaCa-2 tumor cells were established by transducing cells with recombinant lentiviral vectors expressing firefly luciferase.

MIA PaCa-2 cells were transfected with pGFPN2 or pGFPN2-CXCR3-A using lipofectamine 2000 (Invitrogen). Selection of clones was done by Zeocin (200μg/ml).

Hek cells were transfected with the pVAX vector containing the CXCL4L1 cDNA. CXCL4L1 containing conditioned medium (CM) was prepared from MIA PaCa-2 cells that were infected with an adenoviral vector (p104-Ad5, gift from Harald Wodrich's team) containg the CXCL4L1 cDNA. The medium was collected and ELISA assay for human CXCL4 was used. This assay also detects CXCL4L1 but is unable to recognize mouse CXCL4. High levels were obtained ranging from 100 ng/ml to 700 ng/ml. This was used for stimulation of cells in vitro.

To study the involvement of epigenetic events in the CXCL4L1 silencing in pancreatic BxPC3 cell line, cells were treated with 5'-aza (1 μM) for at least 15 days and/or TSA (150 nM) for the last 24 hours. The MG63 cell line was treated with 10ng/ml of IL-1β during 48 hours.

Small interfering RNA transfection

CXCL4L1 and CXCR3 smallinterfering RNA(siRNA) oligosor scrambled siRNA oligos (25 nmol/L) were transfected into PANC-1 cells using the Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen), according to the manufacturer's protocol. Cells were then incubated for 24 hours and trypsinized for proliferation assay.

The following siRNA sequences were used:

siCXCR3 on-target plus set of 4 upgrade siRNA J-005472-12 (Dharmacon) :

target sequences : - CCACCUAGCUGUAGCAGAC
- GCUAAAUGACGCCGAGGUU
- CCGCAACUGUGGCCGAGAA
- UCAUGGACCUGGGCGCUUU

SiCXCL4L1 on-target plus set of 4 upgrade siRNA J-008059-05 (Dharmacon) :

target sequences : - GAGAUGCUGUUCUUGGCGU
- ACAAUUAGCUUGCCAAUAA
- UAGUACUCUUAAGCAUUA
- GCUGAUACAUAUUUGUUCA

Control: Si control on-target plus set of 4 upgrade siRNA D-001810-10-05 (Dharmacon)

Cell proliferation and invasion assay

Cell proliferation was evaluated either by the WST-1 assay (Roche, Neuilly sur Seine Cedex, France) or Incucyte ™ technology (Essen BioScience, Ann Arbor, Michigan) using standard procedures. Briefly, cells were seeded in 96-well plates at a concentration of 1×10^4 (HUVECs) or 3×10^3 (BxPC3 and PANC-1) cells/well and allowed to adhere overnight. Complete medium was replaced by serum-free medium with or without FGF-2, CXCL4L1 proteins and MabL1 blocking antibody at indicated concentrations for 24 (HUVECs), 48 (BxPC3 cells) or 120 (PANC-1 cells) hours. In order to test the CXCR3-dependent activity of CXCL4L1, cells (control MIA PaCa-2, MIA PaCa-2-CXCR3-GFP, HEK293 and HEK293-CXCL4L1) were seeded and cocultured in 6-well plates at a concentration of 2×10^4cells and allowed to adhere overnight. Complete medium was replaced by 1% FBS medium, and cells were treated or not every 48 h with Mabl1 blocking antibodies at indicated concentrations, or with the CXCR3 antagonist SCH546738 at a concentration of 2.2 nM. Fluorescence intensity of control MIA PaCa-2 GFP or MIA PaCa-2 CXCR3A-GFP was then used to specifically monitor cell proliferation.

Cell invasion assays were carried out using 24-well micro-chemotaxis Boyden chambers precoated with 10 μg Matrigel (BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). Cells (1×105) were seeded to the upper chamber and FGF-2 or 1% FCS were used as a chemoattractant for HUVEC and BxPC3 cells respectively. Cells were incubated at 37°C for 24 h, then, cells on the lower face of the filter were fixed, stained with crystal violet and counted under a microscope.

Preparation of microparticles

Microparticles were isolated from supernantant of myofibroblasts grown to confluency (T75 at confluency). Centrifugation at 2500 RPM for the elimination of cellular fragments (10 min). The supernatant was centrifugated at 100 000 g for 1 h and the pellet is collected and resuspended in medium before use.

Co-culture experiments

To approach more the physiologic conditions of the tumor microenvironment we also co-cultured the BxPC3 cell line with myofibroblasts, HUVEC or SMC. Two cell types were seeded on glass coverslips in 24-well plates, and co-cultured for 96h. The cells were washed in cold PBS and fixed in 90% methanol at -20°C for 10 min. The slides were incubated for 1 h with human anti-CXCL4L1 antibody (MabL1) prior to 1h incubation with Alexa 546-coupled anti-mouse secondary antibody (Invitrogen). Cell nuclei were counterstained with 4, 6-diamino-2-phenylindol (DAPI; Sigma). Labeled cells were mounted with prolong, and then examined using a fluorescence microscope (Nikon).

Laser Capture Microdissection Analyses: BxPC3 cells were co-cultured for 96 h with activated myofibroblasts on PEN-membrane. LCM was performed by using a PALM MicroBeam microdissection system version 4.0–1206 equipped with a P.A.L.M.

RoboSoftware (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Zeiss, Germany). Then, total cellular RNA was extracted from microdissected cells after which pre-amplification and qRT-PCR for CXCL4L1, HPRT1 and αSMA was performed.

Furthermore, co-culture experiments using Transwell system (Greiner bio-one< 0.45 μm) with BxPC3 cells and myofibroblasts were used. Tumor cells (2 x 10^5) were place in the upper side of the membrane and myofibroblasts at the lower side in DMEM containing 20% FBS. BxPC3 cells were then removed from the membrane and RNA are extracted as indicated.

Reversibility experiments were carried out in the following way: BxPC3 cells (2 x 10^5) were co-cultured using a transwell system with myofibroblasts (2x10^5) for 24h. Myofibroblasts were then removed from the transwell chamber for 24h. mRNA was then extracted and analyzed by qPCR for CXCL4L1 expression. Data are indicated as copy number / HPRT.

Immunoprecipitation

3 pooled T6 implanted CAM or 1x10^6 BxPC3 cells were collected in 500μl lysis buffer containing 10% glycerol, 50 mMTris-HCl, 0.1 mM EDTA, 5 mM sodium fluoride, 1 mM sodium pyrophosphate, 1 mM sodium vanadate, a protease inhibitor cocktail tablet (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 1% (vol/vol) Nonidet P-40, 0.1% SDS, and 0.1% deoxycholate; pH7.5. Lysates were incubated for 1 hour at 4°C on a rotating mixer, and centrifuged at 13,000 rpm for 10 min at 4°C. Approximately 20μl of Protein G slurry (Invitrogen) previously incubated overnight at 4°C with 2 μg of MabL1 antibody, was added to each sample, adjusted to 1 mg protein/ml lysis buffer and incubated for 1 hour at 4°C. After centrifugation to remove non-specific binding, proteins bound to the antibody were eluted with 50 μl of loading buffer containing β-mercaptoethanol, boiled at 95°C for 10 min, and

analyzed by Western blot. Membranes were immunoblotted with MabL1 antibody and proteins were visualized with enhanced chemiluminescence reagent (Pierce, Rockford, IL).

Western Blotting

Western Blots were done according to standard procedures (4) using anti-vinculin (Sigma, V9131) and anti-P-ERK antibodies (Cell signaling, 4370S).

RNA extraction and semi-quantitative and quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from cells, mice tumors and human tumors using the TriZol reagent protocol (Invitrogen).

After DNAse treatment (DNA free, Ambion) and quantification, reverse transcription was done with 2 μg of total RNA using the RevertAid H Minus First strand cDNA Synthesis kit (Fermentas) and random hexamers.

The resulting cDNA fragments were PCR amplified using the following primers: CXCL4 forward 5'- ATGAGCTCCGCAGCCGGGTT-3'; reverse 5'-CTAACTCTCCAAAAGTTTCT-3'. CXCL4L1 forward 5' ATGAGCTCCGCAGCCAGGTC -3'; reverse 5'-CTAACTCTCCAAATGTTCCT-3'; CXCL1 forward 5'-ATGGCCCGCGCTGCTCTCTC -3'; reverse 5'- GTTGGATTTGTCACTGTTCA -3'; CXCL5 forward 5'-ATGAGCCTCCTGTCCAGCCG -3'; reverse 5'- GTTTTCCTTGTTTCCACCGT -3'. PCR products were loaded on a 2% agarose gel and visualized using SYBR Safe DNA gel staining (Invitrogen). Control reactions were performed using GAPDH control primers supplied in the kit.

CXCL4L1, CXCL4, mouse and human CXCR3, αSMA, MIB1, PECAM1, vimentin, FSP1, FAP, HPRT1, S16 mRNA expression levels were measured by real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) using gene expression assays (Applied Biosystems) on

StepOne (Applied Biosystems), according to the manufacturer's protocol. We have furthermore used specific primers recognizing either CXCR3A or CXCR3B, but not both.

The specific premier sequences were at follows:

Forward (CXCR3-A) : 5' CCATGGTCCTTGAGGTGAGTG 3'

Reverse (CXCR3-A) : 5' AGCTGAAGTTCTCCAGGAGGG 3'

Forward (CXCR3-B) : 5' TGCCAGGCCTTTACACAGC 3'

Reverse (CXCR3-B): 5' TCGGCGTCATTTAGCACTTG 3'

Probe (CXCR3-B) :5' CCCGTTCCCGCCCTCACAGG 3'

The expression levels of interest transcripts were normalized to S16, HPRT1 or GAPDH housekeeping gene transcripts. RNAs from normal human tissues were obtained from Strategene.

Histology, immunohistochemistry and tissue microarray

Primary antibodies used were rabbit anti-human cytokeratin 19 (ab8591; Abcam, Cambridge), rabbit anti-mouse NG2 Chondroitin Sulfate Proteoglycan (AB5320, Millipore, Temecula), rat anti-mouse CD31 (557355, BD Biosciences, San Jose, California),mouse anti-human Ki-67 (M7240, DakoCytomaton, Glostrup, Denmark), mouse anti-human CXCR3 (ab64714, ab154845Abcam), MMP9 (ab38898), hypoxia probe (and hypoxyprobe (HP3-200 antibody) chicken anti-human VAMP-2 (AB5625, Millipore), and mouse monoclonal antibody for CXCL4 (MabL4, clone 2G2-3E3-3C11) and for CXCL4L1 (MabL1, clone 9E11-2D5-2G1).As a negative control, the primary antibody was substituted with a IgG control antibody (Jackson ImmunoResearch laboratory, West Grove, Pennsylvania). Corresponding secondary antibodies were Alexa Fluor 488– or 546– coupled antibodies (Invitrogen) or HRP-coupled antibodies (Dakocytomation). Cell nuclei were stained with dapi dye. Imaging was carried out using a Nikon DXM Eclipse E600 microscope.

Frozen tissues were cut into 8-10 μm-thick sections and stained with hematoxylin-eosin for histological analyses, localization of metastasis and selection of most representative tumor areas. Antibodies (VAMP2, CXCL4L1) were also used in immunolabelling of cocultured cells.

Tissue microarray was done as follows. Paraffin sections from tissue microarrays (TMA) built up using several human pancreatic tissue specimens originated from different types of pancreas cancers lesions including lymph node metastases and from pancreatitis specimens were obtained from BioCatGMbH (Heidelberg, Germany). The TMA contain each 96 spots with 1.5 mm diameter. The tissues were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (Cat.N°: PACA0909-2-OL). The TMA exact composition can be obtained at www.biocat.com/bc/pdf/Pancreas%20Carcinoma%20TMA. TMAs (4 µm thick) were de-paraffinized in xylene and hydrated serially in 100%, 95%, and 80% ethanol. Endogenous peroxidase was quenched in 3% H_2O_2 in PBS for 1 hour, then slides were incubated with MabL1 monoclonal antibody diluted at 1/1000 overnight at 4°C. Sections were washed three times in PBS, and antibody binding was revealed using the Ultra-Vision Detection System anti-Polyvalent HRP/DAB kit according to the manufacturer's instructions (Lab Vision). Finally, the slides were counterstained with Mayer's hematoxylin and washed in distilled water. After dehydration and mounting, expression of CXCL4L1 or CXCR3 was evaluated by two independent investigators.

The expression of CXCR3 was analyzed on 70 human pancreatic adenocarcinomas, included in 3 tissue microarray blocks obtained from 70 patients who underwent pancreatic surgical resection at Beaujon Hospital between 1997 and 2004. The cores were taken at random sites inside the tumors and each tumour specimen was represented by 4 x 1-mm cores on the tissue microarray. The following histopathological and clinical data were available:

tumor size (10-105 mm; median 30 mm), tumor differentiation (well-differentiated n=35, moderately differentiated n=27 or poorly differentiated n=8), lymph node metastasis (positive in 44/70), perineural (present in 47/59 available) and vascular invasion (present in 44/60 available), pT (T1 n=1, T2 n=10 or T3 n=59) classification according to TNM/UICC, disease-free and overall survival. Immunostaining of a 3μm slice was performed as indicated. The immunohistochemical staining was evaluated in a semi-quantitative fashion. A score was calculated, obtained by multiplying the intensity (negative scored as 0, weak scored as 1, moderate scored at 2 and strong scored as 3) by percentage of stained cells (0 to 100%). The mean score of the 4 cores which represented each tumour was taken into account.

In-Situ Hybridization

CXCL4 and CXCL4L1 human riboprobes were synthesized according to the manufacturer's instructions (Roche RNA Labeling Kit (SP6/T7). Briefly pCR2.1 TOPO CXCL4_UTRs and pCR2.1 TOPO CXCL4L1_UTRs vectors were linearized by XhoI (for sense probes) or BamHI (for anti-sense probes) enzyme digestion. After transcription, DNA templates were digested by DNaseI (Invitrogen) and riboprobes were recovered after lithium chloride precipitation.

CAMs with BxPC3 nodules were fixed overnight with PAF 4% at 4°C. After washing in PBS, tissues were dehydrated and embedded in paraffin. Before hydridization, tissues sections were rehydrated, permeabilized by proteinase K and fixed again with PAF 4%. Paraffin-embedded CAM sections were hybridizated overnight at 70°C with CXCL4 or CXCL4L1 probes. For negative control, hybridization with sense probes were performed. Tissues sections were incubated in sheep serum, washed and incubated with anti-DIG sheep antibody

Labeling of MabL1

Monoclonal antibody against CXCL4L1 (MabL1) was labeled with IRDye 800CW (Protein Labeling Kit–HighMW#928-38040, LI-COR®, Lincoln, NE, USA) or with biotin using the kit sulfo-NHS-LC-Biotin (PIERCE, Rockford, IL, USA) following the manufacturer's instructions. The conjugates were dialyzed extensively against phosphate buffered saline to remove excess of non-reacted dyes. MabL1 antibody was labeled without loss oftheir initial activities.

The IRdye-MabL1 and biotinylated-MabL1 were used in bio-distribution, pharmacokinetics and tolerance studies in mice and the IRdye-MabV1 in the study of targeting tumors expressing CXCL4L1.

In vivo mouse models

Clearance kinetic of MabL1 conjugated to IRDye or Biotin: To determine the clearance rate and possible non-specific binding of the antibody, RAG-γ/c mice (n=50) received an intravenous injection of 25μg of labeled antibodies into the tail vein. At different times post-injection, animals were imaged with the Odyssey Imaging System (LI-COR®) equipped with the MousePOD™ until there was no detectable signal above background. After imaging, blood was collected intracardially and the organs were removed, scanned on the Odyssey Imaging System and homogenized for determination of MabL1 concentration by a direct ELISA assay. Data were fitted to two-phase exponential decay by using Prism software (GraphPad, San Diego, CA, USA).

ELISA assays: To evaluate the half-life and clearance of MabL1 antibody in mice, we performed a direct ELISA assay: recombinant CXCL4L1 protein was diluted in a coating solution and immobilized on a microplate. After several steps of washing and blocking,

plasma samples and organs lysates are added to the plate. For samples containing MabL1 conjugated to biotin, the result is obtained directly after adding streptavidin-HRP and a substrate solution (TMB), on a microplate reader set to 450nm. For samples containing IRdye-MabL1, an additional step with a biotinylated anti-mouse antibody was required.

Xenograft models: Eight weeks old mice were anaesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (150mg/kg) and xylazine (15mg/kg) and xenografted with $3x10^6$, $1x10^6$ and $3.75x10^5$ BxPC3, MIA PaCa-2or PANC-1 cells stably transfected with a luciferase reporter gene in 100μl serum free medium by subcutaneous, intra-pancreatic and intra-spleenic injection respectively.

Treatment with MabL1 antibody: In order to evaluate the role of endogenous CXCL4L1 in tumor development, anti-CXCL4L1 neutralizing antibodies were injected into mice. RAG-γ/c mice were divided in two groups: one that received 50μg IgG control antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories; control group, n=16), the other 50μg of anti-CXCL4L1 neutralizing antibody (group MabL1, n=16). Treatment started at day 14 and antibodies were injected twice a week. Tumor dimensions were measured each week and tumor volumes were calculated using the formula: $4/3 \times \Pi \, a \times b^2$ (where a and b are the largest and the smallest radius respectively). Mice were sacrificed after 7 weeks of treatment; tumors were removed, measured and stored in liquid nitrogen before immunohistochemistry studies.

In-vivo tumor targeting: To evidence tumor targeting of MabL1, the antibody was labeled with IRdye and injected into the tail vein of mice with subcutaneous BxPC3 tumors and with metastasis after spreading of BxPC3 cells through portal vein following intra-splenic injection. 6 days after injection, animals were euthanized and the tissues were removed and imaged on the Odyssey Imaging System. Immediately after imaging, organs were frozen and

cut into 10 and 40μm sections for immunohistochemistry studies and Odyssey imaging respectively.

In-vivo tumor growth imaging: Mice bearing intra-pancreatic tumors were injected intraperitoneally with 200 µl of 25 mg/ml d-luciferin (Invitrogen) in PBS and were anesthetized during imaging using isoflurane through nose cone. Bioluminescence images were acquired using a Photon Imager (Biospace Lab, Paris, France).

Construction of luciferase reporter vectors containing different CXCL4L1 upstream and downstream promoters

MG63 genomic DNA was extracted using a genomic DNA extraction kit (Promega). The1-kb upstream promoter, exon 1 and intron 1 regions of human CXCL4L1were cloned from the MG63 genomic DNA. The amplicon of 1470bp was inserted into pGL3 Basic vector (Promega) between XhoI and NcoI restriction sites with the following primers: CXCL4L1 forward 5' – ATGAGCTCCGCAGCCAGGTC- 3', ; reverse 5' -CTAACTCTCCAAATGTTCCT- 3'.To inhibit the methylation of CpG 6 (+227) and CpG 7 (+250) we introduced two point mutations (C➔T) by PCR. The reconstructed plasmids were verified by DNA sequencing.

***In-vitro* methylation of plasmid DNA**

Plasmids were methylated using Sss I CpG methyltransferase (New England Biolabs) according to manufacturer's recommendation. In brief, 5μg plasmid DNA were incubated with Sss I (4u/μg DNA) in the presence of 160mM S-adenosylmethionine at 37°C for 4 hours of incubation. The unmethylated DNA is treated as above but without methylase and SAM. The completeness of the methylation was controlled by digesting both methylated and unmethylated DNA using methylation sensitive enzyme HpaII. Plasmid DNA is then purified with the Wizard SV gel and PCR Clean-up system (Promega).

Luciferase reporter assay

Quantification of Renilla and Firefly Luciferase activities was achieved with a luminometer (FLUOstar omega, BMG Labetch) using the Dual-Luciferase Reporter Assay (Promega), according to the manufacturer's instructions. The pRL-CMV vector (Promega) allowed to control and normalize the transfection. All transfections and measurements were performed in triplicate and repeated at least three times.

Bisulfite sequencing

The methylation status of the CXCL4L1intron 1 was analysed by bisulfite conversion, 2 μg of genomic DNA were converted according to the manufacturer's instructions (MethylDetector, Active Motif). Subsequently, amplification of the first intron (CXCL4L1: 177 bp) was performed using primers, specifically binding bisulfite converted DNA (CpGforward : 5' – GGGAGGAATTTTTTAGGATTATGAT - 3' and CpGreverse : 5' – AAAACCTTTTCCACTACCTTCAACT - 3'). Resulting PCR products were purified, cloned into the pCR®2.1-TOPO® vector (TOPO TA Cloning®, Invitrogen) and sequenced.

Statistical analysis

Results were presented as mean ± the standard error of the mean. Statistical significance was determined by a one-tailed, unpaired Student's *t* test using Prism 5.03 GraphPad Software. For the tissue microarrays, the statistical analysis was performed by using a Kruskal-Wallis test,followed by Dunns multiple comparison procedure. P-values <0.05 were considered significant (***, <0.001; **, <0.01; *, <0.05).

References

1. Gillibert-Duplantier J, Rullier A, Neaud V, Kisiel W, Rosenbaum J. Liver myofibroblasts activate protein C and respond to activated protein C. World journal of gastroenterology : WJG. 2010;16:210-6.
2. Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, Eichmann A, et al. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2005;102:1643-8.
3. Dumartin L, Quemener C, Laklai H, Herbert J, Bicknell R, Bousquet C, et al. Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. Gastroenterology. 2010;138:1595-606, 606 e1-8.
4. Liu ZQ, Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory and trouble shooting. North American journal of medical sciences. 2014;6:160.

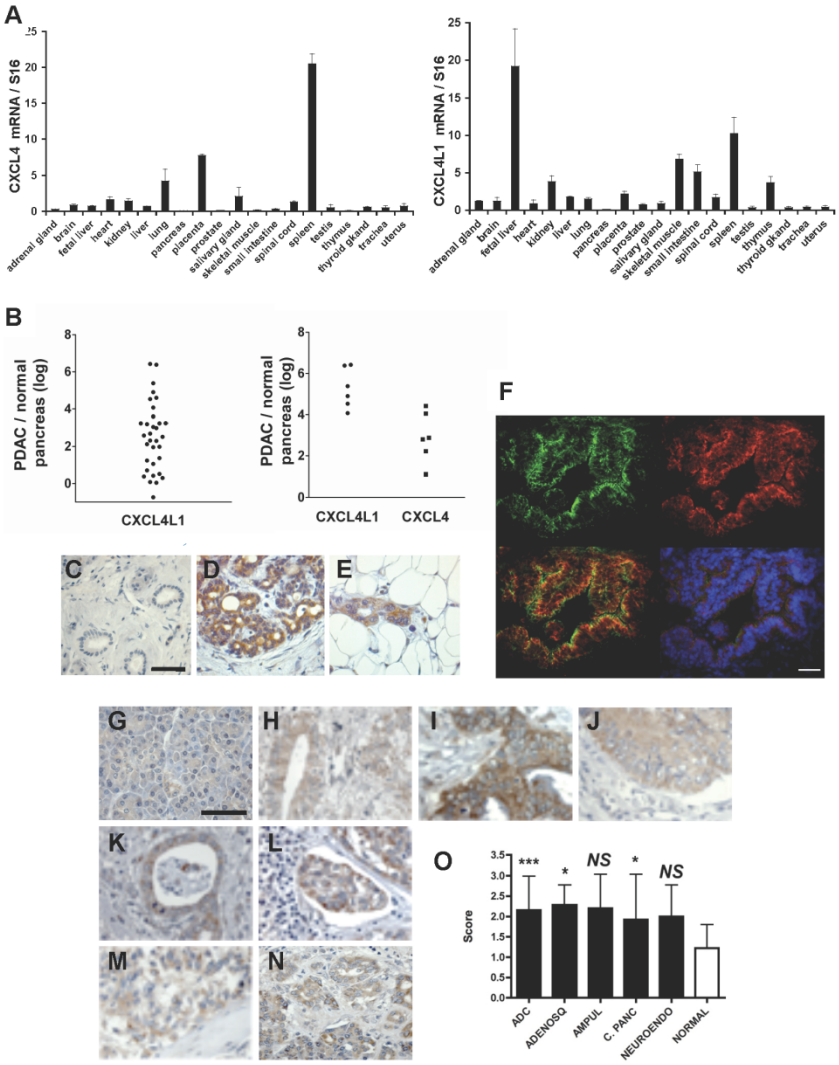


Figure S1: Expression analysis of CXCL4L1 in human pancreatic tissues

A, qRT-PCR for *CXCL4L1* and *CXCL4*expression in different human tissues and normalized to housekeeping gene *S16* expression. Relative mRNA levels are given usingHuman Normal Adult Tissue Total RNA expression as reference. B, qRT-PCR for *cxcl4l1* in pancreatic adenocarcinoma samples of 33 human patients (B, left). Comparison of *cxcl4l1* and *cxcl4* relative expressions in PDAC samples of 6 human patient samples with highest *cxcl4l1* expression (B, right). Expressions in human tumors are given in comparison to expression in normal pancreas and normalized to *S16* expression. C-E. Immunolabelling with MabL1 on individual patient samples. (C) Control ; (D) pancreatic adenocarcinoma; (E) metastasis in fat tissue. F, Double-immunolabelling with mouse monoclonal antibody for CXCL4 (MabL4) (green) and rabbit anti human cytokeratine 19 (red) and counterstained with DAPI (blue) on individual patient samples. Merged staining of CXCL4 and cytokeratine 19 (yellow) revealed areas of co-localization. G-O, Immunohistochemical detection of CXCL4L1 on tissue microarray (TMA). (G) normal human pancreas (expression 0-1+) and various human

pancreatic lesions including (H) invasive ductal pancreas adenocarcinoma grade 2 (expression 2+); (I) invasive ductal pancreas adenocarcinoma grade 3 (ADC,expression 3+); (J) adenosquamous pancreatic carcinoma grade 3 (ADENOSQ, expression 2 to 3+); (K) ampullary pancreas carcinoma grade 3 (AMPUL, expression 2+); (L) lymph node metastasis from a ductal pancreas carcinoma (expression 2 to 3+); (M) neuroendocrine cancer of the pancreas (NEUROENDO, expression 2 to 3+); (N) human chronic pancreatitis (C.PANC, expression 0 to 1+).O, for statistical analysis, expression of CXCL4L1 was evaluated by two independent investigators and quantified as described previously. Statistical analysis was performed by using Kruskal-Wallis test following Dunns multiple comparison. *** <0.001, **<0.01, *<0.05. Error bars indicate SEM.Scale bar :50 μm.

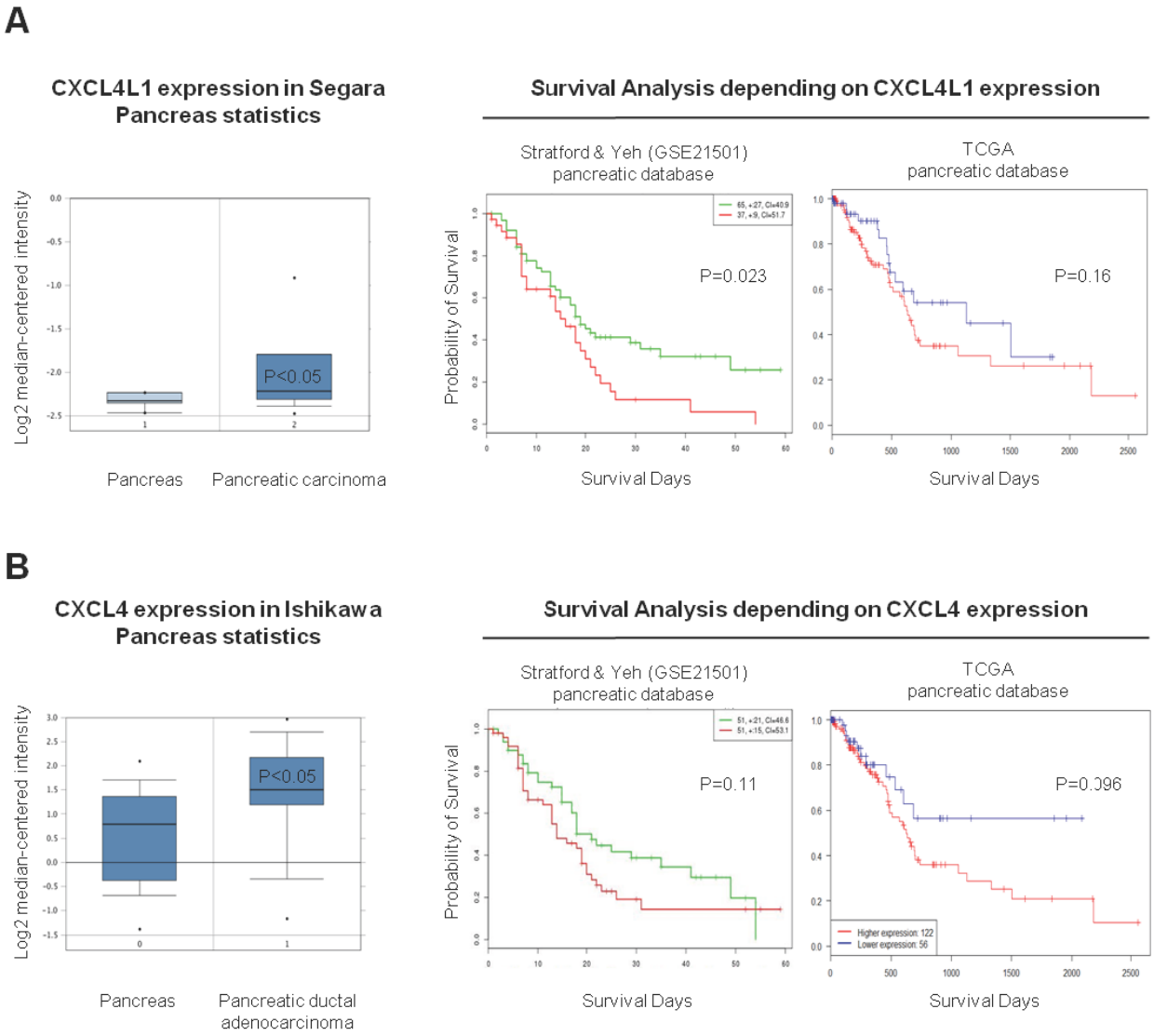
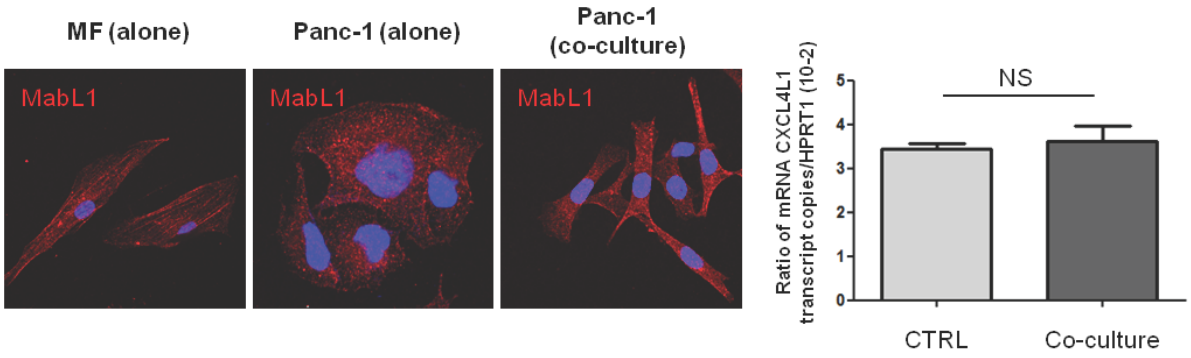


Figure S2: CXCL4L1 and CXCL4 gene expression analysis

Bioinformatics analysis was performed on Oncomine (left panel), on the Stratford & Yeh (GSE21501) pancreatic database (middle panel) or on the TCGA pancreatic database (right panel). (A) The Segara Pancreas statistics (Clinical Can Res,2005;11:3587-96) (mRNA Human Genome U133A Array, left panel) was used to compared CXCL4L1 gene expression in the pancreas (6) or in pancreatic carcinoma (11). Survival analysis (middle panel) did show a significant link to survival in the Stratford & Yeh (GSE21501) pancreatic cohort ($p = 0.023$) but did not show a significant link to survival in the TCGA pancreatic cancer cohort ($p = 0.16$, right panel). However, the TCGA cohort is incomplete because only 185 patients out of 500 are profiled to date (B) The Ishikawa Pancreas statistics (Cancer Science, 2005;96:387-93) (mRNA Human Genome U133A Array, left panel) was used to compared CXCL4 gene expression in the pancreas (25) or in pancreatic ductal adenocarcinoma. Survival analysis (middle panel) did not show a significant link to survival in the Stratford & Yeh (GSE21501) Pancreatic cohort ($p = 0.11$) or in the TCGA pancreatic cancer cohort ($p = 0.096$).

A



B

Myofibroblast					
HPRT1	CXCL4	CXCL4L1	FSP1	FAP	VIM
23.24	28.54	28.52	33.47	23.68	16.48
22.87	28.31	28.61	33.34	23.52	16.30
22.29	28.35	28.42	33.27	23.69	16.14
22.86	27.74	28.59	32.55	22.97	16.46

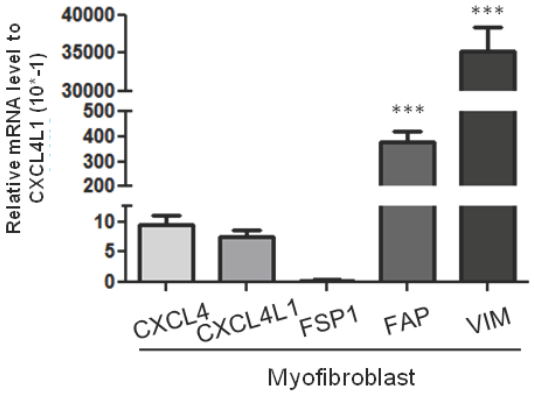


Figure S3: Coculture of Panc-1 tumor cells with myofibroblasts

(A) Immunofluorescence (IF) staining for CXCL4L1 on Myofibroblasts (MF, left), Panc-1 cells alone (middle) or co-cultured for 4 days with myofibroblasts (right). DAPI-labeled nuclei are in blue Scale: 5μm. Panc-1 cells (2 x 10^5) were also co-cultured using transwell system with myofibroblasts (2x10^5) for 24 h (right panel). mRNA was extracted and analysed by qPCR for CXCL4L1 expression. *HPRT1* was used as a housekeeping gene and data are indicated as copy number / HPRT. (B)Myofibroblasts mRNA was extracted and analysed by qPCR for different markers expression. *HPRT1* was used as a housekeeping gene.

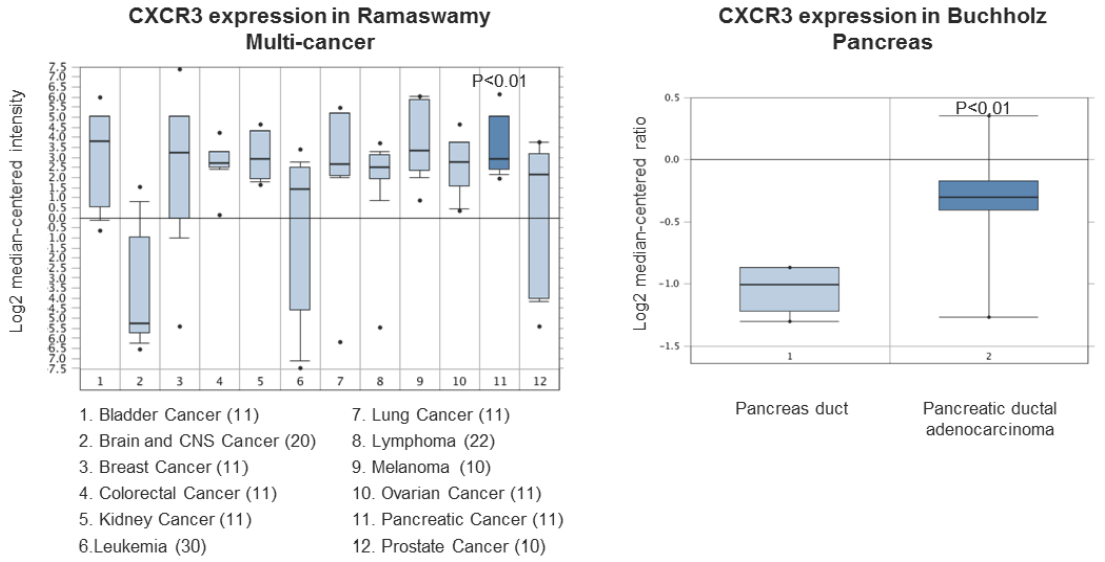


Figure S4: CXCR3 gene expression analysis

Bioinformatics analysis was performed on Oncomine. The Ramaswamy Multi-cancer Statistics (left panel) was used to compared CXCR3 gene expression in several cancers including pancreatic cancer (the National Academy of Sciences of the United States of America2001;98: 15149-54). The Buchholz Pancreas Statistics was used to compared CXCR3 gene expression in pancreatic ducts or in pancreatic ductal adenocarcinoma (Oncogene, 2005;24:6626-36).

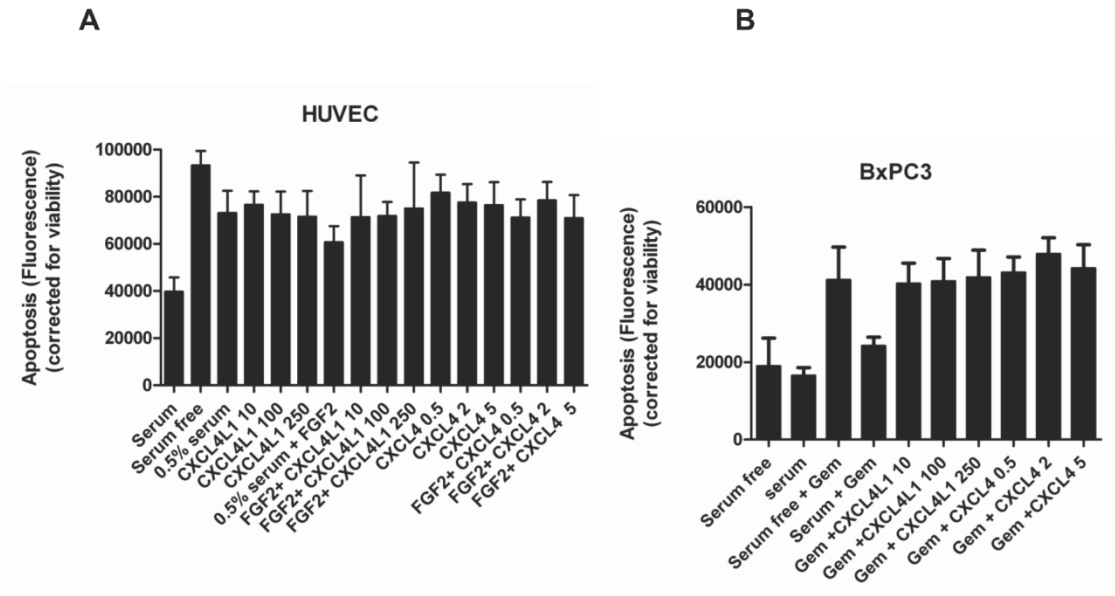


Figure S5: Effect of CXCL4L1 and CXCL4 on apoptosis in pancreatic adenocarcinoma cells and endothelial cells.

Apoptosis was induced by gemcitabine treatment (BxPC3 cells, A) or serum starvation (HUVECs, B) and the effect of increasing concentrations of chemokines on apoptosis was determined. Experiments were done in sexplicates and repeated 2 times. No significant differences in CXCL4L1 treated or untreated samples were seen.

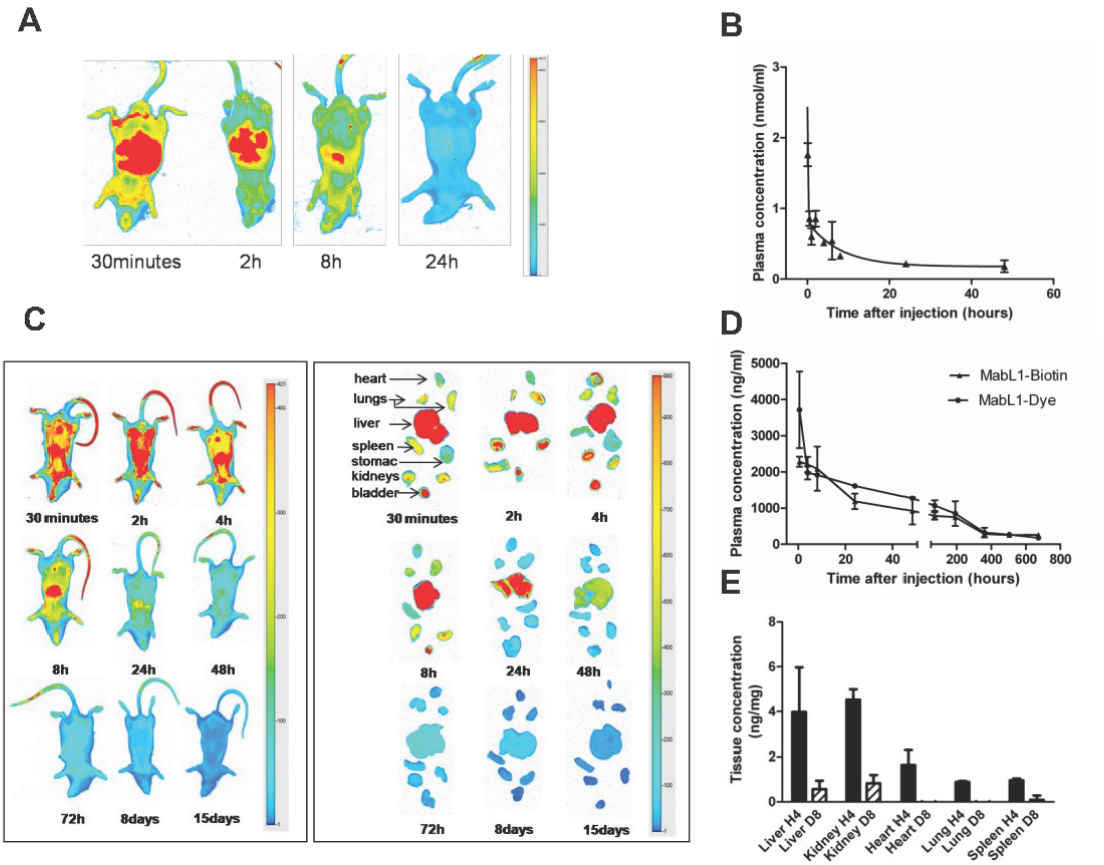


Figure S6: In vivo characterization of the MabL1 antibody

(A) *Elimination of unconjugated IRDye in vivo.* Rag2γc mice were injected with 2 nmol of IRDye intravenously and monitored over time for complete clearance of the dye on the Odyssey Imaging System. (B) Plasma concentration of unconjugated IRDye was determined in comparison with standard concentrations directly on the Imaging System. The results are expressed as mean ± SEM from 2 independent experiments. (C) *In vivo characterization of the anti-CXCL4L1 antibody.* Whole animal and organ clearance profiles of CXCL4L1-IRDye™ 800CW from a control non-tumor bearing mouse over a 15-days period. Images depicting infrared signals captured from the Odyssey Imaging System (Licor). (D) Plasma and (E) organ concentration of MabL1 linked to IRDye or Biotin were measured by a direct ELISA assay as indicated in supplemental Materials and Methods. The results are expressed as mean±SE from 3 independent experiments.

Detailed description of CXCL4L1 antibody characterization in vivo: Infrared imaging of whole animals and organs illustrate a rapid dispersion of unconjugated IRDye (the half life in the blood of the IRDye is 5.553 h; Fig.S6A, B). Injection of MabL1 labeled with IRDye is followed by a complete clearance from mice 72 h after injection. For labeled MabL1, a strong fluorescent signal was observed at the site of injection, in the liver and in the bladder 30 min post injection followed at 2 h by kidneys and lungs (Fig.S6C). Fluorescent intensities in these organs then decreased until 8 h whereas the signal in the liver was still detected at 48 h. The presence of the labeled antibody within the blood stream was evidenced by a blue fluorescent signal (Fig.S6C).

Figure S6 also shows quantification of MabL1 concentration in plasma (D) and in organs (E). The half-life in the blood of the anti-CXCL4L1 antibody was 7.5 and 6.8 days when labeled with IRDye and biotin respectively. On day 8 post-injection, no detectable amounts of antibody in heart and lungs were measured. In liver, kidneys and spleen these reached respectively 15, 18 and 8% of the initial concentration determined at 4 h.

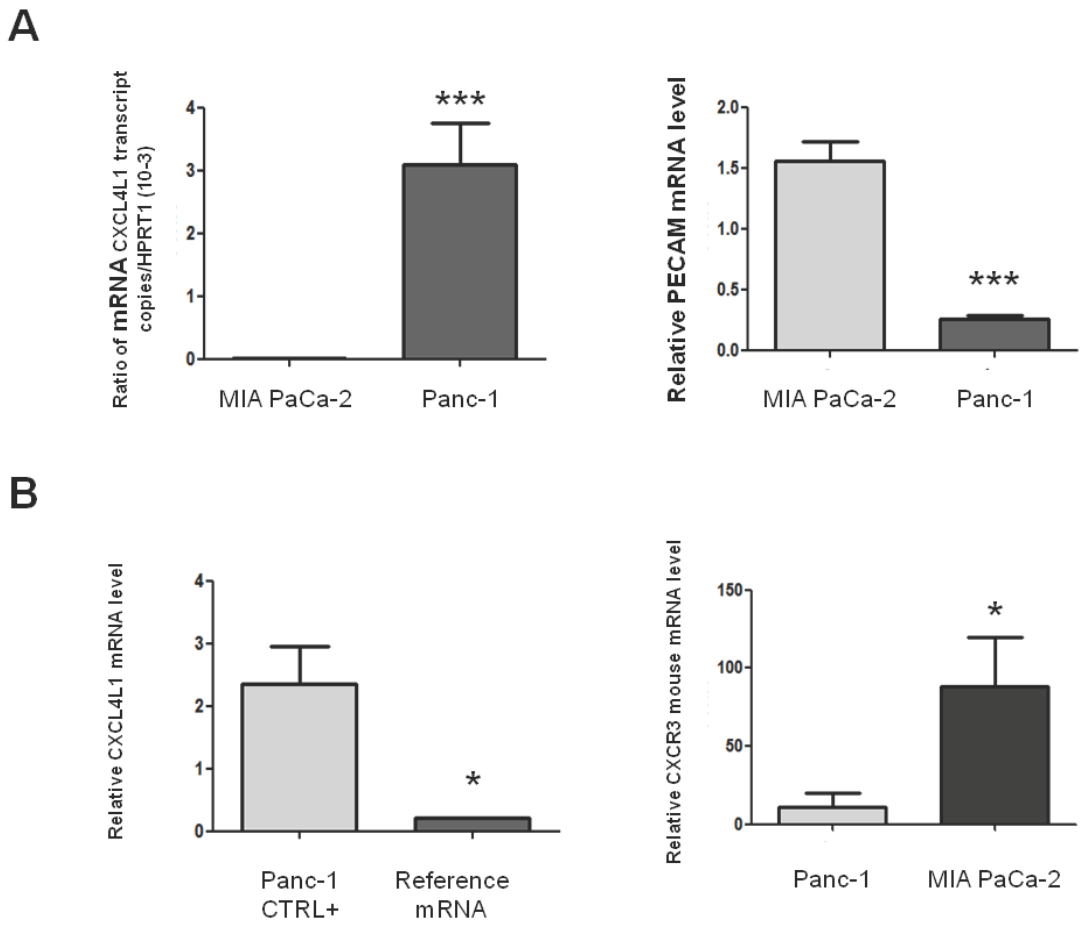


Figure S7: Characterization of PECAM-1 expression in pancreatic tumour

(A) Tumor mRNA was extracted and analysed by qPCR for CXCL4L1 and PECAM expression. *HPRT1* was used as a housekeeping gene for the estimation of CXCL4L1 copy number (left panel). Relative mRNA expression was used to compare PECAM mRNA levels. (B) Relative mRNA levels for CXCL4L1 are shown for Panc-1 tumors in comparison to a reference sample (reference mRNA of healthy pancreas). Relative mRNA levels for mouse CXCR3 are shown for Panc-1 and MIA PaCa-2 tumors. Mouse HPRT1 was used as a housekeeping gene.

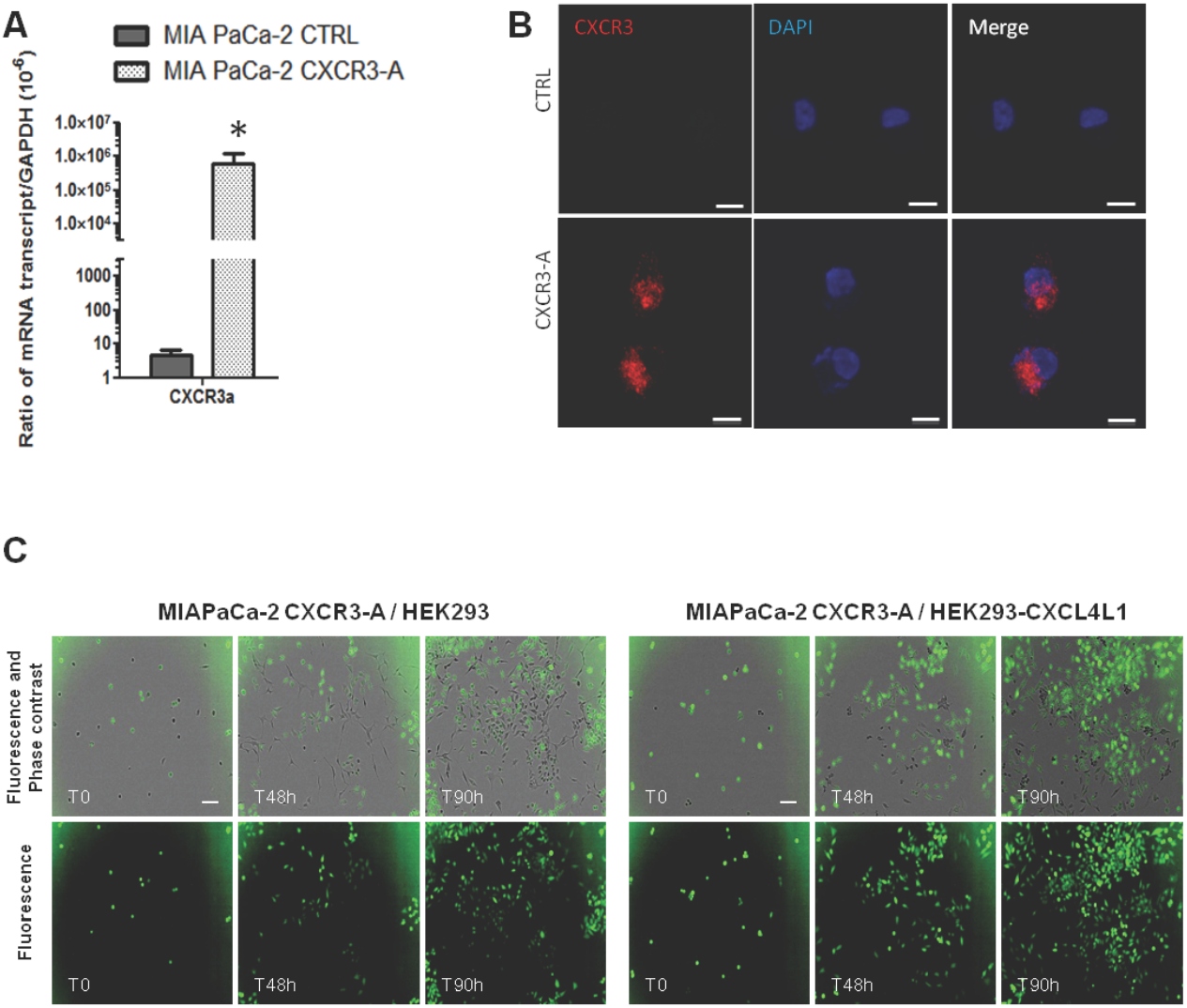
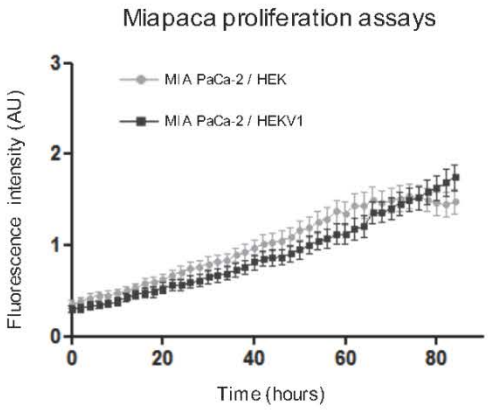


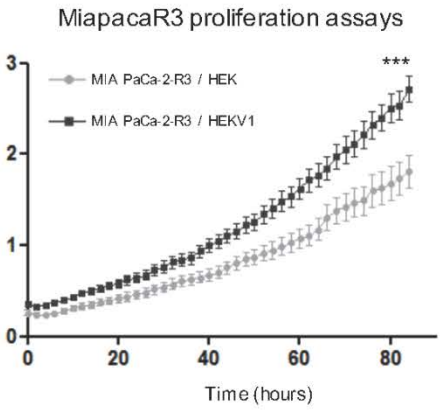
Figure S8: Characterization of CXCR3 overexpression in MIA PaCa-2, in vitro

(A) Copy number of CXCR3-A in MIA PaCa-2 cells transfected either with pGFP2N2-CTRL (MIA PaCa-2 CTRL) or pGFP2N2-CXCR3-A (MIA PaCa-2 CXCR3-A) was determined by RT-qPCR. After overexpression of CXCR3-A, a significantly higher level of CXCR3-A mRNA is seen when compared to MIA PaCa-2 CTRL (*, $p<0.05$). (B).Immunostaining (red) for CXCR3 in CXCR3-A expressing cells in comparison to control using AB64714 (scale bar : 10µm). (C) MIA PaCa-2-CTRL and MIA PaCa-2-R3 were co-cultured with HEK-CTRL or HEK-CXCL4L1 cells for 4 days and cell proliferation of MIA PaCa-2-CTRL and MIA PaCa-2-R3 was assessed by GFP staining. Scale:50µm

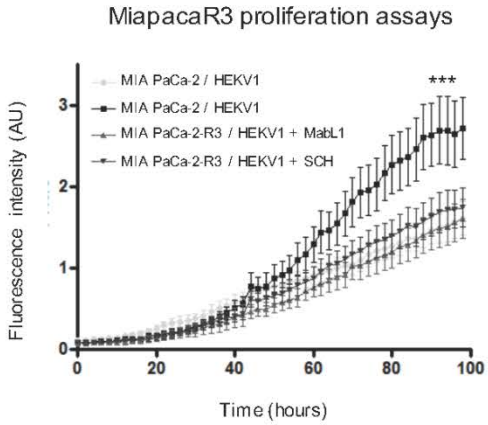
MIA PaCa-2 *in vitro*

A

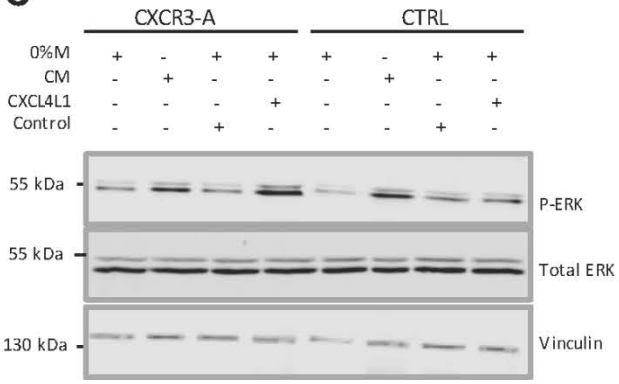




B

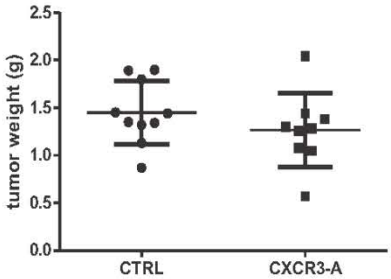


C

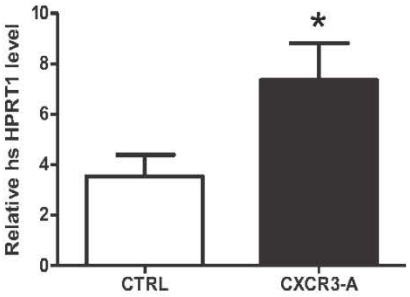


MIA PaCa-2 *in vivo*

D



E



F

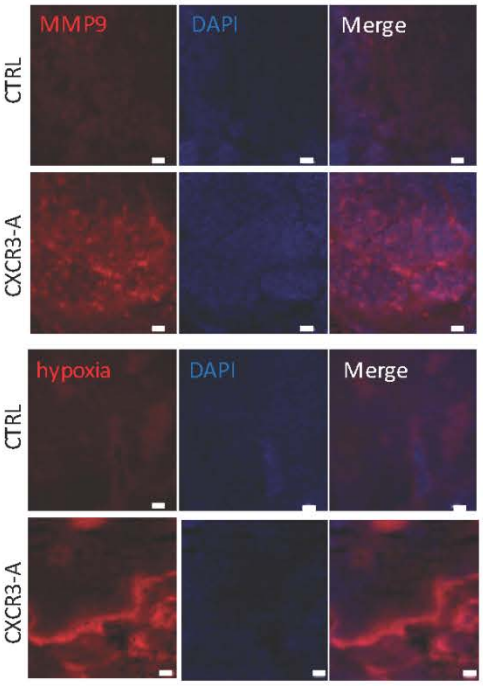


Figure S9: Impact of CXCR3 overexpression in MIA PaCa-2, *in vitro* and *in vivo*

(A) Hek cells transfected with CXCL4L1 (Hek-CXCL4L1) or control Hek cells were cocultured with control MIA PaCa-2 cells (left panel) or MIA PaCa-2-CXCR3-GFP (right panel). Kinetics of in vitro proliferation of control MIA PaCa-2 or MIA PaCa-2-CXCR3-GFP cells was then assessed. (B) Kinetics of in vitro proliferation of control MIA PaCa-2 or MIA PaCa-2-CXCR3-GFP cells using MabL1 or SCH546738 is shown. (C) Stimulation of MIA PaCa-2 CXCR3-A cells by CXCL4L1 (conditioned medium from adenoviral-transduced cells) in comparison to control (control vector) or complete medium. Detection of MIA PaCa-2 phosphorylated p42/p44 (ERK1/2), in a CXCR3-A-dependent manner. 0%M : Serum-free medium. CM : complete medium. (D) Orthotopic xenograft of MIA PaCa-2 CTRL or MIA PaCa-2-CXCR3-A cells in mice. Animals were sacrificed at day 34 post-implantation. Measurements of tumor weight did not reveal a significant difference between the two cell types. (E) Quantification of lung metastasis by qPCR of MIA PaCa-2 CTRL or MIA PaCa-2-CXCR3-A (*, $p<0.05$ between the two groups). (F) Immunostaining of MIA PaCa-2 CXCR3-A or control cells for MMP9 (red, AB38898) or Hypoxia (hypoxyprobe HP3-200 antibody) (scale bar : 100µm). Error bars are indicated as SEM.

Merci.