



**HAL**  
open science

# Etude et inhibition de l'activation endothéliale au cours de l'angiogenèse

Mélessande Cossutta

► **To cite this version:**

Mélessande Cossutta. Etude et inhibition de l'activation endothéliale au cours de l'angiogenèse. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2017. Français. NNT : 2017PESC0011 . tel-01737760

**HAL Id: tel-01737760**

**<https://theses.hal.science/tel-01737760>**

Submitted on 19 Mar 2018

**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.

UNIVERSITE PARIS-EST CRETEIL

# THESE

Présentée pour obtenir le grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS-EST

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Mention : Biologie Cellulaire et Moléculaire

Par Mélissande COSSUTTA

**Etude et inhibition de l'activation endothéliale  
au cours de l'angiogenèse**

Soutenue publiquement le **16 Octobre 2017** devant le jury composé de

Dr. Ilaria CASCONE, directeur de thèse

Dr. José COURTY, directeur de thèse

Dr. Catherine BOISSON-VIDAL, rapporteur

Dr. Julie GAVARD, rapporteur

Dr. Gilles PAGES, examinateur

Dr. Cécile DENIS, examinateur

Dr. Pascale FANEN, examinateur et président du jury

Laboratoire de recherche sur la Croissance Cellulaire, la Réparation  
et la Régénération Tissulaires (CRRET) – ERL CNRS 9215

Thèse financée par un contrat doctoral de l'Université Paris-Est



# TABLE DES MATIERES

<b>Remerciements</b> .....	<b>V</b>
<b>Avant-propos</b> .....	<b>VIII</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>XI</b>
<b>Liste des illustrations</b> .....	<b>XIV</b>
<b>I. Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>II. Synthèse bibliographique</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Le réseau vasculaire</b> .....	<b>5</b>
1.1. L'organisation du réseau vasculaire sanguin .....	5
1.1.1. Les différents types de vaisseaux sanguins .....	5
1.1.1.1. La paroi des artères et des veines .....	6
1.1.1.2. Les différences entre les artères et les veines .....	6
1.1.2. L'endothélium .....	7
1.1.2.1. L'endothélium continu .....	7
1.1.2.2. L'endothélium fenestré.....	7
1.1.2.3. L'endothélium discontinu .....	8
1.1.3. Les composants cellulaires des vaisseaux sanguins.....	8
1.1.3.1. Les cellules endothéliales .....	8
1.1.3.2. Les cellules périvasculaires.....	9
1.1.4. La matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins .....	12
1.2. Les fonctions du réseau vasculaire sanguin .....	12
1.2.1. Le rôle trophique et l'élimination des déchets du métabolisme .....	12
1.2.2. La fonction endocrine de l'endothélium.....	13
1.2.3. Le sang comme véhicule de médiateurs moléculaires et cellulaires .....	13
1.2.4. L'endothélium et l'hémostase.....	15
1.2.5. L'endothélium et la perméabilité vasculaire .....	16
1.2.5.1. La voie transcellulaire .....	16
1.2.5.2. La voie paracellulaire.....	17
1.3. La formation du réseau vasculaire sanguin .....	17
1.3.1. La vasculogénèse.....	18
1.3.2. L'angiogénèse .....	19
<b>2. L'angiogénèse</b> .....	<b>20</b>
2.1. Les facteurs pro-angiogéniques .....	21
2.1.1. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) .....	21
2.1.2. Le système Angiopoïétines/Tie .....	24
2.1.3. Les autres facteurs pro-angiogéniques.....	27

2.1.3.1. Le facteur de croissance des fibroblastes (FGF) .....	27
2.1.3.2. Le facteur de croissance transformant $\beta$ (TGF- $\beta$ ) .....	28
2.1.3.3. Le facteur de nécrose tumorale $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) .....	28
2.2. Les étapes de l'angiogenèse .....	28
2.2.1. L'activation endothéliale.....	29
2.2.2. La sélection des « tip cells » et des « stalk cells ».....	31
2.2.3. L'allongement, le branchement et la formation d'une lumière.....	32
2.2.4. La maturation et la stabilisation des nouveaux vaisseaux.....	33
2.3. La dérégulation de l'angiogenèse.....	36
2.3.1. Des exemples de pathologies liées à un dysfonctionnement de l'angiogenèse.....	36
2.3.2. L'angiogenèse tumorale .....	37
2.3.3. Les thérapies anti-angiogéniques dans le traitement des cancers et le concept de normalisation vasculaire .....	39
2.3.3.1. Les principales thérapies anti-angiogéniques .....	39
2.3.3.2. Les limites des thérapies anti-angiogéniques.....	40
2.3.3.3. La normalisation vasculaire.....	41
2.4. Les modèles d'étude de l'angiogenèse .....	43
2.4.1. Le modèle murin de la vascularisation de la rétine .....	44
2.4.2. Les autres modèles d'étude de l'angiogenèse .....	45
2.4.2.1. Les modèles <i>in vitro</i> .....	45
2.4.2.2. Les modèles <i>ex vitro</i> ou les cultures d'organes .....	46
2.4.2.3. Les modèles <i>in vivo</i> .....	46
<b>3. Les Corps de Weibel et Palade (WPBs).....</b>	<b>47</b>
3.1. La structure et la biogenèse des WPBs.....	47
3.1.1. L'étude de la structure des WPBs par ME et par tomographie.....	47
3.1.2. Le contenu protéique des WPBs.....	50
3.1.3. La biogenèse des WPBs .....	52
3.2. L'exocytose des WPBs .....	53
3.2.1. Les sécrétagogues et les voies de signalisation intracellulaire.....	54
3.2.2. Les différents modes d'exocytose .....	54
3.3. Les principales fonctions des WPBs .....	56
3.3.1. Les WPBs et l'hémostase primaire .....	56
3.3.2. Les WPBs et l'inflammation.....	57
3.3.3. Les WPBs et l'angiogenèse.....	57
<b>4. La nucléoline.....</b>	<b>58</b>
4.1. La structure de la nucléoline .....	58
4.2. Les localisations cellulaires et les fonctions de la nucléoline .....	60

4.2.1. La nucléoline nucléaire et la biogenèse des ribosomes .....	61
4.2.2. La nucléoline cytoplasmique et la survie cellulaire.....	62
4.2.3. La nucléoline membranaire et la fixation de ligands extracellulaires .....	64
4.3. Le ciblage de la nucléoline .....	65
4.3.1. Les molécules de ciblage de la nucléoline.....	65
4.3.2. L'historique et la structure du N6L .....	66
4.3.3. Les effets biologiques du N6L.....	67
<b>5. L'adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC) .....</b>	<b>68</b>
5.1. Les différents types de cancer du pancréas .....	69
5.1.1. Structure et fonctions du pancréas .....	69
5.1.2. Les cancers du pancréas endocrine.....	70
5.1.3. Les cancers du pancréas exocrine.....	71
5.2. Les tumeurs PDAC : tumorigenèse et microenvironnement tumoral .....	72
5.2.1. La tumorigenèse .....	72
5.2.2. Le microenvironnement tumoral.....	74
5.2.2.1. Quelques données générales sur le microenvironnement tumoral .....	75
5.2.2.2. Les particularités du microenvironnement des tumeurs PDAC .....	76
5.3. Les tumeurs PDAC : modèles d'étude et stratégies thérapeutiques.....	77
5.3.1. Les modèles murins .....	77
5.3.2. Les traitements actuels et les stratégies en cours de développement.....	79
5.3.2.1. Les thérapies classiques .....	79
5.3.2.2. Les thérapies ciblées .....	79
<b>III. Projet de thèse .....</b>	<b>82</b>
<b>IV. Matériels et méthodes .....</b>	<b>85</b>
<b>V. Résultats.....</b>	<b>97</b>
<b>A. Première partie : Effets de l'inhibition de la nucléoline sur la croissance et l'angiogenèse tumorales .....</b>	<b>98</b>
1. Introduction .....	98
2. Contexte et objectif de l'étude.....	99
3. Résumé des résultats.....	101
4. Article 1 : <u>Le ciblage de la nucléoline diminue la progression du cancer du pancréas et favorise la normalisation des vaisseaux tumoraux</u> .....	102
5. Figures supplémentaires de l'Article 1 .....	117
<b>B. Seconde partie : Rôle de l'exocytose des Corps de Weibel et Palade au cours de l'angiogenèse physiologique .....</b>	<b>128</b>
1. Introduction .....	128

2. Contexte et objectif de l'étude.....	128
3. Résumé des résultats.....	129
4. Article 2 : <u>Les Corps de Weibel et Palade sont régulés par le VEGF et organisent le recrutement des péricytes pendant l'angiogenèse</u> .....	130
5. Figures supplémentaires de l'Article 2.....	158
6. Résultats complémentaires .....	164
6.1. Effet de l'Ang-2 sur l'adhérence des péricytes .....	164
6.2. Effet de l'absence des WPBs sur l'angiogenèse.....	165
<b>VI. Discussion .....</b>	<b>170</b>
1. Les mécanismes de l'activation endothéliale au cours de l'angiogenèse physiologique .....	171
1.1. Le VEGF régule l'exocytose des WPBs et la sécrétion de l'Ang-2 .....	171
1.2. Quelles voies de signalisation du VEGFR-2 pourraient réguler l'exocytose des WPBs contenant de l'Ang-2 ?.....	173
1.3. L'Ang-2 pourrait-elle sécrétée par d'autres voies que par l'exocytose des WPBs ? .....	174
1.4. L'exocytose des WPBs inhibe le recrutement des péricytes sur les vaisseaux activés .....	175
1.5. Par quels mécanismes l'Ang-2 pourrait-elle réguler le recrutement des péricytes sur les vaisseaux ? .....	176
1.6. D'autres facteurs pourraient-ils réguler l'angiogenèse et le recrutement des péricytes sur les vaisseaux ? .....	177
1.7. Conclusion .....	178
2. L'inhibition de l'activation endothéliale au cours de l'angiogenèse tumorale.....	180
2.1. Le ciblage de la nucléoline inhibe l'activation endothéliale .....	180
2.2. Par quels mécanismes le ciblage de la nucléoline sur les cellules endothéliales pourrait-il inhiber la sécrétion de l'Ang-2 ? .....	181
2.3. Les effets du ciblage de la nucléoline pourraient-ils être liés au VEGF ?.....	183
2.4. L'inhibition de l'activation endothéliale favorise la normalisation des vaisseaux tumoraux .....	184
<b>VII. Conclusions et perspectives .....</b>	<b>187</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>190</b>
<b>Annexes .....</b>	<b>216</b>
Annexe 1 : Matériels et méthodes supplémentaires de l'Article 1 .....	216
Annexe 2 : <u>Des polyplexes pseudopeptidiques cationiques multivalents pour le traitement du cancer</u> (Article 3).....	223
Annexe 3 : Effet du N6L sur les cellules immunitaires dans les tumeurs PDAC .....	242
<b>Résumé / Abstract.....</b>	<b>.....</b>

## REMERCIEMENTS

*Arrivée au terme de cette longue aventure, je souhaiterais adresser mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes ayant contribué de près ou de loin à l'aboutissement de ce travail. Un grand merci...*

*A mes directeurs de thèse, Ilaria CASCONI et José COURTY. Pour leur patience, pour avoir su guider ce travail et pour m'avoir transmis leur passion pour leur métier. Je pense en particulier à mes premiers pas en laboratoire de recherche, ici-même au laboratoire CRRET, en stage de 3<sup>e</sup> année de licence. Ce fut ma première expérience et il semble qu'elle ait été bonne puisque je suis encore là, cinq ans plus tard ! Vous m'avez appris de nombreuses techniques et m'avez initiée au raisonnement scientifique ; je n'oublierai jamais, merci beaucoup.*

*A Dulce PAPY-GARCIA, directrice du laboratoire CRRET, pour m'avoir permis d'y réaliser cette thèse dans de bonnes conditions.*

*Aux membres du jury, Catherine BOISSON-VIDAL et Julie GAVARD pour avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, Gilles PAGES, Cécile DENIS et Pascale FANEN pour leur investissement comme examinateurs. Je vous remercie pour votre disponibilité.*

*A l'ensemble des co-auteurs sans lesquels les articles présentés dans ce travail n'auraient jamais pu voir le jour ; merci beaucoup pour tous ces efforts. A tous les collaborateurs sur les différents projets également. Cécile DENIS et Olivier CHRISTOPHE pour leur disponibilité pendant cette thèse et leur grande connaissance du facteur von Willebrand. Philippe BOUVET pour son expertise de la nucléoline. Caroline PILON, José COHEN et Sina NASSERIAN pour leur patience, leur gentillesse et leur aide précieuse en immunologie. Corinne BOUSQUET pour sa connaissance du microenvironnement tumoral. Michel PAQUES pour son soutien, son expertise en ophtalmologie et sa gentillesse. Je vous remercie également, Caroline, Corinne et Philippe, pour avoir accepté de participer au Comité de mi-thèse l'an passé.*

*A tous les membres de l'équipe COURTY, pour avoir fait de chaque jour passé au laboratoire un moment convivial et agréable ! A Marie DARCHE pour sa curiosité scientifique et son aide précieuse avec les rétines, pour sa bonne humeur et son esprit fédérateur, pour le temps passé dans l'organisation de toutes les activités et... pour m'avoir fait découvrir l'escape-game ! A*

*Fabio RAINERI pour les expériences (fumeuses) avec la carboglace, les concours de pâtes à la carbonara et pour avoir essayé de m'apprendre à manger la pizza « à l'italienne », avec les mains évidemment... A Claire JUSTINE-HOUPPE pour sa maîtrise technique des modèles tumoraux, pour son efficacité avec les commandes et la gestion des stocks et pour ses paroles réconfortantes lors de mes déboires informatiques ! A Matteo PONZO pour son aide et pour son enthousiasme communicatif pour tout ce qui concerne l'Italie et surtout Turin ! A Benoit VALLEE - qui a dû me supporter tous les jours dans son bureau - pour sa bonne humeur, son humour et... son sens du rangement qui lui permet de toujours tout retrouver comme par magie ! A Damien DESTOUCHES pour m'avoir transmis le sens de la rigueur scientifique, pour m'avoir appris à tenir un cahier de labo et pour les nombreux protocoles très utiles rédigés pour l'équipe. A Damien HABERT pour son soutien, sa gentillesse et son calme olympien. A Gilles CARPENTIER pour avoir su éveiller mon intérêt pour la microscopie confocale. A Anne-Chloé DHEZ pour sa bonne humeur et sa gentillesse. Et enfin à Benedetta FERRARA (Bene), pour notre complicité et pour nos longues discussions qui je l'espère seront toujours aussi constructives et réconfortantes !*

*A l'ensemble de l'équipe PAPY, pour la gentillesse et la disponibilité de chacun. Sandrine CHANTEPIE-LABORDE, Auriane MAIZA, Patricia ALBANESE, Gaël LE DOUARON, Nadia HENNI CHEBRA, Olivier STETTLER, Oulfa BEN ABDELOUHAB, Christophe MORIN, Estelle JOSPIN, Fernando SINERIZ, Sarah LAROUCI, Bertille NGUYEN, Minh Bao HUYNH. Merci à Alexandre FIFRE pour son aide dans la mise au point de protocoles et pour ses conseils avec le Ficoll ! A Mohand Ouidir OUIDJA pour son aide en biologie moléculaire. A Sara SHAMDANI pour sa gentillesse et nos conversations. A Laure GARRIGUE-ANTAR pour ses conseils dans la recherche d'un Post-doc. A Xavier LAFFRAY pour son aide en histologie et pour avoir fait tout son possible pour que nos échanges se terminent systématiquement en joutes verbales ! Et enfin à Valérie ITIER-GRANGER pour sa gentillesse, son sens inné de la pédagogie et son écoute toujours bienveillante et attentionnée.*

*Aux anciens membres du laboratoire pour les moments de complicité et leurs conseils. Maha SADER, Charlie BLANC, Laure CARUANA, Silvia DI MARIA, Natalia CORBALIAN, Pierre-Marie RAILLARD, Catia FONSECA-BERNARDO, Marianna MARTINELLI, Camille FLAGEOLLET, Kim RICE, Cecilia VERA.*

*A mes anciens collègues de l'Institut Curie. Jacques CAMONIS (Pelléas) et sa gentillesse, Maria-Carla PARRINI pour m'avoir initiée à la microscopie time-lapse, Marco BIONDINI et ses nombreux conseils, Brigitte MEUNIER (Bibi) et sa bienveillance. Giulia ZAGO, Audrey BETTOUN, Nathalie BRANDON.*

*A mes anciens professeurs qui ont marqué ma scolarité et m'ont donné le goût des études. Isabelle SAVY, Noël ROBY, monsieur HEURTEL, madame CHOUARD, Pascale FANEN.*

*A mes amis pour leur soutien et les moments de complicité. A Benoit FRISQUET pour avoir su rester présent pendant toutes ces années et pour ses mots réconfortants dans les moments plus difficiles.*

*Et enfin à ma famille à laquelle je dois tout. Probablement l'une des meilleures au monde ! A mon père et ma mère pour avoir su me transmettre (du moins je l'espère !) des valeurs nobles ainsi que (ça j'en suis sûre !) plusieurs de leurs passions et pour avoir toujours fait leur maximum pour que ma vie soit la plus douce possible. A ma sœur pour son soutien infaillible, ses conseils avisés et... disons son sens de l'humour ! A mes grands-mères pour leur tendresse et leur présence bienveillante. A mes grands-pères que j'aurais aimé connaître. Et enfin à Gnocchie pour sa façon bien à elle de me réconforter dans les moments de doute...*

*Merci à toutes et à tous.*

## AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse - encadré par les Dr Ilaria CASCONI et José COURTY - a été réalisé au laboratoire de recherche sur la Croissance Cellulaire, la Réparation et la Régénération Tissulaires (CRRET) de l'Université Paris-Est Créteil (UPEC). Il a bénéficié d'un financement par un contrat doctoral de l'Université Paris-Est et par l'Agence Nationale de la Recherche (« ANR-14-LE16-0023-NORMATHER » et « ANR-THERANUC »). Si l'ensemble de mon travail de recherche a été effectué au sein du laboratoire CRRET, les différents travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés en collaboration avec l'équipe du Pr Michel PAQUES de l'Institut de la Vision (Paris, France), avec l'équipe du Dr Enrico GIRAUDO de l'Institut du Cancer de Candiolo (Candiolo, Italie), avec le Pr Anne COUVELARD du Service de Gastroentérologie de l'Hôpital Bichat (Paris, France), avec l'équipe du Dr Jacques PENELLE de l'Institut de Chimie et des Matériaux Paris-Est (Thiais, France), avec l'équipe du Dr Cécile DENIS du CHU de Bicêtre (Le Kremlin-Bicêtre, France), avec l'équipe du Dr Philippe BOUVET du Centre de Recherche sur le Cancer de Lyon (Lyon, France) et avec l'équipe du Pr José COHEN de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (Créteil, France).

Depuis plus de 20 ans, l'équipe « Facteurs de croissance et angiogenèse » dirigée par le Dr José COURTY concentre ses recherches sur le rôle des nucléoprotéines dans la croissance tumorale et l'angiogenèse. A son arrivée au laboratoire CRRET en 2012, le Dr Ilaria CASCONI a développé un vaste projet de recherche visant à étudier le rôle de l'une de ces nucléoprotéines, la nucléoline, dans l'angiogenèse du cancer du pancréas et sur les mécanismes de l'activation endothéliale. Mon travail de thèse s'est inscrit dans ce cadre et visait plus spécifiquement à étudier les mécanismes fondamentaux de l'activation endothéliale et à envisager les effets de son inhibition comme une stratégie thérapeutique du cancer du pancréas.

Ce travail a donné lieu aux communications scientifiques suivantes.

### **Article publié dans un journal scientifique international**

- ❖ Maud-Emmanuelle Gilles\*, Federica Maione\*, **Mélanie Cossutta\***, Gilles Carpentier, Laure Caruana, Silvia Di Maria, Claire Houpe, Damien Destouches, Ksenya Shchors, Christopher Prochasson, Fabien Mongelard, Simona Lamba, Alberto Bardelli, Philippe Bouvet, Anne Couvelard, José Courty, Enrico Giraudo, and Ilaria



Cascone. 2016. Nucleolin Targeting Impairs the Progression of Pancreatic Cancer and Promotes the Normalization of Tumor Vasculature. *Cancer Res.* 76:7181-7193. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0300>

\* Co-auteurs

### **Article soumis à un comité de lecture dans un journal scientifique international**

- ❖ **Mélessande Cossutta**, Marie Darche, Gilles Carpentier, Claire Houpe, Delphine Villain, Emilie Picard, Caterina Casari, Cécile Denis, Michel Paques, José Courty, and Ilaria Cascone. Weibel-Palade Bodies are regulated by VEGF and orchestrate pericyte recruitment during angiogenesis. *eLife*

### **Article accepté pour une publication dans un journal scientifique international**

- ❖ Zoi Diamantopoulou\*, Maud-Emmanuelle Gilles\*, Maha Sader, **Mélessande Cossutta**, Benoit Vallée, Claire Houpe, Damien Habert, Blandine Brissault, Eric Leroy, Federica Maione, Enrico Giraudo, Damien Destouches, Jacques Penelle, José Courty and Ilaria Cascone. Multivalent cationic pseudopeptide polyplexes as a tool for cancer therapy. *Oncotarget*

\* Co-auteurs

### **Communications par poster à des congrès scientifiques internationaux**

- ❖ 2015, Paris (France). 6<sup>e</sup> Congress of the French Angiogenesis Society .Section: Vascular Network and Morphogenesis. A Potential Role for Weibel-Palade Body Exocytosis in Regulating Vascular Angiogenesis. Mélessande Cossutta, Marie Darche, Maud-Emmanuelle Gilles, Gilles Carpentier, Michel Paques, José Courty and Ilaria Cascone
- ❖ 2016, Paris (France). Current Challenges in Cell-Cell Communication. A Potential Role for Weibel-Palade Body Exocytosis in Cell-Cell Communication between Endothelial Cells and Pericytes during Angiogenesis. Mélessande Cossutta, Marie Darche, Gilles Carpentier, Michel Paques, José Courty and Ilaria Cascone
- ❖ 2016, Frankfurt (Germany). Joint International Meeting Perspectives in Vascular Biology. Section: Neovascularisation & Angiogenesis. A Potential Role for Weibel-Palade Body Exocytosis in Regulating Vascular Angiogenesis. Mélessande Cossutta, Marie Darche, Gilles Carpentier, Michel Paques, José Courty and Ilaria Cascone
- ❖ 2016, Boston (USA). 19th International Vascular Biology Meeting. Analysis of the effect of the nucleolin targeting pseudopeptide N6L in retinopathy diseases. Marie Darche, Mélessande Cossutta, Anne Rendon, José Courty, Michel Paques and Ilaria Cascone

- ❖ 2017, Toulouse (France). 7e Congress of the French Angiogenesis Society. A Potential Role for Weibel-Palade Body Exocytosis in Regulating Vascular Angiogenesis. Mélanie Cossutta, Marie Darche, Gilles Carpentier, Michel Paques, José Courty and Ilaria Cascone
- ❖ 2017, Geneva (Switzerland). 2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the European Society for Microcirculation (ESM) and European Vascular Biology Organisation (EVBO). Weibel-Palade Body Exocytosis Regulated by VEGF Gradient Orchestrates Pericyte Coverage During Retinal Vascular Angiogenesis. Mélanie Cossutta, Marie Darche, Gilles Carpentier, Michel Paques, José Courty and Ilaria Cascone

Presenting author

## LISTE DES ABREVIATIONS

### A

---

AC : Adenylyl Cyclase / Adénylate cyclase

ADAMTS-13 : A Disintegrin and Metalloproteinase with A Thrombospondin type 1 motif member 13

ADN : Acide DéoxyriboNucléique

ADNr : ADN ribosomique

Ang-1 : Angiopoietin-1 / Angiopoïétine-1

Ang-2 : Angiopoietin-2 / Angiopoïétine-2

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messagers

ARNr : ARN ribosomaux

### B

---

BMDCs : Bone Marrow Derived Cells / Cellules dérivées de la moelle osseuse

### C

---

CAFs : Cancer Associated Fibroblasts / Fibroblastes associés au cancer

CAM : Chorioallantoic Membrane / Membrane chorioallantoïque

CK2 : Casein Kinase II / Caséine kinase 2

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated antigen 4 / Antigène associé aux lymphocytes T cytotoxiques

### E

---

EGF : Epidermal Growth Factor / Facteur de croissance épidermique

EPCs : Endothelial Progenitor Cells / Progéniteurs endothéliaux

5'-ETS : 5'-External Transcribed Spacers

### F

---

FAK : Focal Adhesion Kinase / Kinase des contacts focaux

FGF : Fibroblast Growth Factor / Facteur de croissance des fibroblastes

5-FU : 5-Fluoro-Uracile

FVIII : Coagulation Factor VIII / Facteur VIII de la coagulation

### G

---

GEMMs : Genetically Engineered Mouse Models / Modèles murins transgéniques

GLUT-1 : Glucose Transporter type 1 / Transporteur du glucose de type 1

### H

---

HDAC : Histone Deacetylase / Histone désacétylase

HGF : Hepatocyte Growth Factor / Facteur de croissance des hépatocytes

HUVECs : Human Umbilical Vein Endothelial Cells / Cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical

## M

---

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase (MAP Kinase)

3-MCA : 3-Methyl-CholAnthrene / Méthyl-3 cholanthrène

MDSCs : Myeloid-Derived Suppressor Cells / Cellules suppressives d'origine myéloïde

MEC : Matrice ExtraCellulaire

miARN : Micro ARN

MMP : Matrix MetalloProteinase / Métalloprotéinases matricielle

MT1-MMP : Membrane-Type-1 Matrix MetalloProteinase / Métalloprotéinase-1 de type membranaire

mTOR : mammalian Target Of Rapamycin / Cible de la rapamycine chez les mammifères

## N

---

NLS : Nuclear Localization Signal / Signal de localisation nucléaire

NRE : Nucleolin Recognition Element / Élément de reconnaissance de la nucléoline

## O

---

OIR : Oxygen-Induced Retinopathy / Rétinopathie induite par l'oxygène

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

## P

---

PanIN : Pancreatic Intraepithelial Neoplasia / Néoplasie pancréatique intraépithéliale

PAR : Protease Activated Receptor / Récepteur activé par des protéases

PD-1 : Programmed cell Death protein 1 / Protéine de mort cellulaire programmée

PDAC : Pancreatic Ductal Adenocarcinoma / Adénocarcinome pancréatique ductal

PDGF : Platelet-Derived Growth Factor / Facteur de croissance dérivé des plaquettes

PD-L1 : Programmed cell Death 1 Ligand 1 / Ligand 1 de la protéine de mort cellulaire programmée

PKA : Protein Kinase A / Protéine kinase A

PKC- $\delta$  : Protein Kinase C- $\delta$  / Protéine kinase C- $\delta$

PLC- $\gamma$  : Phospholipase C- $\gamma$

PIGF : Placental Growth Factor / Facteur de croissance placentaire

pNET : pancreatic NeuroEndocrine Tumor / Tumeur neuroendocrine pancréatique

PRRT : Peptide Receptor RadioTherapy / Radiothérapie par récepteur de peptide

PSGL-1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1

PTN : Pleiotrophin / Pléiotrophine

PVDF : PolyVinylidene Fluoride / Poly(fluorure de vinylidène)

## R

---

RBD : RNA-Binding Domain / Domaine de liaison à l'ARN

RRM : RNA Recognition Motif / Motif de reconnaissance des ARN

## T

---

TAMs : Tumor Associated Macrophages / Macrophages associés à la tumeur

TASP : Template Assembled Synthetic Peptide

TGF- $\beta$  : Transforming Growth Factor  $\beta$  / Facteur de croissance transformant  $\beta$

TGN : Trans-Golgi Network / Réseau trans-golgien

TIMP-3 : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 3 / Inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases 3

Treg : Regulatory T Lymphocyte / Lymphocyte T régulateur

TTF-1 : Termination Transcription Factor 1 / Facteur de terminaison de la transcription 1

## V

---

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor / Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VIP : Vasoactive Intestinal Peptide / Peptide vasoactif intestinal

VWD : von Willebrand Disease / Maladie de von Willebrand

vWF : von Willebrand Factor / Facteur von Willebrand

## W

---

WPBs : Weibel-Palade Bodies / Corps de Weibel et Palade

## LISTE DES ILLUSTRATIONS

<b>Figure 1</b> : origine et différenciation des cellules endothéliales.....	9
<b>Figure 2</b> : disposition des cellules périvasculaires autour des cellules endothéliales.....	10
<b>Figure 3</b> : recrutement des leucocytes circulants .....	14
<b>Figure 4</b> : formation d'un réseau vasculaire primitif par vasculogénèse .....	19
<b>Figure 5</b> : remodelage d'un réseau vasculaire préexistant par angiogénèse.....	20
<b>Figure 6</b> : profil d'expression des VEGFR par différents types cellulaires.....	22
<b>Figure 7</b> : voies de signalisation du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales .....	23
<b>Figure 8</b> : structure et interaction des récepteurs et des ligands du système Angiopoïétines/Tie ....	25
<b>Figure 9</b> : système Angiopoïétines/Tie et déstabilisation de l'endothélium .....	30
<b>Figure 10</b> : boucle de rétrocontrôle déterminant les phénotypes « tip cell » et « stalk cell » .....	31
<b>Figure 11</b> : acteurs moléculaires régulant le recrutement des péricytes pendant l'angiogénèse .....	34
<b>Figure 12</b> : anomalies structurelles et fonctionnelles des vaisseaux tumoraux .....	38
<b>Figure 13</b> : effets bénéfiques de la normalisation des vaisseaux tumoraux .....	41
<b>Figure 14</b> : angiogénèse physiologique de la rétine.....	44
<b>Figure 15</b> : premières observations des WPBs dans l'endothélium artériel pulmonaire de rat.....	48
<b>Figure 16</b> : observation des WPBs dans des cellules endothéliales en culture (HUVECs).....	49
<b>Tableau 1</b> : protéome des WPBs .....	51
<b>Figure 17</b> : représentation schématique de la formation des WPBs.....	52
<b>Figure 18</b> : trois modes d'exocytose des WPBs.....	55
<b>Figure 19</b> : domaines fonctionnels de la nucléoline.....	59
<b>Figure 20</b> : localisations cellulaires et principales fonctions de la nucléoline .....	61
<b>Tableau 2</b> : principaux ARNm cibles de la nucléoline .....	63
<b>Figure 21</b> : structure du pseudopeptide N6L.....	67
<b>Figure 22</b> : anatomie du pancréas .....	69
<b>Figure 23</b> : anomalies génétiques et grades histologiques menant au PDAC.....	73
<b>Figure 24</b> : composants cellulaires du microenvironnement tumoral.....	75
<b>Figure 25</b> : effet de l'Ang-2 sur l'adhérence des péricytes <i>in vitro</i> .....	165
<b>Figure 26</b> : effet de l'absence des WPBs sur l'angiogénèse de la rétine.....	167
<b>Figure 27</b> : effet de l'absence des WPBs dans le modèle des anneaux aortiques .....	168
<b>Figure 28</b> : modèle de régulation du recrutement des péricytes par l'exocytose des WPBs.....	179
<b>Figure 29</b> : caractéristiques de l'activation endothéliale et stratégie d'inhibition par le N6L.....	185
<b>Figure 30</b> : détection des cellules immunitaires dans les tumeurs mPDAC.....	245

# *I. INTRODUCTION*

Le développement d'un organisme et le maintien de son intégrité supposent une adaptation constante du réseau vasculaire pour répondre aux besoins physiologiques et métaboliques des tissus qui le composent. Le remodelage du réseau vasculaire pour former de nouveaux vaisseaux est assuré par un mécanisme biologique appelé angiogenèse. L'angiogenèse physiologique se produit au cours du développement puis chez l'adulte lors d'évènements tels que la réparation et la régénération tissulaires (D'Amore et Thompson, 1987 ; Folkman et Shing, 1992). La première étape de l'angiogenèse, l'activation endothéliale, est nécessaire pour déstabiliser le réseau vasculaire et permettre son remodelage. Les cellules endothéliales, quiescentes dans les vaisseaux matures, adoptent un phénotype activé sous l'effet de divers facteurs environnementaux (Potente *et al.*, 2011). Ce phénotype se caractérise par la prolifération des cellules endothéliales et par la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (Cines *et al.*, 1998) qui induisent une déstabilisation des vaisseaux et le détachement des péricytes associés aux cellules endothéliales (Hammes *et al.*, 2004). L'activation endothéliale est un évènement transitoire disparaissant avec l'extinction des *stimuli* environnementaux. Cependant, la persistance de ces facteurs dans des contextes pathologiques maintiennent une activation endothéliale chronique se traduisant par la mise en place de vaisseaux anormaux et d'un réseau vasculaire anarchique et peu fonctionnel (Gazit *et al.*, 1997 ; Nagy *et al.*, 2002 ; Jain, 2003 ; Nagy *et al.*, 2009 ; Fukumura *et al.*, 2010). L'angiogenèse pathologique est impliquée dans de nombreuses maladies, notamment les cancers, les rétinopathies et certains troubles inflammatoires (Blood et Zetter, 1990 ; Folkman, 1992 ; Weinstat-Saslow et Steeg, 1994). L'angiogenèse tumorale participe par exemple à la croissance tumorale en apportant les éléments nécessaires à la prolifération des cellules cancéreuses et en favorisant la dissémination des cellules tumorales et la formation des métastases dans des foyers secondaires (Goel *et al.*, 2011). Etape clé de l'angiogenèse tumorale, l'activation endothéliale dérégulée est une cible potentielle pour le traitement de ces pathologies dont certaines demeurent encore incurables de nos jours. Ainsi, la compréhension de l'activation endothéliale et son inhibition représentent une stratégie thérapeutique. Le but de cette thèse a été d'étudier dans un contexte physiologique et de cibler dans un contexte pathologique le lien moléculaire entre l'activation endothéliale et le recrutement des péricytes sur les vaisseaux.

Cette thèse est organisée en 6 parties distinctes :



- ❖ La **synthèse bibliographique** vise à fournir au lecteur des informations générales utiles à la compréhension du contexte scientifique
- ❖ Le **projet de thèse** présente les objectifs de ce travail et précise les directions suivies pendant cette thèse
- ❖ Les informations techniques des expériences effectuées sont détaillées dans la partie **Matériels et méthodes**
- ❖ Les **résultats** obtenus sont présentés sous la forme d'articles et sont organisés en 2 parties. Dans une première partie, l'activation endothéliale est étudiée dans un contexte d'angiogenèse tumorale et une stratégie d'inhibition est testée dans le traitement d'un type de cancer du pancréas particulièrement agressif. Ces résultats font l'objet de l'Article 1. Dans une seconde partie, un lien moléculaire entre l'activation endothéliale et le recrutement des péricytes sur les vaisseaux est proposé dans le modèle développemental de l'angiogenèse physiologique de la rétine. Ces résultats sont présentés dans l'Article 2.
- ❖ L'ensemble des résultats sont synthétisés et discutés dans la partie **Discussion**
- ❖ Une dernière partie vise à fournir des **conclusions** plus générales sur l'ensemble de ce travail et à proposer des **perspectives** pour la suite du projet scientifique dans lequel s'inscrit cette thèse

Enfin, des résultats supplémentaires utiles à des développements futurs pour l'équipe sont présentés en annexes.

## *II. SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE*

# 1. Le réseau vasculaire

Il existe deux types de circulations étroitement liées : d'une part la **circulation sanguine** transportant le sang et d'autre part la **circulation lymphatique** contenant la lymphe. Si la circulation sanguine est animée par la pompe cardiaque qui permet la diffusion active du sang dans l'ensemble de l'organisme, la lymphe en revanche circule passivement sous l'effet de la gravité et des contractions musculaires. Le réseau vasculaire assure plusieurs fonctions et met en jeu différents types cellulaires en étroite communication.

## 1.1. L'organisation du réseau vasculaire sanguin

Le réseau sanguin, présent dans la plupart des tissus de l'organisme, est formé par un ensemble de vaisseaux anastomosés de différents calibres. Il met en jeu plusieurs types cellulaires : les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires. Le réseau sanguin est composé de 2 systèmes appelés « **petite circulation** » (ou circulation pulmonaire) et « **grande circulation** ». La petite circulation relie le cœur aux poumons tandis que la grande circulation relie le cœur à tous les autres organes. Les artères de la petite circulation contiennent du sang pauvre en oxygène alors que les artères de la grande circulation contiennent du sang riche en oxygène. A l'inverse, les veines de la grande circulation contiennent du sang pauvre en oxygène alors que les veines de la petite circulation contiennent du sang richement oxygéné après le passage du sang dans les alvéoles pulmonaires (Monahan-Earley *et al.*, 2013).

### 1.1.1. Les différents types de vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins de plus gros calibre sont les artères et les veines. Les **artères** partent du cœur pour apporter le sang oxygéné aux tissus tandis que les **veines** rapportent le sang appauvri en oxygène des tissus vers le cœur. Ces vaisseaux de gros calibres donnent naissance à des vaisseaux plus fins ; respectivement les **artérioles** pour le réseau artériel et les **veinules** pour le réseau veineux. A la confluence des réseaux artériels et veineux se trouvent les plus petits vaisseaux appelés **capillaires**. Bien que similaire, la structure de la paroi des artères et des veines présente des différences liées à leur fonction.

### 1.1.1.1. La paroi des artères et des veines

En coupe transversale, la paroi des artères et des veines est formée de 3 couches superposées. De la lumière vers le tissu conjonctif environnant, on distingue l'intima, la media et l'adventice. L'**intima** est la couche la plus profonde de la paroi formée par l'endothélium. L'endothélium est un tissu épithélial particulier puisqu'il se forme à partir du feuillet embryonnaire mésodermique, alors que la plupart des autres épithéliums dérivent de l'ectoderme et de l'endoderme. L'endothélium est composé par des cellules endothéliales en contact direct avec le sang et une lame basale. La **media** est la couche intermédiaire de la paroi composée de collagène et d'élastine. Elle peut aussi contenir des fibres musculaires lisses permettant la vasoconstriction. L'**adventice** est la couche la plus externe de la paroi composée de tissu conjonctif et de fibres élastiques. Elle contient en outre des capillaires irriguant la paroi vasculaire (*vasa vasorum*) et les terminaisons nerveuses des systèmes autonomes sympathique et parasympathique (Tennant et McGeachie, 1990 ; Stegemann *et al.*, 2007 ; Datta *et al.*, 2017).

### 1.1.1.2. Les différences entre les artères et les veines

Les artères et les veines présentent des différences structurales expliquées par leur fonction. En communication directe avec le cœur, les artères sont généralement plus épaisses et élastiques que les veines pour pouvoir résister aux fortes pressions auxquelles elles sont soumises. Les artères doivent pouvoir se détendre pour supporter l'afflux de sang après la systole (contraction cardiaque) puis reprendre leur taille initiale pour faire progresser le sang dans les vaisseaux. A l'inverse, la pression sanguine dans les veines est faible ce qui implique que les veines n'ont pas besoin d'être aussi déformables que les artères. Par conséquent, les veines sont plus fines et moins élastiques que les artères. De plus, la différence de diamètre entre les veines et les veinules est moins importante qu'entre les artères et les artérioles. Enfin à la différence des artères et des artérioles, les veines et les veinules contiennent des valves capables de se fermer pour éviter le reflux du sang et le forcer à retourner vers le cœur.

### 1.1.2. L'endothélium

L'endothélium est la partie la plus interne de la paroi des vaisseaux sanguins. Il dérive du mésoderme et est formé par une monocouche de **cellules endothéliales** et par une **lame basale** (Bennett *et al.*, 1959 ; Tennant et McGeachie, 1990). Chez l'adulte, l'endothélium est quiescent et les vaisseaux sont stabilisés par des interactions entre les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires (von Tell *et al.*, 2006). L'endothélium peut être activé sous certaines conditions détaillées dans la partie **Angiogenèse**. Il existe différents types d'endothéliums adaptés à la physiologie de l'organe ou du tissu dans lequel ils se trouvent. On distingue les **endothéliums continus**, **fenestrés** et **discontinus** (Bennett *et al.*, 1959 ; Datta *et al.*, 2017).

#### 1.1.2.1. L'endothélium continu

Les endothéliums continus sont formés par des **cellules endothéliales étroitement jointives** associées entre elles par des **jonctions serrées** et par une **lame basale continue**. Ce type d'endothélium est présent dans les vaisseaux de la peau, des poumons, du cœur et des muscles. On le retrouve également dans le système nerveux central au niveau duquel il participe à la constitution de la **barrière hémato-encéphalique** chargée de protéger l'encéphale (cerveau, cervelet et tronc cérébral) et la moelle épinière. Ainsi, les endothéliums continus sont présents au niveau des organes dans lesquels les échanges entre le sang et les tissus doivent être finement régulés (Bennett *et al.*, 1959).

#### 1.1.2.2. L'endothélium fenestré

Dans le cas de l'endothélium fenestré, les cellules endothéliales sont séparées entre elles par des **pores de 50 à 60 nm** de largeur fermés par une fine membrane de 5 à 6 nm d'épaisseur. Bien que la **lame basale** soit **continue**, ce type d'endothélium est retrouvé dans les organes présentant une intense activité de transport trans-endothélial ou une fonction de filtration comme les glandes exocrines et endocrines, le tractus gastro-intestinal, les plexus choroïdes ou les glomérules rénaux (Bennett *et al.*, 1959 ; Esser *et al.*, 1998).

### 1.1.2.3. L'endothélium discontinu

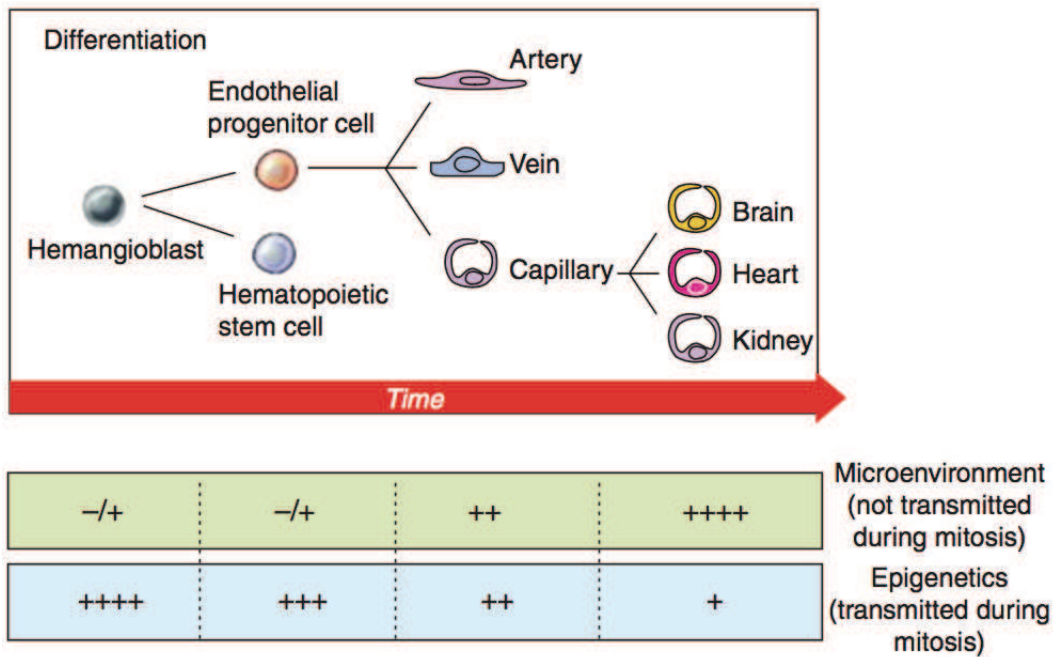
L'endothélium discontinu est formé par des cellules endothéliales non jointives séparées entre elles par de **larges pores ouverts de 100 à 200 nm** de largeur et par une **lame basale moins dense**. Ce type d'endothélium est retrouvé dans les vaisseaux sinusoides hépatiques, dans la rate et la moelle osseuse et permettent la transmigration de cellules entre le compartiment sanguin et le tissu sous-jacent (Bennett *et al.*, 1959).

### 1.1.3. Les composants cellulaires des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux sanguins sont constitués d'un endothélium formé par une monocouche de **cellules endothéliales** et par des **cellules périvasculaires** séparées des cellules endothéliales par la lame basale (Nicosia *et al.*, 1997). Les cellules endothéliales et les cellules périvasculaires communiquent par des contacts directs et par la diffusion de facteurs solubles.

#### 1.1.3.1. Les cellules endothéliales

Lors du développement embryonnaire, le **mésoderme** donne naissance à un précurseur commun aux cellules endothéliales et aux cellules hématopoïétiques appelé **hémangioblaste**. L'hémangioblaste se différencie ensuite en progéniteur endothélial (**angioblaste**) ou en cellule souche hématopoïétique. Enfin, l'angioblaste se différencie en cellules endothéliales des veines, artères, veinules, artérioles et capillaires. La différenciation des cellules endothéliales est régulée par des **facteurs épigénétiques et environnementaux**, les facteurs épigénétiques intervenant plutôt au début de la différenciation et les facteurs environnementaux en fin de différenciation (Figure 1). Enfin, d'autres lignages cellulaires tels que les monocytes, les adipocytes ou les cellules souches neurales peuvent donner naissance à des cellules endothéliales par trans-différenciation (Choi *et al.*, 1998 ; Sumpio *et al.*, 2002 ; Aird *et al.*, 2012).

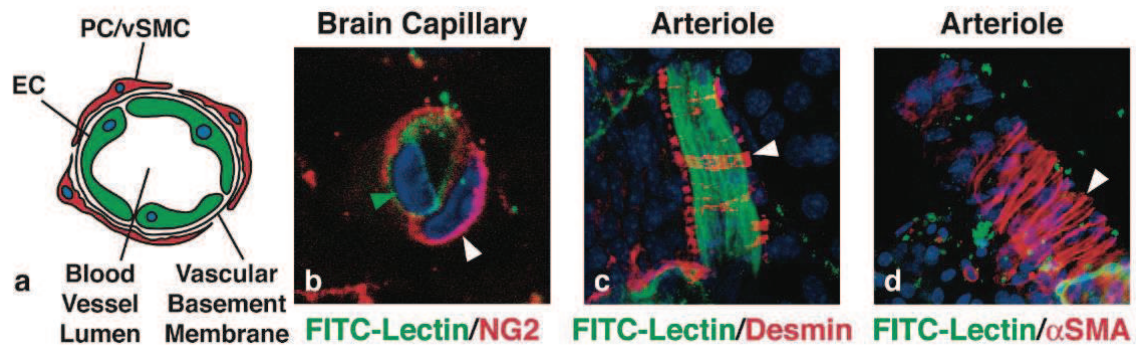


**Figure 1 : origine et différenciation des cellules endothéliales.** Les cellules endothéliales dérivent d'un précurseur commun à la lignée hématopoïétique (hémangioblaste). L'hémangioblaste se différencie en progéniteur endothélial (angioblaste) qui se différencie à son tour en cellules endothéliales spécialisées selon le type de vaisseau. Le processus de différenciation dépend majoritairement de facteurs épigénétiques dans les phases précoces puis de facteurs environnementaux dans les phases plus tardives. D'après Aird *et al.*, 2012.

Les cellules endothéliales expriment les marqueurs **CD31** (PECAM-1), **CD34**, **CD105** (endogline), les récepteurs au VEGF (**VEGFR-1** et **2**), le **facteur von Willebrand (vWF)**, l'enzyme de conversion de l'angiotensine (**ACE**), la cadhérine de l'endothélium vasculaire (**VE-cadhérine**), et la **P-sélectine** (Choi *et al.*, 1998 ; Rakocevic *et al.*, 2017).

### 1.1.3.2. Les cellules périvasculaires

Les cellules périvasculaires, aussi appelées **cellules de Rouget** ou **cellules murales**, entourent les vaisseaux sanguins et peuvent être des **péricytes** ou des **cellules musculaires lisses** (Figure 2a).



**Figure 2 : disposition des cellules périvasculaires autour des cellules endothéliales.** Les cellules périvasculaires sont disposées à l'extérieur de l'endothélium et séparées des cellules endothéliales par la lame basale (a). Présentes dans tous les types de vaisseaux, ces cellules expriment notamment les marqueurs NG2 (b), desmine (c) et  $\alpha$ -SMA (d). EC : cellule endothéliale, PC : péricyte, vSMC : cellule musculaire lisse. D'après Bergers et Song, 2005.

Les cellules périvasculaires peuvent exprimer des marqueurs intracellulaires ou membranaires tels que la **desmine** (Figure 2c), l'actine  $\alpha$  du muscle lisse ( **$\alpha$ -SMA**, Figure 2d), la protéine **RGS-5** (Regulator of G-protein Signaling 5), le protéoglycane à chondroïtine sulfate **NG2** (Neuron-glia 2, Figure 2b), le récepteur  $\beta$  au PDGF (**PDGF-R $\beta$** ) et les **aminopeptidases A** et **N**. Aucun marqueur spécifique des cellules murales n'ayant été clairement décrit à ce jour, ces cellules sont traditionnellement identifiées par une combinaison tissu-spécifique de marqueurs (Armulik *et al.*, 2005 ; Bergers et Song, 2005 ; Armulik *et al.*, 2011). La multiplicité des marqueurs peut être expliquée par une origine très variée des cellules périvasculaires. Si la plupart des cellules périvasculaires ont une **origine mésodermique** (Hungerford et Little, 1999 ; Vrancken Peeters *et al.*, 1999), une étude a montré que les cellules périvasculaires du système nerveux central se différencient à partir des **cellules des crêtes neurales** (Etchevers *et al.*, 2001). De plus, les cellules périvasculaires peuvent également se former par **transdifférenciation des cellules endothéliales** (DeRuiter *et al.*, 1997) ou encore à partir de la **moelle osseuse** chez l'adulte (Rajantie *et al.*, 2004). A l'inverse, les cellules périvasculaires peuvent se différencier en plusieurs types de cellules mésenchymateuses comme des ostéoblastes, des chondrocytes, des adipocytes (Collett et Canfield, 2005) ou des fibroblastes participant au processus de cicatrisation ou encore à la fibrose dans un contexte d'inflammation chronique ou dans le microenvironnement tumoral (Sundberg *et al.*, 1996).



On distingue deux types de cellules périvasculaires - les **péricytes** et les **cellules musculaires lisses** - différenciées en fonction de leur localisation dans l'endothélium, de leur morphologie voire des marqueurs exprimés (Armulik *et al.*, 2005). Toutefois, la distinction entre ces deux types cellulaires n'est pas clairement définie. Les péricytes et les cellules musculaires lisses sont situés autour du pôle basal des cellules endothéliales et participent au maintien de l'intégrité et des fonctions des vaisseaux, notamment la régulation de la perméabilité vasculaire. Les cellules musculaires lisses sont essentiellement présentes dans la media des grands vaisseaux (veines et artères) et sont séparées des cellules endothéliales par l'intima. Au contraire, les péricytes sont en relation beaucoup plus étroite avec les cellules endothéliales et sont inclus dans la même lame basale qu'ils participent à synthétiser (Armulik *et al.*, 2005). Si les cellules endothéliales et les péricytes sont séparés par la lame basale, des communications directes sont permises au niveau de régions dépourvues de lame basale (Rucker *et al.*, 2000). Ainsi, plusieurs types de communications ont été décrites entre les cellules endothéliales et les péricytes. On distingue notamment les **plaques d'adhérence** au niveau desquelles l'espace entre ces deux types cellulaires est maintenu par un dépôt de fibronectine (Courtoy et Boyles, 1983) et les **contacts « peg and socket »** au niveau desquels les membranes des deux types cellulaires forment des invaginations contenant des **jonctions serrées**, des **jonctions gap** et des **jonctions adhérentes** (Tilton *et al.*, 1979 ; Cuevas *et al.*, 1984 ; Gerhardt *et al.*, 2000). Ainsi, il est proposé que les cellules musculaires lisses et les péricytes assurent des fonctions légèrement différentes au niveau de l'endothélium, les cellules musculaires lisses étant plutôt dévolues à la régulation du tonus vasculaire et de la contractilité tandis que les péricytes assurent davantage des fonctions de communication intercellulaire et d'intégration de signaux entre les cellules endothéliales. En effet, il a été montré dans la plupart des organes qu'un seul péricyte contacte plusieurs cellules endothéliales, permettant l'intégration et la coordination de cellules endothéliales voisines (Armulik *et al.*, 2005).

Si le recouvrement des vaisseaux par des péricytes est de l'ordre de 10% à 50% en moyenne, **l'abondance des péricytes est variable** et reflète les fonctions des organes. Ainsi, le *ratio* péricyte/cellule endothéliale est de 1:100 dans le muscle squelettique - un organe où la synchronisation des fibres musculaires est fondamentale - et de 1:1 dans la rétine, où la régulation de la perméabilité vasculaire est cruciale pour le maintien d'une barrière hautement sélective entre le sang et les photorécepteurs (Shepro et Morel, 1993).

Le recouvrement des vaisseaux par des péricytes est le plus élevé dans la rétine, tandis que les péricytes sont peu abondants dans les organes assurant des fonctions d'échange, de transport de nutriments ou de filtration comme les poumons, le placenta, les reins ou la peau. L'abondance des péricytes dans le système nerveux central est expliquée par leur rôle dans la régulation de la perméabilité vasculaire et de la barrière hémato-encéphalique mais aussi par leur capacité à détecter l'hypoxie et l'hypoglycémie pour orchestrer une réponse métabolique et protéger les neurones. Il a été montré *in vitro* que des péricytes de cerveau soumis à des conditions hypoxiques libèrent les prostaglandines D2 et J2 responsables d'une augmentation de l'expression du transporteur de glucose GLUT-1 par les cellules endothéliales (Dore-Duffy *et al.*, 2005).

#### 1.1.4. La matrice extracellulaire des vaisseaux sanguins

La matrice extracellulaire (MEC) des vaisseaux sanguins est formée par la lame basale de l'endothélium, une matrice de 80 nm d'épaisseur permettant l'**ancrage** des cellules endothéliales et des péricytes. Elle sert aussi de **réservoir** pour de nombreuses cytokines, facteurs de croissance et métalloprotéinases matricielles (MMPs) (Kalebic *et al.*, 1983 ; Fischer *et al.*, 2006). La lame basale est produite à la fois par les cellules endothéliales et par les cellules périvasculaires et est composée de **collagènes IV et VIII**, de **laminines**, de **fibronectine**, de **protéoglycanes** (perlecan), de **glycosaminoglycanes** (héparane sulfate) et de **nidogène/entactine**.

### 1.2. Les fonctions du réseau vasculaire sanguin

Les vaisseaux sanguins forment un environnement clos qui véhicule le sang, un tissu conjonctif liquide responsable de la distribution des éléments nutritifs aux organes et à l'élimination de leurs métabolites. L'endothélium a également une fonction endocrine régulant le tonus vasculaire *via* la synthèse et la sécrétion d'hormones. Le réseau vasculaire est aussi impliqué dans l'hémostase, la coagulation ou encore l'immunité.

#### 1.2.1. Le rôle trophique et l'élimination des déchets du métabolisme

Le rôle le plus connu des vaisseaux sanguins est sans aucun doute le transport des éléments nutritifs et des déchets produits par le fonctionnement des tissus. Le sang

transporte des éléments essentiels comme le **glucose**, les **acides aminés**, les **protéines** ou encore les **acides gras**. De plus, les globules rouges utilisent l'affinité du fer présent dans l'hème de l'hémoglobine pour fixer et distribuer le dioxygène ( $O_2$ ). Lors de son passage dans les tissus, le sang fournit les éléments nutritifs et l' $O_2$  aux cellules tout en récupérant les **produits du métabolisme** ( $CO_2$ , toxines, radicaux libres) pour les acheminer aux reins qui les éliminent. Le sang participe aussi à la régulation de l'**équilibre acido-basique** de l'organisme, le plasma ayant pour rôle de maintenir un pH physiologique précisément régulé entre 7,38 et 7,42.

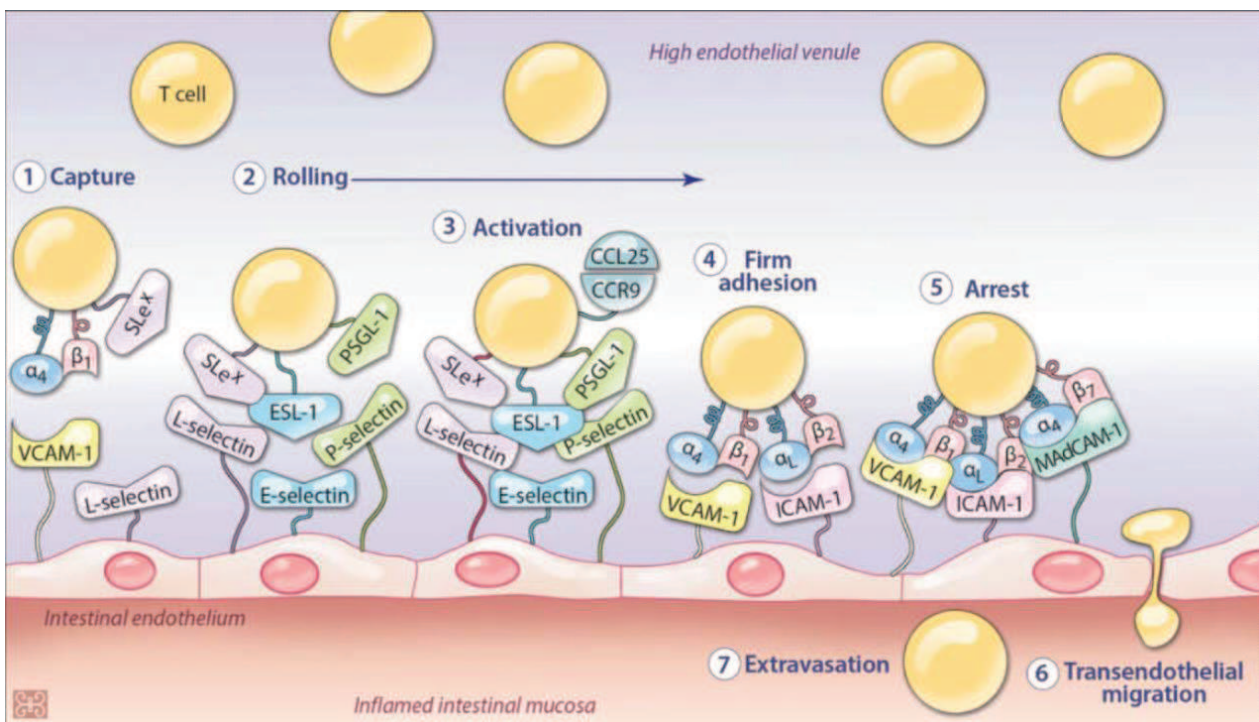
### 1.2.2. La fonction endocrine de l'endothélium

Les cellules endothéliales participent à la **régulation du tonus vasculaire** en sécrétant des facteurs favorisant la **relaxation** ou la **contraction** des **cellules musculaires lisses** de la paroi des vaisseaux (Féléto *et al.*, 2008). Le facteur le plus décrit est le monoxyde d'azote (**NO**) synthétisé à partir de la L-arginine par l'enzyme NO-synthase. Trois NO-synthases ont été décrites selon leur date de caractérisation : NO-synthase I (ou neuronal, nNOS, NOS-1) (Bredt et Snyder, 1990 ; Bredt *et al.*, 1991), NO-synthase II (ou inducible, iNOS, NOS-2) (Yiu *et al.*, 1991 ; Lyons *et al.*, 1992) et NO-synthase III (ou endothéliale, eNOS, NOS-3) (Pollock *et al.*, 1991 ; Sessa *et al.*, 1992). Si les cellules endothéliales peuvent exprimer ces 3 types de NO-synthase, la plus abondante dans les cellules endothéliales saines est la **NO-synthase III** (Matouk et Marsden, 2008). Inactive en condition physiologique, cette enzyme  $Ca^{2+}$ -dépendante peut être activée par les forces de cisaillement (« shear-stress ») qui traduisent une pression sanguine trop élevée. Dans les cellules musculaires lisses, le NO libéré par les cellules endothéliales active une protéine kinase cGMP-dépendante (**cGKI**) qui produit une relaxation en réduisant la concentration de  $Ca^{2+}$  intracellulaire ou en modifiant la sensibilité au  $Ca^{2+}$  des protéines contractiles. Ainsi, les cellules endothéliales sont sensibles à la pression sanguine et régulent le tonus vasculaire en synthétisant des facteurs **vasoconstricteurs** ou **vasodilatateurs** agissant sur les cellules musculaires lisses.

### 1.2.3. Le sang comme véhicule de médiateurs moléculaires et cellulaires

En plus des éléments nutritifs, de l' $O_2$  et des déchets du métabolisme, le sang est impliqué dans le transport de médiateurs moléculaires et cellulaires. Il permet la

communication indirecte entre un tissu émetteur et un tissu cible *via* la diffusion de facteurs solubles tels que les **hormones** et les **cytokines**. Le réseau vasculaire est aussi impliqué dans la diffusion de composants de l'immunité : composants moléculaires (**cytokines pro- et anti-inflammatoires**, **système du complément** dont les **anaphylatoxines**) et cellulaires (**leucocytes**). Les cellules immunitaires, ou leucocytes, passent de la lymphe vers le sang et réciproquement pour être acheminées au plus près d'un site infectieux. En condition physiologique, l'endothélium ne permet pas l'adhérence des cellules immunitaires. Dans un contexte inflammatoire, les cellules endothéliales activées par des facteurs pro-inflammatoires comme l'IL-1 $\beta$  ou le TNF- $\alpha$  modifient leurs protéines de membrane et permettent l'adhérence des leucocytes sur l'endothélium et leur sortie du réseau vasculaire (Figure 3).



**Figure 3: recrutement des leucocytes circulants.** Sous l'effet de facteurs pro-inflammatoires, les cellules endothéliales activées modifient leur profil de protéines d'adhérence, permettant le **ralentissement** (1) et le **roulement** (2) des leucocytes sur l'endothélium. Les leucocytes sont activés (3) puis subissent une étape d'**adhérence forte** (4) et s'arrêtent sur l'endothélium (5) avant la **diapédèse** au cours de laquelle les leucocytes traversent l'endothélium (6) et sortent des vaisseaux pour migrer dans le tissu interstitiel (7). D'après Arseneau et Cominelli, 2015.

Le **recrutement des leucocytes circulants** se déroule en plusieurs phases. Suite à une étape initiale d'adhérence faible permettant le ralentissement des leucocytes, ces derniers roulent sur la surface de l'endothélium grâce à des interactions faibles entre **sélectines** (P-sélectine) (Bullard *et al.*, 1996 ; Ley et Reutershan, 2006). Puis la présence d'**intégrines** (ICAM-1) à la surface des cellules endothéliales provoque une adhérence forte des leucocytes qui s'immobilisent et adhèrent fermement à l'endothélium (Ley et Reutershan, 2006). Enfin survient la diapédèse au cours de laquelle les leucocytes traversent l'endothélium en passant entre ou à travers les cellules endothéliales avant de migrer dans le tissu interstitiel pour rejoindre le site inflammatoire (Feng *et al.*, 1998 ; Ley et Reutershan, 2006).

L'étroite communication entre le sang et la lymphe sert non seulement à la réponse immunitaire mais aussi à la **régulation du statut hydrique** de l'organisme. L'eau est répartie par osmose entre le sang, la lymphe et le tissu interstitiel selon les besoins de l'organisme.

#### 1.2.4. L'endothélium et l'hémostase

L'hémostase est un ensemble de processus contribuant à maintenir le sang dans le réseau vasculaire et empêcher une hémorragie. Pour cela, un **caillot sanguin** (ou **thrombus**) se forme (**thrombose**) avant d'être résorbé (**fibrinolyse**). Dans les conditions physiologiques, le sang est en contact direct avec les cellules endothéliales quiescentes. La face luminale des cellules endothéliales quiescentes est anticoagulante et ne permet pas l'adhérence des leucocytes et des plaquettes sanguines tandis que les macromolécules de la lame basale, synthétisées par les cellules endothéliales et les péricytes, sont fortement thrombogéniques. Lors d'une blessure, la rupture de l'endothélium permet au sang d'entrer en contact avec les macromolécules de la lame basale. Au cours de l'**hémostase primaire**, les plaquettes circulantes se fixent sur les fibres de collagène, la fibronectine et les laminines présentes dans la lame basale. L'**agrégation plaquettaire** est la première étape de la formation d'un caillot sanguin. Puis au cours de l'**hémostase secondaire** se produit la **cascade de coagulation** qui voit l'activation de nombreuses protéines plasmatiques appelées facteurs de coagulation parmi lesquels le facteur VIII. La cascade de coagulation permet la conversion de la protéine plasmatique **fibrinogène** en **fibrine polymérisée** qui renforce le caillot primitif mis en place pendant l'hémostase primaire. Lorsque

l'endothélium est réparé et que le caillot n'est plus nécessaire, ce dernier est dégradé par **fibrinolyse**. Le **plasminogène**, une pro-enzyme inactive, est activé en **plasmine** active par l'**activateur tissulaire du plasminogène (tPA)** et par l'**activateur du plasminogène de type urokinase (uPA)**, 2 enzymes protéolytiques sécrétées par les cellules endothéliales. La plasmine dégrade les fibres de fibrine permettant la dissolution du caillot sanguin. Un autre facteur clé impliqué dans le recrutement des plaquettes et la thrombose est le **facteur von Willebrand (vWF)**, une glycoprotéine stockée par les cellules endothéliales dans les **Corps de Weibel et Palade (WPBs)**, des compartiments de stockage spécifiques détaillés dans la partie **Corps de Weibel et Palade**. Une fois sécrété par les cellules endothéliales, le vWF stabilise le **facteur VIII de la coagulation (FVIII)** et forme de larges polymères sur lesquels se fixent les plaquettes, réalisant un pont moléculaire entre les plaquettes et les cellules endothéliales (Arnout *et al.*, 2006 ; Verhamme et Hoylaerts, 2006). Un déficit qualitatif ou quantitatif du vWF est à l'origine de la **maladie von Willebrand (VWD)**, une maladie génétique se traduisant par des troubles hémorragiques (Sadler *et al.*, 2006).

### 1.2.5. L'endothélium et la perméabilité vasculaire

Une dernière fonction de l'endothélium est de réguler les échanges entre le compartiment sanguin et les tissus. Cette fonction est intrinsèquement liée au type d'endothélium (continu, fenestré ou discontinu) décrit dans la partie **Endothélium**. On distingue traditionnellement une **perméabilité basale** qui se produit dans les capillaires, le principal site d'échange vasculaire, et une **perméabilité induite** associée à l'inflammation et qui se déroule essentiellement dans les veinules post-capillaires qui permettent l'extravasation des leucocytes. Alors que les **liquides** et les **petits solutés** passent facilement à travers l'endothélium par **diffusion passive** entre les cellules endothéliales, les macromolécules requièrent un **transport actif** par des **voies transcellulaires** ou **paracellulaires** (Minshall et Malik ; Aird, 2007a).

#### 1.2.5.1. La voie transcellulaire

Le transport transcellulaire met en jeu des invaginations de la membrane plasmique appelées **cavéoles** qui migrent à l'intérieur des cellules endothéliales et transportent les macromolécules du sang vers le tissu interstitiel. Structures caractéristiques des cellules endothéliales, les cavéoles sont des microdomaines de la membrane plasmique riches en



cholestérol et en glycosphingolipides et recouvertes sur leur face cytoplasmique par la **cavéoline-1** (Rothberg *et al.*, 1992). La phosphorylation de la cavéoline-1 déclenche le détachement des cavéoles de la membrane plasmique et leur endocytose. Les cavéoles migrent dans les cellules endothéliales du pôle apical vers le pôle basolatéral avant de fusionner avec la membrane basolatérale et d'être libérées par exocytose dans le tissu interstitiel sous-jacent. La transcytose peut être incomplète, certaines cavéoles n'atteignant pas la membrane basolatérale mais rejoignant d'autres compartiments intracellulaires. Bien que la perméabilité vasculaire pour les liquides et les petits solutés soit légèrement supérieure dans les endothéliums fenestrés que dans les endothéliums continus, le transport transcellulaire des macromolécules est similaire entre ces 2 types d'endothéliums. Dans les endothéliums discontinus, les liquides, les petits solutés et les macromolécules diffusent directement *via* les larges pores entre les cellules endothéliales.

#### 1.2.5.2. La voie paracellulaire

Dans les conditions physiologiques, les jonctions inter-endothéliales sont imperméables aux macromolécules dans les endothéliums de type continu et fenestré. Les **jonctions serrées** entre cellules endothéliales voisines et les **jonctions adhérentes** entre les cellules endothéliales et la lame basale forment une barrière infranchissable pour les macromolécules. Dans des contextes pathologiques comme l'inflammation ou l'angiogenèse tumorale, de nombreux facteurs tels que l'histamine, la thrombine, les cytokines pro-inflammatoires ou le VEGF induisent une rétraction des cellules endothéliales, élargissant l'espace entre les cellules endothéliales et permettant ainsi la diffusion des liquides, des petits solutés et des protéines plasmatiques. Le dysfonctionnement de la barrière endothéliale conduit à une extravasation anormale des liquides et des macromolécules générant des **œdèmes** (Féléto *et al.*, 1996 ; van Hinsbergh, 1997 ; Michel et Curry, 1999 ; Féléto *et al.*, 2001 ; Féléto *et al.*, 2003). Les œdèmes se produisent lorsque la sortie du plasma des vaisseaux sanguin excède sa réabsorption par le réseau sanguin et les capacités de résorption par la circulation lymphatique drainant le tissu interstitiel impacté.

### 1.3. La formation du réseau vasculaire sanguin

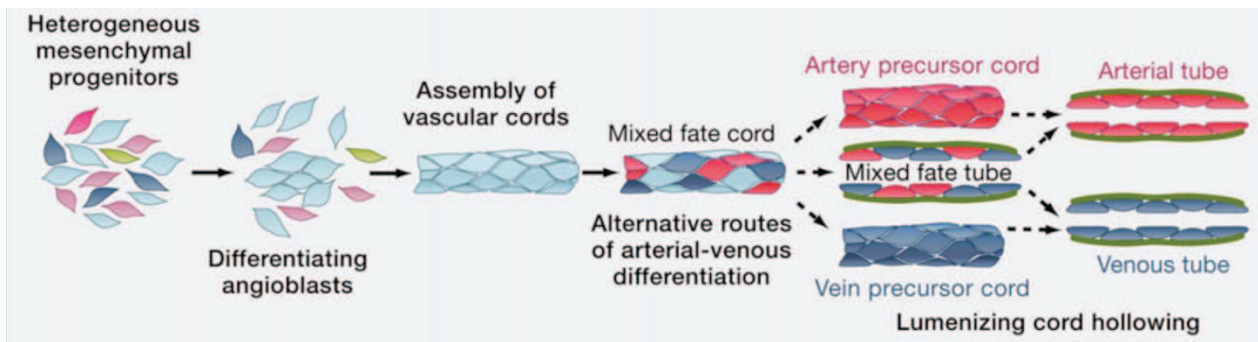
Le système cardiovasculaire est la première structure à se mettre en place pendant le développement embryonnaire. Le **mésoderme** donne naissance à un précurseur commun

aux cellules sanguines et aux cellules endothéliales appelé **hémangioblaste**. L'hémangioblaste prolifère puis se différencie en cellule souche hématopoïétique ou en progéniteur des cellules endothéliales appelé **angioblaste**. Les cellules souches hématopoïétiques donneront les cellules sanguines (érythrocytes, leucocytes, mégacaryocytes) tout au long de la vie de l'individu tandis que les angioblastes se différencient en cellules endothéliales. Le réseau vasculaire primitif est mis en place pendant le développement embryonnaire à partir des angioblastes par un mécanisme appelé **vasculogenèse** (Swift et Weinstein, 2009). Ce réseau primitif est ensuite remodelé par un autre mécanisme appelé **angiogenèse** (Adams et Alitalo, 2007).

### 1.3.1. La vasculogenèse

La vasculogenèse est un mécanisme biologique par lequel les vaisseaux sanguins sont formés *de novo*. Ce processus se produit en premier dans le **sac vitellin** puis dans l'**embryon** lui-même. Un précurseur commun aux lignées endothéliales et hématopoïétiques, l'**hémangioblaste**, apparaît dans le **mésoderme** embryonnaire et prolifère pour former des amas de cellules appelés **îlots sanguins**. Les cellules des îlots sanguins se différencient pour donner les progéniteurs des cellules endothéliales à la périphérie (**angioblastes**) et les progéniteurs des cellules sanguines au centre des îlots (cellules souches hématopoïétiques) (Sumpio *et al.*, 2002 ; Suburo et d'Amore, 2006 ; Tirziu et Simons, 2009). Les angioblastes sont définis comme un type cellulaire ayant le potentiel de se différencier en cellules endothéliales mais qui n'exprime pas encore tous les marqueurs caractéristiques de cette lignée. Puis la fusion de plusieurs îlots sanguins et la différenciation des angioblastes en cellules endothéliales permettent la formation de vaisseaux pleins qui se creusent d'une lumière pour former un **plexus vasculaire primitif** (Figure 4).





**Figure 4: formation d'un réseau vasculaire primitif par vasculogénèse.** Les hémangioblastes se différencient en angioblastes qui prolifèrent et se différencient à leur tour en cellules endothéliales spécifiées vers un phénotype artériel ou veineux. Les cellules endothéliales forment des cordons qui se creusent d'une lumière pour former un réseau vasculaire primitif composé d'artères et de veines. D'après Potente et al., 2011.

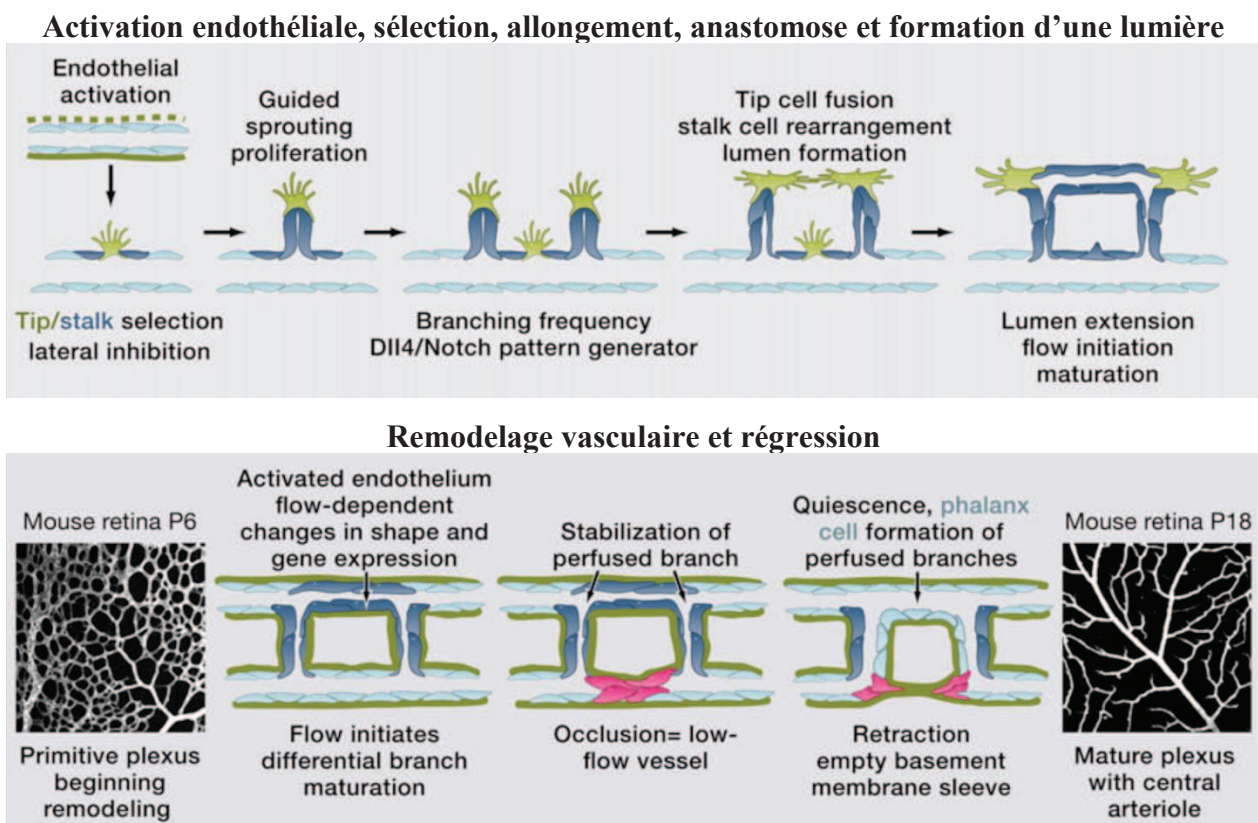
S'il est traditionnellement considéré que la vasculogénèse se produit uniquement pendant la vie embryonnaire, certains auteurs avancent l'hypothèse d'une « **vasculogénèse post-natale** », notamment grâce à la découverte relativement récente de **progéniteurs circulants des cellules endothéliales (EPCs)** (Carmeliet, 2003 ; Timmermans *et al.*, 2009).

### 1.3.2. L'angiogénèse

L'angiogénèse est un processus aboutissant à la mise en place de nouveaux vaisseaux sanguins à **partir du réseau préexistant** (Adams et Alitalo, 2007). Au cours du développement, l'angiogénèse permet de **remodeler le plexus vasculaire primitif** mis en place pendant la vasculogénèse. Dans les premières années de vie après la naissance, l'angiogénèse physiologique permet de **développer le réseau vasculaire** pour répondre aux besoins grandissants des organes en croissance. Chez l'adulte, l'angiogénèse est impliquée dans les mécanismes de **réparation et régénération tissulaire** ainsi que dans le **cycle menstruel** féminin. Cependant, une angiogénèse dérégulée peut se produire au cours de certaines **pathologies** telles que les cancers, les rétinopathies ou l'arthrite rhumatoïde (Carmeliet, 2003). L'angiogénèse étant une thématique centrale de cette thèse, ses aspects sont développés plus en détails dans la partie **Angiogénèse**.

## 2. L'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus biologique aboutissant à la mise en place de nouveaux vaisseaux par remodelage du réseau préexistant. Sous l'effet de facteurs pro-angiogéniques, l'angiogenèse se déroule en plusieurs étapes jusqu'à la disparition des *stimuli* pro-angiogéniques et la maturation des nouveaux vaisseaux (Figure 5). On distingue traditionnellement 2 mécanismes : l'**angiogenèse par bourgeonnement** (« sprouting ») et l'**angiogenèse par intussusception**. Dans le premier cas, les nouveaux vaisseaux se forment par l'apparition d'excroissances sur les vaisseaux préexistants alors que dans le second mécanisme, les nouveaux vaisseaux se forment par la division et l'invagination des vaisseaux préexistants (Makanya *et al.*, 2009 ; Potente *et al.*, 2011 ; Carmeliet et Jain, 2011a). Néanmoins, le type d'angiogenèse le plus connu et présenté dans cette thèse est celui par bourgeonnement.



**Figure 5 : remodelage d'un réseau vasculaire préexistant par angiogenèse.** Suite à l'activation endothéliale, les cellules endothéliales activées subissent un processus de sélection et acquièrent un phénotype de cellule leader (« tip cell ») ou de cellule de soutien (« stalk cell »). La migration des « tip cells » et la prolifération des « stalk cells » permettent la formation de nouvelles branches vasculaires qui fusionnent et s'anastomosent. Le retour du

*flux sanguin permet de creuser une lumière dans les vaisseaux qui subissent ensuite une étape de maturation et de stabilisation permise par la déposition d'une nouvelle lame basale et le recrutement des péricytes. Le flux sanguin est un élément déterminant pour réguler la stabilisation ou la régression des néo-vaisseaux. D'après Potente et al., 2011.*

Cette partie a pour but de décrire les principaux facteurs pro-angiogéniques, les étapes de l'angiogenèse physiologique, la dérégulation de l'angiogenèse survenant dans des contextes pathologiques et les modèles d'étude de l'angiogenèse.

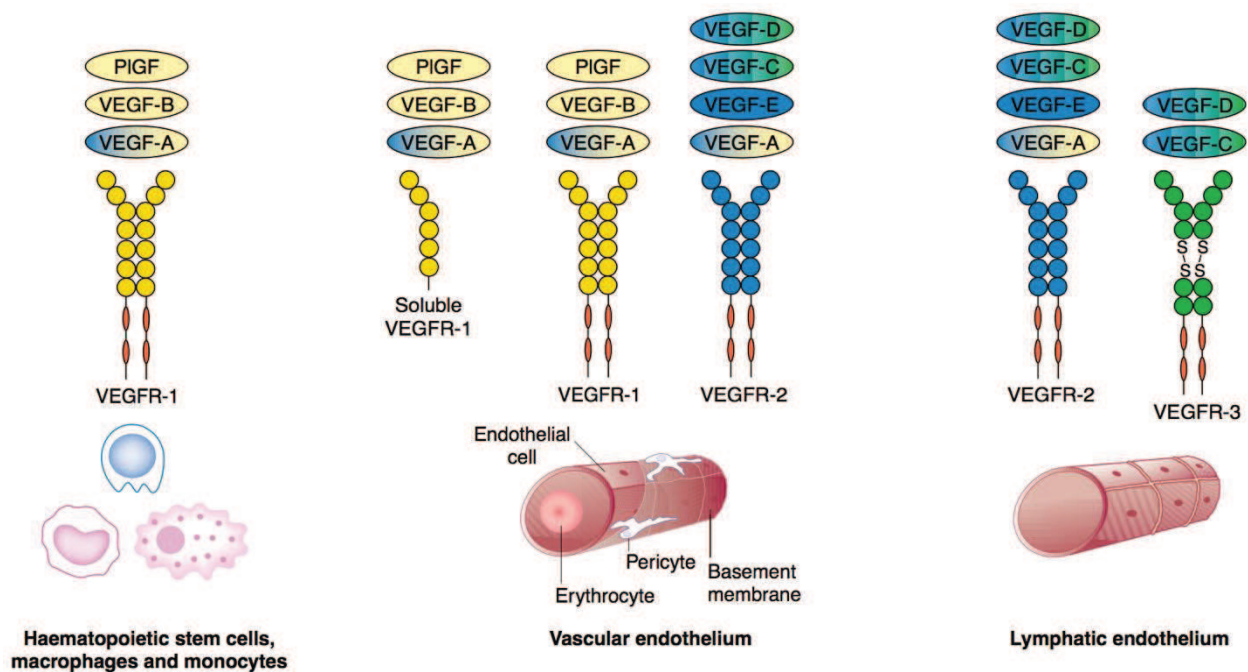
## 2.1. Les facteurs pro-angiogéniques

Les principaux facteurs pro-angiogéniques sont des **cytokines**, des protéines solubles synthétisées par les cellules d'un tissu pour modifier le fonctionnement d'autres cellules. Ce sont des molécules de communication intercellulaire fonctionnant *via* des interactions spécifiques de type ligand-récepteur. Elles peuvent agir selon (1) un mode **endocrine** avec passage dans la circulation pour atteindre des cellules cibles distantes, (2) un mode **paracrine** entre cellules proches, (3) un mode **juxtacrine** entre cellules en contact ou (4) un mode **autocrine** dans lequel la cellule émettrice est aussi la cellule cible. Les principaux facteurs pro-angiogéniques impliqués au cours de l'angiogenèse sont le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le système Angiopoïétine/Tie, le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Ucuzian *et al.*, 2010), certains de ces facteurs étant aussi impliqués dans l'inflammation.

### 2.1.1. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)

Il s'agit en réalité d'une famille de **5 glycoprotéines** structurellement proches : les **VEGF-A**, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le facteur de croissance placentaire (PlGF) (Koch et Claesson-Welsh, 2012). Le plus connu est le VEGF-A, initialement décrit comme le facteur de perméabilité vasculaire (VPF) par l'équipe de Senger en 1983. Il existe 6 isoformes du VEGF-A générées par épissage alternatif du même ARNm et qui varient par le nombre d'acides aminés : les VEGF-A<sub>121</sub>, VEGF-A<sub>145</sub>, **VEGF-A<sub>165</sub>**, VEGF-A<sub>183</sub>, VEGF-A<sub>189</sub>, et le VEGF-A<sub>206</sub> (Robinson et Stringer, 2001). Ces isoformes diffèrent par la présence ou l'absence de séquences codées par les exons 6 et 7 du gène situé sur le chromosome 6 chez l'Homme. Les

VEGF peuvent se lier sur **3 récepteurs à activité tyrosine kinase** : les VEGFR-1 (FLT-1), **VEGFR-2 (FLK-1, KDR, CD309)** et le VEGFR-3 (FLT-4). Comme la plupart des récepteurs à activité tyrosine kinase, la liaison du VEGF sur le VEGFR provoque l'**homo- ou hétérodimérisation du récepteur** et son changement de conformation rendant accessible le site de fixation de l'ATP dans les domaine kinase intracellulaires. Les domaines tyrosine kinase peuvent alors être **auto- ou transphosphorylés** sur les résidus tyrosine et activer les voies de signalisation en aval. Les récepteurs au VEGF sont exprimés par des types cellulaires différents et jouent ainsi un rôle dans plusieurs processus biologiques (Figure 6).

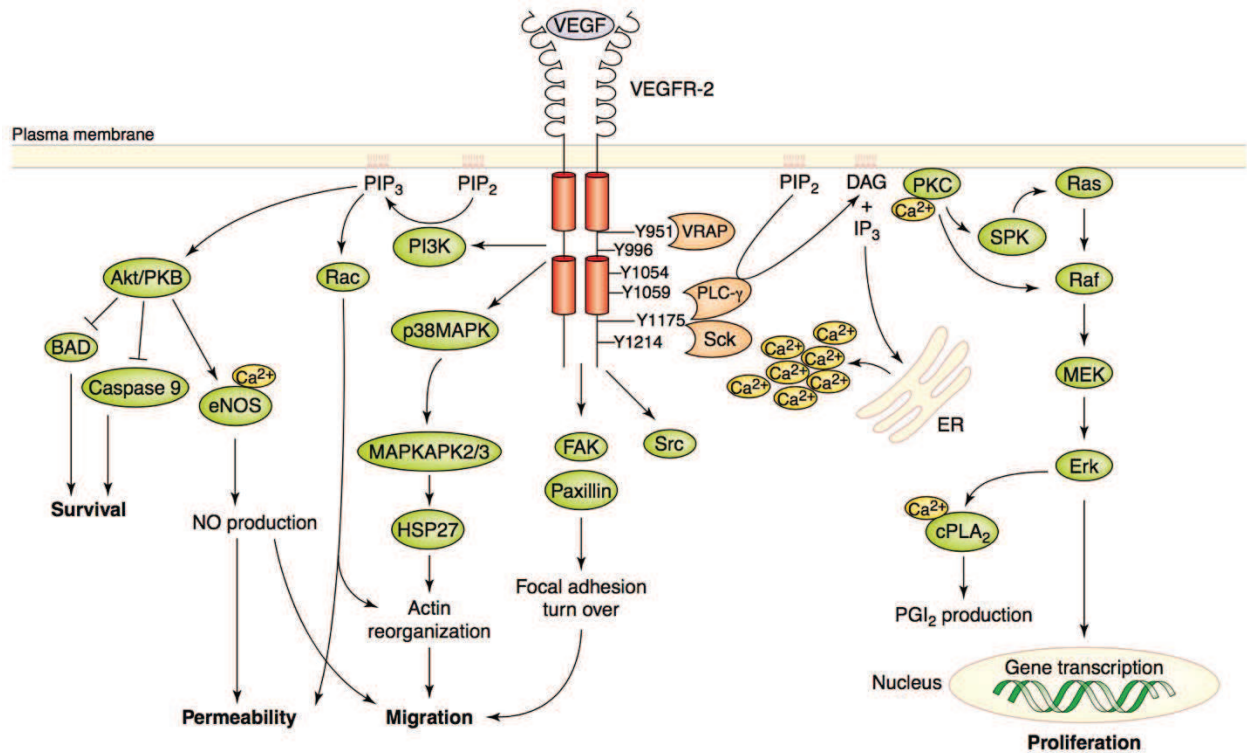


**Figure 6 : profil d'expression des VEGFR par différents types cellulaires.** Les VEGFR sont exprimés par différents types cellulaires expliquant leurs effets biologiques variés. Le VEGFR-2, exprimé par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques, est impliqué dans l'angiogenèse (formation des vaisseaux sanguins) et la lymphangiogenèse (formation des vaisseaux lymphatiques). Toutes les isoformes du VEGF-A se lient au VEGFR-2. D'après Cross et al., 2003.

Au cours de l'angiogenèse, la signalisation du VEGF passe essentiellement par le couple VEGF-A<sub>165</sub>/VEGFR-2 (Robinson et Stringer, 2001 ; Cross et al., 2003 ; Ucuizian et al., 2010 ; Koch et Claesson-Welsh, 2012). Le VEGF a de multiples effets sur les cellules endothéliales *via* le VEGFR-2 (Figure 7). Il favorise la **survie**, la **migration** et la **prolifération** des cellules endothéliales. De plus, il augmente la **perméabilité vasculaire**



et la **fenestration** de l'endothélium, d'où la première fonction qui lui avait été attribuée de facteur de perméabilité vasculaire (VPF).



**Figure 7 : voies de signalisation du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales.** Dans les cellules endothéliales, les effets du VEGFR-2 activé par la fixation du VEGF-A passent par plusieurs voies de signalisation. Au cours de l'angiogenèse, le VEGF joue un rôle majeur en favorisant la prolifération et la migration des cellules endothéliales. D'après Cross et al., 2003.

Les tissus ont besoin d'un apport suffisant en nutriments et en O<sub>2</sub> pour pouvoir maintenir leur fonctionnement voire assurer leur croissance. Cet apport est assuré par le sang. Mais si le réseau vasculaire n'est pas assez développé ou efficace, les tissus sont insuffisamment oxygénés (hypoxie) et envoient alors des signaux pro-angiogéniques perçus par les cellules endothéliales. Ces *stimuli* pro-angiogéniques sont le point de départ de l'angiogenèse qui permet le remodelage du réseau vasculaire pour répondre aux besoins des tissus. L'expression du VEGF est fortement et rapidement augmentée dans les tissus hypoxiques. Le promoteur du gène codant pour le VEGF contient un **élément de réponse à l'hypoxie (HRE)** capable de lier le facteur induit par l'hypoxie (HIF) et d'activer la transcription du gène codant pour le VEGF (Robinson et Stringer, 2001).

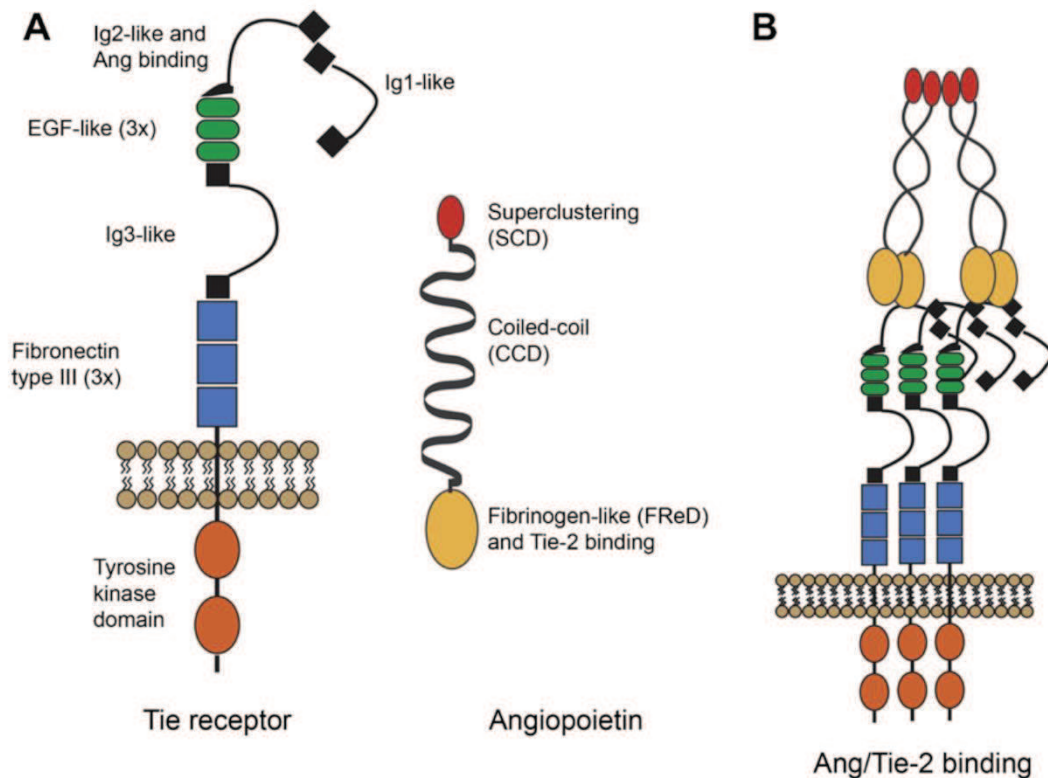
### 2.1.2. Le système Angiopoïétines/Tie

Le système Angiopoïétines/Tie est un ensemble de protéines régulant le **développement vasculaire** et la **stabilité des vaisseaux sanguins**, les angiopoïétines étant les ligands des récepteurs Tie (Fagiani et Christofori, 2013). Il existe 4 angiopoïétines, les **angiopoïétine-1 à 4 (Ang-1, Ang-2, Ang-3 et Ang-4)**, 7 protéines angiopoïétine-like (Angptl-1 à 7) et 2 récepteurs Tie, les récepteurs **Tie-1** et **Tie-2**. Tie-1 est un récepteur orphelin sans ligand connu mais capable de s'hétérodimériser avec Tie-2 et de modifier l'activité de ce dernier. Les molécules angiopoïétine-like ne se fixent pas sur Tie-1 et Tie-2 mais partagent la structure des angiopoïétines et peuvent présenter des propriétés pro-angiogéniques (Augustin *et al.*, 2009).

La structure de ces récepteurs et de ces ligands est présentée dans la Figure 8A. La **partie extracellulaire** des récepteurs Tie (N-terminale) est composée de **2 motifs immunoglobulines** suivis de **3 domaines homologues à l'EGF**, d'un autre **motif immunoglobuline** et de **3 répétitions de type fibronectine type III**. Une **partie transmembranaire** relie la partie extracellulaire à la **partie intracellulaire** contenant un **domaine catalytique tyrosine kinase** (C-terminal) responsable de la transduction du signal. Les angiopoïétines sont des **glycoprotéines sécrétées** d'environ **70 kDa** se liant au 2<sup>e</sup> motif immunoglobuline du récepteur Tie-2, permettant ainsi l'activation de Tie-2 et indirectement de Tie-1 lorsqu'il est associé à Tie-2 dans les hétérodimères Tie-1/Tie-2 (Saharinen *et al.*, 2005 ; Barton *et al.*, 2006). Les angiopoïétines sont composées d'un **domaine SCD** (Super-Clustering Domain) en N-terminal, d'un **domaine central CCD** (Coiled-Coil Domain ou domaine en bobine enroulée) responsable de l'homologomérisation du ligand, d'une **région de liaison** et d'un **domaine FReD** (Fibrinogen-Related Domain) en C-terminal nécessaire à la fixation du ligand sur Tie-2 (Davis *et al.*, 1996 ; Procopio *et al.*, 1999).

La Figure 8B présente les modalités de fixation des angiopoïétines sur Tie-2. Le domaine CCD permet à l'Ang-1 et l'Ang-2 de se complexer en **dimères**, **trimères** et **tétramères** (Davis *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2005). Par la suite, l'Ang-1 s'assemble avec d'autres Ang-1 pour former des **multimères encore plus complexes** *via* son domaine SCD (Kim *et al.*, 2005). Pour activer Tie-2, l'Ang-1 doit se présenter sous forme de tétramère ou de multimères d'ordre supérieur, alors que des formes oligomériques de l'Ang-2

(inférieures au tétramère) suffisent à sa fixation sur Tie-2. Selon le contexte, l'Ang-2 peut agir comme un agoniste de Tie-2 ou comme un antagoniste de l'activation de Tie-2 induite par l'Ang-1. La fixation des multimères de l'Ang-1 induit la multimérisation de Tie-2 permettant la phosphorylation croisée des tyrosines intracellulaires et l'activation des voies de signalisation en aval.



**Figure 8: structure et interaction des récepteurs et des ligands du système Angiopoïétines/Tie.** (A) Structure des récepteurs Tie et des ligands angiopoïétines. Les récepteurs Tie-1 et Tie-2 présentent une grande homologie et sont organisés en domaines fonctionnels de type immunoglobuline, EGF et fibronectine type III. Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase. Les angiopoïétines contiennent des domaines permettant à la fois l'homomultimérisation de l'Ang-1 et de l'Ang-2 et la fixation des multimères sur Tie-2. (B) Interaction ligand-récepteur. Seuls les multimères de l'Ang-1 et de l'Ang-2 peuvent activer Tie-2 en induisant la multimérisation du récepteur pour permettre la trans-phosphorylation des tyrosines et l'activation des voies de signalisation intracellulaires. D'après Fagiani et al., 2013.

Les acteurs du système Angiopoïétines/Tie sont essentiels pour le développement et la maturation du réseau vasculaire. Les **souris KO Tie-1** présentent une angiogenèse normale mais une instabilité des vaisseaux provoquant des œdèmes et des hémorragies. Les souris meurent à partir du jour embryonnaire E13.5 (Puri et al., 1995). Des données

chez des souris KO Tie-1 dans les cellules endothéliales suggèrent que Tie-1 ne serait pas nécessaire pour la différenciation des angioblastes mais serait indispensable pour soutenir l'angiogenèse et la prolifération des cellules endothéliales pendant les étapes plus tardives du développement vasculaire (Partanen *et al.*, 1996). L'inhibition de Tie-2 est plus sévère encore puisque les **souris KO Tie-2** meurent entre les jours embryonnaires E9.5 et E12.5 (Dumont *et al.*, 1994 ; Sato *et al.*, 1995 ; Suri *et al.*, 1996). Le réseau vasculaire primitif est mal organisé, les vaisseaux contiennent peu de cellules endothéliales, de ramifications et manquent de péricytes. L'hématopoïèse et le développement de l'endocarde sont aussi affectés (Sato *et al.*, 1995). Ainsi, Tie-2 ne serait pas nécessaire pour la vasculogenèse mais serait indispensable pour la prolifération et la survie des cellules endothéliales (Dumont *et al.*, 1994). Les **souris KO Ang-1** meurent entre les jours embryonnaires E11.5 et E12.5 avec un phénotype proche de celui des souris KO Tie-2 : des vaisseaux dilatés traduisant un manque de péricytes et un réseau vasculaire peu ramifié (Suri *et al.*, 1996). A l'inverse, des études ont montré que les **souris surexprimant l'Ang-1** dans la peau présentent de plus larges vaisseaux contenant davantage de cellules endothéliales et un excès de péricytes (Thurston *et al.*, 1999). Ce qui démontre que l'Ang-1 est nécessaire pour la survie et la prolifération des cellules endothéliales ainsi que pour la maturation des vaisseaux sanguins qui s'accompagne du recrutement des péricytes. Des études chez des **souris surexprimant l'Ang-1 et le VEGF-A** suggèrent que ces 2 molécules régulent différentes étapes de l'angiogenèse, le VEGF intervenant plus précocement en favorisant le bourgeonnement des vaisseaux (« sprouting ») et leur croissance tandis que l'Ang-1 intervient plus tardivement en régulant le remodelage et la maturation des vaisseaux (Thurston *et al.*, 1999). Le KO Ang-2 n'est pas létal pendant le développement embryonnaire mais selon le fond génétique des animaux, les **souris KO Ang-2** meurent dans les 2 premières semaines après la naissance (souche 129) ou se développent normalement jusqu'à l'âge adulte avec une faible mortalité (souche C57Bl/6) (Gale *et al.*, 2002 ; Fiedler *et al.*, 2006). A l'inverse, les **souris surexprimant Ang-2** meurent entre les jours embryonnaires E9.5 et E10.5 (Maisonpierre *et al.*, 1997 ; Veikkola et Alitalo, 2002).

L'**Ang-1** est majoritairement exprimée par les **péricytes**, les **fibroblastes** et les **cellules tumorales** (Davis *et al.*, 1996 ; Kim *et al.*, 2000 ; Xu et Yu, 2001). Son expression par les péricytes est augmentée par l'hypoxie, le VEGF-A et le PDGF-B (Park *et al.*, 2003 ; Nishishita et Lin, 2004). L'**Ang-2** est exprimée par les **cellules endothéliales** et son expression est régulée au niveau transcriptionnel par l'hypoxie et le VEGF-A (Mandriota et



Pepper, 1998; Oh *et al.*, 1999). L'Ang-2 est peu voire non exprimée dans le réseau vasculaire quiescent mais son expression est très fortement augmentée lorsque l'endothélium est activé au cours de l'angiogenèse (Maisonpierre *et al.*, 1997, Augustin *et al.*, 2009). La protéine produite par les cellules endothéliales est stockée dans des compartiments cytoplasmiques spécifiques de ce type cellulaire, les **Corps de Weibel et Palade (WPBs)**. Elle peut être rapidement libérée par exocytose des WPBs en réponse à divers *stimuli* comme la thrombine ou l'histamine (Fiedler *et al.*, 2004). L'Ang-2 sécrétée par les cellules endothéliales déstabilise l'endothélium par une signalisation **autocrine** et cet effet peut être contré par l'Ang-1. L'Ang-2 agit comme un **antagoniste** de l'Ang-1 en inhibant sa liaison sur Tie-2, perturbant ainsi la signalisation du complexe Ang-1/Tie-2 (Yuan *et al.*, 2009). Enfin, les effets de l'Ang-2 peuvent être très différents selon le contexte. Ainsi, l'Ang-2 induit une **régression des vaisseaux sanguins** en absence de VEGF mais **favorise l'angiogenèse** en présence de VEGF (Hanahan, 1997).

### 2.1.3. Les autres facteurs pro-angiogéniques

D'autres *stimuli* pro-angiogéniques sont le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), le facteur de croissance transformant  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) ou encore le facteur de nécrose tumorale  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Certains d'entre eux présentent à la fois des propriétés pro-angiogéniques et pro-inflammatoires, l'angiogenèse et l'inflammation étant impliquées dans la déstabilisation des vaisseaux sanguins.

#### 2.1.3.1. Le facteur de croissance des fibroblastes (FGF)

Il existe de nombreuses formes du FGF dont deux sont très impliquées dans l'angiogenèse : le **FGF-1 (ou FGF acide, aFGF)** et le **FGF-2 (ou FGF basique, bFGF)**, chacun pouvant se lier sur 2 récepteurs, les **FGFR-1** et **FGFR-2** (Gerwins *et al.*, 2000). Si le FGF est retenu dans la matrice extracellulaire et protégé de la dégradation par les protéoglycanes matriciels, son expression peut aussi être induite pendant l'angiogenèse (Ucuzian *et al.*, 2010). Au cours de l'angiogenèse, la signalisation du FGF passe essentiellement par la fixation du bFGF sur le FGFR-1. Le bFGF favorise la **migration** des cellules endothéliales *in vitro* et augmente la **synthèse du VEGF**. De plus, il est capable d'induire la **synthèse de collagène, de fibronectine et de protéoglycanes** par les cellules endothéliales, ce qui

souligne son implication dans le remodelage de la matrice extracellulaire au cours de l'angiogenèse.

### 2.1.3.2. Le facteur de croissance transformant $\beta$ (TGF- $\beta$ )

La famille du TGF- $\beta$  comprend une trentaine de facteurs de croissance sécrétés sous une forme inactive activée par protéolyse (Ucuzian *et al.*, 2010). Son rôle est relativement ambigu puisqu'il est impliqué dans l'angiogenèse mais aussi dans la différenciation des péricytes et la stabilisation des vaisseaux. Il favorise la **formation de la lame basale** et augmente l'expression du **récepteur aux intégrines** (Collo et Pepper, 1999), nécessaire pour la migration des « tip cells ». Bien que des données *in vitro* ont montré que le TGF- $\beta$  peut inhiber l'angiogenèse dans certaines conditions (Sankar *et al.*, 1996), son rôle *in vivo* dans le **recrutement de cellules immunitaires** sécrétrices de facteurs pro-angiogéniques et son implication dans plusieurs voies de signalisation de l'angiogenèse peuvent expliquer ses effets pro-angiogéniques (Kim *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2003).

### 2.1.3.3. Le facteur de nécrose tumorale $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )

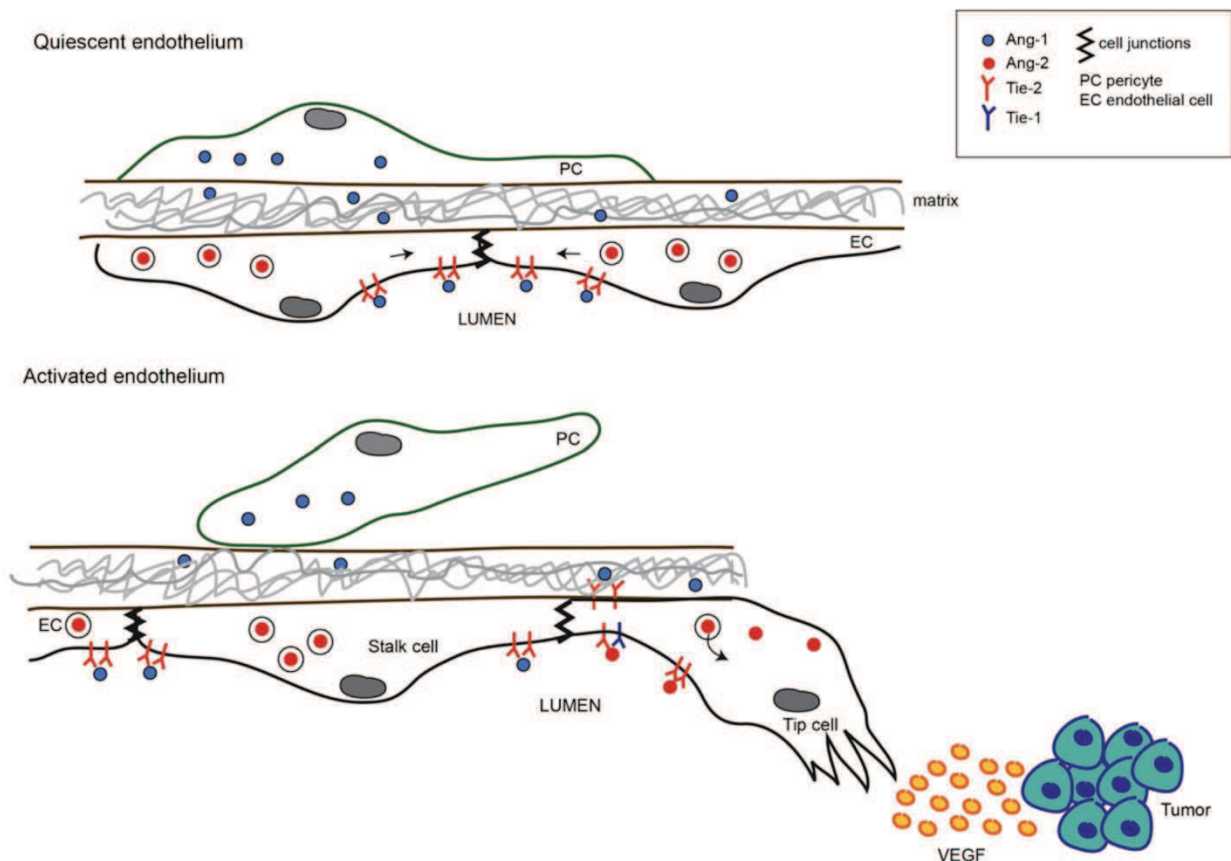
Le TNF- $\alpha$  est une **cytokine pro-inflammatoire** jouant un **rôle indirect dans l'angiogenèse** en favorisant la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par d'autres types cellulaires. Il est aussi impliqué dans la différenciation des cellules endothéliales (Klagsbrun et d'Amore, 1991).

## 2.2. Les étapes de l'angiogenèse

Chez l'adulte sain, le réseau vasculaire est stable et l'endothélium quiescent (Potente *et al.*, 2011). Pour remodeler ce réseau, les vaisseaux doivent être déstabilisés. L'**activation endothéliale** est la première étape de l'angiogenèse au cours de laquelle les cellules endothéliales passent du phénotype quiescent à un phénotype activé permettant de déstabiliser l'endothélium. Les étapes suivantes sont la **sélection** des « tip cell » et des « stalk cell », le **bourgeonnement** (« sprouting »), l'**allongement** des nouvelles branches, la **fusion** de plusieurs branches adjacentes (**anastomose** ou **inosculation**), et enfin la **maturation** et le **retour à la quiescence** de l'endothélium s'accompagnant de la **stabilisation** des nouveaux vaisseaux (Potente *et al.*, 2011).

### 2.2.1. L'activation endothéliale

L'activation endothéliale est un évènement **transitoire** qui se produit lorsque les cellules endothéliales doivent modifier leur phénotype pour répondre aux *stimuli* émis par les tissus environnants. Elle est abondamment documentée dans les **contextes inflammatoires** au cours desquels les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhérence permettant l'extravasation des leucocytes ou changent de forme pour augmenter la perméabilité vasculaire et permettre la diffusion de protéines plasmatiques dans le tissu interstitiel. L'activation endothéliale est par ailleurs l'**étape la plus précoce de l'angiogenèse** (Potente *et al.*, 2011 ; Fagiani *et al.*, 2013). Chez l'adulte sain, les cellules endothéliales sont quiescentes et reçoivent des signaux de survie tels que le VEGF, l'Ang-1 et le FGF (Fagiani *et al.*, 2013). Elles forment une monocouche de cellules associées entre elles par des interactions moléculaires mettant en jeu la VE-cadhérine et les protéines des jonctions serrées (Cavallaro et Dejana, 2011 ; Carmeliet et Jain, 2011a). Cette monocouche est stabilisée par des péricytes qui inhibent la prolifération des cellules endothéliales et leur fournissent des signaux de survie (VEGF et Ang-1) (Carmeliet et Jain, 2011a). La lame basale est produite à la fois par les cellules endothéliales et les péricytes pour réguler la perméabilité vasculaire et maintenir l'intégrité des vaisseaux (Carmeliet et Jain, 2011a). Sous l'effet de *stimuli* environnementaux tels que le VEGF libéré par les **tissus hypoxiques**, les cellules endothéliales passent du **phénotype quiescent** à un **phénotype activé** (Figure 9).



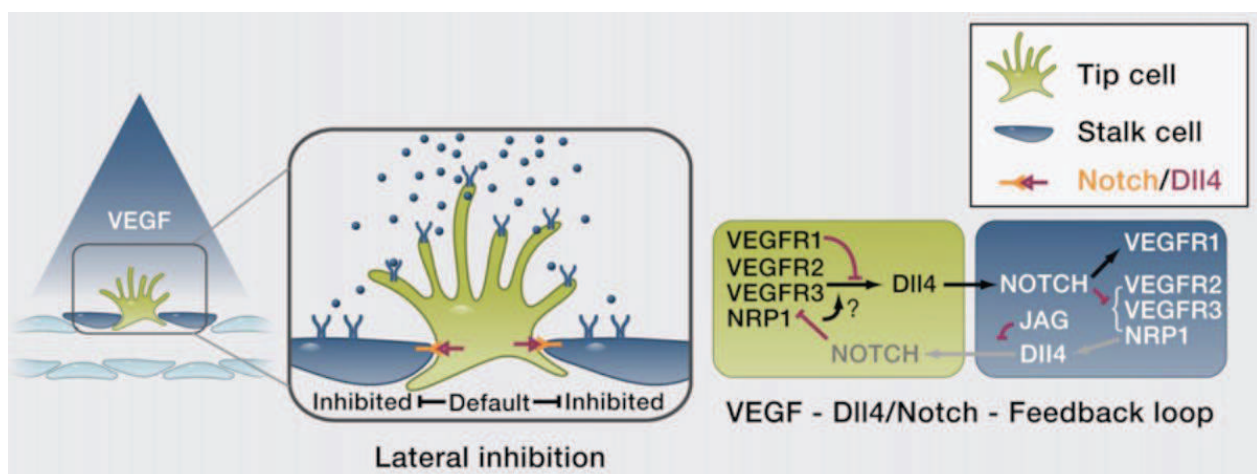
**Figure 9 : système Angiopoïétines/Tie et déstabilisation de l'endothélium.** L'endothélium quiescent est recouvert par des péricytes qui sécrètent de l'Ang-1. L'Ang-1, via l'activation de Tie-2, favorise la survie des cellules endothéliales et la stabilisation des vaisseaux. L'hypoxie et le VEGF induisent la sécrétion de l'Ang-2 qui se fixe sur Tie-2, bloquant la signalisation Ang-1/Tie-2 et provoquant le détachement des péricytes. D'après Fagiani et al., 2013.

Le VEGF induit une **augmentation de l'expression et de la sécrétion de l'Ang-2**, ainsi qu'une **augmentation de la perméabilité vasculaire** par déstabilisation des jonctions entre les cellules endothéliales (Carmeliet et Jain, 2011a). L'Ang-2 sécrétée provoque à la fois le **détachement des péricytes** de l'endothélium et le **blocage de la signalisation Ang-1/Tie-2** dans les cellules endothéliales (Augustin et al., 2009 ; Huang et al., 2010 ; Carmeliet et Jain, 2011a). De son côté, l'augmentation de la perméabilité vasculaire permet la diffusion de macromolécules, notamment de protéases matricielles comme les **métalloprotéinases (MMPs)** qui dégradent la lame basale, facilitant ainsi l'invasion du tissu interstitiel par les cellules endothéliales activées (Carmeliet et Jain, 2011a). Les vaisseaux n'étant plus recouverts de péricytes, les cellules endothéliales ne reçoivent plus de signaux de survie et leur prolifération n'est plus inhibée. Si les cellules endothéliales meurent dans ces conditions en l'absence de VEGF (régession vasculaire),

l'abondance de VEGF pendant l'angiogenèse favorise la **migration** et la **prolifération** des cellules endothéliales activées (Hanahan, 1997).

### 2.2.2. La sélection des « tip cells » et des « stalk cells »

Libérées des péricytes et de la rigidité de la lame basale, les cellules endothéliales activées peuvent migrer et proliférer pour former de nouvelles branches vasculaires. Les tissus hypoxiques créent un **gradient de VEGF** agissant comme un facteur chimiotactique qui attire les cellules endothéliales et guide la formation des nouveaux vaisseaux. Une **sélection** se met en place entre les cellules endothéliales activées, spécifiant les « **tip cells** » (cellules leader) et les « **stalk cells** » (cellules de soutien). La spécification des cellules endothéliales vers un phénotype transitoire de « tip cell » ou de « stalk cell » est contrôlée par la **voie de signalisation Notch** et une **boucle de rétrocontrôle** (Phng et Gerhardt, 2009 ; Eilken et Adams, 2010) (Figure 10).



**Figure 10 : boucle de rétrocontrôle déterminant les phénotypes « tip cell » et « stalk cell ».** La stimulation du VEGFR-2 par le VEGF-A induit l'expression de Dll-4 par les tip-cells. Dll-4 active Notch-1 dans les « stalk cells » et cette activation inhibe l'expression du VEGFR-2. Les « tip cells » sont très sensibles au gradient de VEGF et étendent des filopodes pour migrer tandis que les « stalk cells » sont moins sensibles au VEGF et prolifèrent. D'après Potente et al., 2011.

L'activation du VEGFR-2 par le VEGF-A induit une forte expression du ligand de Notch **Dll-4** dans les cellules endothéliales activées (Thurston et al., 2007). Les cellules qui expriment le plus rapidement ou la plus grande quantité de Dll-4 prennent un avantage sélectif sur les autres cellules et deviennent des « tip cells ». Elles exercent une **inhibition**

**latérale** sur les cellules voisines qui ne peuvent pas devenir des « tip cells » et deviennent des « stalk cells ». L'activation de **Notch-1** par Dll-4 inhibe l'expression de plusieurs gènes dans les « stalk cells », notamment le gène codant pour le VEGFR-2, rendant ces cellules moins sensibles au gradient de VEGF. Les « stalk cells » expriment **Jag-1**, un autre ligand de Notch-1, qui inhibe l'effet de Dll-4 pour maintenir l'expression du VEGFR-2 dans les « stalk cells ». Si les « tip cells » prolifèrent peu, elles étendent des **filopodes** et **migrent** en suivant le gradient de VEGF. Les filopodes fonctionnent comme de véritables capteurs détectant des **signaux attirants** ou **repoussants** pour guider la migration des « tip cells ». Des données suggèrent que la migration des « tip cells » peut mettre en jeu une **signalisation Tie-indépendante de l'Ang-2** via l'activation des **intégrines  $\alpha v \beta 3$**  et  **$\alpha 5 \beta 1$**  (Thomas et Augustin, 2009 ; Felcht *et al.*, 2012 ; Fagiani et Christofori, 2013). Les stalks cells ne forment pas de filopodes et ne migrent pas mais sont capables de **proliférer**, de **former une lumière vasculaire**, **d'établir des jonctions** avec les cellules voisines et de **produire une lame basale** pour assurer l'intégrité de la nouvelle branche vasculaire en formation (Phng et Gerhardt, 2009).

### 2.2.3. L'allongement, le branchement et la formation d'une lumière

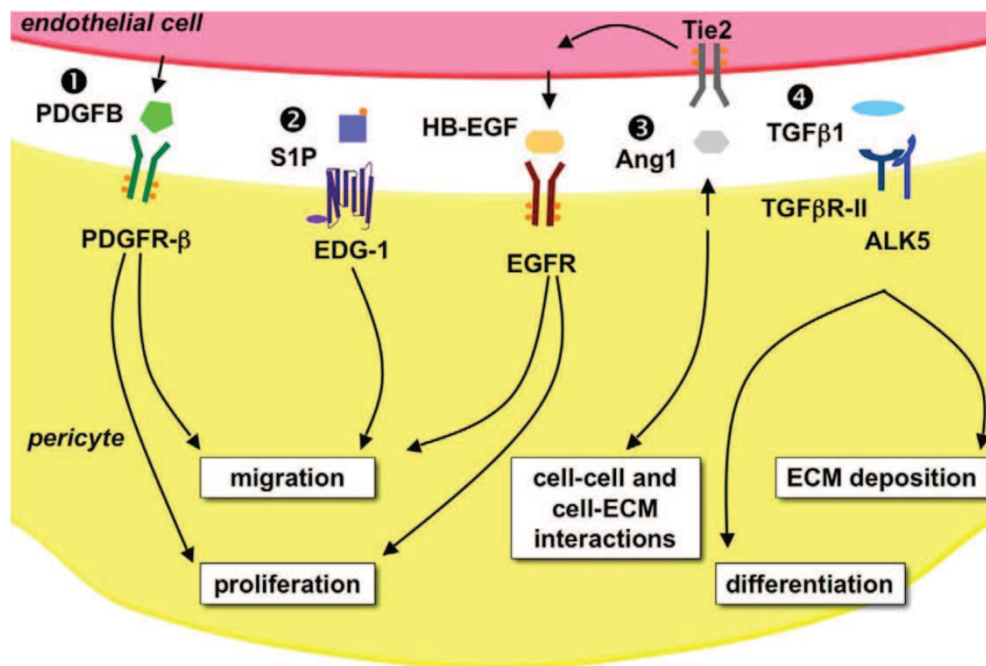
Les vaisseaux sanguins déstabilisés voient apparaître à leur surface des **bourgeoisements** correspondant aux ébauches des nouvelles branches vasculaires. Tandis que les « **tip cells** » **migrent** guidées par leurs filopodes, les « **stalk cells** » **prolifèrent** pour permettre l'**allongement** des nouveaux vaisseaux (Potente *et al.*, 2011). L'Ang-2 sécrétée continue d'inhiber la signalisation du récepteur Tie-2, empêchant ainsi le recrutement des péricytes et préservant le phénotype activé des cellules endothéliales. La balance de signalisation Notch-1/Dll-4/Jag-1 est maintenue en permanence pour éviter la formation d'un nombre excessif de « tip cells » et réguler le profil de ramification des nouveaux vaisseaux. Le **branchement** des vaisseaux se produit lorsque des « tip cells » entrent en contact et permet la mise en place de nouveaux circuits dans le réseau existant. Les contacts intercellulaires sont consolidés par des jonctions impliquant la **VE-cadhérine** (Cavallaro et Dejana, 2011). Des données ont montré une accumulation de **macrophages** au niveau des sites de **fusion par anastomose** de branches vasculaires voisines, suggérant un rôle actif des macrophages qui émettent des filopodes contactant plusieurs « tip cells » (Fantin *et al.*, 2010). Simultanément à l'allongement du réseau, les « stalk cells » mettent en place une **lumière vasculaire** selon différents modes qui semblent dépendre du type de



vaisseau concerné (Iruela-Arispe et Davis, 2009 ; Zeeb *et al.*, 2010). La lumière peut se former par l'apparition de **vacuoles intracellulaires** qui fusionnent avec les vacuoles de cellules endothéliales voisines dans un mécanisme appelé **creusement cellulaire** (« **cell hollowing** »). Dans les vaisseaux de gros calibre, la formation d'une lumière se ferait plutôt par **modification de la forme** des cellules endothéliales et des **jonctions intercellulaires** selon un autre mécanisme appelé **creusement du cordon vasculaire** (« **cord hollowing** »). Après la mise en place d'une **polarité apico-basale**, la **membrane apicale** des cellules endothéliales serait recouverte de **glycoprotéines chargées négativement**. La présence de charges négatives sur la membrane de 2 cellules voisines engendrerait une répulsion écartant les 2 cellules. De plus, le VEGF interviendrait en régulant les **réarrangements du cytosquelette**, l'**adhérence** et la **polarité** des cellules endothéliales (Zeeb *et al.*, 2010).

#### 2.2.4. La maturation et la stabilisation des nouveaux vaisseaux

La formation d'une lumière vasculaire permet la **perfusion** des nouveaux vaisseaux qui s'accompagne d'un apport en O<sub>2</sub> et en nutriments, réduisant l'hypoxie. La diminution de l'hypoxie réduit l'expression du VEGF et oriente progressivement les cellules endothéliales vers un **retour au phénotype quiescent**. Pour être totalement fonctionnels, les nouveaux vaisseaux doivent subir une étape de **maturation** correspondant au remodelage du réseau pour l'adapter à la physiologie du tissu. Les caractéristiques de cette maturation sont la **synthèse d'une lame basale**, la **formation de jonctions intercellulaires**, la **diminution de la prolifération** des cellules endothéliales et le **recrutement des cellules périvasculaires** (Gaengel *et al.*, 2009 ; Potente *et al.*, 2011) (Figure 11).



**Figure 11 : acteurs moléculaires régulant le recrutement des péricytes pendant l'angiogenèse.** Le recrutement des péricytes met en jeu 4 voies de signalisation majeures : (1) PDGFB/PDGFR- $\beta$  favorisant la migration et la prolifération, (2) S1P/S1PR1 régulant la migration, (3) Ang-1/Tie-2 contrôlant les interactions intercellulaires et avec la matrice extracellulaire et modulant indirectement la migration et la prolifération, (4) TGF- $\beta$ 1/TGFR-2 induisant la différenciation des péricytes et la synthèse d'une lame basale. D'après Chantrain *et al.*, 2006.

La stabilisation des nouveaux vaisseaux et le recrutement des péricytes sont régulés par au moins 4 voies de signalisation : (1) PDGFB/PDGFR- $\beta$ , (2) S1P/S1PR1, (3) Ang-1/Tie-2 et (4) TGF- $\beta$ 1/TGFR-2 (Jain, 2003 ; Chantrain *et al.*, 2006). Le principal facteur favorisant le recrutement des péricytes est le **PDGFB** synthétisé par les « tip cells » et se liant au **PDGFR- $\beta$**  exprimé par les péricytes. Le PDGF est un facteur de croissance se présentant sous la forme d'un homodimère ou d'un hétérodimère selon la combinaison des chaînes A et B : PDGF-AA, PDGF-AB ou **PDGF-BB** (PDGFB) (Raica et Cimpean, 2010). Chacune des chaînes est codée par des gènes différents dont la régulation est indépendante. Il a été découvert plus récemment 2 autres gènes codant pour des chaînes C et D ne pouvant s'associer qu'en homodimères (PDGF-CC et PDGF-DD). Le PDGF peut se lier sur 2 récepteurs à activité tyrosine kinase : le PDGFR- $\alpha$  et le PDGFR- $\beta$ . L'affinité des récepteurs varie en fonction de chaque chaîne du PDGF. Ainsi, le PDGFR- $\alpha$  a une affinité plus forte pour les chaînes A, B et C tandis que le PDGFR- $\beta$  a une meilleure affinité pour les chaînes B et D. A la fin de l'angiogenèse, le PDGFB synthétisé par les cellules endothéliales est séquestré par



les protéoglycanes à héparane sulfate (HSPGs) de la matrice extracellulaire. La signalisation PDGFB/PDGFR- $\beta$  favorise la **migration** et la **prolifération** des péricytes (Raica et Cimpean, 2010). Les souris KO pour PDGFB ou PDGFR- $\beta$  présentent un déficit de péricytes, des dysfonctionnements vasculaires graves, des anévrismes et des saignements (Levéen *et al.*, 1994 ; Soriano, 1994 ; Jain, 2003).

La **sphingosine-1-phosphate (S1P)** libérée par les cellules endothéliales se lie sur le **récepteur sphingosine-1-phosphate (S1PR1)**, anciennement appelé gène de différenciation endothéliale (**EDG-1**). Cette interaction favorise la **migration** des péricytes *via* le remodelage du cytosquelette et la régulation de l'adhérence et des jonctions cellulaires (Lucke et Levkau, 2010 ; Potente *et al.*, 2011). Les souris KO pour S1PR1 présentent des déficits vasculaires graves comparables aux KO de la voie du PDGFB, bien que le défaut principal concerne les cellules endothéliales dans lesquelles S1P contrôle l'adressage de la N-cadhérine vers la membrane basale des cellules endothéliales pour renforcer les jonctions intercellulaires entre les cellules endothéliales et les péricytes.

Si le système Angiopoïétines/Tie joue un rôle crucial dès la phase d'activation endothéliale, il est aussi impliqué dans la maturation et la stabilisation des nouveaux vaisseaux. L'activation de **Tie-2** par l'**Ang-1** favorise l'**adhérence** des péricytes en renforçant les jonctions intercellulaires et les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire (Augustin *et al.*, 2009). De plus, Tie-2 activé augmente l'expression et la sécrétion du **facteur de croissance de type épidermique liant l'héparine** (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor-like, **HB-EGF**) par les cellules endothéliales. La fixation de l'HB-EGF sur le récepteur au facteur de croissance de l'épiderme (**EGFR**) favorise la **migration** et la **prolifération** des péricytes (Iivanainen *et al.*, 2003).

Enfin, la fixation du **TGF- $\beta$ 1** sécrété par les cellules endothéliales sur le récepteur **TGFR-2** favorise la **différenciation** des cellules mésenchymateuses en péricytes et la **synthèse de la lame basale** (Pardali *et al.*, 2010).

La maturation et la stabilisation du réseau vasculaire remodelé s'accompagnant d'une diminution de la prolifération des cellules endothéliales, des **signaux de survie** sont mis en place pour éviter l'apoptose des cellules endothéliales et la régression des vaisseaux. Parmi les signaux autocrines et paracrines figure le **VEGF**, sécrété par les cellules endothéliales

elles-mêmes pour activer la **voie de survie cellulaire PI3K/AKT** (Potente *et al.*, 2011). La signalisation autocrine du VEGF dans les cellules endothéliales favorise leur survie tandis que la signalisation paracrine induit l'angiogenèse. Le **FGF** favorise également le maintien de l'intégrité des vaisseaux en renforçant les jonctions adhérentes et les jonctions serrées (Beenken et Mohammadi, 2009). L'**Ang-1** permet la formation de clusters de Tie-2 qui se concentrent au niveau des jonctions intercellulaires, favorisant la survie cellulaire et la quiescence des cellules endothéliales (Augustin *et al.*, 2009). Enfin, le **flux sanguin** crée des **forces de cisaillement** (« **shear stress** ») qui activent des voies de signalisation intracellulaires protégeant les cellules endothéliales de l'apoptose tout en favorisant leur quiescence (Potente *et al.*, 2011). Les cellules endothéliales de vaisseaux non perfusés changent d'emplacement ou meurent par apoptose.

## 2.3. La dérégulation de l'angiogenèse

Les vaisseaux sanguins formant un réseau présent dans l'ensemble de l'organisme, il semble intuitif que le moindre dysfonctionnement peut avoir des répercussions sur tous les organes. L'angiogenèse est un mécanisme complexe mettant en jeu de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires et des cascades de signalisation qui doivent être finement régulées selon un timing précis. Les dérégulations de l'angiogenèse sont à l'origine de très nombreuses pathologies.

### 2.3.1. Des exemples de pathologies liées à un dysfonctionnement de l'angiogenèse

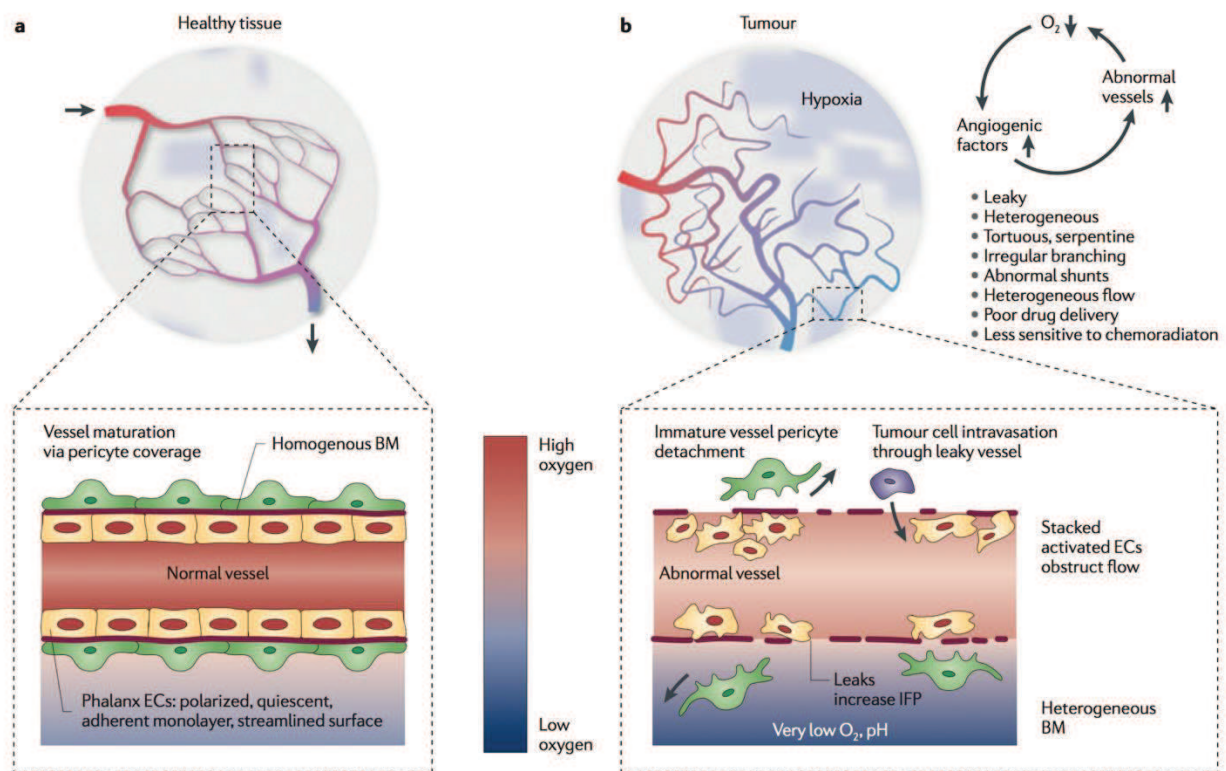
Il existe différentes dérégulations de l'angiogenèse pouvant affecter des organes ou des tissus variés. Certaines pathologies sont liées à une **angiogenèse insuffisante** ou à une **régression vasculaire** par manque de maturation et de stabilisation des vaisseaux (Carmeliet, 2003). La plupart de ces maladies sont causées par une perturbation de la voie de signalisation du VEGF. Par exemple, l'**emphysème** et la **fibrose pulmonaires** sont liées à une apoptose des cellules endothéliales alvéolaires par inhibition du VEGF. L'**ostéoporose** est en partie expliquée par un déficit d'ostéogenèse lié à une inhibition âge-dépendante de l'angiogenèse déclenchée par le VEGF. De plus, les inhibiteurs de l'angiogenèse empêchent la réparation des **fractures osseuses**. Pendant la grossesse, la forme soluble du VEGFR-1 peut priver les cellules endothéliales de VEGF, occasionnant des

dysfonctionnements vasculaires à l'origine de la **pré-éclampsie** (thrombose, hypertension). La **maladie de Crohn** est caractérisée par une ischémie des muqueuses (diminution de l'apport sanguin artériel). Dans le système nerveux central, la **maladie d'Alzheimer** est favorisée par une dégénérescence des microvaisseaux liée à une toxicité des cellules endothéliales occasionnée par la formation des plaques amyloïdes. Enfin, certains troubles du **diabète** sont favorisés par une altération de l'angiogenèse dans les membres ischémiques et une néovascularisation de la rétine liée à une perte des péricytes.

L'angiogenèse est un processus biologique puissant devant rester transitoire, à l'instar d'autres mécanismes comme l'inflammation qui utilise des événements cellulaires et des médiateurs chimiques dangereux tels que les dérivés réactifs de l'oxygène. Une **angiogenèse anormale** ou **excessive** est à l'origine de nombreuses pathologies et se trouve très souvent associée à une dérégulation de l'inflammation. L'angiogenèse pathologique est impliquée dans de nombreuses maladies inflammatoires comme le **psoriasis**, l'**inflammation intestinale**, les **ascites**, la **synovite**, l'**asthme**, l'**arthrite** ou encore diverses **maladies auto-immunes**. Une angiogenèse excessive est également impliquée dans d'autres pathologies comme les **rétinopathies** ou les **cancers** (Carmeliet, 2003).

### 2.3.2. L'angiogenèse tumorale

Les besoins métaboliques des tumeurs sont exacerbés par la forte demande énergétique des cellules tumorales et stromales. De plus, l'augmentation du volume tumoral génère de l'hypoxie et la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par les cellules tumorales et certaines cellules du microenvironnement tumoral. L'**angiogenèse physiologique** aboutit à la mise en place d'un réseau mature et stabilisé par le recrutement des péricytes, générant un **réseau vasculaire organisé et fonctionnel**. L'activation endothéliale disparaît avec la vascularisation efficace des tissus et l'extinction des signaux pro-angiogéniques. Au cours de l'**angiogenèse tumorale**, la persistance des signaux pro-angiogéniques inhibe le recrutement des péricytes et induit une **activation endothéliale chronique**, générant un **réseau vasculaire instable, tortueux, mal organisé et peu fonctionnel** (Goel *et al.*, 2011) (Figure 12).



**Figure 12 : anomalies structurales et fonctionnelles des vaisseaux tumoraux.** Alors que les vaisseaux d'un tissu sain (a) sont parfaitement organisés et fonctionnels grâce à la présence d'un endothélium stable et de péricytes, les vaisseaux tumoraux (b) forment un réseau instable et peu fonctionnel. L'activation endothéliale chronique liée à la présence persistante de facteurs pro-angiogéniques empêche la maturation des vaisseaux et le recrutement des péricytes. L'absence de maturation rend la perfusion inefficace, générant de l'hypoxie qui maintient l'expression des facteurs pro-angiogéniques et l'activation endothéliale, le tout formant un cercle vicieux interminable. BM : lame basale, EC : cellule endothéliale, IFP : pression du liquide interstitiel. D'après Carmeliet et Jain, 2011b.

Les vaisseaux tumoraux forment un réseau mal organisé et peu fonctionnel. Alors que l'organisation physiologique hiérarchisée en réseaux artériel, veineux et capillaire permet un bon écoulement du sang dans les vaisseaux du réseau artériel (forte pression sanguine) vers le réseau veineux (faible pression), cette organisation perdue dans le réseau tumoral crée une **mauvaise perfusion** de la tumeur et un écoulement anormal du sang. De plus, l'environnement très fibreux et desmoplastique de certaines tumeurs réduit encore l'efficacité de la perfusion par compression solide des vaisseaux sanguins. Par ailleurs, la persistance de l'activation endothéliale s'accompagne du maintien d'un endothélium déstructuré avec une **lame basale irrégulière, lâche et perméable** et des **cellules endothéliales non jointives**. Cet endothélium déstructuré induit une **augmentation de la**

**perméabilité vasculaire**, ce qui a pour conséquence de modifier la recirculation de l'eau entre le réseau sanguin, le réseau lymphatique et le liquide interstitiel, générant une **augmentation de la pression interstitielle** dans la tumeur. La mauvaise perfusion de la tumeur et la compression des vaisseaux exercée par le stroma limitent l'accès des composés chimiothérapeutiques à la tumeur et l'infiltration leucocytaire, **réduisant l'efficacité des chimiothérapies et de la réponse immunitaire anti-tumorale**. Enfin, la déstructuration de l'endothélium favorise l'**intravasation des cellules tumorales** et la **formation de métastases** (Goel *et al.*, 2011).

### 2.3.3. Les thérapies anti-angiogéniques dans le traitement des cancers et le concept de normalisation vasculaire

L'angiogenèse tumorale développe le réseau vasculaire apportant les nutriments et l'O<sub>2</sub> nécessaires à la croissance d'une tumeur. L'une des stratégies thérapeutiques antitumorales est d'inhiber cette angiogenèse dans l'espoir « d'affamer » la tumeur et de limiter la prolifération des cellules cancéreuses. La plupart des approches anti-angiogéniques consistent à inhiber la signalisation des facteurs pro-angiogéniques. Face à la relative inefficacité de cette approche dans certains types de cancers, une nouvelle stratégie est en développement et vise à « normaliser » les vaisseaux tumoraux (Carmeliet et Jain, 2011b).

#### 2.3.3.1. Les principales thérapies anti-angiogéniques

Plusieurs molécules anti-angiogéniques sont utilisées dans le traitement de certains cancers et de maladies oculaires telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Ces composés sont des **anticorps** ou des **inhibiteurs chimiques multi-kinases** ciblant les voies de signalisation de plusieurs facteurs pro-angiogéniques en inhibant le ligand, le récepteur ou les kinases des voies en aval du récepteur et sont généralement utilisés en combinaison avec une chimiothérapie (Carmeliet et Jain, 2011a). Le **bévacizumab** (Avastin<sup>®</sup>) est un **anticorps neutralisant du VEGF** utilisé en combinaison avec une chimiothérapie dans le traitement du cancer colorectal métastatique, d'un type de cancer métastatique du poumon et du cancer du sein métastatique. Il est également utilisé en monothérapie dans le traitement de certaines formes du glioblastome ou en association avec de l'Interféron- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) dans le traitement du carcinome rénal métastatique. Le

**sorafénib** (Nexavar<sup>®</sup>) est un inhibiteur de tyrosine kinases (TKI) utilisé dans le traitement du carcinome rénal métastatique et du carcinome hépatocellulaire non résécable. Le **sunitinib** (Sutent<sup>®</sup>) est un autre TKI utilisé dans le traitement du carcinome rénal métastatique et des tumeurs neuroendocrines pancréatiques avancées. Le **pazopanib** (Votrient<sup>®</sup>) est un TKI utilisé dans le traitement du carcinome rénal métastatique. Enfin, le **vandetanib** (Caprelsa<sup>®</sup>) est un TKI utilisé dans le traitement du cancer médullaire métastatique de la thyroïde. Dans tous les types de cancers, ces traitements anti-angiogéniques allongent la survie des patients de quelques mois.

### 2.3.3.2. Les limites des thérapies anti-angiogéniques

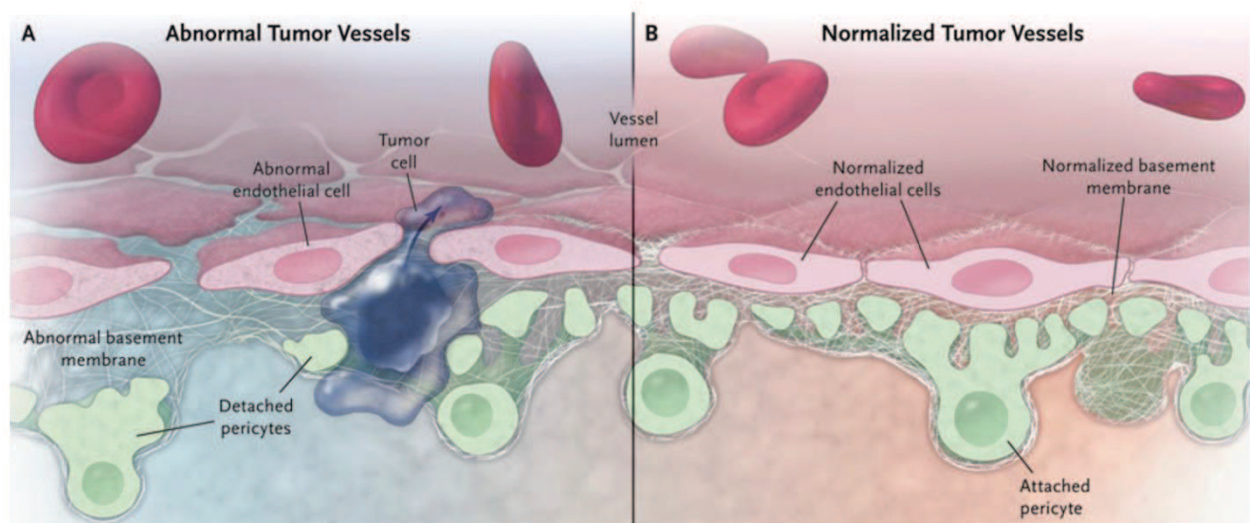
Si l'hypothèse que limiter le développement du réseau vasculaire pour réduire la croissance tumorale soit pertinente et fonctionne dans certains types de cancers, cette stratégie reste malheureusement inopérante dans d'autres cancers ou chez certains patients. C'est le cas notamment du carcinome pancréatique dont le stroma hypovasculaire rend les thérapies anti-angiogéniques inefficaces (Carmeliet et Jain, 2011a). Alors que certains patients sont totalement réfractaires aux thérapies anti-angiogéniques, d'autres le deviennent en cours de traitement. Plusieurs mécanismes sont proposés pour expliquer la **résistance** de certaines tumeurs aux stratégies anti-angiogéniques et impliquent aussi bien les cellules tumorales que les cellules stromales. Le blocage du VEGF augmente l'hypoxie qui peut induire la **production d'autres facteurs pro-angiogéniques** tels que le PlGF, les FGFs, des chimiokines et des éphrines capables de restaurer l'angiogenèse ; ces tumeurs deviennent indépendantes du VEGF (Bergers et Hanahan, 2008). L'hypoxie peut aussi augmenter l'expression de gènes impliqués dans l'invasion et favoriser le **potentiel invasif** des cellules tumorales. De plus, les cellules tumorales peuvent acquérir des **mutations** les rendant plus agressives et tolérantes à l'hypoxie. Dans ce cas, les thérapies anti-angiogéniques rendent les tumeurs plus agressives et favorisent les métastases. Par ailleurs, la formation de nouveaux vaisseaux peut se faire par **d'autres modes que l'angiogenèse par bourgeonnement** (Carmeliet et Jain, 2011a) : angiogenèse par intussusception, transdifférenciation de cellules souches tumorales en cellules endothéliales ou encore vasculogenèse par recrutement de progéniteurs endothéliaux dérivés de la moelle osseuse ou résidents de l'endothélium (EPCs). Ces tumeurs sont moins sensibles au blocage du VEGF. En outre, les vaisseaux tumoraux sont habituellement très peu recouverts par des péricytes, ce qui les rend sensibles au VEGF. Mais dans certaines



tumeurs, les microvaisseaux peuvent être abondamment recouverts par de **nombreux péricytes** et par une **membrane basale épaisse**. Ces vaisseaux sont beaucoup moins sensibles aux VEGF donc le blocage du VEGF n'a que très peu d'effet dans ces tumeurs. Enfin, les **cellules stromales modifiées** telles que les cellules dérivées de la moelle osseuse (BMDCs), les macrophages (TAMs) ou les fibroblastes activés (CAFs) peuvent être des sources d'autres facteurs pro-angiogéniques que le VEGF (Carmeliet et Jain, 2011a).

### 2.3.3.3. La normalisation vasculaire

Devant l'inefficacité des thérapies anti-angiogéniques dans certains cancers, une nouvelle stratégie est apparue récemment et consiste à rendre les vaisseaux tumoraux « normaux » : c'est le concept de normalisation vasculaire (Carmeliet et Jain, 2011b) (Figure 13). Les vaisseaux tumoraux sont désorganisés et peu fonctionnels, ce qui génère un microenvironnement immunosuppresseur et mal perfusé. Le but de la normalisation est de rendre les vaisseaux tumoraux plus fonctionnels.



**Figure 13 : effets bénéfiques de la normalisation des vaisseaux tumoraux.** (A) Les vaisseaux tumoraux présentent des anomalies structurelles et fonctionnelles. Les cellules endothéliales, dont la morphologie est modifiée, ne sont pas jointives, les péricytes sont détachés et la membrane basale est plus souple, ce qui favorise l'intravasation des cellules tumorales et la formation de métastases. (B) Les vaisseaux tumoraux normalisés retrouvent des caractéristiques structurelles et fonctionnelles proches des vaisseaux sains. Les cellules endothéliales sont jointives et stabilisées par des péricytes et la composition de la membrane basale la rend rigide et peu perméable, limitant ainsi l'intravasation des cellules tumorales. D'après Goel et al., 2011.

Structurellement, il a été montré dans plusieurs modèles tumoraux que la normalisation (1) **améliore la forme et les jonctions entre les cellules endothéliales**, (2) **favorise le recouvrement des vaisseaux par des péricytes** et (3) **restaure la composition et la rigidité de la membrane basale** (Goel *et al.*, 2011). Le VEGF-A inhibe l'adhérence cellule-cellule passant par la VE-cadhérine pour déstabiliser l'endothélium ; il est probable que l'inhibition du VEGF favorise le retour des interactions entre les cellules endothéliales. Par ailleurs, les mécanismes par lesquels la normalisation favorise le recrutement des péricytes sont encore mal connus. Des données suggèrent qu'il pourrait y avoir un effet direct de l'inhibition du VEGF. En effet, le VEGF-A se lie sur le VEGFR-2 porté par les péricytes et inhibe le recrutement induit par la signalisation PDGFB/PDGFR- $\beta$  (Greenberg *et al.*, 2008 ; Goel *et al.*, 2011). De plus, il est probable que l'inhibition du VEGF modifie le profil de sécrétion des cellules endothéliales qui régulent à leur tour le recrutement des péricytes *via* des cytokines.

Fonctionnellement, la normalisation permet (1) **d'améliorer l'oxygénation** de la tumeur et donc de **diminuer l'hypoxie et l'angiogenèse**, (2) **d'améliorer la perfusion de la tumeur** pour favoriser **l'accès des chimiothérapies et des immunothérapies** aux cellules tumorales, (3) de **limiter l'intravasation des cellules tumorales et la formation de métastases** et (4) **d'augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale** en favorisant l'infiltration de la tumeur par des lymphocytes T anti-tumoraux et la polarisation des macrophages du phénotype pro-tumoral de type M2 vers le phénotype anti-tumoral de type M1 (Goel *et al.*, 2011). En outre, l'amélioration de la perfusion et de l'accès des chimiothérapeutiques permet (1) de sensibiliser la tumeur aux chimiothérapies et immunothérapies et (2) de réduire les doses de médicaments et par conséquent les effets secondaires sur les autres cellules saines prolifératives, notamment les cellules souches impliquées dans le renouvellement de tous les tissus de l'organisme.

Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la normalisation sont toujours en cours d'investigation mais plusieurs études suggèrent qu'une **fenêtre de normalisation** se met en place lors des thérapies anti-angiogéniques (Jain, 2005 ; Goel *et al.*, 2011). Cette fenêtre se maintient pendant quelques jours puis disparaît, probablement à cause de l'activation d'autres voies pro-angiogéniques, de la régression des vaisseaux par excès de signaux anti-angiogéniques ou de la formation des vaisseaux par d'autres modes que l'angiogenèse par bourgeonnement. Ainsi, il semble que la dose et la durée des thérapies anti-angiogéniques



soient cruciales pour contrôler la durée de cette fenêtre de normalisation pendant laquelle la tumeur est sensibilisée aux chimiothérapies et immunothérapies. Actuellement, des études sont en cours dans différents modèles tumoraux pour définir les doses optimales pour allonger le plus possible la durée de la fenêtre de normalisation. De plus, il est montré que les tumeurs sont sensibilisées aux cytotoxiques pendant cette période. La plupart des essais précliniques et cliniques tentent de **combiner une thérapie « normalisatrice » aux cytotoxiques de référence** et de déterminer la bonne cinétique de traitement.

## 2.4. Les modèles d'étude de l'angiogenèse

Il existe de nombreux modèles d'étude de l'angiogenèse physiologique ou pathologique, la plupart étant des **modèles *in vitro*** utilisés pour disséquer les principaux mécanismes cellulaires impliqués dans l'angiogenèse, notamment la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Mais les tests *in vitro* ne reflétant pas la complexité d'un tissu et les interactions entre différents types cellulaires, il existe aussi plusieurs **modèles *ex vivo*** voire ***in vivo***. Voici les critères que doivent respecter un bon modèle d'étude de l'angiogenèse (Jain *et al.*, 1997) :

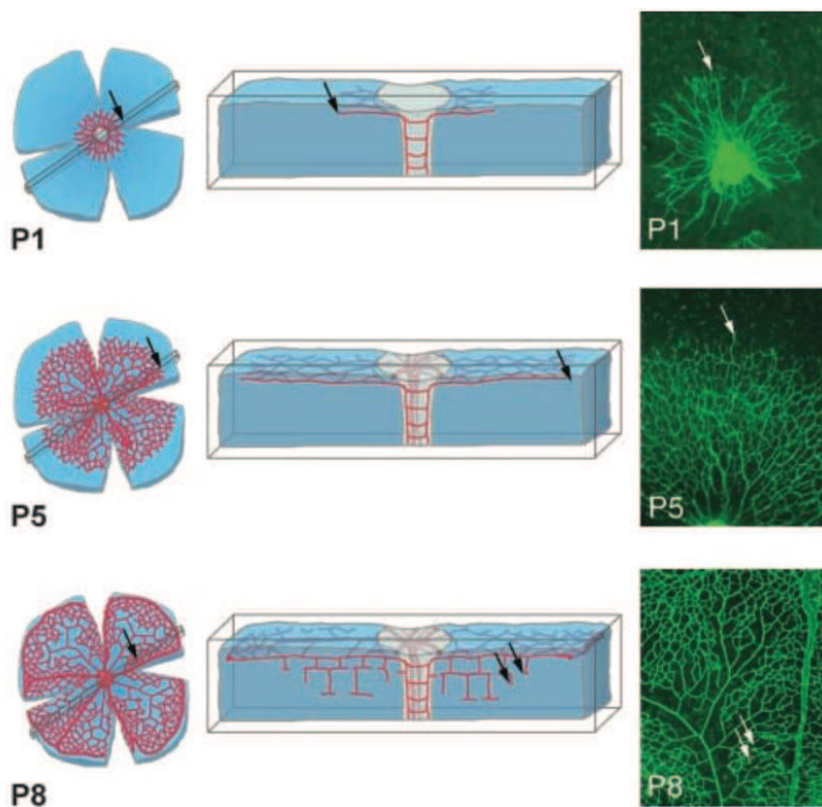
- ❖ La sécrétion et la distribution spatio-temporelle des facteurs pro- ou anti-angiogéniques doivent pouvoir être connues de façon à établir des courbes de dose-réponse
- ❖ Si des cellules néoplasiques (dérivées de tumeurs) sont utilisées, elles doivent être génétiquement caractérisées en termes d'expression de proto-oncogènes et de production de facteurs de croissance
- ❖ Le modèle doit permettre une mesure quantitative de la structure des nouveaux vaisseaux : longueur, aire, volume et nombre de vaisseaux, taille de la membrane basale
- ❖ Il doit aussi permettre de quantifier les caractéristiques fonctionnelles des nouveaux vaisseaux : prolifération et migration des cellules endothéliales, flux sanguin et perméabilité vasculaire
- ❖ La distinction entre les nouveaux vaisseaux et les vaisseaux préexistants doit être claire
- ❖ Les tissus ne doivent pas être endommagés puisqu'une lésion pourrait générer de l'angiogenèse par elle-même
- ❖ Les réponses observées *in vitro* doivent être confirmées *in vivo*

- ❖ Le modèle doit permettre un suivi à long terme et si possible non invasif de l'angiogénèse
- ❖ Enfin, le modèle doit être peu coûteux, rapide, facile à utiliser, reproductible et fiable

#### 2.4.1. Le modèle murin de la vascularisation de la rétine

Le modèle le plus utilisé dans cette thèse est le modèle murin de la vascularisation de la rétine (Stahl *et al.*, 2010). L'angiogénèse physiologique peut être suivie au cours du développement du réseau vasculaire rétinien. En outre, ce modèle permet également d'étudier l'angiogénèse pathologique se produisant dans les rétinopathies diabétiques ou la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA).

Chez la souris, la rétine est dans un premier temps irriguée par les **vaisseaux hyaloïdes**. Après la naissance, ces vaisseaux régressent et sont remplacés par une véritable vascularisation de la rétine. L'**angiogénèse physiologique par bourgeonnement** assure la mise en place de ce réseau vasculaire en deux semaines (Figure 14).



**Figure 14 : angiogénèse physiologique de la rétine.** Chez la souris, le réseau vasculaire de la rétine se met en place pendant les premiers jours suivant la naissance. Les vaisseaux s'étendent du centre de la rétine (nerf optique) vers la périphérie. Le **plexus superficiel** se forme entre les jours P1 et P8 (P Postnatal), puis les vaisseaux plongent pour former le **plexus profond** (P8 - P12) et enfin le **plexus intermédiaire** (P12 - P15). D'après Gerhardt *et al.*, 2003.

Les vaisseaux sanguins forment un **plexus primaire superficiel** qui progresse du centre de la rétine - près du nerf optique - vers la périphérie entre les jours **P1 et P8** (P Postnatal) (Stahl *et al.*, 2010). Pour migrer, les cellules endothéliales s'appuient sur un maillage formé par des **astrocytes** qui servent à la fois de **support mécanique** et de **source de VEGF** (Stone et Dreher, 1987 ; Fruttiger *et al.*, 1996 ; Gerhardt *et al.*, 2003). Ainsi, les astrocytes contribuent à créer un **gradient de VEGF guidant la migration des « tip cells »** (Gerhardt *et al.*, 2003 ; Gerhardt, 2008). La région proche du nerf optique, vascularisée, est exposée à de faibles concentrations de VEGF tandis que la région proche de la périphérie, avasculaire, est exposée à de fortes concentrations de VEGF. Puis les vaisseaux sanguins plongent dans l'épaisseur de la rétine pour former un **plexus profond** entre les jours **P8 et P12** puis le **plexus intermédiaire** entre les jours **P12 et P15**, en sorte que le réseau vasculaire mature est composé d'une superposition de trois couches de vaisseaux réparties dans l'épaisseur de la rétine (Stahl *et al.*, 2010). L'angiogenèse est le plus souvent étudiée sur le plexus superficiel, pendant la première semaine suivant la naissance. Ce modèle présente l'avantage de permettre l'observation spatio-temporelle des différents types cellulaires aux différentes étapes de l'angiogenèse en préservant l'organisation du tissu.

#### 2.4.2. Les autres modèles d'étude de l'angiogenèse

Il existe de nombreux autres modèles permettant d'étudier l'angiogenèse (Auerbach *et al.*, 2003 ; Norrby *et al.*, 2006 ; Staton *et al.*, 2009). Les modèles *in vitro* s'attachent davantage à préciser des mécanismes cellulaires et moléculaires tels que la prolifération ou la migration des cellules endothéliales alors que les modèles *in vivo* répondent plutôt aux caractéristiques fonctionnelles des vaisseaux comme la perméabilité, la perfusion ou le flux sanguin. Sans être exhaustive, cette partie liste brièvement les modèles les plus couramment utilisés.

##### 2.4.2.1. Les modèles *in vitro*

#### Les tests de prolifération

La prolifération des cellules en culture est quantifiée par dénombrement cellulaire direct, par mesure optique de la métabolisation du sel de tétrazolium MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) en cristaux de formazan par la

déshydrogénase mitochondriale ou encore par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée ( $^3\text{H}$ ) ou de BrdU (bromodésoxyuridine).

### **Les tests de migration**

La migration cellulaire peut être quantifiée en chambre de Boyden ou dans des tests de « wound-healing » couplés à de la microscopie time-lapse.

### **Les tests de différenciation**

En ce qui concerne l'angiogenèse et les cellules endothéliales, le processus cellulaire le plus souvent étudié est la formation de tubules (tubulogenèse). Les cellules endothéliales sont incluses en trois dimensions dans un gel de collagène, de fibrine ou de Matrigel. La formation de tubules est quantifiée selon quatre paramètres : la longueur, le nombre et l'aire des tubules, ainsi que le nombre de branchements.

#### **2.4.2.2. Les modèles *ex vivo* ou les cultures d'organes**

Des sections de vaisseaux sanguins provenant de différents tissus sont maintenues en culture dans une matrice en trois dimensions et du milieu de culture. La croissance des nouveaux vaisseaux est suivie sur une période de 10 à 14 jours. Le modèle le plus utilisé pour quantifier l'angiogenèse est celui des **anneaux aortiques** de rat ou de souris (Nicosia *et al.*, 1997). L'aorte d'un même animal peut fournir jusqu'à une trentaine de sections transversales. Ce modèle présente l'avantage de conserver la matrice extracellulaire et les autres types cellulaires présents autour des vaisseaux comme les macrophages résidents, les fibroblastes et les péricytes. De plus, des modèles utilisant des **explants humains** ont été développés pour mieux répondre aux études précliniques, notamment les vaisseaux du placenta et du cordon ombilical ou la veine saphène (Brown *et al.*, 1996).

#### **2.4.2.3. Les modèles *in vivo***

Ces modèles étudient l'angiogenèse dans des organismes vivants. Les plus utilisés sont la **membrane chorioallantoïque (CAM) de l'embryon de poulet**, le poisson tropical **Zebrafish**, la **néovascularisation de la cornée**, ou encore l'**implantation de chambres d'observation** sur les oreilles ou sur la peau du dos de petits mammifères (souris, rat, hamster ou lapin).

### 3. Les Corps de Weibel et Palade (WPBs)

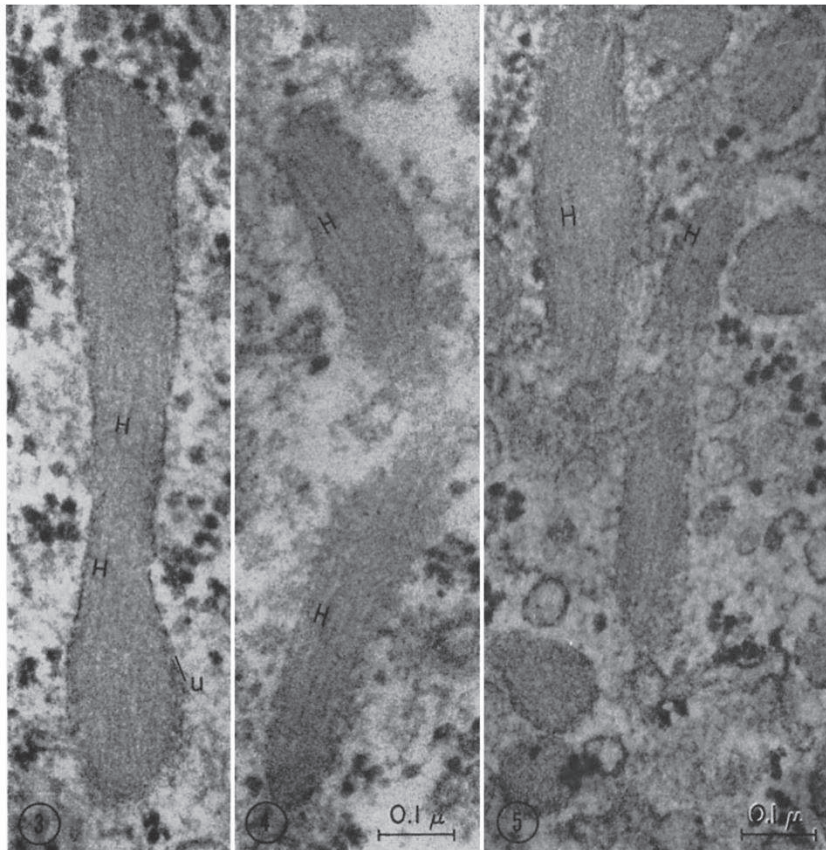
Les cellules endothéliales répondent à divers *stimuli* comme une inflammation ou une rupture de l'endothélium par la sécrétion locale de facteurs solubles. Cette sécrétion localisée nécessite que ces facteurs soient rapidement disponibles en grande quantité. L'expression protéique est un processus biologique dont la cinétique n'est pas compatible avec la nécessité de fournir une réponse rapide à des situations critiques. Par conséquent, les cellules endothéliales synthétisent et stockent ces facteurs dans des compartiments cytoplasmiques spécifiques pour être en mesure de libérer ces facteurs en grande quantité si de tels contextes se présentent. Ces **compartiments de stockage spécifiques des cellules endothéliales** sont appelés **Corps de Weibel et Palade (WPBs pour l'anglais Weibel-Palade Bodies)**. Ces organites ont été découverts en **1964** par l'anatomiste suisse **Ewald R. Weibel** (Université de Berne, Suisse) et par le biologiste roumano-américain **George Emil Palade** (Université Rockefeller, Etats-Unis).

#### 3.1. La structure et la biogenèse des WPBs

##### 3.1.1. L'étude de la structure des WPBs par ME et par tomographie

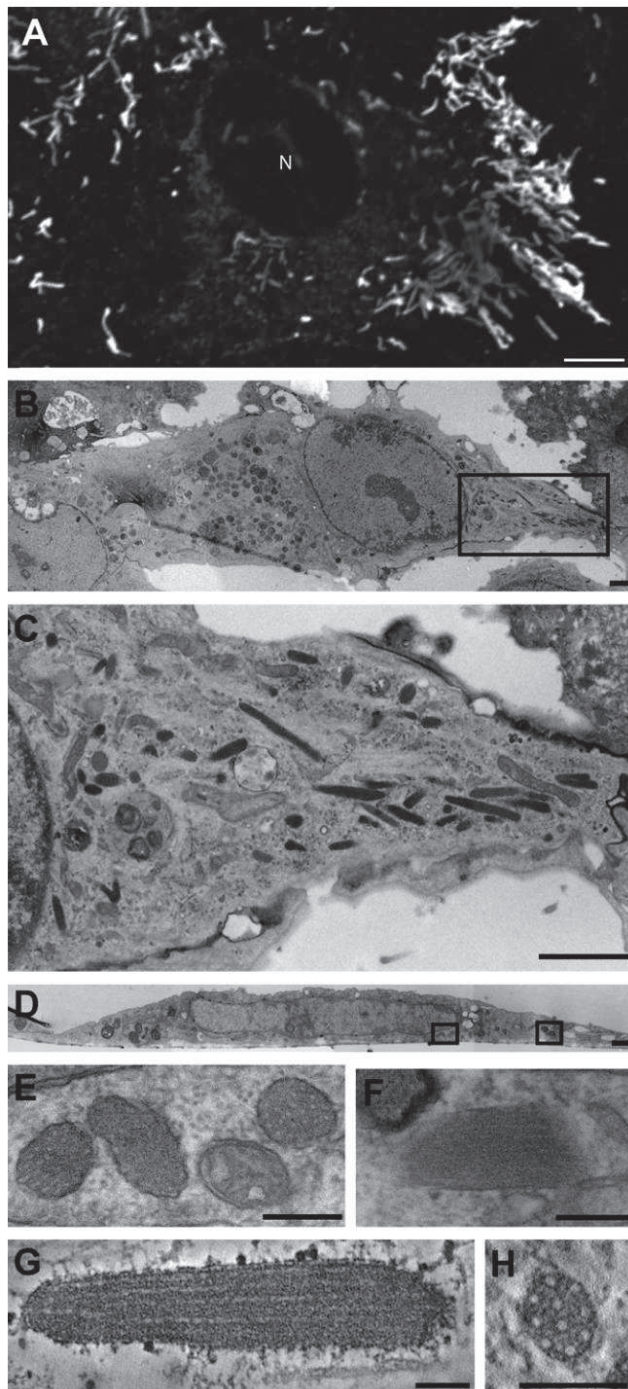
Les WPBs ont été observés pour la première fois par **microscopie électronique (ME)** dans l'endothélium artériel pulmonaire, l'endocarde et le myocarde de rat (Weibel et Palade, 1964) (Figure 15), puis dans l'endothélium de l'aorte de rat (Fuchs et Weibel, 1966). Ils ont ensuite été observés par microscopie électronique, par **tomographie** et par **immunofluorescence** dans des cellules endothéliales en culture comme les cellules endothéliales humaines de la veine de cordon ombilical (Wagner *et al.*, 1982 ; Ewenstein *et al.*, 1987 ; Valentijn *et al.*, 2008 ; Weibel, 2012) (Figure 16).





**Figure 15 : premières observations des WPBs dans l'endothélium artériel pulmonaire de rat.** Les WPBs sont observés pour la première fois dans l'endothélium de l'artère pulmonaire de rat par microscopie électronique. Ces sections obliques montrent des striations correspondant à des tubules internes parallèles (H) et la présence d'une membrane entourant la structure (u). D'après Weibel et Palade, 1964.

Les WPBs sont des **compartiments cytoplasmiques allongés et tubulaires** en forme de bâtonnet d'environ **0,1 à 0,3 μm de diamètre** et de **1 à 5 μm de longueur** (Weibel et Palade, 1964 ; Michaux et Cutler, 2004 ; Valentijn *et al.*, 2011). L'observation de sections transversales de WPBs par tomographie a permis de révéler la structure de ces compartiments. Les WPBs sont formés par des **tubules denses aux électrons** d'un diamètre de 12 nm régulièrement espacés et entourés par une **matrice moins dense** (Valentijn *et al.*, 2008). L'ensemble étant entouré d'une **bicouche lipidique**, les WPBs sont des organites intracellulaires présents uniquement dans le cytoplasme des cellules endothéliales (Valentijn *et al.*, 2008). Dans l'endothélium des vaisseaux sanguins, les WPBs sont majoritairement **orientés dans le sens du flux sanguin**. Dans les cellules endothéliales en culture, les WPBs sont essentiellement **regroupés autour du noyau** (Figure 16A) et apparaissent orientés longitudinalement lorsque les cellules sont observées parallèlement à la surface sur laquelle elles adhèrent (Figures 16B et 16C) et transversalement lorsque les cellules sont observées perpendiculairement à la surface de culture (Figures 16D et 16E). La distribution et l'orientation des WPBs dans les cellules endothéliales peuvent être influencés par des contraintes mécaniques comme des forces de cisaillement (« shear stress ») (Dragt *et al.*, 2012).



**Figure 16 : observation des WPBs dans des cellules endothéliales en culture (HUVECs).**

(A) Distribution des WPBs observés par immunofluorescence du vWF. N : noyau. (B-F) Images de ME de cellules coupées parallèlement (B, C) ou perpendiculairement (D-F) à la surface de culture. (B) un regroupement de WPBs à droite du noyau (encadré). (C) agrandissement de l'encadré du panel (B) montrant que les WPBs sont majoritairement orientés parallèlement au plan de coupe. (D) regroupements de WPBs à droite du noyau (encadrés). (E) agrandissement de l'encadré gauche du panel (D) montrant des WPBs en section transversale. (F) agrandissement de l'encadré droit du panel (D) montrant une section diagonale d'un WPB. (G et H) images de tomographie montrant un WPB en section longitudinale (G) ou en section transversale (H).

Barres d'échelle : (A, B, C) 2  $\mu\text{m}$ , (D) 1  $\mu\text{m}$ , (E, F) 0,25  $\mu\text{m}$ , (G, H) 100 nm. D'après Valentijn et al., 2008.

Si les premières publications concernant les WPBs décrivent essentiellement leur structure, la mise en évidence en 1987 d'un marqueur spécifique des WPBs a permis l'étude approfondie de ces compartiments dans les cellules endothéliales en culture, la caractérisation de leur contenu protéique et de leurs principales fonctions.

### 3.1.2. Le contenu protéique des WPBs

Des observations par ME dans des cellules endothéliales en culture ont permis de mettre en évidence que les striations caractéristiques des WPBs sont des polymères du **facteur von Willebrand (vWF)** (Wagner *et al.*, 1982 ; Ewenstein *et al.*, 1987). Depuis, de nombreuses publications utilisent le vWF pour détecter les WPBs dans les cellules en culture. Le vWF est une glycoprotéine exprimée par les cellules endothéliales, les mégacaryocytes et les plaquettes. Si les plaquettes stockent le vWF dans les granules  $\alpha$  (Cramer *et al.*, 1985), le stockage du vWF dans les WPBs est spécifique des cellules endothéliales. Le vWF est le composant majoritaire (au moins 95% du contenu protéique) de tous les WPBs (Babich *et al.*, 2008). Les WPBs peuvent également contenir d'autres protéines comme des **facteurs pro-inflammatoires** tels que l'IL-8 (Utgaard *et al.*, 1998 ; Wolff *et al.*, 1998 ; Romani de Wit *et al.*, 2003a ; Oynebraten *et al.*, 2004) ou la P-sélectine (Bonfanti *et al.*, 1989 ; Harrison-Lavoie *et al.*, 2006) et des **facteurs pro-angiogéniques** tels que l'Ang-2 (Fiedler *et al.*, 2004).

Il semble que les WPBs forment une population hétérogène variant selon le contenu protéique puisque le stockage de la P-sélectine et de l'Ang-2 dans les WPBs est mutuellement exclusif (Fiedler *et al.*, 2004), suggérant une spécialisation des WPBs vers un phénotype pro-inflammatoire (WPBs contenant de la P-sélectine) ou pro-angiogénique (WPBs contenant de l'Ang-2). Un second niveau d'hétérogénéité réside dans le fait que les cellules endothéliales ne forment pas un type cellulaire homogène mais varient entre les différents types de vaisseaux et entre les tissus (Chi *et al.*, 2003 ; Hirakawa *et al.*, 2003 ; Hendrickx *et al.*, 2004 ; Pusztaszeri *et al.*, 2006 ; Aird, 2007a ; Aird, 2007b). Par exemple, dans certains endothéliums hautement spécialisés comme les capillaires alvéolaires, les cellules endothéliales n'expriment pas de vWF et par conséquent ne contiennent pas de WPBs (Pusztaszeri *et al.*, 2006). Enfin, le niveau d'expression du vWF varie entre les différents types de vaisseaux, les veines exprimant généralement plus de vWF que les artères (Yamamoto, 1998 ; Chi *et al.*, 2003).

Si la caractérisation du contenu protéique des WPBs a nécessité de nombreuses études, le développement relativement récent des techniques de protéomique a permis de compléter efficacement la description du protéome des WPBs (van Breevoort *et al.*, 2012). Les composants connus des WPBs sont présentés dans le Tableau 1.

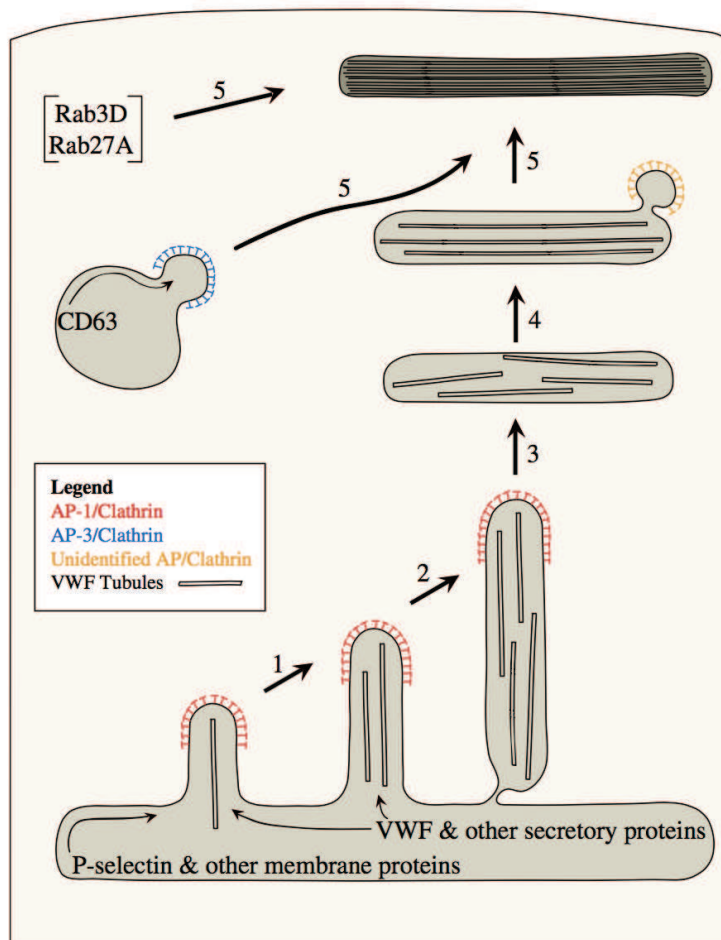


MW (kDa)	description	reference
72.3	78 kDa-regulated protein	
39.3	Alpha-2-HS-glycoprotein	
56.9	Angiopoietin-2	Fiedler et al., 2004
41.6	Biglycan	
48.1	Calreticulin	
71.6	Cell Surface glycoprotein MUC18	
52.5	Clusterin	
138.9	Collagen alpha-1(I) chain	
138.5	Collagen alpha-1(III) chain	
54.6	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	
92.4	Endoplasmic	
26.7	Endothelial protein C receptor	
113.9	Epididymis-specific alpha-mannosidase	
143.6	Insulin receptor-related protein	
29.1	Insulin-like growth factor-binding protein 7	new WPB component
114.5	Integrin alpha-5	
23.5	Lysozyme g-like protein 2	
12.3	Matrix Gla protein	
138.0	Multimerin-1	
53.8	Nucleobindin-1	
41.9	Pentraxin-related protein PTX3	
54.0	Plasma alpha-L-fucosidase	
51.9	Plasma glutamate carboxypeptidase	
45.0	Plasminogen activator inhibitor 1	
82.5	Platelet endothelial cell adhesion molecule	
211.9	Plexin-D1	
56.7	Protein disulfide-isomerase A3	
72.9	Protein disulfide-isomerase A4	
57.1	Protein disulfide-isomerase	
90.8	P-selectin	Bonfanti et al., 1989 and McEver et al., 1989
53.7	Puromycin-sensitive aminopeptidase-like protein	
48.4	Serpin H1	
346	SPARC	
129.3	Thrombospondin-1	
133.7	von Willebrand factor A domain-containing protein SB1	
309.1	von Willebrand factor	Wagner et al., 1982
43.9	V-set and immunoglobulin domain-containing protein 8	

**Tableau 1 : protéome des WPBs.** Ce tableau montre l'ensemble des protéines pouvant être contenues dans les WPBs. Modifié d'après van Breevoort et al., 2012.

### 3.1.3. La biogenèse des WPBs

La formation des WPBs repose sur la **synthèse** et la **polymérisation du vWF**. En effet, les WPBs ne peuvent pas se former en l'absence de vWF (Denis *et al.*, 2001). Réciproquement, ces organites spécialisés sont indispensables pour la maturation du vWF en un polymère fonctionnellement actif (Nightingale et Cutler, 2013). Les principales étapes de la biogenèse des WPBs sont représentées dans la Figure 17.



**Figure 17 :** représentation schématique de la formation des WPBs. (1) La tubulisation du vWF et la présence du manteau clathrine/AP-1 sont nécessaires pour la formation des WPBs au niveau du TGN. (2) Les WPBs continuent de s'allonger tandis qu'ils restent associés au TGN. (3) Après dissociation du TGN, les WPBs immatures restent localisés près du noyau. Le revêtement clathrine/AP-1 disparaît tandis que les tubules sont toujours désorganisés. (4) Le transfert des WPBs de la région périnucléaire vers la périphérie cellulaire, dépendant du cytosquelette, s'accompagne de leur maturation. (5) Les WPBs matures sont compactés et denses aux électrons. D'après Metcalf *et al.*, 2008

Le vWF est synthétisé sous la forme d'un **monomère de 350 kDa** et de 2813 acides aminés contenant une séquence signal de 22 résidus, un pro-peptide de 741 résidus et une région de 2050 résidus correspondant à la protéine mature (Metcalf *et al.*, 2008 ; Nightingale et Cutler, 2013). Il forme un **dimère** dans le réticulum endoplasmique grâce à des **ponts disulfure dans la région C-terminale** puis rejoint l'appareil de Golgi par la **voie antérograde**. Dans l'appareil de Golgi se produit le **clivage du pro-peptide** et la multimérisation de la protéine en tubules dans un processus appelé **tubulisation** (Nightingale et Cutler, 2013). La tubulisation permet la condensation du vWF sans laquelle

le stockage intracellulaire du vWF serait impossible (Metcalf *et al.*, 2008). Les WPBs les plus précoces apparaissent au niveau du **réseau trans-Golgien (TGN)** par l'incorporation des tubules de vWF dans des expansions du TGN recouvertes par **un manteau de clathrine** et par la **protéine adaptatrice AP-1** (Lui-Roberts *et al.*, 2005 ; Zenner *et al.*, 2007). La protéine AP-1 est nécessaire pour l'adressage des WPBs vers une **voie de sécrétion régulée** par des sécrétagogues. L'absence de la protéine AP-1 résulte en une diminution de la sécrétion régulée des WPBs qui ne répondent pas aux sécrétagogues et par conséquent en une augmentation de la sécrétion basale des WPBs (Lui-Roberts *et al.*, 2005 ; Lui-Roberts *et al.*, 2008). Certains composants protéiques sont incorporés dans les WPBs naissants au niveau du TGN, comme la protéine sécrétée Ang-2 ou la protéine membranaire P-sélectine. Après **dissociation du TGN**, les WPBs immatures restent dans une **région périnucléaire** où ils incorporent d'autres protéines membranaires comme le marqueur endosomal/lysosomal tardif CD63 ou des protéines liées à l'exocytose Rab27A et Rab3D (Metcalf *et al.*, 2008 ; Valentijn *et al.*, 2011) puis se dispersent dans le cytoplasme. Les WPBs immatures sont acheminés de la région périnucléaire vers la périphérie cellulaire grâce au réseau de **microtubules** et aux **microfilaments d'actine** associés respectivement à la **kinésine/dynéine** et à la **myosine** (de Wit et van Mourik, 2001 ; Manneville *et al.*, 2003 ; Rondaij *et al.*, 2006b ; Rojo Pulido *et al.*, 2011). L'adressage des WPBs vers la périphérie cellulaire s'accompagne de leur **maturation** se traduisant notamment par la **perte du revêtement clathrine/AP-1** (Lui-Roberts *et al.*, 2005 ; Zenner *et al.*, 2007) et par une **acidification** des WPBs vers un pH d'environ 5,4 (Erent *et al.*, 2007). La maturation permet également une **compaction** progressive de 45% des WPBs, leur diamètre passant d'environ 220 nm pour les WPBs immatures à 150 nm pour les WPBs matures (Zenner *et al.*, 2007).

### 3.2. L'exocytose des WPBs

L'exocytose des WPBs peut être basale ou régulée (Lopes da Silva et Cutler, 2016). L'**exocytose basale** des WPBs permet la sécrétion permanente de vWF en l'absence de *stimulus* et pourrait être la principale source de vWF plasmatique, nécessaire à l'hémostase. Par ailleurs, les cellules endothéliales peuvent sécréter le vWF et d'autres protéines grâce à l'**exocytose régulée** des WPBs. Dans ce cas, l'exocytose des WPBs est induite selon le contexte physiologique par des molécules appelées **sécrétagogues**. Plusieurs voies de signalisation intracellulaire peuvent être impliquées selon le *stimulus* et différents modes d'exocytose des WPBs ont été décrits.

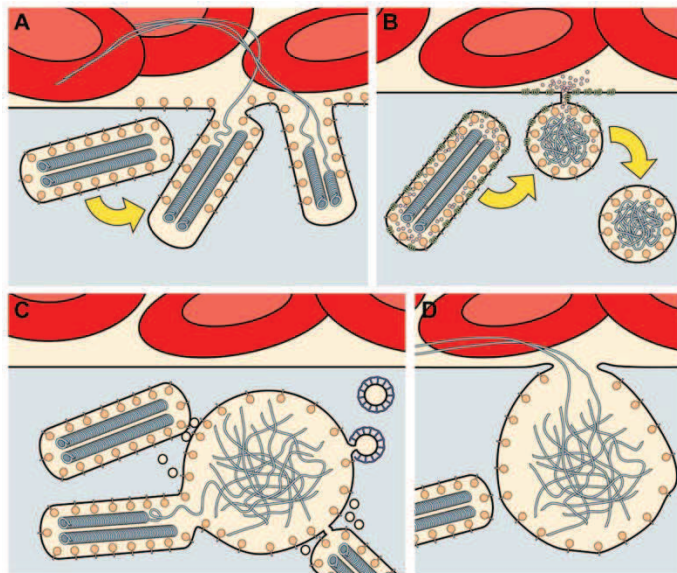
### 3.2.1. Les sécrétagogues et les voies de signalisation intracellulaire

Les principaux facteurs induisant l'exocytose des WPBs sont la thrombine, le VEGF, l'histamine, l'épinéphrine ou encore la vasopressine. Chez l'Homme, la **thrombine** est une protéase à sérine de 36 kDa obtenue par le clivage de la prothrombine synthétisée à partir du gène F2 situé sur le chromosome 11. Elle joue un rôle majeur dans les premières phases de la cascade de la coagulation (Jamieson, 1997 ; Coughlin, 2000). La fixation de la thrombine sur une famille de **récepteurs activés par des protéases** appelés **PARs** induit l'exocytose des WPBs par l'activation de deux voies de signalisation : la voie de l'**adénylate cyclase (AC)** dont le messager est l'**AMPc** (Cleator *et al.*, 2006) et la voie de la **phospholipase C- $\gamma$  (PLC-  $\gamma$ )** induisant une augmentation rapide du taux de **Ca<sup>2+</sup> intracellulaire** (Rondaij *et al.*, 2008 ; van den Biggelaar *et al.*, 2014). La stimulation des récepteurs PARs par la thrombine permet une réponse très rapide des cellules endothéliales qui sécrètent du vWF en seulement  $1,6 \pm 0,2$  secondes entre l'augmentation du taux de Ca<sup>2+</sup> intracellulaire et l'exocytose des WPBs (Erent *et al.*, 2007). Le **VEGF** peut également induire l'exocytose des WPBs (Matsushita *et al.*, 2005 ; Lorenzi *et al.*, 2008 ; Xiong *et al.*, 2009). Dans ce cas, l'exocytose des WPBs est induite par la phosphorylation de la **tyrosine 1175 du VEGFR-2** qui active ensuite deux voies de signalisation : la voie de la **PLC- $\gamma$**  et la voie de l'**AC**. La voie de la PLC- $\gamma$  met en jeu le **Ca<sup>2+</sup> intracellulaire** (Xiong *et al.*, 2009) et la **protéine kinase C- $\delta$  (PKC- $\delta$ )** (Lorenzi *et al.*, 2008) tandis que la voie de l'**AC** active la **protéine kinase A (PKA)** induisant une augmentation du taux d'AMPc (Xiong *et al.*, 2009). Ainsi, il apparait que la thrombine et le VEGF utilisent des voies de signalisation et des médiateurs communs pour induire l'exocytose des WPBs. Enfin, l'exocytose des WPBs peut être induite par un **stress mécanique** des cellules endothéliales comme les **forces de cisaillement**, bien que les détails moléculaires ne soient pas bien connus (Galbusera *et al.*, 1997 ; Huang *et al.*, 2009).

### 3.2.2. Les différents modes d'exocytose

Tandis qu'ils terminent leur maturation, les WPBs sont acheminés grâce aux microtubules et aux microfilaments d'actine vers la périphérie cellulaire où ils peuvent être sécrétés en réponse à des *stimuli* chimiques ou mécaniques. Plusieurs modes d'exocytose des WPBs, qui dépendent du *stimulus* et du contenu protéique, ont été décrits (Figure 18).





**Figure 18 : trois modes d'exocytose des WPBs.** (A) Exocytose "conventionnelle" dans laquelle un WPB isolé fusionne avec la membrane plasmique et libère tout son contenu. (B) Exocytose « lingering-kiss » au cours de laquelle la fusion d'un WPB isolé avec la membrane plasmique génère un pore permettant uniquement la sécrétion des petites protéines. (C, D) Exocytose multigranulaire dans laquelle plusieurs WPBs fusionnent avant de libérer leur contenu. D'après Valentijn *et al.*, 2011.

Les WPBs peuvent être sécrétés par un mode d'**exocytose conventionnelle** au cours de laquelle un WPB fusionne avec la membrane plasmique pour libérer tout son contenu (McNiff *et Gil*, 1983 ; Romani de Wit *et al.*, 2003b ; Hannah *et al.*, 2005 ; Erent *et al.*, 2007 ; Babich *et al.*, 2009). Dans l'exemple de la Figure 18A, la P-sélectine est transférée sur la membrane plasmique tandis que le vWF est libéré dans le sang où il peut former de longs polymères sur lesquels les plaquettes adhèrent. Les WPBs peuvent également être sécrétés par un mode d'**exocytose « lingering-kiss »** au cours de laquelle un WPB fusionne avec la membrane plasmique mais libère une partie seulement de son contenu (Babich *et al.*, 2008). La fusion avec la membrane plasmique crée un pore d'environ 10-12 nm de diamètre permettant une sécrétion sélective des plus petites protéines. Dans l'exemple de la Figure 18B, la protéine membranaire CD63 est transférée sur la membrane plasmique et la protéine soluble IL-8 est sécrétée dans la circulation tandis que le vWF ou la P-sélectine sont retenus. Ce mode d'exocytose est caractérisé par un arrondissement des WPBs qui finissent par se dissocier de la membrane plasmique. Enfin, un mode d'**exocytose multigranulaire** a été décrit (Valentijn *et al.*, 2010). Dans ce cas, la fusion de plusieurs WPBs génère de grandes vésicules intracellulaires appelées « secretory pods » qui fusionnent ensuite avec la membrane plasmique. Comme représenté dans la Figure 18C, la fusion des WPBs est favorisée par de petites vésicules appelées nanovésicules. A l'intérieur des « secretory pods », le vWF perd son organisation en tubules. La Figure 18D montre que la fusion des « secretory pods » avec la membrane plasmique permet la libération de polymères de vWF à travers un large pore d'environ 1-2  $\mu\text{m}$ .

Il semble que ces différents modes d'exocytose permettent aux cellules endothéliales d'adapter leur réponse au contexte physiologique (Valentijn *et al.*, 2011). Ainsi, les « secretory pods » pourraient faciliter la formation de longs polymères de vWF au niveau d'un site spécifique de l'endothélium grâce à l'accumulation de quantités importantes de vWF avant l'exocytose des WPBs. Par ailleurs, l'exocytose conventionnelle pourrait être favorisée dans des situations où les autres composants des WPBs sont nécessaires, comme l'exposition de la P-sélectine sur la membrane plasmique pour initier le recrutement des leucocytes dans un contexte inflammatoire. Enfin, l'exocytose « lingering-kiss » permet une sécrétion sélective des composants des WPBs en fonction de leur taille.

### 3.3. Les principales fonctions des WPBs

Le stockage de nombreuses protéines dans les WPBs permet la sécrétion régulée de facteurs impliqués dans des processus biologiques variés aussi variés que l'**hémostase**, l'**inflammation** ou encore l'**angiogenèse**.

#### 3.3.1. Les WPBs et l'hémostase primaire

Le composant majoritaire des WPBs est le vWF dont le rôle principal est de participer à l'hémostase primaire en permettant l'adhérence des plaquettes sanguines à la surface des cellules endothéliales ou à la matrice sous-endothéliale dans le cas d'une rupture de l'endothélium (Wang *et al.*, 2013). Suite à l'exocytose des WPBs, le vWF sécrété forme de longs polymères sur lesquels l'**adhérence des plaquettes** permet d'initier la formation d'un **caillot sanguin** *via* la liaison du vWF au **facteur de la coagulation VIII (FVIII)**. De plus, la fixation du vWF sur le FVIII permet de protéger ce dernier de la protéolyse (Sadler, 1998 ; Valentijn *et al.*, 2011). Les longs polymères de vWF sont ensuite coupés en fragments par la protéase **ADAMTS-13** (a disintegrin and metalloproteinase with a thrombospondin type 1 motif, member 13) pour éviter les occlusions vasculaires (Dong *et al.*, 2002). L'importance du vWF dans l'hémostase est souligné par la **maladie von Willebrand (VWD)** dans laquelle un déficit quantitatif (VWD de type 1 et de type 3) ou fonctionnel (VWD de type 2) du vWF est à l'origine de troubles hémorragiques (Sadler *et al.*, 2006).



### 3.3.2. Les WPBs et l'inflammation

Les WPBs assurent un rôle dans l'inflammation en permettant notamment l'exposition de la **P-sélectine** à la surface de l'endothélium (Wagner, 1993), nécessaire au recrutement des leucocytes, ou encore en libérant des **cytokines pro-inflammatoires** comme l'**IL-8** capable d'attirer les granulocytes neutrophiles vers un site d'infection. Le vWF participe indirectement à l'inflammation puisqu'il est indispensable pour la formation des WPBs, comme évoqué plus haut. De plus, des données suggèrent que le vWF pourrait directement participer à l'inflammation (Lenting *et al.*, 2012). Il a été montré que l'interaction du **vWF** avec un ligand de la P-sélectine (**P-Selectin Glycoprotein Ligand-1, PSGL-1**) et les **intégrines  $\beta 2$**  favorise l'adhérence des leucocytes (Pendou *et al.*, 2006) et que le vWF peut se lier au **récepteur Siglec-5** porté par les cellules immunitaires (Pegon *et al.*, 2012). Enfin, il a été montré que les complexes formés par les polymères de vWF et les plaquettes sanguines adhérentes participent à l'extravasation des leucocytes (Bernardo *et al.*, 2005 ; Petri *et al.*, 2010).

### 3.3.3. Les WPBs et l'angiogenèse

Si le rôle des WPBs dans l'hémostase et l'inflammation est relativement bien connu, de rares travaux montrent un rôle direct du vWF au cours de l'angiogenèse (Starke *et al.*, 2011), suggérant un rôle possible des WPBs. Dans cette étude, l'équipe d'Anna M. RANDI a montré que les souris KO vWF<sup>-/-</sup> présentent une angiogenèse accrue et un réseau vasculaire plus dense tandis que la déplétion par siRNA du vWF dans des cellules endothéliales humaines augmente la tubulogenèse, la migration et la prolifération des cellules endothéliales par des mécanismes dépendant du VEGFR-2 et de l'intégrine  $\alpha\beta 3$ , une molécule d'adhérence hétérodimérique impliquée dans l'angiogenèse et l'homéostasie vasculaire (Brooks *et al.*, 1994 ; Hodivala-Dilke, 2008). Il a été montré que le vWF se lie à l'intégrine  $\alpha\beta 3$  (Cheresh, 1987 ; Huang *et al.*, 2009) et régule l'expression de la chaîne  $\beta 3$  (Starke *et al.*, 2011). De plus, l'inhibition du vWF par siRNA ou dans des modèles animaux montre que le vWF régule la sécrétion (Starke *et al.*, 2011 ; Starke *et al.*, 2013) et l'expression de l'Ang-2 (Starke *et al.*, 2013 ; Yuan *et al.*, 2016), un facteur pro-angiogénique contenu dans les WPBs (Fiedler *et al.*, 2004). Ainsi, il est proposé que le vWF pourrait réguler l'angiogenèse, la migration et la prolifération des cellules endothéliales par une **voie extracellulaire** mettant en jeu l'**intégrine  $\alpha\beta 3$**  et par une **voie intracellulaire** impliquant

l'**Ang-2**, ces deux voies convergeant vers la signalisation du VEGFR-2 (Randi, 2016). Cependant, aucune donnée de la littérature ne montre clairement un rôle direct des WPBs au cours de l'angiogenèse et les mécanismes liant les acteurs moléculaires évoqués ci-dessus restent à préciser.

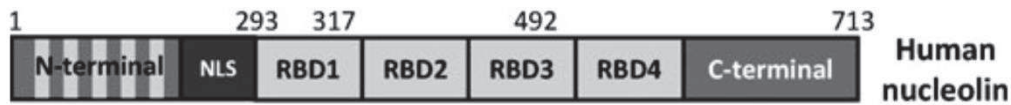
## 4. La nucléoline

La nucléoline est une **nucléoprotéine** essentiellement exprimée dans le **noyau** et le **nucléole** des cellules quiescentes mais **relocalisée à la surface des cellules en prolifération**, notamment les cellules tumorales et les cellules endothéliales activées au cours de l'angiogenèse. L'expression de la nucléoline à la surface cellulaire est un marqueur des cellules endothéliales dans les vaisseaux angiogéniques (Christian *et al.*, 2003). Par conséquent, la relocalisation de la nucléoline à la surface cellulaire est un évènement clé de l'activation endothéliale survenant au cours de l'angiogenèse. La nucléoline a des localisations cellulaires et des fonctions très variées, ce qui rend cette protéine difficile à étudier. Elle peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles et ses fonctions sont généralement corrélées à sa localisation.

### 4.1. La structure de la nucléoline

La nucléoline est décrite pour la première fois chez l'humain en **1973** (Orrick *et al.*, 1973) et initialement appelée **protéine C23** en raison de sa mobilité sur un gel d'électrophorèse à deux dimensions (Prestayko *et al.*, 1974). Le gène humain de la nucléoline est situé sur le locus **2q12-qter** et est composé de **14 exons** et **13 introns** (Srivastava *et al.*, 1990). La protéine humaine contient **710 acides aminés** pour une **masse théorique de 77 kDa** (Uniprot P19338). Sa séquence aminopeptidique est très fortement conservée entre les espèces, ce qui suggère un rôle crucial de cette protéine dans le fonctionnement des cellules eucaryotes. Expérimentalement, on attribue plutôt à la nucléoline une **masse réelle de 100 à 110 kDa**. Cette différence entre la masse théorique et la masse réelle de la nucléoline est expliquée par les **nombreuses modifications post-traductionnelles** que peut subir la protéine et par l'existence de **protéines homologues** (Srivastava *et al.*, 1989). La nucléoline peut être fortement **phosphorylée** (Olson *et al.*, 1975 ; Rao *et al.*, 1982), **méthylée** (Lischwe *et al.*, 1982) et **ADP-ribosylée** (Leitinger et

Wesierka-Gadek, 1993). La protéine est organisée en différents domaines fonctionnels (Figure 19).



**Figure 19 : domaines fonctionnels de la nucléoline.** La nucléoline est composée d'un domaine N-terminal phosphorylable pouvant réguler la condensation de la chromatine via la liaison à l'histone H1, d'une séquence d'adressage au noyau (NLS), de 4 domaines de liaison aux ARN (RBD1 à 4) et d'un domaine C-terminal riche en glycine, arginine et phénylalanine pouvant se lier à des ARN et des protéines. D'après Losfeld et al., 2011.

Structurellement, la nucléoline est composée de trois principaux domaines : un **domaine N-terminal**, un **domaine central** et un **domaine C-terminal**.

Le domaine N-terminal est composé de **régions hautement acides** espacées par des **séquences basiques**. Ce domaine contient de nombreux **sites de phosphorylation**. Les domaines acides peuvent se lier à l'**histone H1**, induisant sa dissociation de l'ADN et la **décondensation de la chromatine** (Olson et Thompson, 1983 ; Erard et al., 1988 ; Erard et al., 1990). De plus, le domaine N-terminal de la nucléoline est impliqué dans de nombreuses **interactions avec d'autres protéines** (Ginisty et al., 1998), notamment des protéines ribosomales (Bouvet et al., 1998). Enfin, ce domaine est **phosphorylé par de nombreuses kinases** (Mamrack et al., 1979 ; Rao et al., 1982 ; Bourbon et al., 1983). La nucléoline est notamment phosphorylée par les kinases Casein Kinase II (CK2) pendant l'interphase (Caizergues-Ferrer et al., 1987 ; Li et al., 1996) et p34<sup>cdc2</sup> pendant la mitose (Belenguer et al., 1989 ; Peter et al., 1990). La phosphorylation de la nucléoline sur son domaine N-terminal pourrait réguler ses fonctions pendant le cycle cellulaire.

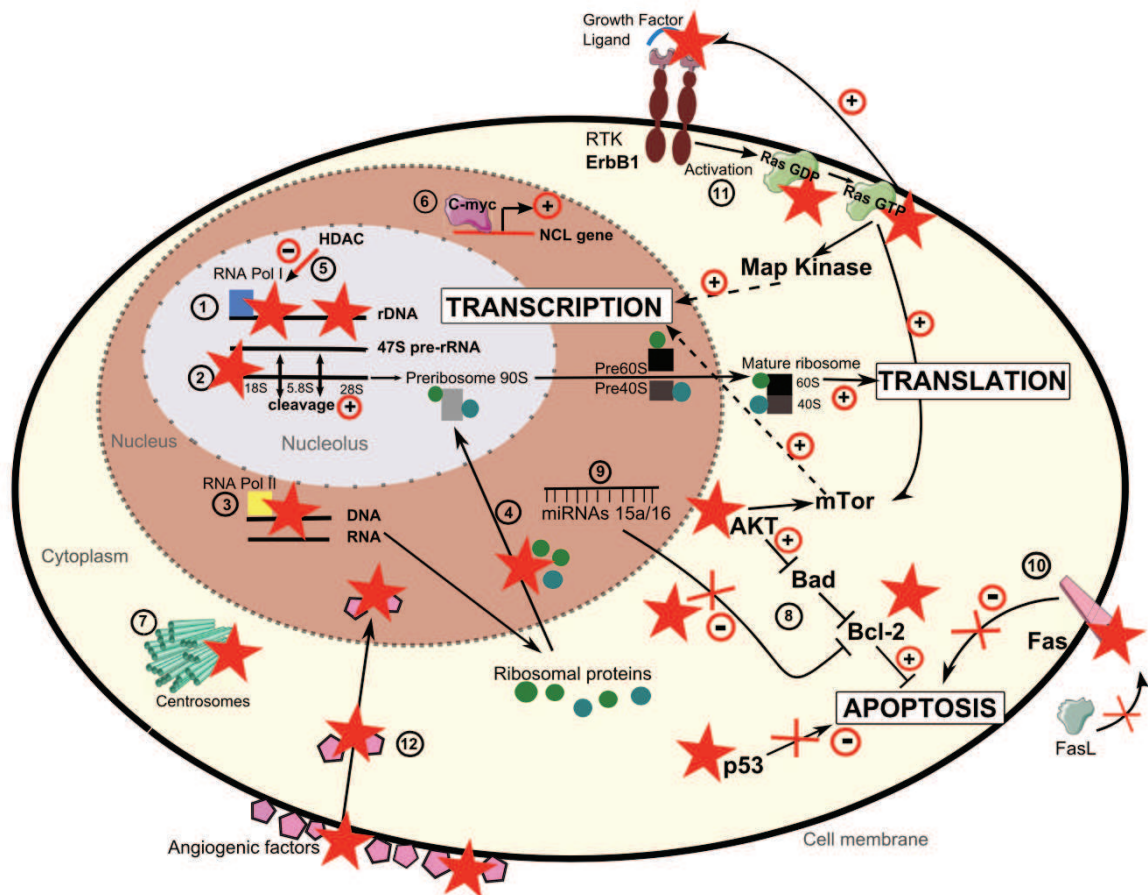
Situé en aval de la séquence de localisation nucléaire (NLS), le domaine central de la nucléoline contient **quatre domaines de liaison aux ARN (RBD1 à 4)**, également appelés motifs de reconnaissance des ARN (RRM). Avant même la découverte de ces motifs, la forte présence de la nucléoline dans les **régions fibrillaires denses du nucléole** (Lischwe et al., 1981 ; Escande et al., 1985) laissait déjà supposer que la protéine pouvait interagir avec les ARN ribosomiaux (ARNr). En 1986, il est montré que la nucléoline peut s'associer avec des **ARN pré-ribosomiaux** naissant (Herrera et Olson, 1986). La nucléoline se lie avec une

grande affinité et une grande spécificité à la région 5'-ETS (5'-External Transcribed Spacers) des ARN pré-ribosomiaux (Ghisolfi *et al.*, 1992b ; Serin *et al.*, 1996). Les ARNr cibles contiennent un **site minimal de fixation** à la nucléoline appelé **élément de reconnaissance de la nucléoline (NRE)** (Serin *et al.*, 1997 ; Ginisty *et al.*, 2001). Par ailleurs, il a été montré que le domaine central permet l'**association de plusieurs molécules de nucléoline** (Hanakahi *et al.*, 2000).

Le domaine C-terminal de la nucléoline est appelé **domaine GAR ou RGG** en raison de sa forte teneur en glycine, arginine et phénylalanine. Il peut lier des protéines ribosomales (Bouvet *et al.*, 1998), des ARNr (Ghisolfi *et al.*, 1992a) ou d'autres protéines comme la lactoferrine (Legrand *et al.*, 2004).

## 4.2. Les localisations cellulaires et les fonctions de la nucléoline

La nucléoline est une nucléoprotéine majoritairement exprimée dans le nucléole des cellules. Elle est aussi exprimée dans le nucléoplasme, où elle peut représenter jusqu'à 10% des protéines nucléaires (Bugler *et al.*, 1982), dans le cytoplasme (Borer *et al.*, 1989) et à la membrane plasmique (Semenkovich *et al.*, 1990). La nucléoline possède de nombreuses fonctions qui dépendent du compartiment cellulaire dans lequel elle se trouve (Figure 20).



**Figure 20 : localisations cellulaires et principales fonctions de la nucléoline.** La nucléoline est symbolisée par l'étoile rouge. Présente dans tous les compartiments des cellules en prolifération, la nucléoline favorise notamment la croissance tumorale. Elle participe à l'expression génique en favorisant la transcription et la traduction. De plus, elle protège les cellules de l'apoptose en stabilisant l'ARNm de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 dans le cytoplasme et en inhibant la signalisation Fas-FasL à la membrane plasmique. D'après Berger et al, 2015.

#### 4.2.1. La nucléoline nucléaire et la biogenèse des ribosomes

Dans le nucléole, la nucléoline participe à la synthèse des ARNr en augmentant la **transcription des ARNr** par l'ARN polymérase I (Figure 20, ①) et en favorisant le maintien de l'ADN codant pour les ARNr, l'ADN ribosomique (ADNr), sous la forme d'euchromatine active (Figure 20, ⑤). En effet, la déplétion de la nucléoline par siRNA dans des cellules humaines entraîne une diminution de la quantité d'ARN pré-ribosomiaux s'accompagnant d'une augmentation de l'hétérochromatine et d'une diminution de l'euchromatine au niveau de l'ADNr (Rickards *et al.*, 2007 ; Ugrinova *et al.*, 2007 ; Cong *et al.*, 2012). La nucléoline peut se lier directement sur la chromatine au niveau du promoteur et

des régions codantes des ARNr (Rickards *et al.*, 2007 ; Cong *et al.*, 2012). On attribue également à la nucléoline un rôle de protéine chaperonne qui pourrait favoriser la progression de l'ARN polymérase I le long de l'ADN lors de la transcription des ARN pré-ribosomiaux (Angelov *et al.*, 2006). La fixation de la nucléoline sur l'ADNr empêche la fixation du facteur de terminaison de la transcription 1 (TTF-1) nécessaire pour le recrutement de l'histone désacétylase (HDAC), responsable de la conversion de l'euchromatine en hétérochromatine. Ainsi, la nucléoline pourrait inhiber la condensation de la chromatine et favoriser le maintien de l'ADNr sous forme d'euchromatine permettant la transcription (Cong *et al.*, 2012). De plus, la nucléoline permet la **maturation des ARNr** en favorisant le clivage des ARN pré-ribosomiaux (Figure 20, ②) *via* sa fixation sur la région 5'-ETS des ARN pré-ribosomiaux (Ginisty *et al.*, 1998 ; Ginisty *et al.*, 2000). Enfin, la nucléoline participe à l'**assemblage des ribosomes** en interagissant avec des protéines ribosomiales grâce aux motifs RGG de son domaine c-terminal (Bouvet *et al.*, 1998 ; Roger *et al.*, 2003).

Dans le nucléoplasme, la nucléoline participe à la **transcription des ARNm** par l'ARN polymérase II (Figure 20, ③) et au **transfert des protéines ribosomiales** du cytoplasme vers le noyau (Figure 20, ④). Il a été montré notamment que la nucléoline augmente l'expression du VEGF en se fixant sur le promoteur du gène et en favorisant la transcription de l'ARNm codant pour le VEGF (Uribe *et al.*, 2003), ce qui suggère un rôle de la nucléoline au cours de l'angiogenèse. Enfin, la nucléoline favorise l'**expression de gènes impliqués dans la tumorigenèse** en se liant au promoteur d'oncogènes tels que *C-MYC* (Figure 20, ⑥) et en interagissant avec des miRNA régulant l'expression des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (Figure 20, ⑨).

#### 4.2.2. La nucléoline cytoplasmique et la survie cellulaire

Dans le cytoplasme, la nucléoline participe au maintien de l'**intégrité des centrosomes** (Figure 20, ⑦). Bien que les mécanismes moléculaires entre la nucléoline et les centrosomes ne soient pas encore connus, il a été montré que l'inhibition de la nucléoline par siRNA provoque des aberrations nucléaires dans les cellules en interphase (noyaux multiples, micronoyaux) et un dysfonctionnement des centrosomes dans les cellules en mitose, avec l'apparition de fuseaux mitotiques multipolaires (Ugrinova *et al.*, 2007 ; Gaume *et al.*, 2011). *In fine*, le knock-down de la nucléoline induit un arrêt du cycle



cellulaire et une augmentation de l'apoptose (Ugrinova *et al.*, 2007 ; Gaume *et al.*, 2011). Il semble qu'il s'agisse d'effets directs de la nucléoline puisque plusieurs études ont montré que la nucléoline est directement associée aux centrosomes et aux fuseaux mitotiques. En effet, la nucléoline a été détectée dans les centrosomes humaines (Andersen *et al.*, 2003) et dans les fuseaux mitotiques (Sauer *et al.*, 2005) par des analyses protéomiques. Une forme phosphorylée de la nucléoline a également été observée dans les pôles des fuseaux mitotiques par immunofluorescence (Ma *et al.*, 2007). Ainsi, il semble que la nucléoline soit impliquée dans la prolifération cellulaire en participant aux mécanismes de la division cellulaire.

Par ailleurs, la nucléoline régule la **stabilité de nombreux ARNm** (Figure 20, ⑧). Le Tableau 2 présente les principaux ARNm cibles de la nucléoline.

mRNA (protein)	Interaction with Nucleolin	Consequences on mRNA	Other factors involved	Implication in disease
<b>BCL2</b> (Bcl-2)	3'UTR ARE	Stabilization	HuR cooperates AUF1 antagonizes	Cancer (anti-apoptotic)
<b>APP</b> (APP)	3'UTR	Decay	hnRNP C antagonizes	Alzheimer's Disease
<b>IL2</b> (IL-2)	5'UTR	Stabilization	YB-1 cooperates	Cancer (immunosurveillance)
<b>GADD45A</b> (Gadd45 $\alpha$ )	3'UTR	Stabilization	TIAR antagonizes (?) AUF1 antagonizes (?)	Cancer (stress response)
<b>GAST</b> (Gastrin)	3'UTR	Stabilization	hnRNP C cooperates PCBP1 cooperates	Cancer (inflammation)
<b>HBB</b> ( $\beta$ globin)	3'UTR	Stabilization	hnRNP E cooperates	Thalassemia
<b>PGHS1</b> (Pghs-1)	5'UTR NRE	Translation repression	NF45, NF90 cooperate (?)	Inflammation
<b>TP53</b> (p53)	5'UTR	Translation repression	RPL26 antagonizes	Cancer
<b>MMP9</b> (MMP9)	3'UTR	Translation enhancement	HuR cooperates (?)	Cancer (invasion)
<b>AKT1</b> (Akt1)	5'UTR,CR,3'UTR	Translation enhancement	-	Cancer (survival)
<b>CCNI</b> (Cyclin I)	5'UTR,CR,3'UTR	Translation enhancement	-	Cancer (anti-apoptotic)

**Tableau 2 : principaux ARNm cibles de la nucléoline.** La nucléoline favorise la croissance tumorale en stabilisant l'ARNm de Bcl-2 (inhibition de l'apoptose), en inhibant la traduction du suppresseur de tumeur p53 ou encore en augmentant la traduction de la métalloprotéinase MMP-9, impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire, l'invasion des cellules cancéreuses et la formation des métastases. D'après Abdelmohsen et Gorospe, 2012.

Comme mentionné plus haut, la nucléoline peut se lier à des ARN grâce aux domaines RBD de son domaine central et à son domaine C-terminal. Des analyses par

immunoprécipitation de complexes ribonucléoprotéiques dans des cellules HeLa ont permis d'identifier de nombreux ARN liés à la nucléoline (Abdelmohsen et Gorospe, 2012). La nucléoline exerce notamment un **rôle anti-apoptotique** en stabilisant les ARNm de Bcl-XL (Zhang *et al.*, 2008) et de Bcl-2 (Sengtupa *et al.*, 2004 ; Otake *et al.*, 2007 ; Ishimaru *et al.*, 2010) de même qu'en inhibant la traduction de l'ARNm de p53 (Takagi *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2012). Ainsi en régulant la stabilité et la traduction des ARNm de plusieurs protéines impliquées dans l'apoptose et la prolifération cellulaire, la nucléoline possède des activités anti-apoptotiques et pro-oncogéniques.

#### 4.2.3. La nucléoline membranaire et la fixation de ligands extracellulaires

Bien qu'elle ne possède ni domaine transmembranaire hydrophobe ni séquence d'adressage à la membrane, la nucléoline a été observée à la membrane plasmique pour la première fois en 1990 (Semenkovich *et al.*, 1990) puis par immunofluorescence et par microscopie électronique dans plusieurs études (Deng *et al.*, 1996 ; Larrucea *et al.*, 1998 ; Hovanessian *et al.*, 2000). Par conséquent, il semble que la nucléoline pourrait être associée à la membrane plasmique par des interactions hydrophobes ou électrostatiques. A la surface cellulaire, la nucléoline interagit avec des ligands impliqués dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et l'angiogenèse. La nucléoline **inhibe l'apoptose** en se liant au récepteur **Fas** (Figure 20, ⑩), inhibant ainsi l'interaction avec son ligand FasL (Wise *et al.*, 2013). Par ailleurs, la nucléoline **favorise la prolifération cellulaire et la migration** en interagissant avec **ErbB1** (Di Segni *et al.*, 2008) et **Ras** (Farin *et al.*, 2011). ErbB1 est un récepteur au facteur de croissance épidermique (EGF) dont la signalisation requiert l'activation de la voie Ras/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase). Les MAPK induisent la mitose, la prolifération cellulaire et la migration. La nucléoline peut se lier aux formes GDP et GTP de Ras grâce à son domaine C-terminal (Farin *et al.*, 2011). L'interaction de la nucléoline avec Ras-GTP augmente l'interaction de la nucléoline avec ErbB1 et stabilise le récepteur (Figure 20, ⑪). La stabilisation du récepteur ErbB1 activé entraîne une boucle de rétrocontrôle positive et une accumulation de Ras-GTP. Ainsi la nucléoline, ErbB1 et Ras participent à la croissance tumorale (Farin *et al.*, 2011) et favorisent la prolifération et la survie des cellules tumorales *in vitro* (Schokoroy *et al.*, 2013). La nucléoline interagit également avec des facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse comme le **facteur de croissance des hépatocytes (HGF)** (Tate *et al.*, 2006) et le **VEGF** (Huang *et al.*, 2006). Cependant, elle peut aussi se lier à l'**endostatine**, le fragment C-terminal du collagène XVIII.

La nucléoline et l'endostatine interagissent à la surface des vaisseaux angiogéniques et inhibent l'angiogenèse (Shi *et al.*, 2007). Enfin, la nucléoline participe au **transfert de molécules** de la surface vers le cytoplasme et le noyau (Figure 20, ⑫). A la surface cellulaire, la nucléoline fixe l'endostatine et les facteurs de croissance **pléiotrophine** (PTN) (Said *et al.*, 2005) et **midkine** (Shibata *et al.*, 2002) puis les transfère vers le noyau (Koutsoumpa *et al.*, 2012a ; Koutsoumpa *et al.*, 2012b ; Song *et al.*, 2012). Dans le noyau, midkine favorise la survie cellulaire (Shibata *et al.*, 2002) tandis que l'endostatine inhibe la phosphorylation de la nucléoline par la kinase CK2 et ainsi la prolifération cellulaire (Shi *et al.*, 2007).

### 4.3. Le ciblage de la nucléoline

L'expression de la nucléoline à la surface cellulaire est augmentée dans les **cellules tumorales** (Hoja-Lukowicz *et al.*, 2009 ; Galzio *et al.*, 2012) et dans les **cellules endothéliales activées** au cours de l'angiogenèse (Christian *et al.*, 2003). La surexpression de la nucléoline de surface favorise la croissance tumorale et l'angiogenèse et constitue un **marqueur de diagnostic** des cancers. De plus, la présence sélective de la nucléoline à la surface des cellules tumorales et non des cellules saines quiescentes fait de la nucléoline de surface une **cible potentielle** pour des inhibiteurs utilisables dans le traitement des cancers. A ce jour, plusieurs inhibiteurs ciblant la nucléoline de surface ont été développés depuis la fin des années 1990.

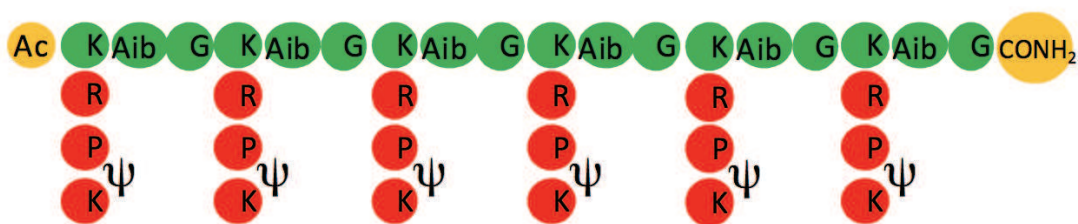
#### 4.3.1. Les molécules de ciblage de la nucléoline de surface

Le premier inhibiteur synthétique utilisé contre la nucléoline de surface est le **pseudopeptide HB-19**, formé par la répétition de 5 motifs KPR fixés sur une matrice TASP. Sa formule **5[KΨ(CH<sub>2</sub>N)PR]-TASP** indique la présence d'une liaison peptidique réduite Ψ(CH<sub>2</sub>N) entre les résidus lysine et proline. Comparé à la forme non réduite 5[KPR]-TASP, la liaison peptidique réduite augmente l'affinité, l'activité biologique et la résistance à la dégradation par les protéases (Callebaut *et al.*, 1997). Dans plusieurs travaux, l'équipe d'Hovanessian a montré que l'interaction entre la nucléoline et la boucle V3 de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 est nécessaire pour l'entrée du VIH dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. La liaison du peptide HB-19 sur la nucléoline de surface inhibe cette interaction et l'entrée du VIH (Nisole *et al.*, 1999 ; Nisole *et al.*, 2000 ; Nisole *et al.*, 2002). Par la suite,

l'équipe COURTY a montré que le ciblage de la nucléoline de surface par le peptide HB-19 exerce également une activité anti-tumorale et anti-angiogénique dans des modèles de tumeurs du sein et de mélanome (Destouches *et al.*, 2008 ; El Khoury *et al.*, 2010 ; Birmpas *et al.*, 2012). Puis d'autres inhibiteurs ont été développés et sont testés dans des essais cliniques, tels que le **pseudopeptide F3** (Christian *et al.*, 2003), l'**aptamer AS1411** (Bates *et al.*, 2009 ; Rosenberg *et al.*, 2014), l'**anticorps anti-nucléoline 4LB5** (Palmieri *et al.*, 2015) et un dérivé du peptide HB-19, le **NucAnt N6L**.

#### 4.3.2. L'histoire et la structure du N6L

L'étude des mécanismes d'entrée du VIH dans les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont permis de mettre en évidence une séquence riche en résidus lysine (K), proline (P) et arginine (R) dans la boucle V3 de la glycoprotéine d'enveloppe gp120 du virus (Callebaut *et al.*, 1993). Ces observations ont conduit à la synthèse du pseudopeptide HB-19 qui reprend 5 répétitions du motif KΨPR fixées sur une matrice TASP et qui inhibe l'entrée du VIH dans les cellules cibles (Callebaut *et al.*, 1996). D'autres études ont ensuite montré que le récepteur de la boucle V3 et du peptide HB-19 est une glycoprotéine de 95 kDa (Callebaut *et al.*, 1997) identifiée par la suite comme étant la nucléoline (Callebaut *et al.*, 1998). Comme décrit ci-dessus, plusieurs études ont montré des effets anti-tumoraux et anti-angiogéniques du pseudopeptide HB-19. Des dérivés du peptide HB-19 ont ensuite été synthétisés et appelés **NucAnts** pour Nucleolin Antagonists. Les NucAnts sont une famille de 7 pseudopeptides synthétiques composés de répétitions du motif KΨPR fixées sur une matrice peptidique riche en lysines. Les différents NucAnts diffèrent par le **nombre de répétitions du motif KΨPR** et par leur **forme linéaire, cyclique ou hélicoïdale** (Thèse de Damien Destouches, 2009). Le **N6L** est un NucAnt de **forme hélicoïdale** composé de **6 répétitions du motif KΨPR** fixées sur une matrice riche en lysines constituée de 18 acides aminés (Figure 21). Le « L » de N6L signifie que les lysines sont sous forme lévogyre, tandis que la lettre Ψ symbolise la présence d'une liaison peptidique réduite entre les résidus lysine et proline des tri-peptides greffés sur la matrice.



**Figure 21 : structure du pseudopeptide N6L.** D'après la thèse de Damien Destouches, 2009.

Très riche en acides aminés basiques (lysines et arginines), le N6L est très **hydrophile** et **chargé positivement** au pH physiologique. La synthèse du N6L est brevetée par le CNRS et l'entreprise Immupharma (brevet WO 2009141687 A1, « Nouveau composé optiquement pur pour une amélioration de l'efficacité thérapeutique »).

#### 4.3.3. Les effets biologiques du N6L

Plusieurs travaux ont montré des effets anti-tumoraux et anti-angiogéniques du N6L. Les **effets anti-tumoraux** du N6L se traduisent par une diminution de la viabilité et de la prolifération cellulaire *in vitro*, de même qu'une inhibition de la croissance tumorale dans différents modèles tumoraux *in vivo*. Dans les cellules HeLa, la liaison du N6L sur la nucléoline de surface induit une **diminution de l'expression de la nucléoline de surface et de la nucléoline cytoplasmique** sans affecter l'expression de la nucléoline nucléaire (Krust *et al.*, 2011). De plus, le N6L **inhibe la croissance** des cellules endothéliales HUVECs et de plusieurs lignées de cellules tumorales (Destouches *et al.*, 2011). La variabilité de la sensibilité des différentes lignées cellulaires au N6L indique peut-être une variabilité de la quantité de nucléoline exprimée à la surface cellulaire. Des études de corrélation sont actuellement menées par Fabio RAINERI, étudiant en thèse dans l'équipe COURTY sous la direction d'Illaria CASCONI depuis janvier 2017. Par ailleurs, plusieurs techniques ont permis de mettre en évidence un **effet pro-apoptotique** du N6L sur différentes lignées tumorales (Destouches *et al.*, 2011 ; Krust *et al.*, 2011). D'autres études ont montré que le ciblage de la nucléoline par le N6L **diminue l'expression** de protéines dont la stabilité ou la traduction des ARNm est régulée par la nucléoline, notamment les métalloprotéinases matricielles MMP-2 et MMP-9 impliquées dans l'invasion des cellules tumorales et la formation des métastases (Krust *et al.*, 2011 ; Birmas *et al.*, 2012). Enfin, des études *in vivo* menées dans des modèles murins de xénogreffes ectopiques (MDA-MB-231 et PC3) ont mis en évidence que le traitement N6L **inhibe efficacement la croissance tumorale** dès 1

mg/kg sans présenter de toxicité sur les autres tissus et **allonge significativement la survie** des souris porteuses de lymphomes B (A20) et T (T29) (Destouches *et al.*, 2011).

Le N6L présente également des **propriétés anti-angiogéniques**. Il **inhibe l'adhérence, la prolifération et la migration** des cellules endothéliales humaines HUVECs **sans induire l'apoptose** de ces cellules (Destouches *et al.*, 2011 ; Birmapas *et al.*, 2012). Le N6L **diminue la phosphorylation de SRC, FAK, AKT et ERK1/2**, des kinases impliquées dans les voies de signalisation régulant l'angiogenèse (Birmapas *et al.*, 2012). De plus, le N6L induit une **diminution de l'expression de la MMP-2** dans les HUVECs (Birmapas *et al.*, 2012), une métalloprotéinase favorisant la dégradation de la MEC et l'invasion cellulaire. Enfin, il a été montré que le N6L inhibe également l'invasion cellulaire *via* le **relargage de l'inhibiteur tissulaire des métalloprotéinases 3 (TIMP-3)** (Destouches *et al.*, 2012).

Pour finir, la **biodistribution** du N6L a été étudiée chez des souris athymiques porteuses de xéno greffes de cellules tumorales MDA-MB-231 par l'injection intraveineuse de N6L-alexa fluor 633 (Destouches *et al.*, 2011). L'observation de la fluorescence a révélé une **accumulation du N6L dans la tumeur** dès 4 minutes après l'injection et un enrichissement du N6L dans la tumeur en cas d'injections répétées de N6L. Dans les animaux sans tumeur, le N6L fluorescent se distribue de manière homogène dans les poumons et les organes d'élimination comme les reins et le foie.

## 5. L'adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC)

Avec une incidence de 14,1 millions et un nombre de décès de 8,2 millions en 2012, les cancers restent la deuxième cause de mortalité dans le monde selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), derrière les maladies cardiovasculaires. Les cancers les plus fréquents chez l'homme sont le cancer du poumon (16,7%), le cancer de la prostate (15%) et le cancer colorectal (10%) tandis que le cancer du sein (25,2%), le cancer colorectal (9,2%) et le cancer du poumon (8,7%) sont les plus courants chez la femme (Ferlay *et al.*, 2015) (Ferlay *et al.*, 2015). Bien que relativement peu fréquent (12<sup>e</sup> cancer chez l'homme et 11<sup>e</sup> chez la femme) et représentant 2,4% des cas de cancer dans les deux sexes, le **cancer du pancréas est la 4<sup>e</sup> cause de mortalité par cancer** dans le monde avec une **survie globale à 5 ans parmi les plus faibles (inférieure à 5%)** (Cid-Arregui et Juarez, 2015). Avec une incidence croissante, les projections estiment que le cancer du pancréas pourrait

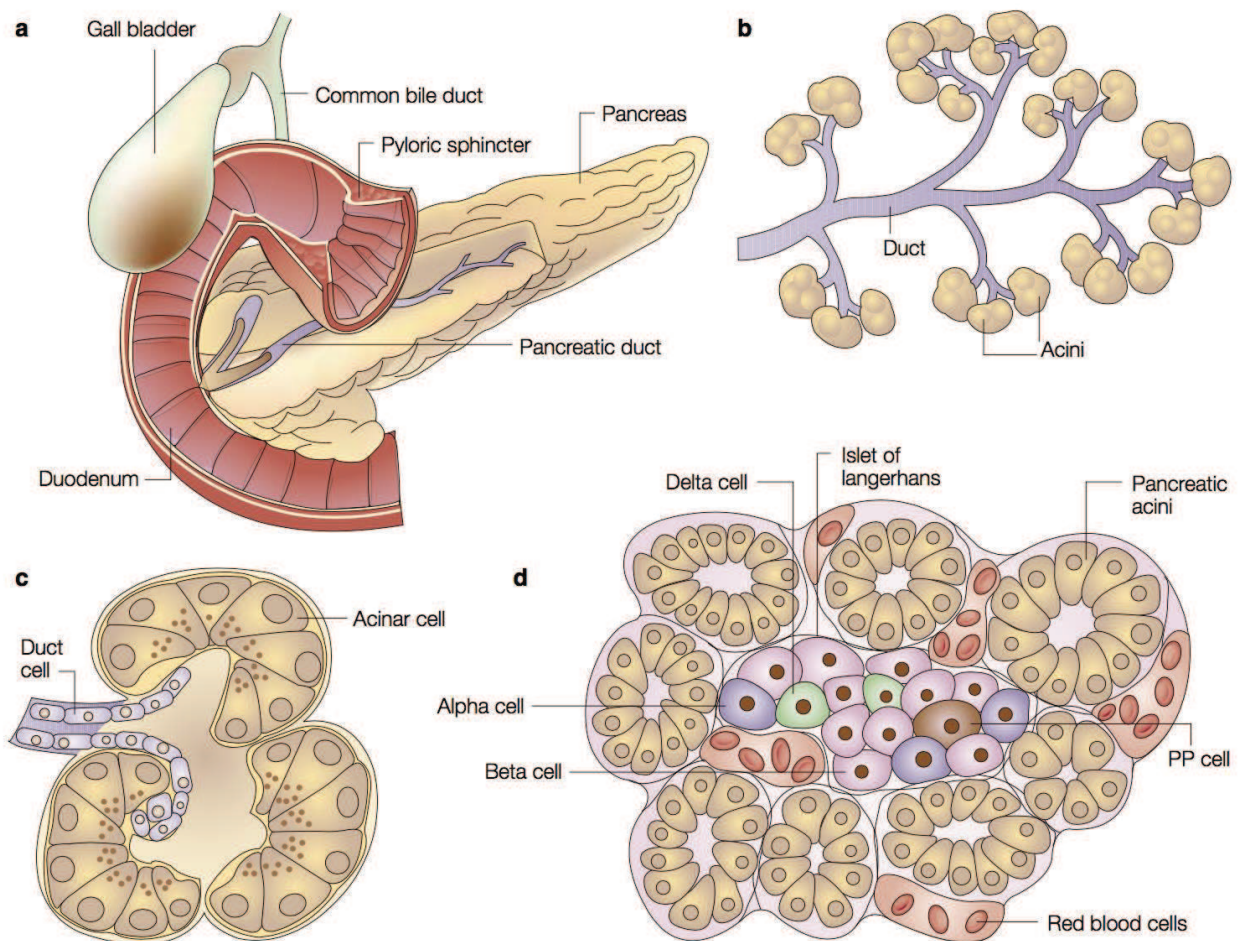


devenir la 2<sup>e</sup> cause de mortalité par cancer d'ici 2020. Il existe plusieurs types de cancer du pancréas, dont l'adénocarcinome pancréatique ductal.

## 5.1. Les différents types de cancer du pancréas

### 5.1.1. Structure et fonctions du pancréas

Le pancréas est un organe annexe du système digestif de forme allongée et situé dans la cavité abdominale, derrière l'estomac. Chez l'humain, il mesure environ 15 cm de long pour 4 cm de large et 2 cm d'épaisseur. Il est constitué de trois parties anatomiques : la **tête**, le **corps** et la **queue**. Assurant à la fois des fonctions exocrines et endocrines, le pancréas est une **glande amphicrine** (Rhim et Stanger, 2010 ; Cid-Arregui et Juarez, 2015) (Figure 22).



**Figure 22 : anatomie du pancréas.** (a) connexion du pancréas au duodénum de l'intestin grêle, (b) pancréas exocrine, (c) acinus pancréatique et (d) îlot de Langerhans inclus dans du

*tissu exocrine. Le pancréas est une glande amphicrine composée d'une partie exocrine (acini) et d'une partie endocrine (îlots de Langerhans). Les acini du pancréas exocrine déversent des sucs digestifs dans le duodénum tandis que les îlots de Langerhans du pancréas endocrine libèrent des hormones impliquées dans la régulation de la glycémie, notamment le glucagon (synthétisé par les cellules  $\alpha$ ) et l'insuline (produite par les cellules  $\beta$ ). D'après Bardeesy et DePinho, 2002.*

Le **pancréas exocrine** sécrète le **suc pancréatique** composé d'enzymes nécessaires pour la digestion des protéines, des glucides et des acides gras ingérés par l'organisme. Il est constitué par des **acini** formés de **cellules glandulaires acineuses** synthétisant ces enzymes (protéases, lipase, amylase) et les déversant dans des **canaux excréteurs** convergeant vers le canal de Wirsung et le canal de Santorini connectés à une partie de l'intestin grêle appelée duodénum. Le **pancréas endocrine** sécrète des **hormones**, des médiateurs solubles déversés dans le sang pour agir à distance sur des tissus cibles. Alors que le pancréas exocrine représente 95% de la masse de l'organe, le pancréas endocrine constitue seulement 1 à 2% de la masse pancréatique (Cid-Arregui et Juarez, 2015). Le pancréas endocrine est organisé en amas de cellules appelés **îlots de Langerhans** et composés de différents types cellulaires sécrétant chacun des hormones différentes. Les **cellules  $\alpha$**  sécrètent l'hormone hyperglycémiant **glucagon** et les **cellules  $\beta$**  synthétisent l'hormone hypoglycémiant **insuline**, tandis que les **cellules  $\delta$**  libèrent la **somatostatine**, une hormone réduisant la sécrétion du glucagon et de l'insuline. Enfin, les **cellules F** (également appelées **cellules PP**) sécrètent le **polypeptide pancréatique**, une hormone impliquée dans la régulation de la contraction de la vésicule biliaire et de la sécrétion exocrine du pancréas. Les cellules  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  et F représentent respectivement 20%, 70%, 5% et 5% des cellules du pancréas endocrine.

### 5.1.2. Les cancers du pancréas endocrine

Les cancers du pancréas endocrine sont appelés **tumeurs neuroendocrines pancréatiques (pNETs)**. Ce sont des tumeurs rares, représentant **1 à 2%** des tumeurs pancréatiques totales, mais leur incidence a plus que doublé depuis les trente dernières années (Lawrence *et al.*, 2011 ; Fraenkel *et al.*, 2012). Si la majorité des pNETs se développent de façon sporadique, des facteurs génétiques sont impliqués dans 10% des déclenchements de pNETs (de Wilde *et al.*, 2012 ; McKenna et Edil, 2014). Les pNETs sont

classées en **tumeurs fonctionnelles** (10%) ou en **tumeurs non fonctionnelles** (90%) (McKenna et Edil, 2014). Dans ce dernier cas, les patients ne présentent pas de symptômes liés à l'hyper-sécrétion hormonale, même si les taux hormonaux détectés sont élevés. En effet, les pNETs affectent le plus souvent un type cellulaire du pancréas endocrine, provoquant une augmentation spécifique de la sécrétion de l'hormone produite par ces cellules. Ainsi, on distingue l'**insulinome** (35-40% des pNETs), le **gastrinome** (16-30%), le **VIPome** (10%), le **glucagonome** (10%) et le **somatostatine** (5%) touchant respectivement la sécrétion de l'insuline, de la gastrine, du peptide vasoactif intestinal (VIP), du glucagon ou encore de la somatostatine (McKenna et Edil, 2014). La plupart des patients se présentent en consultation au stade métastatique (60%) ou au stade de pNET localisé avancé (21%) (Halfdanarson *et al.*, 2008). Le traitement des pNETs dépend du stade d'avancement de la tumeur. Le seul traitement réellement curatif à ce jour est la **résection chirurgicale de la tumeur**, envisageable dans la mesure où la maladie est encore à un stade localisé et que le siège de la tumeur le permette. Dans le cas où la tumeur est à un stade métastatique ou que l'intervention chirurgicale n'est pas envisageable, d'autres traitements peuvent être proposés et visent généralement à soulager les symptômes liés à l'hyper-sécrétion hormonale et à allonger la survie (McKenna et Edil, 2014). Parmi ces traitements figure le protocole de **radiothérapie par récepteur de peptide (PRRT)** permettant le ciblage des cellules tumorales *via* le couplage d'isotopes radioactifs à des analogues de la somatostatine (McKenna et Edil, 2014), une hormone surexprimée dans de nombreuses pNETs. Un autre traitement proposé est l'utilisation de cytotoxiques dans le cadre de **chimiothérapies** utilisant notamment la cisplatine, la streptomycine, le 5-Fluoro-Uracile (5-FU) ou encore la doxorubicine. Enfin, des **thérapies moléculaires dirigées** peuvent être proposées comme l'évérolimus, un inhibiteur de la voie de signalisation de mTOR impliquée dans 16% des tumeurs (McKenna et Edil, 2014). Les pNETs étant des tumeurs richement vascularisées, une récente étude utilisant l'inhibiteur de tyrosine kinase sunitinib a montré une amélioration de la survie des patients (Raymond *et al.*, 2011).

### 5.1.3. Les cancers du pancréas exocrine

La majorité des tumeurs pancréatiques apparaissent dans le pancréas exocrine (95%). Parmi ces tumeurs du pancréas exocrine, 95% sont des adénocarcinomes prenant origine dans les cellules acineuses des canaux pancréatiques. Ce type de tumeurs est appelé

**adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC)**. D'autres types de tumeurs du pancréas exocrine peuvent également se former à partir des cellules épithéliales des canaux pancréatiques, du tissu conjonctif ou du tissu lymphatique. Bien qu'ayant une **faible prévalence**, les tumeurs PDAC sont un type de cancer **très agressif** avec un **mauvais pronostic** et une **survie globale à 5 ans particulièrement basse (inférieure à 5%)** faisant des tumeurs PDAC le cancer le plus létal à l'heure actuelle (Ferlay *et al.*, 2015). Comme pour les autres types de cancers, la survie est d'autant plus faible que le diagnostic est tardif. Ainsi, la survie à 5 ans est de 25% pour les tumeurs PDAC localisées (stades I et IIA), de 9,9% pour les tumeurs ayant investi les ganglions drainants (stades IIB et III) et de 2,3% pour les tumeurs avec métastases (stade IV) (Cid-Arregui et Juarez, 2015). Malheureusement, seulement 9% et 27% des patients sont diagnostiqués respectivement aux stades localisé et étendu aux ganglions tandis que la plupart des patients sont diagnostiqués au stade métastatique (53%). La faible prévalence, la forte mortalité et l'incidence croissante des tumeurs PDAC en font une maladie pour laquelle se présente une nécessité urgente de découvrir de nouveaux traitements et de nouveaux marqueurs permettant un diagnostic plus précoce. En effet, la forte mortalité des tumeurs PDAC est le plus souvent liée à un diagnostic tardif au stade avancé voire métastatique en raison de l'absence de symptômes spécifiques pendant les stades précoces de la maladie et de l'absence de marqueurs diagnostics précoces connus. Les tumeurs PDAC se développent majoritairement dans la tête du pancréas (70%) et possèdent un fort potentiel métastatique vers le foie et les poumons (Cid-Arregui et Juarez, 2015).

## **5.2. Les tumeurs PDAC : tumorigenèse et microenvironnement tumoral**

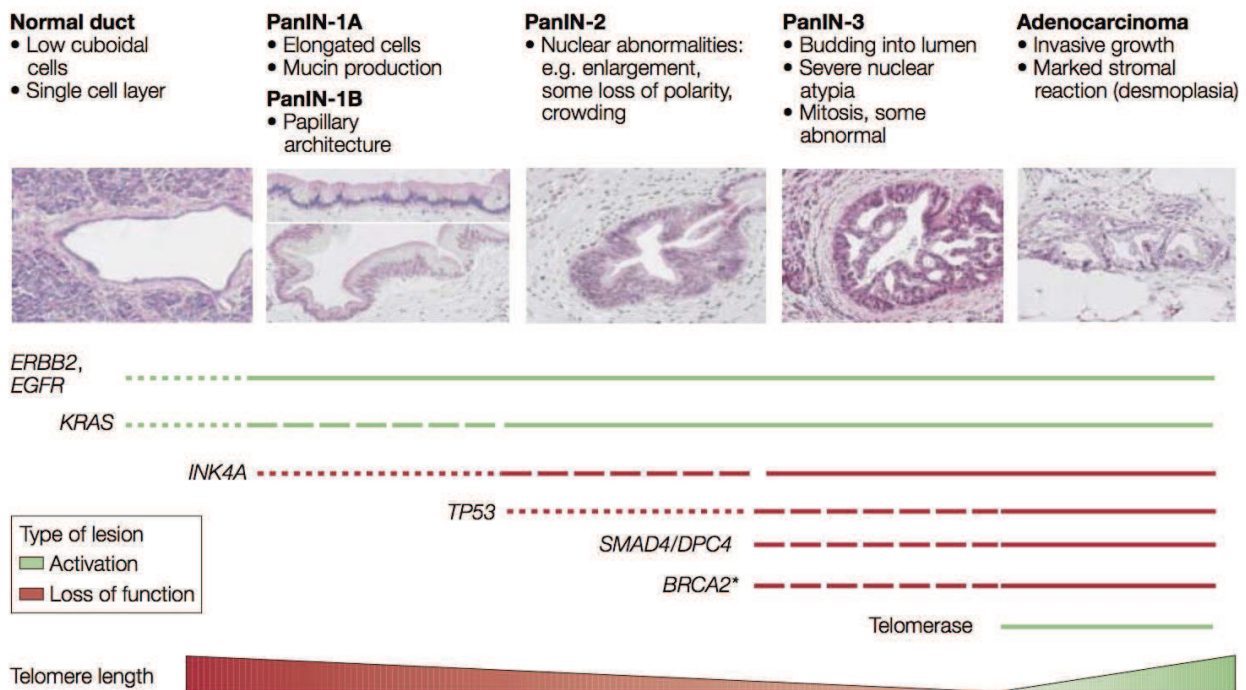
Les tumeurs PDAC sont des adénocarcinomes prenant leur origine dans les canaux pancréatiques et se développant à la faveur de l'accumulation de mutations génétiques selon des stades de tumorigenèse actuellement bien définis. La tumorigenèse et l'agressivité des tumeurs PDAC sont également liées au stroma très particulier de ce type de tumeurs.

### **5.2.1. La tumorigenèse**

Les tumeurs PDAC se développent à partir des cellules épithéliales formant les canaux des acini pancréatiques. L'accumulation d'anomalies génétiques favorise la progression des lésions selon 4 stades histologiques appelés **néoplasies pancréatiques intraépithéliales**



(PanIN-1A, PanIN-1B, PanIN-2 et PanIN-3) et conduisant à la tumeur différenciée PDAC (Bardeesy et DePinho, 2002) (Figure 23).



**Figure 23: anomalies génétiques et grades histologiques menant au PDAC.** L'accumulation de plusieurs anomalies génétiques induisant l'activation du proto-oncogène KRAS et la perte de fonction de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs favorise la progression tumorale qui évolue selon différents grades histologiques appelés néoplasies pancréatiques intraépithéliales (PanIN) conduisant au PDAC. D'après Bardeesy et DePinho, 2002.

Les gènes les plus fréquemment retrouvés mutés dans les tumeurs PDAC sont les gènes KRAS, CDKN2A, TP53, BRCA2 et SMAD4/DPC4 (Bardeesy et DePinho, 2002). KRAS est un proto-oncogène impliqué dans la prolifération cellulaire. Les mutations activatrices de **KRAS** sont les premiers évènements génétiques survenant dans la tumorigenèse des tumeurs PDAC et se produisent dans les cellules saines de manière aléatoire et dans 30% des lésions précoces. La fréquence des mutations de KRAS augmente avec la progression tumorale si bien que KRAS est systématiquement retrouvé muté dans les tumeurs PDAC (Rozenblum *et al.*, 1997). L'activation de KRAS est souvent corrélée à une surexpression de l'EGF et de ses récepteurs **ERBB2 et EGFR** dès les stades les plus précoces des lésions PanIN (Day *et al.*, 1996). Des mutations entraînant une perte de fonction du gène

suppresseur de tumeur **CDKN2A** sont aussi retrouvées dans 80 à 95% des tumeurs PDAC sporadiques et se produisent le plus souvent dans les stades intermédiaires des lésions PanIN (Rozenblum *et al.*, 1997). Des mutations de CDKN2A peuvent aussi être héritées et génèrent une prédisposition génétique augmentant de 13 fois le risque de développer un cancer du pancréas (Whelan *et al.*, 1995 ; Goldstein *et al.*, 1995). Les mutations de CDKN2A sont souvent associées à une perte de fonction des suppresseurs de tumeurs **INK4A** et **ARF** (Sherr, 2001). Par ailleurs, des mutations du suppresseur de tumeur **TP53** sont retrouvées dans 50% des tumeurs PDAC et induisent la perte de fonction du gène qui favorise la progression tumorale et l'instabilité génétique (Rozenblum *et al.*, 1997). Les mutations de TP53 surviennent le plus souvent dans les stades avancés des lésions PanIN. De plus, des mutations du gène **BRCA2**, impliqué dans les cancers familiaux du sein et de l'ovaire, sont retrouvés dans environ 7% des tumeurs PDAC et se produisent également vers la fin de la progression tumorale (Bardeesy et DePinho, 2002). Le suppresseur de tumeur **SMAD4/DPC4**, impliqué dans la voie de signalisation du TGF- $\beta$ , est aussi retrouvé muté et inactivé dans 30% des tumeurs PDAC (Hahn *et al.*, 1996). Enfin, la progression tumorale est favorisée par une **instabilité chromosomique** initiée au stade PanIN-3 et liée à un dysfonctionnement des centrosomes et du fuseau mitotique. En effet, des anomalies des centrosomes sont détectées dans 85% des tumeurs PDAC et expliquent l'importance de l'aneuploïdie et de l'instabilité génomique dans les tumeurs PDAC (Sato *et al.*, 2001). En termes de chronologie, les évènements génétiques les plus précoces dans la tumorigenèse des tumeurs PDAC sont les mutations des gènes KRAS et CDKN2A tandis que les évènements plus tardifs sont les mutations des gènes TP53 et SMAD4/DPC4. L'ensemble des anomalies génétiques accumulées au cours de la progression tumorale conduisent au stade ultime de tumeur PDAC, caractérisée par un microenvironnement particulier.

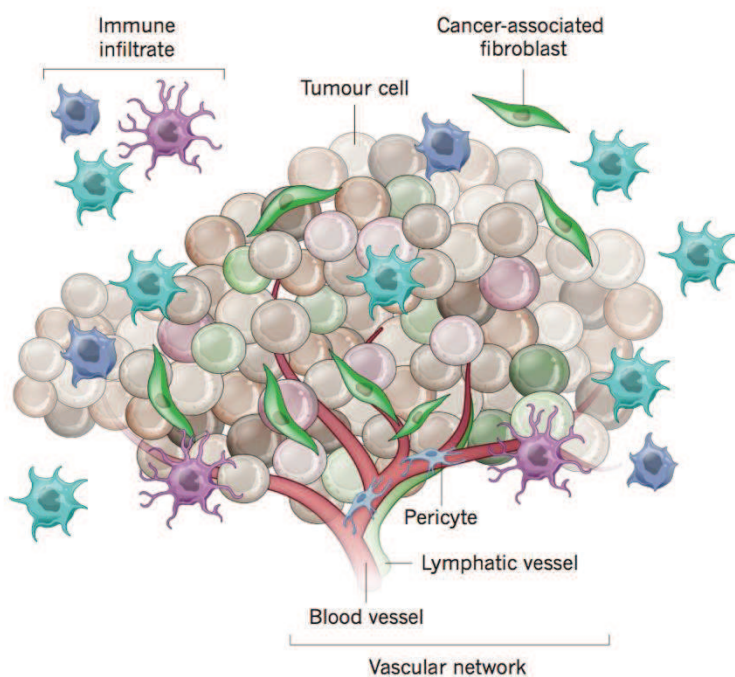
### 5.2.2. Le microenvironnement tumoral

Le **microenvironnement** ou **stroma tumoral** est l'ensemble des **composants cellulaires et moléculaires** présents dans une tumeur solide. Bien que partageant des caractéristiques avec d'autres types de cancers, le stroma des tumeurs PDAC présente des particularités, notamment celles d'être hypoxique, hypovasculaire et immunosuppresseur.



### 5.2.2.1. Quelques données générales sur le microenvironnement tumoral

Le microenvironnement tumoral est un système complexe et hétérogène contenant différents types cellulaires, des protéines matricielles et des facteurs diffusibles. Parmi les composants cellulaires figurent les cellules tumorales et les cellules stromales (Figure 24).



**Figure 24 : composants cellulaires du microenvironnement tumoral.**

Dans une tumeur primaire, les cellules tumorales communiquent par des contacts directs et des facteurs diffusibles avec les cellules stromales. Les cellules stromales sont les autres types cellulaires du microenvironnement tumoral et incluent les cellules immunitaires, les fibroblastes, les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et lymphatiques et les péricytes. D'après Junttila et de Sauvage, 2013.

Les **cellules tumorales** sont des cellules transformées par des mutations génétiques, ayant la capacité de proliférer de manière dérégulée et de survivre à la mort cellulaire programmée (apoptose). Au sein d'une tumeur primaire, ces cellules communiquent avec les **cellules stromales** : **cellules immunitaires, fibroblastes, cellules endothéliales et péricytes** (Hanahan et Weiberg, 2011 ; Hanahan et Coussens, 2012 ; Junttila et de Sauvage, 2013). *Via* la sécrétion de facteurs diffusibles, les cellules tumorales modifient les cellules stromales et les conduisent à adopter un profil pro-tumoral. Les cellules stromales modifiées sécrètent alors à leur tour des facteurs pro-tumoraux comme des facteurs de croissance ou des MMPs favorisant la dégradation de la MEC, la dissémination des cellules tumorales hors de la tumeur primaire et la formation de métastases dans d'autres organes. Il est avéré par exemple que les macrophages et les fibroblastes modifiés (respectivement TAMs et CAFs) sont d'importantes sources de VEGF-A, de bFGF et de TGF- $\beta$  favorisant l'angiogenèse pour nourrir la tumeur et permettre la dissémination des cellules tumorales lors du processus de métastase (Motz et Coukos, 2011).

### 5.2.2.2. Les particularités du microenvironnement des tumeurs PDAC

Les tumeurs PDAC sont caractérisées par une importante **réaction desmoplastique** à l'origine d'un microenvironnement tumoral particulièrement riche et dense. La réaction desmoplastique est une modification du stroma tumoral correspondant à une **production excessive de tissu connectif fibreux**, appelée **fibrose**, et à une **activation de chacune des composantes cellulaires** conduisant à des **réactions inflammatoires, immunitaires et angiogéniques pro-tumorales** (Bousquet et Susini, 2007). Les tumeurs PDAC figurent parmi les types de cancer dans lesquels le stroma est le plus abondant, le stroma représentant plus de 80% des tumeurs PDAC (Duluc *et al.*, 2015). Les cellules les plus abondantes du stroma des tumeurs PDAC sont des fibroblastes activés, appelés CAFs ou encore cellules étoilées pancréatiques activées (Feig *et al.*, 2012). Ces cellules jouent un rôle fondamental dans la réaction desmoplastique dans la mesure où ce sont les principales cellules productrices des composants protéiques de la MEC, des facteurs de croissance et des MMPs. Les tumeurs PDAC sont également caractérisées par un stroma particulièrement **immunosuppresseur** favorisant la progression tumorale, la formation des métastases et l'échappement de la tumeur au système immunitaire. Les cellules inflammatoires les plus abondantes dans ces tumeurs sont des cellules immunosuppressives comme les TAMs, les cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSCs) et les lymphocytes T régulateurs (Treg) (Lunardi *et al.*, 2014). Par ailleurs, la MEC des tumeurs PDAC est essentiellement composée de collagènes interstitiels fibrillaires de types I et III, de glycoprotéines non collagéniques comme la fibronectine, d'élastine et de protéoglycanes. L'excès de dépositions protéiques dans le stroma des tumeurs PDAC génère une fibrose à l'origine de contraintes physiques limitant la diffusion des chimiothérapeutiques et comprimant les vaisseaux sanguins. Les vaisseaux collapsés ne perfusent pas efficacement la tumeur, ce qui génère un stroma généralement très **hypoxique**, bien que l'hypoxie soit hétérogène au sein d'une même tumeur. De plus, les tumeurs PDAC sont considérées comme **hypovasculaires** en raison de la faible densité des microvaisseaux, ce qui accentue encore l'hypoxie et la mauvaise distribution des chimiothérapeutiques. Comme dans d'autres types de tumeurs, les cellules tumorales et les cellules stromales sécrètent des facteurs de croissance favorisant la prolifération cellulaire et des MMPs permettant la dégradation de la MEC. L'une des MMPs les plus abondantes dans les tumeurs PDAC est la métalloprotéinase-1 de type membranaire (MT1-MMP, ou MMP-14) qui favorise la croissance et l'angiogenèse tumorale en dégradant la MEC et en augmentant l'expression du VEGF (Sounni *et al.*, 2002). Enfin, la

fibrose provoquée par la réaction desmoplastique augmente la rétention des facteurs de croissance et des cytokines dans le stroma tumoral.

### 5.3. Les tumeurs PDAC : modèles d'étude et stratégies thérapeutiques

Dans le but de mettre au point des traitements et de découvrir des marqueurs diagnostiques précoces des tumeurs PDAC, plusieurs modèles murins ont été développés. Ces modèles sont utilisés en recherche pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires de la tumorigenèse des tumeurs PDAC et pour tester les effets de différents traitements sur la croissance et l'angiogenèse tumorales ainsi que sur la réponse immunitaire et plus généralement sur l'ensemble du microenvironnement tumoral. Plusieurs stratégies thérapeutiques ont été testées dans des essais cliniques chez l'homme et sont succinctement présentées dans cette partie.

#### 5.3.1. Les modèles murins

Les modèles murins sont utilisés en recherche fondamentale pour comprendre les mécanismes de la tumorigenèse et lors des études précliniques pour définir des stratégies thérapeutiques et des marqueurs prédictifs potentiellement applicables chez l'humain. Ces modèles doivent être les plus proches possibles de la pathologie humaine et récapituler les anomalies génétiques, les stades évolutifs de la maladie et les étapes de la tumorigenèse, les caractéristiques cytologiques et histologiques, l'intégrité du microenvironnement tumoral ou encore la formation des métastases dans le(s) même(s) tissu(s) cible(s) que chez l'Homme. Plusieurs types de modèles murins de tumeurs PDAC ont été développés depuis les années 1980. Soit les tumeurs apparaissent spontanément dans des **modèles murins transgéniques (GEMMs)**, soit les tumeurs sont induites par l'**injection orthotopique** de cellules tumorales dans le pancréas de souris saines.

L'un des premiers GEMMs à avoir été créé pour reproduire un cancer du pancréas est le **modèle RIP1-Tag2** dans lequel les souris expriment l'antigène T du virus SV40 sous le contrôle du promoteur du gène de l'insuline (Hanahan, 1985 ; Eklund *et al.*, 2013). Ce modèle génère des pNETs très vascularisées dont la tumorigenèse relativement lente et progressive a permis de réaliser de nombreuses études sur le rôle de l'angiogenèse et des autres composants cellulaires et moléculaires du stroma sur la croissance tumorale et de

tester des inhibiteurs de l'angiogenèse. Toutefois la majorité des cancers du pancréas affectant la partie exocrine, des modèles de tumeurs PDAC ont été développés. Le premier modèle ayant le mieux reproduit la tumorigenèse et l'évolution des lésions PanIN vers le stade PDAC et les métastases est le **modèle KC** dans lequel l'activation constitutive de l'oncogène KRAS est inducible par une recombinaison Cre-LoxP (LSL-KRAS<sup>G12D</sup>) (Hingorani *et al.*, 2003 ; DuPage *et al.*, 2009 ; Weidenhofer *et al.*, 2016). Ces tumeurs présentant une latence relativement longue et une faible formation de métastases, d'autres modèles ont ensuite été créés dont le **modèle KPC** dans lequel le gène suppresseur de tumeur TP53 est inactivé (mutation R172H) en plus de l'activation constitutive de KRAS. Ce modèle reproduit plus fidèlement la pathologie humaine avec une tumorigenèse accélérée, une faible vascularisation de la tumeur et la formation de métastases hépatiques. D'autres variantes du modèle KC ont été développées en inactivant le suppresseur de tumeur SMAD4, générant les **modèles SMAD4** dont le modèle LSL-KRAS<sup>G12D</sup>;Ink4a/Arf<sup>fl/fl</sup> (Kojima *et al.*, 2007 ; Grippo et Tuveson, 2010).

Dans les **modèles orthotopiques syngéniques immunocompétents**, des cellules tumorales pancréatiques sont injectées directement dans le pancréas de souris du même fond génétique et ayant un système immunitaire complet et fonctionnel. La prise en considération de l'importance du microenvironnement tumoral dans la tumorigenèse et dans la réponse aux traitements est un concept relativement récent et avait tendance à être négligée. Ces modèles murins permettent de développer des tumeurs ayant un microenvironnement tumoral complet reproduisant plus fidèlement la pathologie humaine, en particulier la réponse immunitaire et les mécanismes pro-tumoraux exercés par les cellules inflammatoires dont les TAMs. Les cellules injectées sont des lignées tumorales établies à partir de cellules prélevées chez des animaux porteurs de tumeurs PDAC. Nous citerons par exemple les **cellules mPDAC** porteuses des mutations p48<sup>Cre</sup>, KRAS<sup>LSL-G12D</sup>, p53<sup>R172H/+</sup> et Ink4a/Arf<sup>fllox/+</sup>. Dans ce modèle rapide et agressif, les cellules tumorales injectées dans le pancréas de souris FVB/n immunocompétentes donnent des tumeurs PDAC d'environ 80 mm<sup>3</sup> en une semaine et des métastases hépatiques 4 semaines après l'injection des cellules. Un autre modèle est obtenu dans le fond génétique C57BL/6 par l'injection orthotopique de **cellules Panc02** isolées en 1984 à partir de tumeurs PDAC générées par l'implantation de cotons imprégnés de méthyl-3 cholanthrène (3-MCA) dans le pancréas de souris saines (Corbett *et al.*, 1984 ; Partecke *et al.*, 2011 ; Torres *et al.*, 2013). Ces cellules donnent des tumeurs PDAC à croissance rapide mais pas de métastases.

## 4.3.2. Les traitements actuels et les stratégies en cours de développement

### 5.3.2.1. Les thérapies classiques

Le principal traitement des tumeurs PDAC - et le plus efficace si le diagnostic est suffisamment précoce - demeure la **résection chirurgicale** de la tumeur, suivie ou non par de la radiothérapie et/ou de la chimiothérapie (Seufferlein *et al.*, 2012). La **radiothérapie** est une méthode visant à exposer localement un tissu à des radiations X ou  $\gamma$ . Les rayons endommagent l'ADN, bloquant la prolifération des cellules tumorales et favorisant l'apoptose. La radiothérapie est souvent associée à de la chimiothérapie. Dans le cas des tumeurs PDAC, les doses administrées sont de l'ordre de 40 à 60 Gy pendant 6 semaines, en combinaison avec une chimiothérapie radiosensibilisante (Merchant *et al.*, 2009). Par ailleurs, il existe 3 protocoles de **chimiothérapies** utilisés dans le traitement des tumeurs PDAC (Seufferlein *et al.*, 2012). La **gemcitabine**, un analogue d'une base de l'ADN, est préconisée depuis 1996 et induit la mort cellulaire par arrêt de la synthèse d'ADN. Un autre cytotoxique utilisé est le **5-FU**, un analogue de la pyrimidine incorporé dans l'ADN et induisant l'arrêt de la prolifération et l'apoptose par blocage du cycle cellulaire. Enfin, le **folfirinox** est utilisé depuis 2010 dans le traitement des tumeurs PDAC métastatiques. C'est un mélange de produits cytotoxiques : le 5-FU bloquant la synthèse d'ADN, l'acide folique pour réduire les effets secondaires du 5-FU, l'irinotécan inhibant la topo-isomérase et l'oxaliplatine inhibant la synthèse de l'ADN et sa réparation.

### 5.3.2.2. Les thérapies ciblées

D'autres stratégies visent à cibler plus spécifiquement des voies de signalisation pro-tumorales ou des composants du microenvironnement comme les CAFs, les cellules immunitaires ou les vaisseaux tumoraux. Plusieurs essais ont été menés pour inhiber des **voies de signalisation** impliquées dans la progression des tumeurs PDAC. L'**EGFR**, surexprimé dans les stades précoces de la tumorigenèse, est ciblé par des anticorps monoclonaux tels que le cétuximab et le panitumumab ou par des TKI comme le géfitinib et l'erlotinib. Malheureusement, des essais précliniques et cliniques en combinaison avec la gemcitabine n'ont pas montré d'amélioration significative de la survie des patients (Weiner *et al.*, 2008). D'autres stratégies ciblent des proto-oncogènes comme **KRAS** ou des molécules en aval de sa voie de signalisation. Les tumeurs PDAC figurent parmi les plus

résistantes aux chimiothérapies en raison d'une mauvaise distribution des agents cytotoxiques liée à l'hypovascularisation, à la compression des vaisseaux tumoraux et à la présence d'un stroma rigide particulièrement pro-tumoral. Ainsi, le ciblage du microenvironnement tumoral a pour but de sensibiliser les tumeurs aux chimiothérapies. Le rôle pro-tumoral des **CAFs** peut être inhibé en ciblant des molécules exprimées par ce type cellulaire fortement impliqué dans la progression tumorale et la résistance des tumeurs PDAC aux chimiothérapies. Le losartan est un antagoniste synthétique du récepteur à l'**Angiotensine II**, une molécule favorisant l'activation des CAFs et la production de collagène de type I. Son utilisation dans un modèle murin de tumeur PDAC a augmenté de 50% la quantité de 5-FU dans la tumeur par amélioration de la vascularisation (Chauhan *et al.*, 2013). Un essai clinique utilisant le losartan en combinaison avec la gemcitabine est en cours. Le ciblage des CAFs a pour objectif de réduire la fibrose pour diminuer la pression interstitielle et favoriser la perfusion de la tumeur de manière à augmenter la distribution des chimiothérapeutiques. De la même façon, l'inhibition de la voie de signalisation **mTOR/4E-BP1** par le pasiréotide (SOM230) a donné des résultats précliniques encourageants dans un modèle murin de tumeurs PDAC (Duluc *et al.*, 2015). Dans cette étude, l'utilisation du SOM230 en combinaison avec la gemcitabine réduit la fibrose *via* le ciblage des CAFs, améliorant la distribution de la gemcitabine et sensibilisant les cellules tumorales au cytotoxique. Par ailleurs, des stratégies de ciblage des **cellules immunitaires** sont également en cours d'investigation dans d'autres types de cancers et pourraient être envisageables dans le traitement des tumeurs PDAC. Dans les tumeurs PDAC, la fibrose et la pression interstitielle limitent l'infiltration des cellules immunitaires tandis que les cellules inflammatoires présentes dans ces tumeurs exercent un rôle immunosuppresseur et anti-tumoral. Ainsi, des stratégies sont développées pour favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale et inhiber la réponse pro-tumorale. L'ipilimumab est un anticorps monoclonal commercialisé pour le traitement du mélanome avancé. Cet anticorps cible la protéine **CTLA-4**, un antigène de costimulation négative à la surface des lymphocytes T dont la fixation par CD80 ou CD86 sur les cellules présentatrices d'antigène induit une inhibition de l'activation des lymphocytes T. Par conséquent, le blocage de CTLA-4 par cet anticorps favorise l'activation des lymphocytes T cytotoxiques et la réponse immunitaire anti-tumorale (Buchbinder et McDermott, 2015). De la même façon, l'inhibition de la protéine **PD-1** par l'anticorps monoclonal nivolumab a pour but de favoriser la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, le complexe PD-1/PD-L1 favorise la tolérance des cellules tumorales par les lymphocytes. Des essais cliniques de phase III



sont en cours pour le traitement d'un type de cancer du poumon (Guillemainault *et al.*, 2015). Enfin, une autre stratégie thérapeutique vise à cibler les **vaisseaux tumoraux**. Des essais de combinaison des chimiothérapies de référence à des composés anti-angiogéniques comme le bévacizumab, l'erlotinib ou le sunitinib ont été menés. Malheureusement, une étude clinique de phase III associant la gemcitabine et le bévacizumab menée sur des patients atteints de tumeurs PDAC avancées n'a pas montré d'amélioration de la survie des patients (Kindler *et al.*, 2010). Si les thérapies anti-angiogéniques s'avèrent inopérantes dans le traitement des tumeurs PDAC, une solution en cours d'étude pour améliorer la distribution des chimiothérapeutiques et détruire les cellules tumorales est la **normalisation du microenvironnement tumoral**. Cette stratégie a déjà montré améliorer l'efficacité des chimiothérapies en augmentant la perfusion et en diminuant la pression interstitielle pour favoriser la distribution des chimiothérapeutiques et en favorisant la restauration d'une barrière endothéliale imperméable aux cellules tumorales pour limiter la formation des métastases (Goel *et al.*, 2011).

### *III. PROJET DE THESE*

Depuis plus de 20 ans, l'équipe COURTY concentre ses recherches sur les nucléoprotéines dont la nucléoline et étudie l'effet de leur ciblage par le N6L - un pseudopeptide synthétique développé par l'équipe - dans différents modèles tumoraux. Ilaria CASCONI a rejoint l'équipe en 2012 pour travailler sur le rôle de la nucléoline dans l'angiogenèse tumorale du cancer du pancréas et sur les mécanismes de l'activation endothéliale. Suite aux travaux de l'équipe dirigés par Ilaria CASCONI visant à étudier l'effet du ciblage de la nucléoline par le N6L dans l'adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC), mon projet de thèse s'est inscrit dans l'étude des mécanismes de l'implication de la nucléoline dans l'angiogenèse.

Le PDAC est un cancer du pancréas pour lequel il n'existe encore aucun traitement curatif et dont les rares traitements disponibles allongent la survie de quelques mois. Les tumeurs PDAC sont des tumeurs très agressives pour lesquelles la forte résistance aux thérapies classiques est expliquée par une résistance des cellules tumorales mais aussi par une mauvaise distribution des chimiothérapeutiques liée à des vaisseaux tumoraux peu fonctionnels, à cause de la compression exercée par un stroma tumoral fibreux particulièrement dense (Olive *et al.*, 2009 ; Koay *et al.*, 2014). En effet, le stroma fibreux induit une mauvaise perfusion des tumeurs PDAC générant un flux sanguin et une oxygénation anormaux qui favorisent la croissance tumorale, l'hypoxie et la formation de métastases tout en limitant la distribution efficace des chimiothérapeutiques (Hanahan et Weinberg, 2011 ; Feig *et al.*, 2012 ; Stylianopoulos et Jain, 2013). Par conséquent, bien que les tumeurs PDAC soient des tumeurs hypovascularisées, les vaisseaux sanguins exercent un rôle pro-tumoral important. Une preuve vient d'un travail où il a été montré que la réduction du stress solide dans ces tumeurs augmente la densité vasculaire qui à son tour accélère la croissance tumorale et favorise la formation des métastases (Affeldt *et al.*, 2013 ; Rhim *et al.*, 2014). D'après ces données et face à la nécessité urgente de développer de nouvelles stratégies pour traiter ce type de cancer, l'équipe s'est donné pour but de cibler à la fois les cellules tumorales et les vaisseaux sanguins pour inhiber la croissance tumorale et l'angiogenèse dans les tumeurs PDAC.

L'angiogenèse est un processus de formation de nouveaux vaisseaux à partir du réseau vasculaire préexistant (Adams et Alitalo, 2007). L'activation endothéliale est l'étape la plus précoce de l'angiogenèse caractérisée par une perte de quiescence et par la sécrétion de facteurs solubles par les cellules endothéliales, provoquant la déstabilisation des

vaisseaux sanguins (Cines *et al.*, 1998). La déstabilisation signifie le détachement des cellules murales (cellules musculaires lisses et péricytes) de la paroi vasculaire pour permettre le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux (Augustin *et al.*, 2009). Cette étape est transitoire au cours de l'angiogenèse physiologique et disparaît avec l'extinction des facteurs pro-angiogéniques qui se traduit par la maturation des nouveaux vaisseaux et le recrutement des cellules murales. Mais dans le cas de l'angiogenèse tumorale, la persistance des *stimuli* pro-angiogéniques induit une dérégulation de l'activation endothéliale qui est maintenue et qui génère une instabilité vasculaire avec une perméabilité accrue et une absence des cellules murales (Carmeliet, 2003). Par conséquent, l'activation endothéliale est une étape cruciale de l'angiogenèse pathologique et sa compréhension pourrait déboucher sur des stratégies thérapeutiques innovantes.

A mon arrivée, les travaux de l'équipe montraient que le ciblage de la nucléoline inhibe à la fois la croissance tumorale et normalise les vaisseaux tumoraux. Mon projet de thèse avait pour objectif d'**étudier les mécanismes de la normalisation vasculaire et le lien moléculaire entre l'activation endothéliale et le recrutement des péricytes sur les vaisseaux**. En effet, l'étude de l'activation endothéliale m'a permis de mieux comprendre le rôle de la nucléoline dans l'angiogenèse tumorale et de découvrir de nouveaux mécanismes de régulation mis en jeu au cours de l'angiogenèse et dont le ciblage pourrait trouver des applications dans le traitement de maladies associées à une angiogenèse pathologique telles que les tumeurs PDAC ou les rétinopathies.

Mes questions étaient :

- ❖ Quel est le rôle de l'activation endothéliale et de la nucléoline sur l'angiogenèse et sur la stabilisation des vaisseaux permise par le recrutement des péricytes ?
- ❖ Quel est l'effet du ciblage de la nucléoline et de l'activation endothéliale sur la normalisation vasculaire des tumeurs *via* le recrutement des péricytes ?

## *IV. MATÉRIELS ET MÉTHODES*

## 1. Culture cellulaire

### 1.1. Cellules primaires humaines

Les cellules endothéliales humaines extraites de la veine de cordon ombilical (Human Umbilical Vein Endothelial Cells, HUVECs) ont été périodiquement achetées entre 2013 et 2015 chez Lonza (Bâle, Suisse) et cultivées jusqu'au 4<sup>e</sup> passage dans le milieu EBM-2 (Endothelial Basal Medium-2, CC-3156, Lonza) complété avec les facteurs de croissance et antibiotiques appropriés (EGM-2 SingleQuot Kit Suppl. & Growth Factors, CC-4176, Lonza). Les HUVECs sontensemencées dans des boîtes de Pétri, des flasks ou des plaques de culture en plastique traité coatées avec de la gélatine 1% (Sigma Aldrich, G9391). La gélatine est dissoute dans de l'eau et chauffée à 50°C pendant 1 heure sous agitation modérée jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. Lorsque la température de la solution de gélatine redescend à 40°C, la solution est filtrée sous PSM avec une unité de filtration à 0,22 µm puis conservée à 4°C. Pour réaliser le coating, 5 mL de gélatine 1% sont répartis sur la surface d'une boîte de Pétri 100 mm (ou d'une flask T75) et incubés pendant 30 minutes à 37°C. Juste avant l'ensemencement des cellules, la gélatine est aspirée et remplacée par le milieu de culture. Les péricytes vasculaires humains extraits de cerveaux (Human Brain Vascular Pericytes, HBVPs) ont été achetés en 2014 chez ScienCell (Carlsbad, Etats-Unis) et cultivés jusqu'au 4<sup>e</sup> passage dans le milieu PM-prf (Pericyte Medium phenol red free, 1201-prf-SC, ScienCell) contenant les facteurs de croissance et antibiotiques adaptés. Les HBVPs sontensemencés dans des boîtes de Pétri, des flasks ou des plaques de culture en plastique traité coatées avec de la poly-L-lysine 2 µg/cm<sup>2</sup> (Sigma Aldrich, P4707-50ML). Pour réaliser le coating, 1,5 mL de poly-L-lysine et 3,5 mL de ddH<sub>2</sub>O sont répartis dans une boîte de Pétri 100 mm (ou d'une flask T75) et incubés toute la nuit à 37°C. Le lendemain, la solution de coating est aspirée et le support est rincé 2 fois avec 5 mL de ddH<sub>2</sub>O puis avec 5 mL de PBS avant l'ajout du milieu de culture. Ces deux cultures primaires sont maintenues dans des incubateurs à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>.

### 1.2. Cellules tumorales pancréatiques murines

Deux lignées tumorales pancréatiques murines sont utilisées : les cellules mPDAC et PANC-02. Les cellules mPDAC nous ont été fournies par l'équipe de Douglas HANAHAN (Lausanne, Suisse) et ont été cultivées dans du DMEM + 10% SVF + 1% P/S. Elles ont été



prélevées sur des souris FVB/n porteuses de tumeurs PDAC. Ces cellules portent des mutations sur les gènes Kras, Cdkn2a (Ink4a/Arf) et Trp53. Les cellules PANC-02 nous ont été fournies par l'équipe de Roberto RONCA (Brescia, Italie) et ont été cultivées dans du RPMI 1640 + 10% SVF + 1% P/S + 1% sodium pyruvate. Ces deux lignées tumorales sont maintenues dans des incubateurs à 37°C et 7% CO<sub>2</sub>.

## 2. Modèles murins de tumeurs pancréatiques orthotopiques

### 2.1. Modèle mPDAC

Ce modèle réalisé dans des souris WT immunocompétentes est utilisé pour étudier l'effet du ciblage de la nucléoline par le N6L *in vivo*. Des souris FVB/n syngéniques femelles achetées chez Charles River (Calco, Italie) sont utilisées pour générer des tumeurs PDAC orthotopiques. Les souris âgées de 8 semaines (souche n°207, masse moyenne de 20g) sont injectées en orthotopique dans le pancréas avec des cellules mPDAC (10<sup>3</sup> cellules/souris dans 50 µL). Une semaine après l'injection des cellules tumorales (volume moyen des tumeurs de 80 mm<sup>3</sup>), les souris sont injectées en intrapéritonéal avec du N6L (10 mg/kg) ou une solution saline pendant 3 semaines à raison de 3 injections/semaine, puis sacrifiées 4 semaines après l'injection des cellules tumorales.

### 2.2. Modèle PANC-02

Ce modèle réalisé dans des souris WT ou KO NCL<sup>+/-</sup> est utilisé pour étudier l'effet de l'inhibition de la nucléoline dans le microenvironnement tumoral, sans cibler la nucléoline dans les cellules tumorales. Les souris transgéniques KO NCL<sup>+/-</sup> ont été générées par l'équipe de Philippe BOUVET (Lyon, France). Le KO conditionnel de la nucléoline a été induit sur un allèle en floxant le 3<sup>e</sup> exon du gène *Ncl* dans des souris du fond génétique C57BL/6. Ces souris ont été croisées avec des souris exprimant la Cre recombinase inducible ubiquitaire (souche C57BL/6-*Gt(ROSA)26Sortm9(Cre/ESR1)<sup>Arte</sup>*) pour générer des individus *Ncl<sup>fl/WT</sup>;Cre<sup>+/-</sup>* et *Ncl<sup>fl/fl</sup>;Cre<sup>+/-</sup>*. Des souris *Ncl<sup>WT/WT</sup>;Cre<sup>+/-</sup>* ont été utilisées comme témoins. La délétion de l'allèle est induite par l'injection pendant 5 jours consécutifs de 100 µL/souris de tamoxifène (10 mg/mL) dilué dans de l'huile de colza. Les souris KO NCL<sup>-/-</sup> meurent en quelques jours tandis que les souris KO NCL<sup>+/-</sup> ne présentent aucun

phénotype particulier après plusieurs mois d'observation. Les souris WT (NCL<sup>+/+</sup>) et KO NCL<sup>+/-</sup> sont injectées en orthotopique dans le pancréas avec des cellules PANC-02 (10<sup>5</sup> cellules/souris dans 50 µL) puis sacrifiées 4 semaines après l'injection des cellules tumorales.

### 3. Anticorps

Les anticorps utilisés en Western-Blotting sont dirigés contre la **nucléoline** (polyclonal de lapin, Abcam ab22758), l'**Ang-2** (polyclonal de chèvre, R&D Systems AF623), la **β-tubuline** (polyclonal de lapin, Abcam ab6046), la **GAPDH** (monoclonal de souris, Invitrogen AM4300, clone 6C5), la **vinculine** (monoclonal de souris, Sigma Aldrich V9131, clone hVIN-1) ou la **β-actine** (monoclonal de souris, Sigma Aldrich A3854, clone AC-15). Les anticorps utilisés pour l'immunofluorescence sont dirigés contre la **nucléoline** (polyclonal de lapin, Abcam ab22758), **MECA32** (monoclonal de rat, BD Pharmingen 550563, clone MECA-32), **NG2** (polyclonal de lapin, Merck Millipore AB5320), le **PDGFR-β** (polyclonal de chèvre, R&D Systems AF1042), l'**Ang-2 humaine** (polyclonal de chèvre, R&D Systems AF623), l'**Ang-2 murine** (polyclonal de chèvre, Santa Cruz Biotechnology sc-7015) et le **vWF** (polyclonal de lapin, Dako A0082).

### 4. Construction peptidique

Le N6L est un pseudopeptide synthétique appartenant à la famille des NucAnts (Nucleolin Antagonists), des antagonistes de la nucléoline dérivés du peptide HB-19. Il est constitué d'une matrice hélicoïdale riche en lysine composée d'une répétition de 6 motifs Lys-Aib-Gly et sur laquelle sont greffés 6 tri-peptides K $\Psi$ PR.

### 5. Marquages par immunofluorescence

#### 5.1. Immunofluorescence du vWF et de l'Ang-2 dans les HUVECs

Après le traitement indiqué, les HUVECs sont fixées pendant 10 minutes à -20°C dans du méthanol. Après une saturation de 30 minutes à 37°C dans du PBS – BSA 3%, les cellules sont incubées pendant 45 minutes à 37°C avec un anticorps anti-Ang-2 (R&D Systems,

AF623) dilué au 1:50 dans du PBS – BSA 0,3%. Après 3 lavages dans du PBS, les cellules sont incubées pendant 45 minutes à 37°C avec un anticorps anti-vWF (Dako, A0082) dilué au 1:1000 dans du PBS – BSA 0,3%. Après 3 nouveaux lavages dans du PBS, les cellules sont incubées pendant 45 minutes avec des anticorps secondaires fluorescents (Invitrogen) dilués dans du PBS – BSA 0,3% et les noyaux sont marqués avec du DAPI 2 µg/mL (Sigma Aldrich, D8417). Les lamelles sont montées sur des lames avec du Prolong (Life Technologies, P36934) ou du VectaShield (Vector Laboratories, H-1000).

## **5.2. Immunofluorescence des WPBs et des péricytes dans les rétines**

Les yeux sont prélevés et fixés en PFA 4% pendant 1 heure sur la glace. Les rétines sont isolées par Marie DARCHE et perméabilisées toute la nuit dans du PBS - Triton 0,5% - BSA 0,2% à 4°C avant d'être incubées une nouvelle nuit entière à 4°C avec les anticorps anti-vWF (Dako, A0082, 1:500), anti-NG2 (Merck Millipore, AB5320, 1:200) ou anti-PDGFR-β (R&D Systems, AF1042, 1:50) et la lectine-FITC (Sigma Aldrich, L2895, 1:100) dilués dans du PBS - Triton 1%. Les anticorps secondaires fluorescents (Invitrogen) dilués dans du PBS - Triton 1% sont incubés pendant 75 minutes à température ambiante puis les noyaux sont marqués avec du DAPI 1 µg/mL (Sigma Aldrich, D8417) pendant 30 minutes à température ambiante. Enfin, les rétines sont fixées avec du PFA 4% pendant 20 minutes à température ambiante avant d'être montées à plat avec du Prolong (Life Technologies, P36934) ou du VectaShield (Vector Laboratories, H-1000).

## **5.3. Immunofluorescence des vaisseaux et des péricytes dans les coupes de tumeurs PDAC**

Au moment du sacrifice des animaux, les tumeurs sont incluses en OCT et congelées. Les tumeurs congelées sont coupées avec un cryostat et les coupes sont conservées à -80°C. Lors du marquage, les coupes sont décongelées et séchées à l'air pendant 2 - 3 minutes puis délimitées avec un trait de Dakopen. Les coupes sont fixées pendant 15 minutes à température ambiante avec 100 µL/coupe d'une solution de zinc fixative (6,05g Tris + 0,35g Ca(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> + 2,5g Zn(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub> + 2,5g ZnCl + 3,8 mL HCl 37%) puis lavées avec du PBS avant d'être perméabilisées pendant 5 minutes à 4°C avec 100 µL/coupe de PBS – Triton 0,1%. Après un nouveau lavage au PBS, les coupes sont saturées pendant 1 heure à température ambiante avec 100 µL/coupe de PBS – BSA 3% - donkey serum 5% puis lavées

en PBS. Les coupes sont incubées pendant 1 heure à température ambiante avec 50  $\mu\text{L}$ /coupe d'anticorps primaires dilués dans la solution de saturation, puis rincées 2 fois avec du PBS (5 minutes/lavage). Les coupes sont incubées pendant 1 heure à température ambiante avec 50  $\mu\text{L}$ /coupe d'anticorps secondaires dilués dans du PBS, puis rincées 2 fois avec du PBS (5 minutes/lavage) avant d'être incubées pendant 10 minutes à température ambiante avec 50  $\mu\text{L}$ /coupe de DAPI 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Sigma Aldrich, D8417). Enfin, les coupes sont lavées et montées entre lame et lamelles avec du Prolong (Life Technologies, P36934) ou du VectaShield (Vector Laboratories, H-1000).

## 6. Migration des péricytes en chambres de Boyden

Les HUVECs sont ensemencées dans des plaques 6 puits coatées en gélatine 1% :  $9 \times 10^4$  cellules/puits pour le traitement siRNA 10 nM ou  $3 \times 10^5$  cellules/puits pour le traitement anti-VEGF 20 ng/mL (R&D Systems, 471-F1).

### **Cellules endothéliales traitées avec des siRNA**

Le lendemain de l'ensemencement, les HUVECs sont transfectées avec 10 nM de siRNA dilués dans de l'EGM-2 contenant des antibiotiques (voir la rubrique Transfection siRNA). 72 heures plus tard, les cellules sont rincées avec du PBS et le milieu est remplacé par de l'EBM-2 pendant 1 heure à 37°C pour obtenir un milieu conditionné utilisé pour les expériences de migration.

### **Cellules endothéliales traitées avec un anticorps anti-VEGF**

Le lendemain de l'ensemencement, les HUVECs sont traitées pendant 5 heures à 37°C avec 20 ng/mL d'anticorps anti-VEGF dilué dans de l'EGM-2 contenant des antibiotiques. Les cellules sont rincées avec du PBS et le milieu est remplacé par de l'EBM-2 pendant 1 heure à 37°C pour obtenir un milieu conditionné utilisé pour les expériences de migration.

$2 \times 10^4$  HBVPs sont ensemencés en présence ou non de 400 ng/mL d'Ang-2 recombinante (R&D Systems, 623-AN) dans la partie supérieure de chambres de Boyden percées de pores de 8  $\mu\text{m}$  (BD Falcon, 353097) et préalablement coatées avec 1,5 mg/mL de collagène I. Le milieu conditionné des HUVECs est ajouté dans la partie inférieure du dispositif. Les péricytes sont incubés pendant 3 heures à 37°C puis fixés avec du PBS – glutaraldéhyde 2,5% et colorés avec du cristal violet 0,2%. Pour chaque chambre de

Boyden, les noyaux des cellules de 5 champs sont comptés en utilisant un microscope Leica Aristoplan équipé d'une caméra CoolSNAP CCD.

## **7. Extraction des ARN et quantification de l'expression par RT-qPCR**

Les ARN totaux sont extraits des cellules ou des tumeurs en suivant les instructions du kit PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Carlsbad, Etats-Unis). La quantité d'ARN obtenu est mesurée avec un spectrophotomètre NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) et la qualité des ARN est systématiquement vérifiée sur un gel d'agarose 2%. Les échantillons qui ne sont pas contaminés par de l'ADNg et qui ne sont pas dégradés sont utilisés pour l'analyse de l'expression par RT-qPCR. 1 µg d'ARN est reverse transcrit en ADNc en utilisant le kit SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis). Des PCR quantitatives (qPCR) sont réalisées à partir des ADNc en utilisant des sondes TaqMan, le kit TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Alameda, Etats-Unis) et un thermocycleur AriaMX Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, Etats-Unis). Les données sont analysées avec le logiciel Agilent AriaMX version 1.0 (Agilent Technologies) et normalisées par les niveaux d'expression des ARNm de GAPDH ou MECA32. Les variations d'expression des gènes d'intérêt sont calculées en utilisant la méthode  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

## **8. Quantification de la sécrétion du vWF, de l'Ang-2 et du PDGFB par ELISA**

Pour l'ELISA du vWF, des plaques 96 puits spéciales (Costar 3590, Corning) sont incubées toute la nuit à température ambiante avec 100 µL/puits d'anticorps anti-vWF (Dako, A0082) dilué au 1:800 dans du PBS. Le lendemain, les puits sont lavés 3 fois avec du PBS - Tween 20 0,05% (« Washing Buffer ») et saturés pendant 90 minutes à 37°C avec du PBS - Tween 20 0,1% - gélatine 0,2% (« Blocking Buffer »). Le surnageant des HUVECs ou le plasma des souris est incubé pendant 90 minutes à 37°C. Les puits sont lavés 3 fois avec le « Washing Buffer » et incubés pendant 90 minutes à 37°C avec 100 µL/puits d'anticorps anti-vWF couplé à l'HRP (Dako, P0226) dilué au 1:4000 dans du « Blocking Buffer ». Les puits sont lavés 3 fois avec le « Washing Buffer » avant l'ajout du substrat de l'HRP (TMB

Substrate Kit, Thermo Fisher). La réaction est arrêtée par l'ajout de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> et l'absorbance est mesurée à 450 nm avec une correction des imperfections optiques à 540 nm. La quantité d'Ang-2 dans le surnageant des HUVECs est mesurée en utilisant le kit human Angiopoietin-2 DuoSet ELISA (R&D Systems, DY623). La quantité d'Ang-2 dans le plasma des souris est analysée en utilisant le kit Angiopoietin 2 mouse ELISA (Abcam, ab171335). La quantité de PDGFB dans le plasma des souris est mesurée en utilisant le kit Mouse/Rat PDGF-BB DuoSet ELISA (R&D Systems, DY8464-05). Les taux plasmatiques d'Ang-2 et de PDGFB sont normalisés par le taux plasmatique de vWF pour chaque souris. La concentration du vWF et de l'Ang-2 dans le surnageant des HUVECs est normalisée par la quantité totale de protéine dans le lysat cellulaire mesurée par un dosage BCA (Pierce).

## **9. Analyse de la sécrétion des cytokines angiogéniques par puces à protéome**

Le plasma des souris est analysé selon les instructions du kit Proteome Profiler Mouse XL Cytokine Array (R&D Systems, ARY028). Le surnageant des HUVECs est analysé en utilisant le kit Proteome Profiler Human Angiogenesis Array (R&D Systems, ARY007).

## **10. Transfection siRNA des HUVECs**

La veille de la transfection, les cellules sontensemencées dans les puits d'une plaque 6 puits coatée en gélatine 1% (9x10<sup>4</sup> ou 3x10<sup>5</sup> HUVECs/puits). Le lendemain, le milieu de culture est remplacé 1 heure avant la transfection par 2 mL/puits de milieu de culture contenant des antibiotiques. Les mix de transfection sont préparés 30 minutes avant d'être ajoutés sur les cellules. Les siRNA sont dilués dans de l'Opti-MEM I + GlutaMAX (Gibco, 51985) et vortexés pendant 10 secondes puis la Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen, 13778) est diluée au 1:50 dans de l'Opti-MEM I + GlutaMAX et vortexée pendant 10 secondes. Les siRNA et la Lipofectamine RNAiMAX dilués sont mélangés avec un *ratio* 1:1, vortexés pendant 10 secondes et incubés pendant 20 minutes à température ambiante. Les mix de transfection sont ajoutés dans chaque puits en goutte à goutte à raison de 500 µL/puits. Les cellules sont incubées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant 72 heures pour la plupart des expériences puis lysées pour vérifier l'efficacité du knock-down par Western-Blotting.



## **11. Analyse de l'expression protéique par Western-Blotting**

L'expression protéique de la nucléoline dans le foie des souris et de l'Ang-2 dans les lysats des HUVECs est analysée par Western-Blotting. Les échantillons sont mélangés avec du tampon Laemmli 4X puis dénaturés par chauffage à 95°C pendant 5 minutes dans un bain-marie. Les échantillons sont concentrés dans un gel de concentration à 4% d'acrylamide puis séparés dans un gel de séparation à 8% d'acrylamide. La migration se fait dans du tampon de migration contenant du SDS pendant 30 minutes à 50V puis environ 2 heures à 90V. Les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF avec des pores de 0,45  $\mu\text{m}^2$  (Immobilon Transfer Membranes, Merck Millipore, IPVH304F0) pendant toute la nuit à 4°C et 100 mA (ampérage constant, environ 15V) dans un tampon de transfert contenant du méthanol. Le lendemain, la membrane est saturée pendant 1 heure à température ambiante sur un roller de Falcon avec 5 mL de SuperBlock blocking buffer (Thermo Scientific, 37515) puis découpée en 2 pour procéder au marquage de la nucléoline ou de l'Ang-2 et d'une protéine de ménage. La membrane est incubée à température ambiante dans une chambre humide avec 1 mL d'anticorps primaire dilué dans du SuperBlock blocking buffer : pendant 1 heure pour la nucléoline (Abcam, ab22758, 1:1000) ou pendant 2 heures pour l'Ang-2 (R&D Systems, AF623, 1:200). Puis la membrane est incubée pendant 1 heure à température ambiante sur un roller de Falcon avec 2 mL d'anticorps secondaire : anti-lapin pour la nucléoline (Southern Biotech, 4050-05, 1:10.000) ou anti-chèvre pour l'Ang-2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-2020, 1:5000). Les complexes anticorps sont révélés avec le substrat Pierce ECL Western Blotting (Thermo Scientific, 32106) et avec la caméra Odyssey Fc (Li-Cor).

## **12. Quantifications au microscope confocal**

### **12.1. Quantification des coupes de tumeurs PDAC**

Les images des coupes de tumeurs immunofluorescentes sont réalisées avec un microscope confocal à balayage laser FV1000 IX81 (Olympus) équipé d'un objectif sec 10x ou d'un objectif à immersion 40x (NA 1.3). Les acquisitions sont faites avec les mêmes réglages sur plusieurs échantillons (5 champs/souris, n = 5 à 7) et comprennent des témoins négatifs pour déterminer le bruit de fond.

## **12.2. Quantification de la densité des WPBs et des péricytes dans les rétines**

Les images des rétines immunofluorescentes sont réalisées avec un microscope confocal à spinning disk DSU IX81 (Olympus) équipé d'un objectif à immersion 60x (NA 1.25) ou avec un scanner de lame digital Nanozoomer (Hamamatsu) au grossissement 40x. Les acquisitions sont faites avec les mêmes réglages sur plusieurs rétines et comprennent des témoins négatifs pour déterminer le bruit de fond. Pour les quantifications avec le microscope confocal, les rétines sont échantillonnées dans les plexus immatures et matures en réalisant des piles de 8 à 12 plans axiaux espacés de 0,5  $\mu\text{m}$ . Pour les quantifications avec le Nanozoomer, les arbres vasculaires sont divisés en 5 sections de même aire de la région des « tip cells » vers le nerf optique. Dans les 2 types d'analyses, les densités des WPBs et des péricytes sont calculées en quantifiant respectivement les aires des marquages vWF et NG2 par un threshold manuel. Les aires des marquages vWF et NG2 sont normalisées par l'aire vasculaire identifiée par la lectine.

## **12.3. Quantification des WPBs et de l'Ang-2 dans les HUVECs traitées avec le N6L**

Les images des HUVECs marquées par les anticorps anti-vWF et anti-Ang-2 sont réalisées avec un microscope DSU IX81 (Olympus) équipé d'un objectif à immersion 40x (NA 1.3). Les objets vWF<sup>+</sup> ou Ang-2<sup>+</sup> sont détectés par un threshold manuel et quantifiés comme l'aire de marquage vWF ou Ang-2 normalisée par le nombre de noyaux.

## **12.4. Quantification des WPBs et de l'Ang-2 dans les HUVECs traitées avec le VEGF<sub>165</sub>, la thrombine ou l'anticorps anti-VEGF**

Les images des HUVECs immunofluorescentes sont acquises avec un microscope confocal à spinning disk DSU IX81 (Olympus) équipé d'un objectif à immersion 60x (NA 1.25). 3 canaux ont été utilisés : bleu pour le DAPI (détection des noyaux), rouge pour l'Ang-2 et vert pour le vWF. Le traitement et l'analyse des images sont réalisés avec le logiciel ImageJ (1). Des piles de 8 ou 10 images espacées de 0,5  $\mu\text{m}$  sont faites avec les mêmes réglages sur de nombreux échantillons cellulaires et les acquisitions comprennent des

témoins négatifs pour déterminer le bruit de fond. Les images correspondant à la projection maximale de chaque pile sont analysées avec un programme développé par Gilles CARPENTIER et détaillé dans le Matériels et Méthodes de l'Article 2. Brièvement, ce programme peut détecter et mesurer l'aire de 3 types d'objets : vWF+Ang-2<sup>-</sup> correspondant aux WPBs qui ne contiennent pas d'Ang-2, vWF+Ang-2<sup>+</sup> correspondant aux WPBs qui contiennent de l'Ang-2 et vWF-Ang-2<sup>+</sup> correspondant à des particules d'Ang-2 qui ne sont pas des WPBs.

(1) Rasband WS (1997–2017) ImageJ website, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Available: <http://imagej.nih.gov/ij/>.

## **13. Traitement des HUVECs avec le N6L, le VEGF-A<sub>165</sub>, la thrombine ou l'anticorps anti-VEGF**

### **13.1. Etudes de sécrétion et d'expression protéique**

#### **Traitement N6L**

1,5x10<sup>5</sup> HUVECs/puits sontensemencées dans une plaque 12 puits coatée en gélatine 1%. Le lendemain, les cellules sont traitées pendant 5 heures à 37°C avec la concentration indiquée de N6L dilué dans de l'EGM-2. Les cellules sont rincées et le milieu est remplacé par de l'EBM-2 contenant ou non du N6L pendant 1 heure à 37°C.

#### **Traitement VEGF-A<sub>165</sub>**

1,5x10<sup>5</sup> HUVECs/puits sontensemencées dans une plaque 12 puits coatée en gélatine 1%. Le lendemain, les cellules sont sevrées pendant 5 heures à 37°C dans de l'EBM-2. Les cellules sont rincées et le milieu est remplacé pendant 3 heures à 37°C par 100 ng/mL de VEGF-A<sub>165</sub> recombinant (R&D Systems, 293-VE) dilué dans de l'EBM-2.

#### **Traitement anti-VEGF**

2x10<sup>6</sup> HUVECs/boîte sontensemencées dans une boîte de Pétri 100 mm coatée en gélatine 1%. Le lendemain, les cellules sont traitées pendant 5 heures à 37°C avec 20 ng/mL d'anticorps anti-VEGF (R&D Systems, 471-F1) dilué dans de l'EGM-2.

Les surnageants sont récupérés et les cellules sont lysées avec un tampon de lyse bouillant composé de 1V SDS 20% - 1V Tris 0,5M - 2V ddH<sub>2</sub>O. Les surnageants sont analysés par ELISA ou par puces à protéome. Les lysats cellulaires sont quantifiés par un dosage BCA et analysés par Western-Blotting.

## 13.2. Etude des WPBs et de l'Ang-2 à l'intérieur des HUVECs

### Traitement VEGF-A<sub>165</sub>

9x10<sup>4</sup> HUVECs/puits sontensemencées sur des lamelles coatées en gélatine 1% et placées dans une plaque 24 puits. Les cellules sont traitées comme pour l'étude de sécrétion et d'expression protéique puis fixées avec du méthanol pendant 10 minutes à -20°C.

### Traitement thrombine

9x10<sup>4</sup> HUVECs/puits sontensemencées sur des lamelles coatées en gélatine 1% et placées dans une plaque 24 puits. Les cellules sont sevrées pendant 1 heure à 37°C dans de l'EBM-2. Les cellules sont rincées et le milieu est remplacé pendant 5 minutes à 37°C par 1U de thrombine (Sigma Aldrich, T4393) diluée dans de l'EBM-2. Les cellules sont fixées avec du méthanol pendant 10 minutes à -20°C.

### Traitement anti-VEGF

3x10<sup>4</sup> HUVECs/puits sontensemencées sur des lamelles coatées en gélatine 1% et placées dans une plaque 24 puits. Les cellules sont traitées comme pour l'étude de sécrétion et d'expression protéique puis fixées avec du méthanol pendant 10 minutes à -20°C.

## 14. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont effectuées avec le test-*t* de Student à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.01 (San Diego, Etats-Unis). Les valeurs de *p* inférieures à 0,05% sont considérées comme significatives.

## *V. RESULTATS*

## A. Première partie

# Effets de l'inhibition de la nucléoline sur la croissance et l'angiogenèse tumorales

## 1. Introduction

La nucléoline est une nucléoprotéine exprimée dans le nucléole des cellules quiescentes et transférée vers la membrane plasmique des cellules en prolifération. Ainsi, la nucléoline est présente à la surface des cellules tumorales (Hovanessian *et al.*, 2010 ; Krust *et al.*, 2011 ; Galzio *et al.*, 2012) et des cellules endothéliales activées au cours de l'angiogenèse (Christian *et al.*, 2003). Plusieurs peptides ciblant la nucléoline ont été développés pour tenter de limiter la progression tumorale, parmi lesquels le peptide F3, l'anti-nucléoline 4LB5, l'aptamère AS1411 testé dans des essais cliniques de phase II pour le traitement de tumeurs rénales métastatiques (Rosenberg *et al.*, 2014) et le pseudopeptide multivalent HB-19 (Nisole *et al.*, 1999 ; Nisole *et al.*, 2000 ; Krust *et al.*, 2010 ; Sader *et al.*, 2015). L'équipe COURTY a montré que le peptide HB-19 inhibe la croissance tumorale dans des modèles murins de xénogreffes de cancer du sein et de mélanome (Destouches *et al.*, 2008 ; El Khoury *et al.*, 2010) et présente une activité anti-angiogénique dans le modèle de la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet (Birmapas *et al.*, 2012). L'équipe COURTY a ensuite développé un dérivé du peptide HB-19 en collaboration avec une équipe de chimistes de l'Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IBMC) de l'Université de Strasbourg (France) : le pseudopeptide N6L qui a passé avec succès une étude clinique de phase I/II (IPP-204106). Le N6L inhibe la croissance tumorale dans des modèles murins de xénogreffes de cancer du sein ou de la prostate (Destouches *et al.*, 2011) et présente une activité anti-angiogénique dans le modèle de la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet (Destouches *et al.*, 2011). En accord avec ces résultats anti-angiogéniques, il a été montré que le ciblage de la nucléoline par un anticorps bloquant inhibe l'angiogenèse tumorale des tumeurs ectopiques du sein (Fogal *et al.*, 2009). A la suite de ces observations, nous avons souhaité évaluer l'effet de l'inhibition de la nucléoline sur l'angiogenèse et la croissance tumorales. Pour cela, nous avons choisi d'utiliser le modèle de l'adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC).



Le PDAC est un cancer du pancréas de type exocrine résultant de l'accumulation de mutations génétiques par les cellules acineuses conduisant à une transformation tumorale selon plusieurs stades évolutifs dont le stade ultime est la tumeur PDAC. Les altérations génétiques les plus fréquentes concernent majoritairement le proto-oncogène KRAS (90%) et les gènes suppresseurs de tumeurs TP53 (85%) et SMAD4 (50%). Le gène inhibiteur du cycle cellulaire CDKN2A est retrouvé muté dans 85% des tumeurs PDAC (Korc, 2003). L'ensemble de ces mutations favorisent la progression tumorale en inhibant l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire (Rhim et Stanger, 2010). La transformation des cellules tumorales s'accompagne d'une réaction desmoplastique (Bousquet et Susini, 2007) mettant en place un microenvironnement tumoral fortement fibreux et dense représentant environ 80% de la tumeur et contenant des cellules stromales activées : fibroblastes associés au cancer (CAFs), macrophages associés à la tumeur (TAMs), cellules endothéliales activées par l'angiogenèse tumorale, cellules immunitaires infiltrées. Ce stroma activé sécrète des facteurs pro-tumoraux accélérant la croissance tumorale et favorisant la dissémination des cellules tumorales et la formation de métastases (Whatcott *et al.*, 2013 ; Esposito *et al.*, 2014). Le microenvironnement fibreux limite la formation des vaisseaux sanguins et génère un stroma hétérogène, certaines régions de la tumeur étant très peu vascularisées et faiblement infiltrées par des cellules immunitaires. De plus, la rigidité du stroma comprime les vaisseaux et réduit l'efficacité de la perfusion de la tumeur, conférant aux tumeurs PDAC la caractéristique d'être des tumeurs globalement très hypoxiques (Feig *et al.*, 2012). Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pour ce type de cancer et les rares traitements disponibles allongent la survie de quelques mois.

## 2. Contexte et objectif de l'étude

Les tumeurs PDAC étant faiblement vascularisées, les essais thérapeutiques associant un composé anti-angiogénique et les chimiothérapies classiques se sont révélés peu concluants. Par exemple, un essai clinique de phase III associant un anticorps anti-VEGF (bevacizumab) et la gemcitabine n'a pas amélioré la survie des patients atteints de tumeurs avancées du pancréas (Kindler *et al.*, 2010). Une nouvelle stratégie vise à favoriser la biodistribution des chimiothérapeutiques en améliorant la perfusion de la tumeur. Il s'agit du concept de normalisation vasculaire (Carmeliet et Jain, 2011b ; Goel *et al.*, 2011 ; Huang *et al.*, 2013 ; Park *et al.*, 2016). L'objectif est de rendre plus fonctionnels les vaisseaux tumoraux collapsés pour améliorer l'accès des chimiothérapeutiques et l'infiltration des

cellules immunitaires anti-tumorales tout en limitant l'intravasation des cellules tumorales et l'hypoxie de la tumeur qui favorisent la formation des métastases. Etant donné les effets anti-tumoraux et anti-angiogéniques du N6L démontrés dans plusieurs modèles murins, nous avons choisi d'évaluer l'effet de l'inhibition de la nucléoline dans les tumeurs PDAC. Pour cela, nous avons mis en place deux modèles murins orthotopiques d'adénocarcinome pancréatique ductal. Ces modèles permettent de reproduire un stroma proche de la pathologie humaine avec un système immunitaire fonctionnel. Les données ont été validées sur des modèles orthotopiques décrits dans la littérature et reproduits au laboratoire.

Le premier modèle a été développé par l'équipe et par des collaborateurs du laboratoire « Transgenic Mouse Models » de l'Institut de Recherche sur le Cancer (IRCCS) de Candiolo (Turin, Italie) dirigé par Enrico GIRAUDO. Les cellules tumorales pancréatiques murines mPDAC sont injectées dans le pancréas de souris syngéniques immunocompétentes FVB/n. Ces cellules nous ont été fournies par l'équipe de Douglas HANAHAN du laboratoire « Swiss Institute for Experimental Cancer Research » (ISREC) de l'EPFL (Lausanne, Suisse). Elles proviennent de souris transgéniques portant des mutations sur les gènes *Kras*, *Cdkn2a* (*Ink4a/Arf*) et *Trp53*. Dans ce modèle agressif, les tumeurs se développent en 4 semaines avec la formation de métastases hépatiques. Une semaine après l'injection des cellules tumorales, les souris sont injectées 3 fois par semaines avec du N6L pendant 3 semaines puis sacrifiées 4 semaines après le début de l'expérience. Au terme de l'expérience, les effets du ciblage de la nucléoline par le N6L sur la croissance et l'angiogenèse tumorales sont évalués. En parallèle, des études *in vitro* ont été conduites pour étudier l'effet du N6L sur les cellules endothéliales en culture.

Pour distinguer les effets de l'inhibition de la nucléoline sur les cellules cancéreuses et dans le microenvironnement tumoral, nous avons mis en place un second modèle murin de tumeur pancréatique exocrine orthotopique. Ce modèle consiste à injecter des cellules tumorales pancréatiques murines PANC-02 dans le pancréas de souris syngéniques immunocompétentes C57BL/6 KO NCL<sup>+/-</sup>. Le KO homozygote de la nucléoline étant létal en quelques jours, Philippe BOUVET et Fabien MONGELARD du « Centre de Recherche sur le Cancer de Lyon » (France) ont créé une lignée de souris transgéniques chez lesquelles l'inactivation d'un allèle de la nucléoline est induite par l'injection de tamoxifène. Les tumeurs se développent en 4 semaines mais ne donnent pas de métastases. Les effets de

l'inactivation spécifique de la nucléoline dans le microenvironnement tumoral sur la croissance et l'angiogenèse tumorales sont évalués au terme des 4 semaines et confrontés aux effets de l'inhibition de la nucléoline par le N6L sur les cellules en prolifération (cellules tumorales et cellules endothéliales activées).

### 3. Résumé des résultats

Au cours de ce travail publié dans le journal *Cancer Research*, nous avons montré que la nucléoline est surexprimée dans les tumeurs PDAC humaines, ce qui en fait une nouvelle cible potentielle dans ce type de cancers. *In vivo*, l'inhibition de la nucléoline par le N6L dans le modèle mPDAC réduit significativement la croissance tumorale et la formation de métastases hépatiques tout en réduisant l'aire vasculaire et en favorisant la normalisation des vaisseaux tumoraux *via* le recrutement des péricytes et l'amélioration de la perfusion vasculaire. Conséquence de la normalisation vasculaire, nous avons observé que l'inhibition de la nucléoline réduit l'hypoxie de la tumeur et améliore la perfusion et la biodistribution des chimiothérapeutiques. Le recrutement des péricytes a également été observé dans les tumeurs développées dans les souris KO NCL<sup>+/-</sup>. Dans ce modèle, l'expression de la nucléoline est partiellement inhibée dans toutes les cellules du stroma tumoral sauf dans les cellules cancéreuses, ce qui démontre que ces effets sont liés à l'inhibition directe de la nucléoline dans le microenvironnement tumoral et pas à un effet indirect dû à l'inhibition de la nucléoline dans les cellules cancéreuses. Pour ce qui concerne les cellules tumorales, les résultats ont montré que les effets anti-tumoraux sont liés à une induction directe de l'apoptose et à une diminution de la viabilité et de la migration de plusieurs lignées tumorales pancréatiques humaines et murines traitées avec le N6L. Les effets anti-angiogéniques et normalisateurs sont expliqués par un blocage des cellules endothéliales en phase G1/S du cycle cellulaire et par une inhibition de la sécrétion du facteur pro-angiogénique Ang-2 par les cellules endothéliales. L'inhibition de la sécrétion de l'Ang-2 passe par une régulation de l'exocytose des WPBs et contrôle le recrutement des péricytes. Ces résultats indiquent que le ciblage de la nucléoline inhibe l'activation endothéliale et soulignent l'importance de l'exocytose des WPBs et de la sécrétion de l'Ang-2 dans la régulation de la normalisation des vaisseaux tumoraux. Ce travail a aussi montré l'importance de l'application du double effet anti-tumoral et normalisateur dans l'amélioration de la distribution des chimiothérapeutiques à la tumeur qui pourrait

expliquer l'effet combinatoire du N6L avec la gemcitabine dans la réduction du volume tumoral des tumeurs PDAC traitées.

#### **4. Article 1 : Le ciblage de la nucléoline diminue la progression du cancer du pancréas et favorise la normalisation des vaisseaux tumoraux**

Ce travail a été publié le 15 Décembre 2016 dans le journal *Cancer Research*.



## Nucleolin Targeting Impairs the Progression of Pancreatic Cancer and Promotes the Normalization of Tumor Vasculature

Maud-Emmanuelle Gilles<sup>1</sup>, Federica Maione<sup>2,3</sup>, Mélissande Cossutta<sup>1</sup>, Gilles Carpentier<sup>1</sup>, Laure Caruana<sup>1</sup>, Silvia Di Maria<sup>1</sup>, Claire Houppé<sup>1</sup>, Damien Destouches<sup>1</sup>, Ksenya Shchors<sup>4</sup>, Christopher Prochasson<sup>5</sup>, Fabien Mongelard<sup>6</sup>, Simona Lamba<sup>7</sup>, Alberto Bardelli<sup>7,8</sup>, Philippe Bouvet<sup>6</sup>, Anne Couvelard<sup>5</sup>, José Courty<sup>1</sup>, Enrico Giraudo<sup>2,3</sup>, and Ilaria Cascone<sup>1</sup>

### Abstract

Pancreatic cancer is a highly aggressive tumor, mostly resistant to the standard treatments. Nucleolin is overexpressed in cancers and its inhibition impairs tumor growth. Herein, we showed that nucleolin was overexpressed in human specimens of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and that the overall survival significantly increased in patients with low levels of nucleolin. The nucleolin antagonist N6L strongly impaired the growth of primary tumors and liver metastasis in an orthotopic mouse model of PDAC (mPDAC). Similar antitumor effect of N6L has been observed in a highly angiogenic mouse model of pancreatic neuroendocrine tumor RIP-Tag2. N6L significantly inhibited both human and mouse pancreatic cell proliferation and invasion. Notably, the analysis of tumor vasculature revealed a strong increase of pericyte coverage and vessel perfusion both in mPDAC and RIP-Tag2 tumors, in parallel to an inhibition of tumor

hypoxia. Nucleolin inhibition directly affected endothelial cell (EC) activation and changed a proangiogenic signature. Among the vascular activators, nucleolin inhibition significantly decreased angiopoietin-2 (Ang-2) secretion and expression in ECs, in the tumor and in the plasma of mPDAC mice. As a consequence of the observed N6L-induced tumor vessel normalization, pre-treatment with N6L efficiently improved chemotherapeutic drug delivery and increased the antitumor properties of gemcitabine in PDAC mice. In conclusion, nucleolin inhibition is a new anti-pancreatic cancer therapeutic strategy that dually blocks tumor progression and normalizes tumor vasculature, improving the delivery and efficacy of chemotherapeutic drugs. Moreover, we unveiled Ang-2 as a potential target and suitable response biomarker for N6L treatment in pancreatic cancer. *Cancer Res*; 76(24); 7181–93. ©2016 AACR.

<sup>1</sup>University of Paris Est (UPEC), ERL-CNRS 9215, Laboratory of Growth, Reparation and Tissue Regeneration (CRRET), UPEC, Créteil, France. <sup>2</sup>Laboratory of Transgenic Mouse Models, Candiolo Cancer Institute - FPO, IRCCS, Candiolo (TO), Italy. <sup>3</sup>Department of Science and Drug Technology, University of Torino, Torino, Italy. <sup>4</sup>Swiss Institute for Experimental Cancer Research (ISREC), EPFL SV ISREC, Station 19, Lausanne, Switzerland. <sup>5</sup>Department of Pathology, Bichat Hospital APHP DHU UNITY and University of Paris Diderot, Paris, France. <sup>6</sup>University of Lyon, Ecole normale Supérieure de Lyon, Cancer Research Center of Lyon, Cancer Cell Plasticity Department, UMR INSERM 1052 CNRS 5286, Centre Léon Bérard, Lyon, France. <sup>7</sup>Department of Oncology, University of Torino, Candiolo (TO), Italy. <sup>8</sup>Candiolo Cancer Institute-FPO, IRCCS, Candiolo (TO), Italy.

**Note:** Supplementary data for this article are available at Cancer Research Online (<http://cancerres.aacrjournals.org/>).

M.-E. Gilles, F. Maione, and M. Cossutta share co-authorship for this article.

J. Courty, E. Giraudo, and I. Cascone share co-senior authorship for this article.

**Corresponding Authors:** Ilaria Cascone, Université Paris Est Créteil, CRRET ERL CNRS 9215, Val de Marne, 61 Avenue du Général de Gaulle, 94010 Créteil Cedex, France. Phone: 336-3125-1698; Fax: 331-4517-1816; E-mail: [ilaria.cascone@u-pec.fr](mailto:ilaria.cascone@u-pec.fr); and Enrico Giraudo, University of Torino 10125 Torino, Italy, and Laboratory of Transgenic Mouse Models, Candiolo Cancer Institute - FPO, IRCCS, Candiolo (TO), Italy. Phone: 39-011-9933279; Fax: 39-011-9933524; E-mail: [enrico.giraudo@ircc.it](mailto:enrico.giraudo@ircc.it)

doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0300

©2016 American Association for Cancer Research.

### Introduction

Pancreatic cancer, which includes pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and pancreatic neuroendocrine tumors (PNET), is the fourth most common cause of cancer-related deaths worldwide (1). PDAC is a highly aggressive cancer with a very poor prognosis and an overall 5-year survival rate less than 5%. Current therapies in PDAC and PNET, consist solely of surgery followed or not by targeted or chemotherapies (2, 3).

Nucleolin is highly expressed in several types of cancer (4), and is a cancer-specific target, being localized at the cell surface of tumor cells and activated endothelial cells (EC; refs. 5–7). Nucleolar nucleolin principally regulates rRNA transcription and ribogenesis whereas cell surface nucleolin acts as a low-affinity receptor for specific ligands (4). Moreover, nucleolin stabilizes the mRNA of antiapoptotic proteins (8). Nucleolin is a novel target for anticancer therapy as demonstrated by the effects of several nucleolin-targeting molecules (9–11). We recently developed a multivalent synthetic pseudopeptide N6L that selectively binds to nucleolin (9). N6L strongly inhibits breast cancer growth by inducing apoptosis of tumor cells and is currently in preparation for phase II clinical trials (IPP-204106; ref. 9). Interestingly, N6L as well as a nucleolin-blocking antibody impairs both experimental and *in vivo* angiogenesis by targeting ECs and tumor vessels (9, 12, 13). The mechanisms of regulation of tumor angiogenesis by nucleolin are poorly described, such as the effect of nucleolin inhibition in tumor cells and stroma of pancreatic cancer.



Gilles et al.

Several molecules that regulate tumor angiogenesis are over-expressed in pancreatic cancer. In human PDAC, VEGF expression is increased and high levels of angiopoietin-2 (Ang-2) correlate with metastatic spread and poor survival of PDAC patients (14, 15). However, blood vessels in PDAC are compressed by the fibrous stroma and PDAC is poorly perfused with a consequent aberration in local blood flow and oxygenation (16). This contributes to the promotion of cancer growth, tumor hypoxia, metastasis formation, and prevents an efficient delivery of chemotherapeutic drugs (17, 18). PNETs, differently from PDAC are highly vascularized, but share the same vascular abnormality phenotype that contributes to cancer progression and metastatic dissemination (3).

On the basis of these findings our aim was to target both cancer cells and tumor vasculature in pancreatic cancer. In this work, we studied nucleolin-targeted therapy, demonstrating that N6L hampers pancreatic cancer growth and metastasis by dually targeting cancer cell growth and tumor vasculature, and we explored the potential mechanisms of action.

## Materials and Methods

The source of antibodies (Ab) and the experimental procedures not described herein are detailed in Supplementary Data.

### Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were authenticated by Lonza and periodically provided between 2013 and 2015, cultured in EGM-2 and used until the fourth passage. BxPC-3 cells were obtained in 2014 from ATCC and frozen in aliquots. Fresh aliquots were used for each experiment. Cells were cultured in DMEM 10% FBS. Human brain vascular pericytes (HBVP) were authenticated and provided by ScienCell in 2014, maintained in Pericyte Medium phenol red free (PM-prf, ScienCell) containing appropriated growth supplements and used until the fourth passage. Murine pancreatic cancer cell (mPDAC), were isolated, as described in Supplementary Methods, from tumor-bearing  $p48^{cre}$ ,  $Kras^{LSL-G12D}$ ,  $p53^{R172H/+}$ ,  $Ink4a/Arf^{fllox/+}$  mice in 2012 and the genotype was verified by PCR.

### Tumor mouse models

Cohorts of female FVB/n syngenic mice were obtained from Charles River (Calco). Eight weeks of age FVB/n mice (strain code 207, weight average of 20g) were injected orthotopically in the pancreas with mPDAC cells ( $10^3$  cells/mouse in  $50 \mu\text{L}$ ). We defined as starting point to perform a regression trial one week after cancer cells inoculation, time-period in which tumors reached a volume of approximately  $80 \text{ mm}^3$ . The mice were treated 3 times a week for the duration of 3 weeks by intraperitoneal injections with either N6L (10 mg/kg) or vehicle (saline solution) as a control. Gemcitabine was injected in the tail vein (i.v.; 100 mg/kg) two times a week as indicated. In the combination treatment, GEM was injected two times a week (i.v.) and N6L 3 times a week (intraperitoneally) after 1 week of N6L for a total of 2 weeks to the animals. Regarding the measurement of metastasis, livers from PDAC mice were entirely cut and sections spaced of  $200 \mu\text{m}$  were stained by hematoxylin. Images were taken by Scanner Aperio Scanscope CS. The metastatic surface of each nodule in the liver sections was measured, and the total surface occupied by metastasis was divided by the total area of the liver section.

The RIP-Tag2 transgenic mouse model has been previously described (19), RIP-Tag2 male mice were treated by

N6L 10 mg/kg, 3 times a week for a duration of 4 weeks from 12 to 16 weeks of age.

For the orthotopic mouse model of human pancreatic cancer, we inoculated BxPC-3 cells ( $10 \times 10^6$  cells/mouse) within the pancreas of 8-wk-old immunodeficient NOD/SCID from Charles River (strain code 394, weight average of 20g) female mice. One month after cell injection, mice were treated 3 times a week for the duration of 2 weeks by intraperitoneal injections with either N6L (10 mg/kg) or vehicle (saline solution) as a control. Mice were sacrificed and total tumor burden was quantified as previously described (9). All *in vivo* experiments were carried out with the approval of the Institutional Ethical Committees and of the Italian and French Ministries of Health in compliance with European laws and policies.

### Tissue microarray staining and analysis

An immunohistochemical staining was performed with anti-nucleolin antibody (Supplementary Methods) using standard protocol in 47 human PDAC included in a tissue microarray (TMA) paraffin block. Immunostaining was performed using an automated technique (Streptavidin-peroxydase with an automate Bond Max, Leica), and slides were counterstained with hematoxylin. Images were taken by the Scanner Aperio Scanscope CS. Analysis of nucleolin staining was performed by a score determination corresponding to the intensity of the labeling of tumor cells from 0 to 3 (0, no staining; 1, low staining; 2, moderate staining; 3, high staining) in each spot. The final score for each tumor was the average of the scores obtained for each spot available by tumor.

### Measurement of tumor delivery of doxorubicin and vessel perfusion

To evaluate tumor vessel perfusion, 0.05 mg FITC-labeled tomato lectin (Vector laboratories) were injected intravenously into PDAC-carrying mice, as previously described (20). After 10 minutes, the animals were euthanized, and lectin distribution was visualized by fluorescent confocal microscopy.

To measure the tumor delivery of doxorubicin mice were injected with 10 mg/kg doxorubicin hydrochloride (Sigma-Aldrich) *via* the lateral tail vein 4 hours before sacrifice. Tumors and kidneys as controls were collected from each mouse and weighted. Samples were resuspended in a lysis buffer (0.25 mol/L sucrose, 5 mmol/L TrisHCl pH 7.6, 1 mmol/L  $\text{MgSO}_4$ , 1 mmol/L  $\text{CaCl}_2$ ) and homogenized in an ice-cold Potter homogenizer.  $200 \mu\text{L}$  of each homogenate was added to 10% Triton X-100 and 1.5 mL acidified isopropanol, kept at  $-20^\circ\text{C}$  overnight and centrifuged  $15,000 \times g$  for 20 minutes. Doxorubicin was quantified by spectrophotometric analysis at 590 nm using TECAN Infinite M1000 plate reader (Tecan). These values were calculated as the fluorescence/weight ratio of the tumor divided by the fluorescence/weight ratio of the kidney and expressed as  $\mu$  equivalents/g tissue of doxorubicin. Data are mean  $\pm$  SD of triplicate aliquots from tumor homogenates.

### Cell transfection and cell migration

Cell transfection by siRNA was performed by following manufacturer instructions (Hiperfect, Qiagen), for siRNA sequences see Supplementary Methods.

For pericyte motility,  $9 \times 10^4$  HUVECs per well were seeded in 6-well plate. The day after, HUVECs were transfected with 10 nmol/L siRNA or treated with  $30 \mu\text{mol/L}$  N6L. Three days later HUVECs were washed and medium was replaced by EBM-2. Cell supernatant was collected 1 hour after. A total of  $20 \times 10^4$  HBVPs were seeded in the upper chamber (with or without 400 ng/mL recombinant Ang-2) coated with  $1.5 \mu\text{g/mL}$  collagen type I and



the EC supernatant was added in the lower chamber. For each Transwell, nuclei of cells from 5 fields were counted using Leica Aristoplan microscope equipped with a CoolSNAP CCD camera.

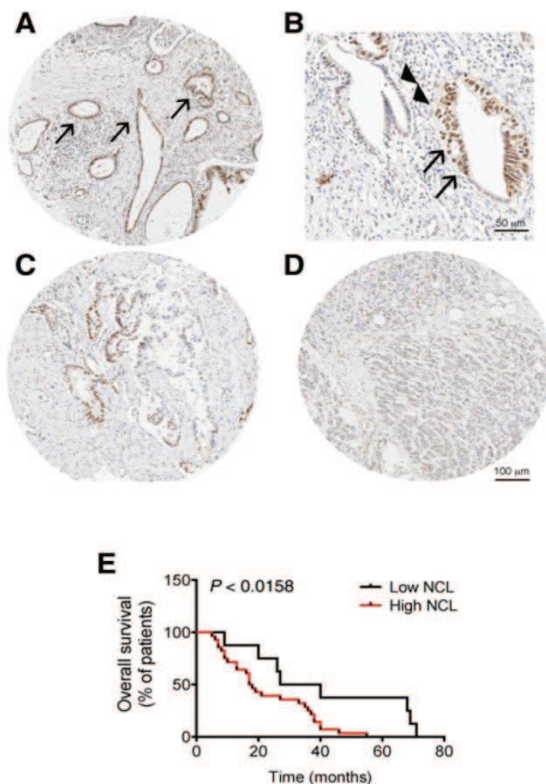
#### Statistical analysis

Unless indicated otherwise, bars represent mean  $\pm$  SEM ( $n \geq 3$ ),  $P$  values have been calculated using a two-tailed or one-tailed unpaired  $t$  test using GraphPad Prism software. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.00001$ .  $P$  values of the Kaplan-Meier curve of survival has been calculated by using the Long-rank (Mantel-Cox) test.

## Results

### Nucleolin is a potential new target of tumor progression in PDAC

Nucleolin is overexpressed in tumors and its inhibition hampers breast, prostate, and melanoma cancer growth and angiogenesis (4). To evaluate nucleolin as a potential target in human PDAC, we analyzed nucleolin protein expression levels in 47 tumors included in TMA. 74.5% of the tumors showed a moderate



**Figure 1.** Nucleolin is highly expressed in human and PDAC mouse models. Human PDAC included in a TMA was immunostained with anti-nucleolin antibody and scored as high (A and B), moderate (C), low (D) or negative (see Materials and Methods). The nucleolin expression was barely detected in the tumor stroma and the surrounding pancreatitis (D). Nucleolin was highly expressed by tumor glands (arrows in A and B) but not in normal ducts included in the tumor (arrowheads in B). E, Kaplan-Meier OS curves (Mantel Cox test, \*,  $P < 0.0158$ ).

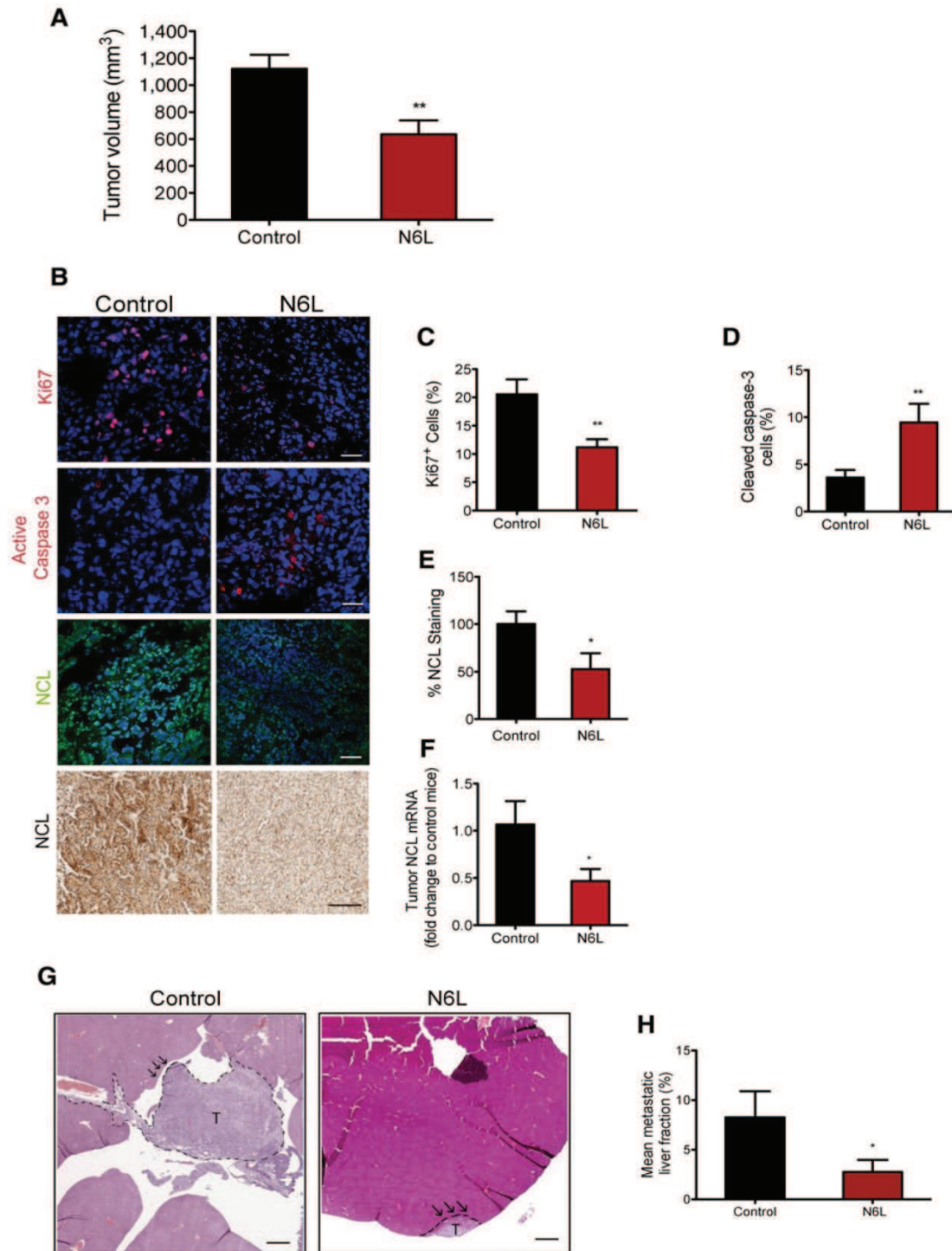
(Fig. 1C) or high nucleolin staining (Fig. 1A and B, arrows). Nontumoral pancreas, corresponding to pancreatitis (Fig. 1D), normal peritumoral tissue or normal ducts either around or included in the tumors (Fig. 1B, arrowheads) were not or very faintly stained by anti-nucleolin antibody. Next, we checked the correlation between nucleolin expression level and overall survival (OS) in patients with PDAC. Notably, the OS significantly increased in PDAC patients with low levels of nucleolin compared with patients with high levels of this protein (Fig. 1E).

Nucleolin protein level was analyzed in four different human pancreatic cancer cell lines (hPDAC), a murine PDAC cell line (mPDAC), and ECs (Supplementary Fig. S1A). Capan-2 and BxPC-3 showed similar protein level than nontumoral cells, whereas MIA PaCa-2, PANC-1 and mPDAC cell lines displayed higher nucleolin protein levels. We sought to investigate whether nucleolin inhibition affects progression of PDAC. The multivalent pseudopeptide N6L (9) bound to nucleolin in human pancreatic cancer cells PANC-1, as well as in ECs (Supplementary Fig. S1B). N6L inhibited pancreatic cell growth of all cell lines cited above (Supplementary Fig. S1C). The  $GI_{50}$  was in a range between 5 and 36  $\mu$ mol/L and increased with nucleolin levels. Coherently, N6L significantly reduced the amount of PDAC cells in S phase after 24 hours of treatment (Supplementary Fig. S1D), and the active caspase-3 levels increased after 48 hours of treatment (Supplementary Fig. S1E). Moreover, N6L strongly inhibited the migration of MIA PaCa2 and mPDAC cell lines by 69% and 72%, respectively, compared with controls (Supplementary Fig. S1F), and the invasion of mPDAC cells through a layer of Matrigel, as compared with controls (Supplementary Fig. S1G). The implication of nucleolin in PDAC cell proliferation was tested by other experimental approaches. For instance, the viability of mPDAC cells was decreased by a nucleolin blocking antibody (MS3; Supplementary Fig. S2A). Moreover, the knock down of the nucleolin gene (*NCL*) in mPDAC by means of CRISP-Cas9 technology caused massive death of the cells (Supplementary Fig. S2C). Nucleolin blocking antibody pretreatment decreased the efficacy of the entry of Alexa546-N6L in PDAC cells (Supplementary Fig. S2B). In line with these results, the combination of nucleolin-blocking antibody and N6L did not show a cumulative effect on cell viability (Supplementary Fig. S2A). These results suggested that N6L and nucleolin blocking antibody competed for nucleolin targeting in PDAC cells.

### N6L treatment hampers PDAC growth and liver metastasis

On the basis of the high levels of nucleolin found in human PDAC (Fig. 1), and according to the observation that N6L inhibited hPDAC and mPDAC cell proliferation (Supplementary Fig. S1), we decided to assess the antitumor effect of N6L in an orthotopic mouse model of PDAC. The model was obtained by injecting mPDAC tumor cells orthotopically into the pancreas of a cohort of FVB/n syngenic mice (from here the model will be called mPDAC model). This model recapitulated many features of the human PDAC, showing a malignant epithelial neoplasm with ductal differentiation (Supplementary Fig. S3A) or sarcomatoid carcinoma (Supplementary Fig. S3B; ref. 21). Tumor tissues in mPDAC model were highly hypoxic (Supplementary Fig. S3C) and fibrotic (Supplementary Fig. S3E, arrows), and showed a high heterogeneity of vessel density as in human patients (22), with poorly vascularized regions (arrows in Supplementary Fig. S3D) and regions with a higher vessel density (arrowheads in Supplementary Fig. S3D). Notably, carbonic anhydrase 9 (CA9) expression significantly increased in parallel with

Gilles et al.





enhanced synthesis of collagen I during cancer progression in mPDAC (Supplementary Fig. S3E, S3F, and S3G). These data suggest that, similarly to the human disease, hypoxic level well correlated with increased fibrosis in PDAC tumors. Similarly to human samples (Fig. 1 A–D), nucleolin was expressed in the nuclei of pancreatic acinar cells (Supplementary Fig. S3K) but highly expressed in tumor tissues compared with healthy pancreas (Supplementary Fig. S3H, S3I, S3K, and S3L), in particular in ducts and sarcomatoid regions of the tumor (Supplementary Fig. S3H and S3I). In addition, nucleolin was significantly expressed in the tumor vasculature of the mPDAC model (Supplementary Fig. S3J).

The treatment of mPDAC mice with 10 mg/kg of N6L significantly decreased the tumor volume by 43.4% (Fig. 2A). The rate of proliferative cells decreased in PDAC tumors treated by N6L compared with controls (Fig. 2B and C) while, N6L treatment enhanced apoptosis in tumor cells (Fig. 2B and D). Because nucleolin expression is coupled to tumor cell proliferation (6), we analyzed the effect of N6L on nucleolin protein (Fig. 2B and E) and mRNA levels in tumors (Fig. 2F). Consistently, both nucleolin mRNA and protein were decreased in N6L-treated mPDAC (Fig. 2B, E, and F).

Two ways of dissemination to the liver are described in PDAC patients, through vessels and through a peritoneal dissemination. mPDAC model developed liver metastasis prominently in the liver at close contact to the peritoneal surface (Fig. 2G, arrows). The total metastatic area was quantified (Fig. 2H). Remarkably, N6L strongly reduced liver metastasis area by 67% (Fig. 2G and H). These findings are further supported by our data describing a strong effect of N6L in blocking the motility and the invasion of mouse and tumor cell lines (Supplementary Fig. S1F and S1G).

#### Nucleolin targeting by N6L normalizes tumor vessels and counteracts tumor hypoxia in PDAC and PNET

Because nucleolin targeting inhibits EC growth and nucleolin is significantly expressed in the vasculature of mPDAC, we investigated the effect of N6L on tumor blood vessel density and morphology. Vessel density and vessel branching were significantly decreased in N6L-treated mPDAC by 42% and by 62%, respectively (Fig. 3A, B, and C). Therefore, the effect of N6L on tumor vessel normalization in mPDAC tumors was studied by analyzing the changes in pericyte vessel coverage, perfusion, and hypoxic levels, all hallmarks of vessel normalization in cancer (23). In mPDAC model, tumor blood vessels typically had low pericyte coverage, detected with two different markers of pericytes (24). The treatment of mPDAC tumors with N6L 10 mg/kg resulted in an increase of pericyte coverage of tumor blood vessels. NG2<sup>+</sup> pericytes increased by 71% (Fig. 3A and D) and PDGFR-β<sup>+</sup> pericytes by 77% (Fig. 3A and E). The treatment with N6L 2 mg/kg resulted in an increase of NG2<sup>+</sup> pericyte coverage of tumor blood vessel by 52% (Supplementary Fig. S4A), supporting

a dose effect of N6L. Then, we sought to evaluate the effect of the inhibition of stromal nucleolin versus tumoral cell nucleolin on tumor vascularization. We evaluated the tumor vascularization and pericyte coverage in an orthotopic mouse model of pancreatic tumor generated by injecting PDAC cells (Panc-02) into the pancreas of wild type (*NCL*<sup>wt/wt</sup>; *Cre*<sup>+/-</sup>) mice or in animals in which nucleolin was deleted in one allele (*NCL*<sup>flwt</sup>; *Cre*<sup>+/-</sup>; Supplementary Fig. S4B and S4C). Remarkably, we observed reduced tumor vascularization (Supplementary Fig. S4D and S4E) and increased pericyte coverage in *NCL*<sup>+/-</sup> (Supplementary Fig. S4F and S4G), compared with *NCL*<sup>+/+</sup> mice.

Blood vessel perfusion is a parameter of vessel homeostasis and correlates with pericyte coverage and oxygenation (25). Interestingly, the treatment of mPDAC with N6L enhanced the perfusion of the tumor vasculature, compared with controls (Fig. 3F and G). Next, we assessed whether the tumor oxygenation levels were affected by N6L. In line with its normalizing effect, N6L reduced the hypoxic area, detected by pimonidazole staining (Fig. 3H and I). In addition, N6L strongly inhibited the expression of carbonic anhydrase 9 (CA9), a marker of hypoxia (Fig. 3J and K; ref. 26).

To better assess the effects of N6L on tumor vessel normalization and the related antitumor properties, we employed a transgenic mouse model of pancreatic neuroendocrine tumor (PNET) RIP-Tag2. This model has been widely used to assess the efficacy of several antiangiogenic compounds and to evaluate the effect of vessel normalization to block tumor growth and invasion (19, 24). To this aim, we performed a regression trial (24), treating a cohort of tumor-bearing RIP-Tag2 mice with N6L. This treatment showed an inhibition of tumor growth by 40% (Fig. 4A) and an increase of tumor cell apoptosis (Fig. 4B), compared with controls. Similarly to PDAC, N6L significantly induced tumor vessel normalization by increasing pericyte coverage (by 42%; Fig. 4C and F), and enhanced the perfusion of the tumor vasculature (Fig. 4G and H). In line with these vessel normalization effects N6L-treated tumors showed reduced vessel number and branching (Fig. 4C, D, and E).

All together these results demonstrate that the inhibition of nucleolin induces vessel normalization in two different mouse models of pancreatic cancer by increasing pericyte coverage, vessel perfusion and reducing intratumoral hypoxia.

#### Nucleolin inhibition affects EC activation and Ang-2 secretion

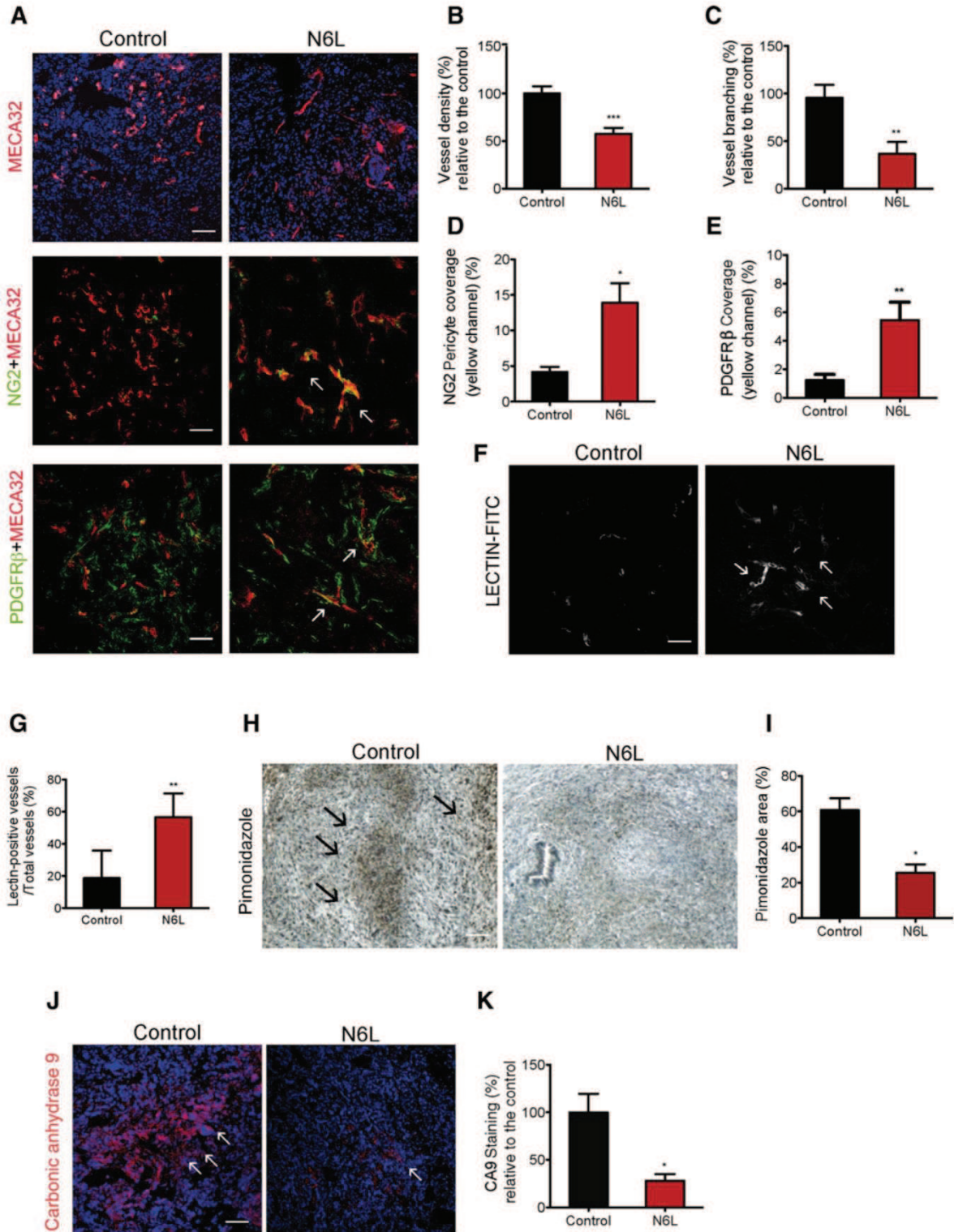
The mechanisms of tumor inhibition and vessel normalization by N6L were further studied. N6L does not induce apoptosis of ECs (15), and did not change the viability value of confluent ECs (Supplementary Fig. S5A), suggesting that nucleolin inhibition specifically target proliferating and activated ECs. N6L significantly decreased the percentage of ECs in S phase when compared with control-treated cells (14% vs 27%) and increased the percentage of cells in G1 (64% vs. 47%; Fig. 5A). The involvement of nucleolin

#### Figure 2.

N6L reduces PDAC tumor growth and liver metastasis. Immunocompetent syngenic FVB/n mice were injected with mPDAC cells into the pancreas. Mice were treated one week after inoculation of tumor cells with N6L alone (10 mg/kg) or saline solution intraperitoneally three times a week for 3 weeks. Mice were sacrificed and tumor volumes were measured (A; Student *t* test; \*\*, *P* < 0.01; *n* = 10 mice). mPDAC tissues were immunostained with anti-Ki67 (B) or anti-active caspase 3 or nucleolin antibodies, and images show representative fields; white scale bars, 10 μm; black scale bar, 100 μm. The quantification of percentage of Ki67<sup>+</sup> cells (C) and of apoptotic cells (D) or nucleolin staining (E) was plotted as inhibition relative to control and was performed by ImageJ analysis as described in Materials and Methods (Student *t*-test, \*\**P* < 0.01 \**P* < 0.05, *n* = 8 mice). F, Nucleolin mRNA level of PDAC tissues was quantified by qPCR and normalized to the GAPDH mRNA level (Ct<sub>NCL</sub>-Ct<sub>GAPDH</sub>; Student *t*-test, \**P* < 0.05, *n* = 5 mice). Histograms represent the fold change relative to control mice, calculated from the 2<sup>-ΔΔCt</sup>. G, Representative histological images of liver sections (hematoxylin and eosin staining) showing metastatic foci marked by black arrows; scale bar, 100 μm. H, The area of liver nodules was quantified by digitized image analysis using ImageJ software and is plotted as the metastatic liver fraction (Student *t* test one-tail, \*, *P* < 0.05; *n* = 5 mice).



Gilles et al.





in EC cycle progression was further confirmed by depleting nucleolin in ECs. In fact, nucleolin depletion by siRNA significantly decreased the percentage of ECs in S phase, and increased the amount of cells in G<sub>1</sub> phase when compared to control ECs (4% vs. 32% and 86% vs. 42%, respectively; Fig. 5B).

Another feature of EC activation is the secretion of pro-angiogenic molecules by ECs (27). Therefore, we evaluated the effect of N6L on the basal secretion of angiogenic-related molecules by ECs by using a proteome angiogenesis antibody array (R&D Systems). Interestingly, among the different secreted pro-angiogenic factors, we observed that Ang-2, shown to promote tumor progression and whose inhibition induces vessel normalization (28–32), was inhibited by N6L treatment (Supplementary Table S1). On the basis of this screening, we analyzed the effect of N6L on the secretion of Ang-2 by ECs. Ang-2 level decreased in the EC supernatant upon 5 hours of N6L treatment but not in EC lysates (Fig. 5C). Ang-2 is stocked in Weibel and Palade bodies (WPB) and basally secreted by WPB exocytosis in activated ECs (33). Ang-2 colocalized with the WPB protein vWF in ECs (Fig. 5D, inset). Interestingly, 5 hours of N6L treatment enhanced Ang-2 content (Fig. 5D and E), indicating that N6L interferes with the turnover of Ang-2 secretion, accumulating this protein into ECs. The importance of nucleolin in Ang-2 secretion inhibition under N6L was tested (Fig. 5F). Although significant inhibition of secreted Ang-2 has been observed in siControl ECs treated with N6L, no detectable differences in Ang-2 levels were measured in siNCL-EC supernatants, compared with their respective controls (Fig. 5F). The effect of longer N6L treatment (72 hours) on Ang-2 expression was analyzed (Fig. 5H and I). Ang-2 level decreased in EC lysates at the protein level (Fig. 5H) and at the mRNA level (Fig. 5I) under N6L treatment. Coherently, Ang-2 basal secreted levels (Fig. 5F) and Ang-2 protein level in ECs (Fig. 5G) were also decreased in nucleolin-depleted cells. These data suggest that nucleolin inhibition affects Ang-2 secretion and expression. In line with the observed pro-normalizing effect of N6L, among angiogenic-related secreted molecules in ECs, we observed that PDGF $\beta$ , a factor mediating pericyte recruitment (34), was also upregulated by N6L (Supplementary Table S1), and its mRNA was significantly increased under N6L treatment (Supplementary Fig. S5B).

Together these data demonstrate that nucleolin depletion or inhibition by N6L affects EC activation by decreasing the percentage of cells in S phase and regulating angiogenic molecules involved in pericyte recruitment.

#### Nucleolin inhibition decreases plasma Ang-2 level in PDAC model

In human cancers Ang-2 is highly expressed by ECs in tumor blood vessels and tumor cells (35, 36). Notably, Ang-2 is

expressed mostly in tumor blood vessel of the PDAC model (Supplementary Fig. S5D). Pilot studies aiming to measure the time-course of plasmatic Ang-2 amount showed that the levels of Ang-2 in the plasma were unchanged until the second week of PDAC growth and increased then after (Supplementary Fig. S5E). On the basis of these preliminary data, we next analyzed plasmatic Ang-2 level of different mice injected by PDAC cells or saline solution after 3 weeks of inoculation (Fig. 6A). As expected from our previous observation, Ang-2 was significantly increased in tumor-bearing mice (Fig. 6A). To evaluate the effect of N6L-treatment on secreted Ang-2 levels *in vivo*, we checked the plasma of control and N6L-treated mPDAC at the end of the treatment. Remarkably, Ang-2 was significantly decreased by 68% in the plasma of N6L-treated mice compared with control (Fig. 6B), whereas PDGF $\beta$  level did not change (Supplementary Fig. S5G). In parallel, Ang-2 expression was evaluated in tumors. Because tumor vessel density was decreased in N6L-treated mPDAC (Fig. 3A and B), Ang-2 expression was normalized to the tumor vessel gene MECA32 and Fig. 6C shows that Ang-2 expression decreased under N6L treatment. Notably, VEGF signaling was not affected by N6L, because VEGF-A expression (Supplementary Fig. S5F) was unchanged in N6L-treated PDAC tumors, and VEGFR2 levels was not affected in N6L-treated ECs (Supplementary Fig. S5C).

To better assess the role of secreted Ang-2 in vessel normalization, we sought to investigate whether decreased Ang-2 secretion by Ang-2-depleted or N6L-treated ECs was sufficient to induce pericyte recruitment. Pericyte migration toward the supernatants of Ang-2-depleted ECs was strongly increased compared with control (Fig. 6D). Moreover, pericyte migration toward the supernatant of ECs treated with N6L was similarly increased (Fig. 6E). Because pericytes express the Ang-2 receptor Tie-2 and Ang-2 induces dose-dependent pericyte loss on retina vessels (37), we investigated if Ang-2 could directly affect pericyte migration. Ang-2 functions are dependent to the context of angiogenic cytokines or factors regulating pericyte response (37). Recombinant Ang-2 did not affect alone the migration of control pericytes, as previously shown (37). However, recombinant Ang-2 significantly reduced the increased pericyte migration toward the supernatants of Ang-2-depleted ECs (Fig. 6D) or N6L-treated ECs (Fig. 6E). Together these data demonstrate the crucial involvement of Ang-2 in the pro-normalizing effect induced by N6L.

#### N6L enhances drug delivery in PDAC treatment

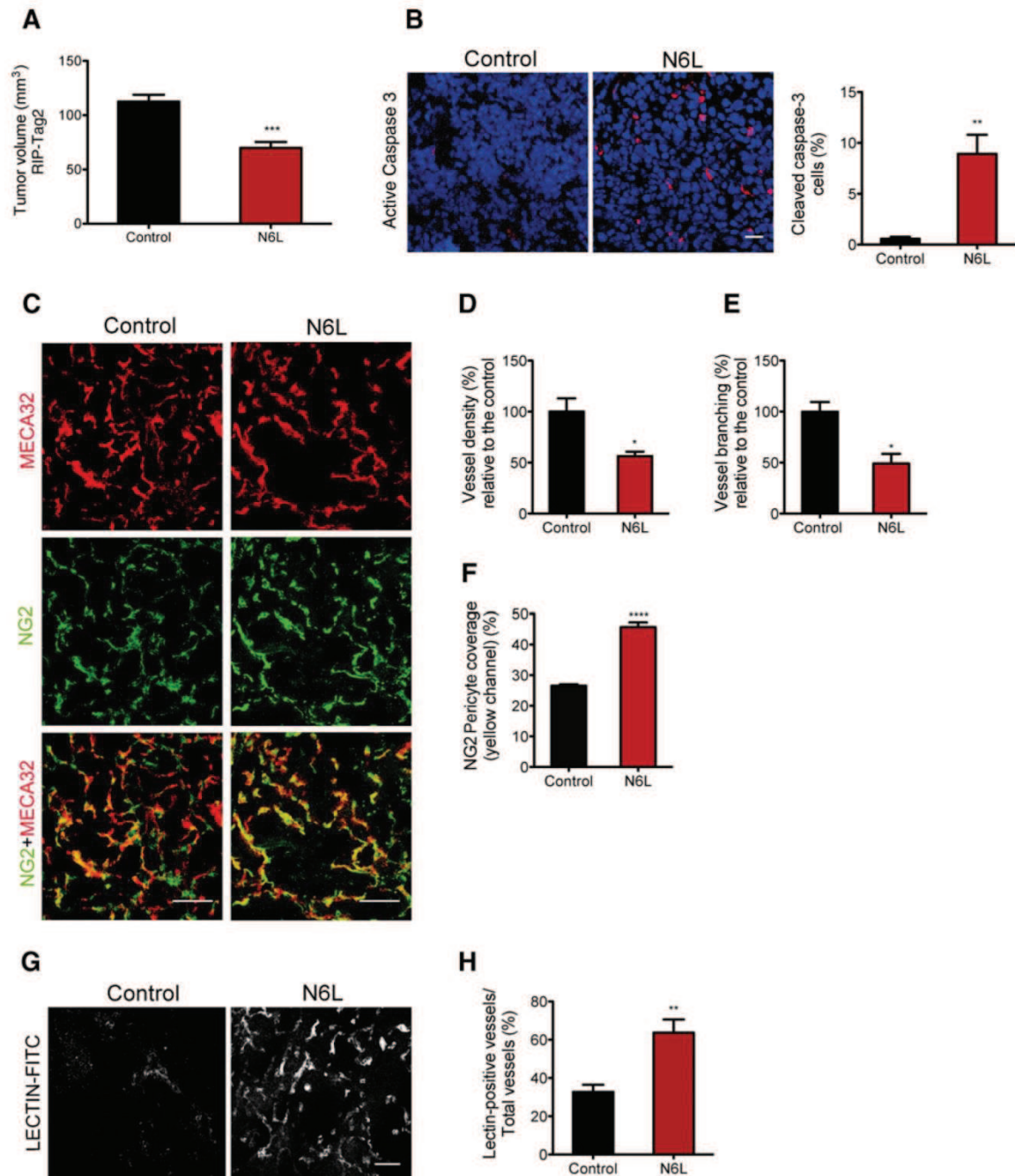
It has been shown that tumor vessel normalization represents a remarkably advantageous anticancer strategy, being also able to enhance drug delivery and, consequently, chemotherapy efficacy (23). To first assess whether the enhanced perfusion induced by N6L could also increase drug delivery, doxorubicin was injected in the tail vein of control or N6L-treated mice at the end of the trial

#### Figure 3.

N6L normalizes tumor blood PDAC vessels and counteracts tumor hypoxia in mPDAC. PDAC mice were treated or not with N6L for 3 weeks as in Figure 2. **A**, Tumor sections were immunostained by an anti-MECA32 antibody to detect tumor blood vessels, or coimmunostained by the anti-MECA32 and anti-NG2 or anti-PDGFR $\beta$  antibodies for pericyte analysis. Scale bars, 10  $\mu$ m. Tumor vessels and pericyte coverage analysis were performed as described in Materials Methods. **B** and **C**, The tumor blood vessel density (**B**) and the tumor vessel branching (**C**) are plotted as the percentage of the inhibition to control tumors. **D** and **E**, NG2<sup>+</sup> (**D**) and PDGFR- $\beta$ <sup>+</sup> (**E**) pericyte coverage of vessels is represented. **G**, Vessel perfusion was assessed by tail-injecting animals with FITC-lectin at the end of the treatment with N6L and was quantified as percentage of perfused/total blood ( $n = 6$  mice, Student *t* test, \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ). **F**, Images are representative of lectin-FITC signal. **H** and **I**, Hypoxia analysis was detected with an antibody recognizing the pimonidazole adducts (arrows) in control or N6L-treated tumor tissues (**H**) and the area positive for pimonidazole adducts was plotted (**I**). **J** and **K**, Tumor sections were immunostained by an anti-CA9 antibody for hypoxia-induced protein analysis (**J**) and the CA9 fluorescence intensity was plotted as a percentage relative to the control (**K**). **B**, **C**, **D**, **E**, **I**, and **K**, from at least  $n = 5$  mice per stage (Student *t* test, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ).



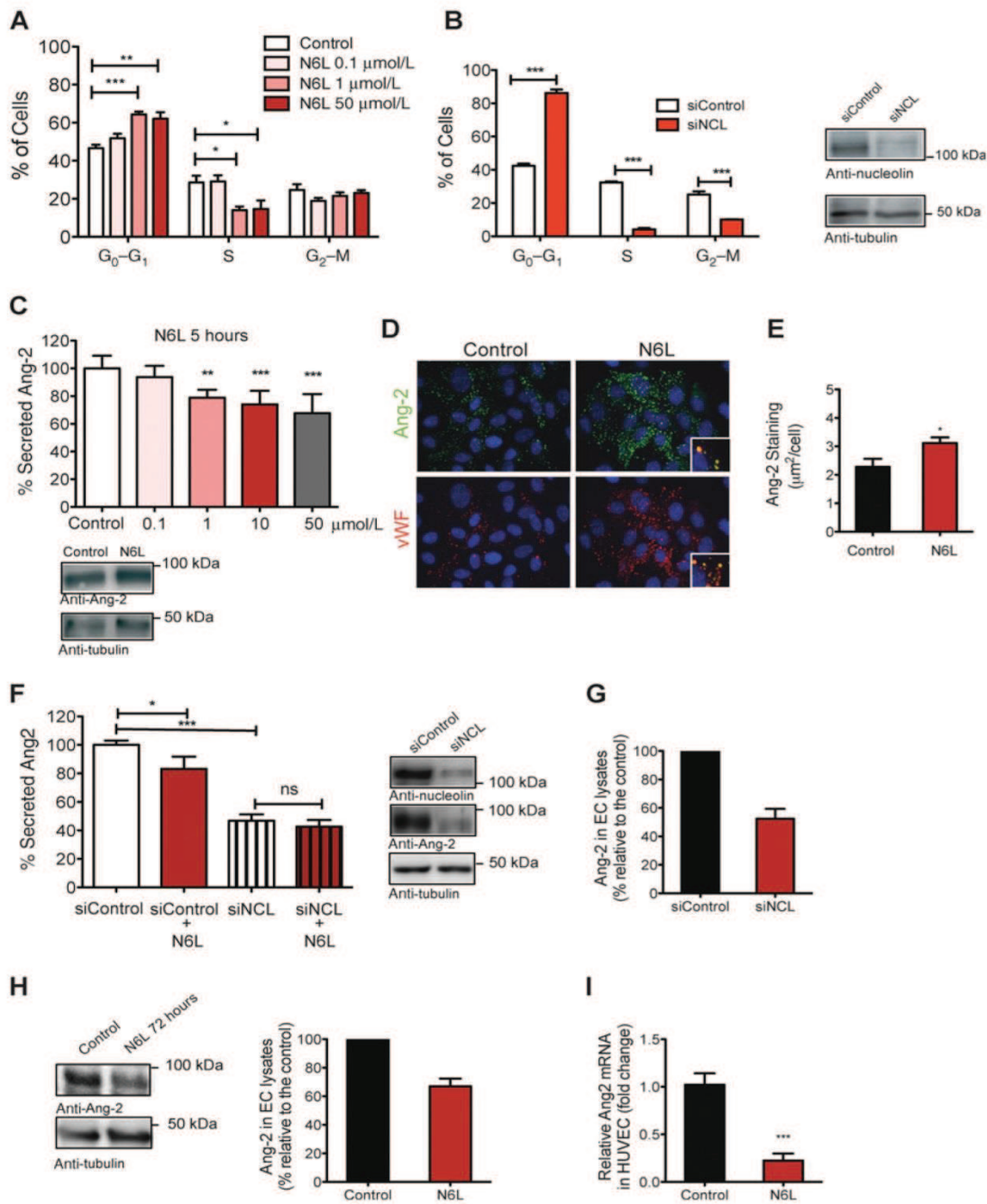
Gilles et al.



**Figure 4.**

N6L normalizes RIP-Tag2 tumor blood vessels and blocks tumor growth. **A**, Total tumor volume in 4-weeks treatment regression trial showed that the treatment with N6L reduced tumor burden by 40% compared with controls (Student *t* test, \*\*,  $P < 0.01$ ;  $n = 6$  mice). Tumor sections were immunostained by anti-active caspase 3 antibody (**B**) or coimmunostained by the anti-MECA32 and anti-NG2 for pericyte analysis (**C**); scale bars, 20  $\mu$ m. Quantification of apoptotic staining, tumor blood vessel density, tumor vessel branching, and pericyte coverage was performed as in Fig. 3 and is shown in **B**, **D**, **E**, **F**, respectively. (Student *t* test; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ;  $n = 5$  mice). **H**, Vessel perfusion was assessed as in Figure 3 ( $n = 4$  mice, Student *t*-test, \*\*,  $P < 0.01$ ). **G**, Images are representative of lectin-FITC signal.

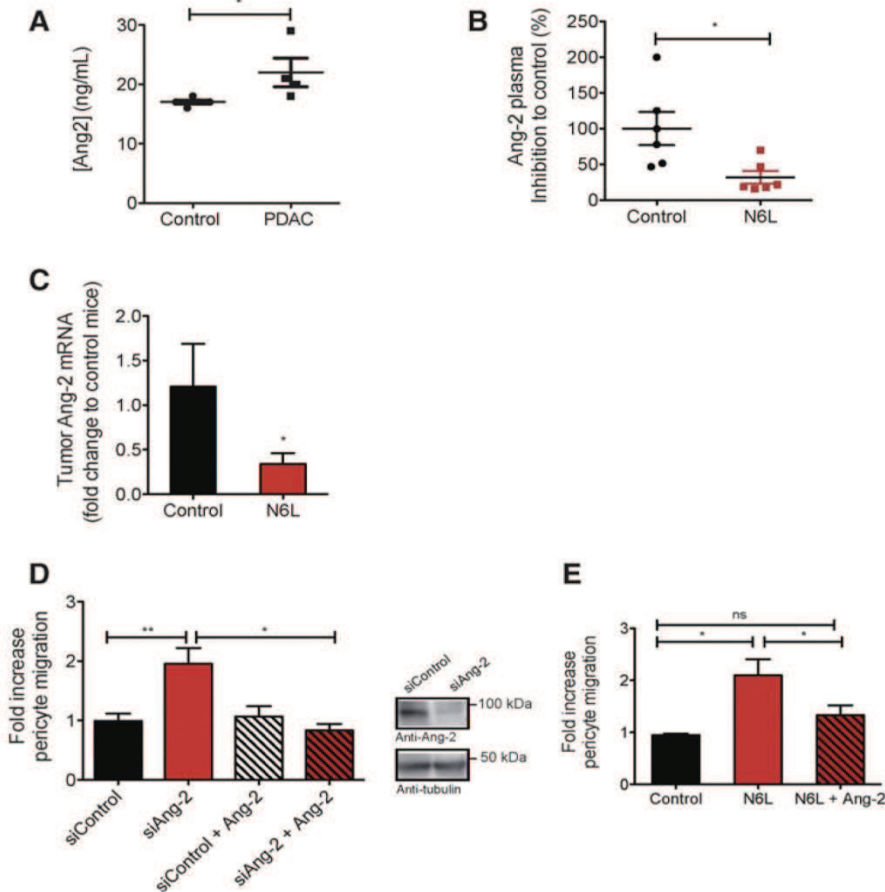




**Figure 5.**

Nucleolin inhibition blocks cell cycle in G<sub>1</sub>-S and decreases Ang-2 secretion. **A** and **B**, ECs were incubated with N6L for 24 hours or transfected with siControl or siNCL. Cell-cycle progression was analyzed by BrdUrd incorporation and the percentage of cells in each phase (G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>-M) is shown in the graph. **B**, Efficiency of siNCL is shown by immunoblotting analysis. **C** and **F**, Supernatants of ECs were treated with increasing concentrations of N6L for 5 hours or from siControl- or siNCL-transfected ECs were analyzed by ELISA. The concentration of Ang-2 was normalized to the whole protein amount of the corresponding cell lysates in the different treatment groups. **D**, N6L-treated ECs for 5 hours were fixed and coimmunostained with an anti-Ang-2 and anti-vWF antibodies. The Ang-2 area of staining per cell is plotted in **E**. Insets show colocalization between the two stainings. (Student *t* test, \*, *P* < 0.01; \*\*, *P* < 0.05; \*\*\*, *P* < 0.001; *n* = 3 independent experiments). **G** and **H**, ECs treated by N6L at 10 μmol/L or transfected by nucleolin siRNA were lysed and Western blotting of Ang-2 in EC lysates is shown. **I**, Ang-2 mRNA level of ECs treated by N6L were quantified by qPCR and normalized to the GAPDH mRNA level. Histograms represent the fold change relative to control cells (±SEM) of three independent experiments, calculated from the 2<sup>-ΔΔCt</sup> (Student *t* test, \*, *P* < 0.05).

Gilles et al.



**Figure 6.** Nucleolin inhibition decreases Ang-2 secretion by ECs and plasma Ang-2. **A** and **B**, FVB/n mice were injected with PDAC cells (PDAC) or saline solution (Control) into the pancreas, blood samples were collected after 3 weeks (**A**), or PDAC mice were treated or not with N6L for 3 weeks as in Fig. 3 (**B**). Plasma Ang-2 was quantified by ELISA (Student *t* test, \*, *P* < 0.05, *n* = 6 mice). **C**, Ang-2 mRNA level of PDAC tissues was quantified by qPCR and normalized to the MECA32 mRNA level ( $Ct_{Ang-2} - Ct_{MECA32}$ ; *n* = 5 mice; Student *t* test, \*, *P* < 0.05). Histograms represent the fold change relative to Control mice, calculated from the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . **D** and **E**, HBVPs were allowed to migrate in the presence of supernatants of siControl- or siAng2-transfected or N6L-treated ECs. Recombinant Ang-2 at 400 ng/mL was added as indicated. The graph shows the fold increase of pericyte migration relative to control cells (Student *t* test, \*, *P* < 0.05; \*\*, *P* < 0.01, *n* = 3 experiments). On the right, immunoblotting analysis of Ang-2 in siControl or siAng-2-transfected ECs, Ang-2 depletion was of 90% by siRNA transfection. ns, nonsignificant.

and the amount of drug present into the tumor tissues was quantified. In line with the normalized vessel phenotype, N6L treatment increased by 3.5 fold the efficacy of the doxorubicin delivery to the tumors of mPDAC, compared with controls (Fig. 7A). The resistance of PDAC tumors to chemotherapies, and consequently the extremely bad prognosis for PDAC patients is at least partly due to the extremely poor perfusion of blood vessels and drug delivery (38, 39). Increasing drug delivery represents a key strategy to treat PDAC patients. To evaluate whether the effect observed in mouse tumors was also observed in human cancers, both human BxPC-3-derived orthotopic (Fig. 7B) and subcutaneous (Supplementary Fig. S5H) xenograft tumors were treated with N6L and doxorubicin was injected and quantified at the end of the treatment. N6L-treatment significantly increased the delivery of the drug into the tumor similarly to the mPDAC (Fig. 7B; Supplementary Fig. S5H). The time course of N6L treatment necessary to increase doxorubicin delivery induced by N6L was evaluated by a treatment of 1 or 2 weeks in subcutaneous BxPC-3 (Supplementary Fig. S5H). The improvement of the doxorubicin delivery by N6L was clearly improved by kinetics between the first and the second week of treatment (Supplementary Fig. S5H). Stemming from these data, we sought to investigate whether the pretreatment of N6L was able to enhance the antitumor effect of gemcitabine, the standard of care for PDAC human patients. Our

preliminary data in mPDAC showed that the dose of 2 mg/kg N6L impaired tumor growth with less efficacy compared with the dose of 10 mg/kg, but was still able to induce pericyte coverage of tumor vessels (Fig. 7C; Supplementary Fig. S4A). This suboptimal antitumor dose was therefore used to test the effects of the combination of N6L and gemcitabine in mPDAC model. Gemcitabine and N6L used as single agents had a similar effect in reducing tumor growth. Remarkably, the pretreatment of mPDAC with N6L and the subsequent treatment with the combination of N6L with gemcitabine showed a greater effect in decreasing tumor volume in mPDAC, by 75% compared with the single treatments and by 82% compared with the control (Fig. 7C).

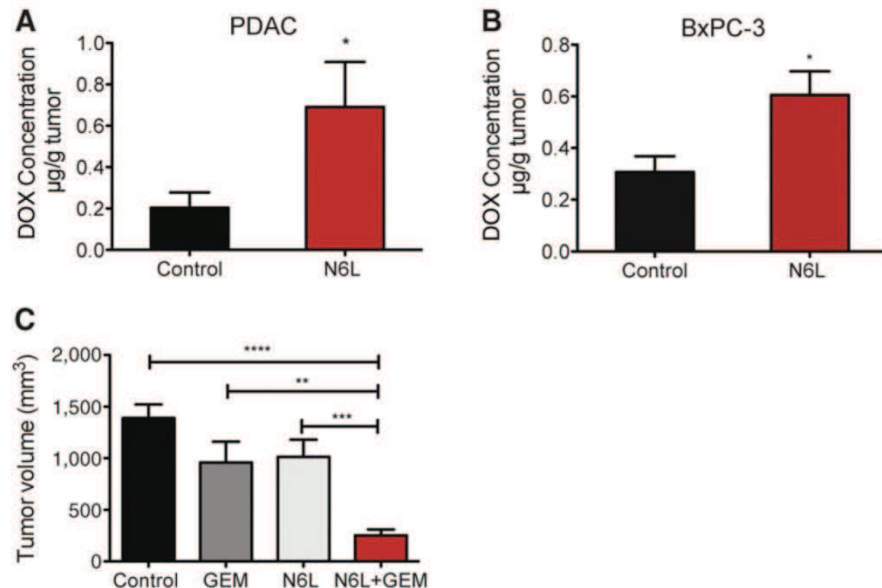
## Discussion

Nucleolin inhibition is known to reduce tumor growth, and different strategies of nucleolin-targeted therapy are in development for clinical application in renal cell cancer and breast cancer (10, 11). In this study, we described for the first time nucleolin-targeted therapy in pancreatic cancer. We used a highly aggressive and invasive orthotopic mouse PDAC model and RIP-Tag2 transgenic mouse model and demonstrated the antitumoral and antimetastatic potential of the N6L pseudopeptide on pancreatic



**Figure 7.**

Nucleolin inhibition improves drug delivery to the tumor. Doxorubicin delivery was evaluated after 3 weeks of treatment of PDAC-carrying animals with N6L (A) or 2 weeks of treatment of BxPC-3 orthotopic tumors (B). Amount of doxorubicin (DOX) present in tumors was expressed as  $\mu\text{g}$  equivalent/g tumor. N6L enhanced doxorubicin delivery to PDAC 3.5-fold and 1.9-fold to BxPC-3. (Student *t* test, \*,  $P < 0.05$ ;  $n = 6$  mice). C, Immunocompetent syngenic FVB/n mice were injected with PDAC cells into the pancreas and treated with control and N6L, alone or in combination with gemcitabine (GEM). Mice were sacrificed and tumor volumes were measured (Student *t* test, \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $P < 0.0001$ ; control,  $n = 5$ ; N6L,  $n = 4$ ; gemcitabine,  $n = 7$ ; N6L+GEM,  $n = 7$ ).



cancer. Besides the effect of nucleolin on tumor cell proliferation, N6L targets also the tumor microenvironment reducing blood vessel area and promoting tumor vessel normalization that, in turn, impairs hypoxia and improves drug delivery.

PDAC is one of the most lethal cancers. The analysis of PDAC from human patients reveals that 74.5% of patients have a higher nucleolin level when compared with nontumoral tissues. Importantly low level of nucleolin in PDAC correlates with increased survival of patients and may be a good prognostic factor. N6L exerts a potent antitumor and antimetastatic effect in mPDAC, by inhibiting tumor proliferation and invasion, and inducing tumor apoptosis as previously described in breast and prostate xenograft tumors (9, 40). Because the complete knock down of nucleolin in cells and adult animals was not viable, the side effects of nucleolin inhibition induced by a target therapy have to be carefully verified. The dose of N6L used in the treatment *in vivo* was obtained from the results of the clinical trial phase I. The safety and tolerability of N6L tested in a range of 1 to 40 mg/kg in patients with different tumor types is described at <http://www.immupharma.org/cancer-treatment>. Nucleolin expression is regulated by cell proliferation (10) and the antiproliferative activity of N6L was accompanied by a decrease of 50% of nucleolin expression in PDAC tumors.

Together, these findings, along with the OS observed in patients with low nucleolin level, suggest that the downmodulation of nucleolin levels in human patients by N6L treatment could contribute to the improvement of the survival in patients with pancreatic cancer.

Importantly, in PDAC, N6L induced tumor vessel normalization improving vessel perfusion and drug delivery. In addition, N6L efficiently affected tumor growth and tumor vasculature in RIP-Tag2, a mouse model highly vascularized in which antiangiogenic therapies and vessel normalization has been demonstrated to be an efficient strategy to inhibit tumor growth (20). The strong effect of N6L on vessel normalization also in this model that displays a different angiogenic pattern compared with PDAC, further corroborates the selective effect of nucleolin inhibition on

tumor stroma in pancreatic cancer. To further understand the importance of nucleolin inhibition in the tumor vessel compartment, cancer vascularization was studied in a model of orthotopic PDAC developed in *NCL*<sup>+/+</sup> or *NCL*<sup>+/-</sup> background. This approach allowed us to clearly show that the single allele deletion of the stromal nucleolin is sufficient to impact the tumor vascularization, and that the tumor vessel normalization induced by nucleolin inhibition is not a secondary effect due to a reduced tumoral cell proliferation.

Nucleolin is a marker of angiogenic vessels (7) and our data support an autocrine effect of the nucleolin inhibition on ECs. During angiogenesis, EC activation induces loss-of-quiescence of ECs (33) and the secretion of proangiogenic molecules (33). Nucleolin inhibition by N6L starts a program of EC loss-of-activation through the induction of EC quiescence and promotion of an antiangiogenic balance. Indeed, on the basis of our proteome assay, N6L decreased the level of secreted proangiogenic molecules (Ang-2, FGF-2, VEGF-C and IL1 $\beta$ ; refs. 41–43) while enhanced antiangiogenic molecules (thrombospondin 1, pentraxin 3, and platelet factor 4; refs. 44–46). Between the molecules regulated by N6L, Ang-2, and PDGF $\beta$  regulate pericyte recruitment (34). Remarkably, Ang-2 plasma levels were significantly reduced after N6L treatment together with its expression in the tumors, whereas plasma PDGF $\beta$  and VEGFA mRNA levels did not change. In addition, we demonstrated that nucleolin is involved in maintaining an active basal secretion of Ang-2 regulated by Weibel and Palade body exocytosis in activated ECs *in vitro*. While short-term nucleolin inhibition decreases Ang-2 secretion by ECs, longer nucleolin inhibition decreased the expression of Ang-2. This last effect is probably associated to the induction of EC quiescence, because Ang-2 is only expressed *in vivo* in remodeling and activated vessels (28). It is known that the angiopoietins/TIE2 system regulates vascular development and maturation (41). Ang-1 activates TIE2 receptor and promotes vessel stabilization, while Ang-2, produced by activated ECs, promotes angiogenesis by inducing blood vessel destabilization and sprouting (41). Ang-2 blockade induces tumor



Gilles et al.

vessel stabilization, decreases angiogenesis and slows the growth of several tumor models (28–32). On the basis of these observations, we can argue that the observed pro-normalizing effect of N6L on tumor vasculature could be in part mediated by the inhibition of Ang-2 during the treatments. Notably, we observed that the depletion of Ang-2 and the inhibition of secretion by N6L in ECs are sufficient to promote pericyte migration. Because recombinant Ang-2 is able alone to rescue these effects, we could argue that the regulation of Ang-2 expression and secretion by ECs is crucial for pericyte recruitment. These findings suggest that the arrest of the EC cell cycle, along with the reduction of Ang-2 level *in vivo*, could contribute to the anti-angiogenic and pro-normalizing effect of nucleolin inhibition observed in mPDAC and RIP-Tag2 mice.

Single-agent gemcitabine is the standard-of-care treatment for PDAC patients, but the addition of targeted therapies to chemotherapy failed to show any improvement (47). One possible novel strategy to improve the current therapy in PDAC is to enhance drug delivery by targeting tumor microenvironment (39, 48, 49). However, decrease of PDAC solid stress by Shh deletion or Smoothed inhibition, increased vascular density, which in turn accelerated tumor growth and promoted metastasis (48). Interestingly, whereas the antiangiogenesis therapies fail to improve PDAC survival, VEGFR inhibition was capable to counteract tumor angiogenesis induced by reduction of stroma stiffness (48). There is a growing body of evidences highlighting, both in preclinical and clinical settings, the importance of tumor vessel normalization, described by Jain and colleagues (23, 50). It has been demonstrated that the strong reduction of tumor hypoxia and the enhancement of vessel perfusion, accompanied by improved drug delivery, is a great advantage of using a pronormalizing agent in anticancer therapies in the clinic (23). Remarkably, N6L treatment increased tumor vessel perfusion, strongly reduced tumor hypoxia and enhanced chemotherapeutic drug delivery *in vivo*. Consistently with the observed improved vessel perfusion and drug delivery to the tumor, pretreatment of tumors with N6L strongly enhanced the effect of gemcitabine on tumor growth in mPDAC. Further experiments will be needed to better assess the combinatorial effects of N6L and chemotherapeutic treatments on metastasis.

In conclusion, this work highlights a new therapeutic strategy that selectively targets nucleolin by dually targeting both cancer cells and tumor vessels in pancreatic cancer. We uncovered, for the first time, the inhibition of Ang-2 as a pro-normalizing mecha-

nism of nucleolin-inhibition and important biomarker of N6L treatment. N6L treatment represents a new and more efficient antitumor and antiangiogenic therapy for PDAC and insulinoma and could represent a promising drug to design combination therapies with established anticancer drugs or stroma-targeting molecules.

### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

### Authors' Contributions

**Conception and design:** F. Maione, D. Destouches, J. Courty, E. Giraudo, I. Cascone

**Development of methodology:** F. Maione, M. Cossutta, G. Carpentier, C. Prochasson, S. Lamba, P. Bouvet, I. Cascone

**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** M.-E. Gilles, F. Maione, M. Cossutta, S.D. Maria, C. Houpe, K. Shchors, F. Mongelard, P. Bouvet, A. Couvelard, E. Giraudo, I. Cascone

**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** M.-E. Gilles, F. Maione, M. Cossutta, G. Carpentier, S.D. Maria, A. Bardelli, A. Couvelard, J. Courty, E. Giraudo, I. Cascone

**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** M.-E. Gilles, F. Maione, M. Cossutta, G. Carpentier, D. Destouches, K. Shchors, P. Bouvet, A. Couvelard, J. Courty, E. Giraudo, I. Cascone

**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** M.-E. Gilles, L. Caruana, C. Houpe, F. Mongelard, S. Lamba, A. Couvelard, I. Cascone

**Study supervision:** E. Giraudo, I. Cascone

### Grant Support

This work was supported by grants from the French charitable organization "Ligue Nationale contre le Cancer," the "ANR-14-LE16-OO23-NORMATHER" and Immupharma (I. Cascone, J. Courty). Associazione Italiana per la Ricerca sul Cancro (AIRC) investigator grants IG (# 15645; E. Giraudo); MIUR 2010 VASCHETTO – 5 × 1000 2010 (FPRC-ONLUS; E. Giraudo). Swiss National Science Foundation (SNSF), Sinergia Grant (# CRSI3 160742/1; E. Giraudo). Supported by European Community H2020 Program grant agreement no. 635342-2 MoTriColor (A. Bardelli); AIRC IG n. 16788 (A. Bardelli); Fondazione Piemontese per la Ricerca sul Cancro-ONLUS 5 per mille 2011 Ministero della Salute (A. Bardelli).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received February 2, 2016; revised October 5, 2016; accepted October 12, 2016; published OnlineFirst October 17, 2016.

### References

- Matsuoka T, Yashiro M. Molecular targets for the treatment of pancreatic cancer: clinical and experimental studies. *World J Gastroenterol* 2016; 22:776–89.
- Garrido-Laguna I, Hidalgo M. Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2015; 12:319–34.
- Jayson GC, Kerbel R, Ellis LM, Harris AL. Antiangiogenic therapy in oncology: current status and future directions. *Lancet* 2016; 388:518–29.
- Berger CM, Gaume X, Bouvet P. The roles of nucleolin subcellular localization in cancer. *Biochimie* 2015; 113:78–85.
- Destouches D, El Khoury D, Hamma-Kourbali Y, Krust B, Albanese P, Katsoris P, et al. Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin. *PLoS ONE* 2008; 3:e2518.
- Hovanessian AG, Soundaramourty C, El Khoury D, Nondier I, Svab J, Krust B. Surface expressed nucleolin is constantly induced in tumor cells to mediate calcium-dependent ligand internalization. *PLoS ONE* 2011; 5:e15787.
- Christian S, Pilch J, Akerman ME, Porkka K, Laakkonen P, Ruoslahti E. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol* 2003; 163:871–8.
- Otake Y, Soundararajan S, Sengupta TK, Kio EA, Smith JC, Pineda-Roman M, et al. Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood* 2007; 109:3069–75.
- Destouches D, Page N, Hamma-Kourbali Y, Machi V, Chaloin O, Frechault S, et al. A simple approach to cancer therapy afforded by multivalent pseudopeptides that target cell-surface nucleoproteins. *Cancer Res* 2011; 71:3296–305.
- Bates PJ, Laber DA, Miller DM, Thomas SD, Trent JO. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol* 2009; 86:151–64.



11. Pichiorri F, Palmieri D, De Luca L, Consiglio J, You J, Rocci A, et al. *In vivo* NCL targeting affects breast cancer aggressiveness through miRNA regulation. *J Exp Med* 2013;210:951–68.
12. Fogal V, Sugahara KN, Ruoslahti E, Christian S. Cell surface nucleolin antagonist causes endothelial cell apoptosis and normalization of tumor vasculature. *Angiogenesis* 2009;12:91–100.
13. Birmpas C, Briand JP, Courty J, Katsoris P. Nucleolin mediates the anti-angiogenesis effect of the pseudopeptide N6L. *BMC Cell Biol* 2012;13:32.
14. Itakura J, Ishiwata T, Shen B, Kornmann M, Korc M. Concomitant over-expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2000;85:27–34.
15. Schulz P, Fischer C, Detjen KM, Rieke S, Hilfenhaus G, von Marschall Z, et al. Angiopoietin-2 drives lymphatic metastasis of pancreatic cancer. *FASEB J* 2011;25:3325–35.
16. Feig C, Gopinathan A, Neesse A, Chan DS, Cook N, Tuveson DA. The pancreas cancer microenvironment. *Clin Cancer Res* 2012;18:4266–76.
17. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646–74.
18. Stylianopoulos T, Jain RK. Combining two strategies to improve perfusion and drug delivery in solid tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:18632–7.
19. Hanahan D. Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. *Nature* 1985;315:115–22.
20. Maione F, Capano S, Regano D, Zentilin L, Giacca M, Casanovas O, et al. Semaphorin 3A overcomes cancer hypoxia and metastatic dissemination induced by antiangiogenic treatment in mice. *J Clin Invest* 2012;122:1832–48.
21. Hruban RH, Adsay NV, Albores-Saavedra J, Anver MR, Biankin AV, Boivin GP, et al. Pathology of genetically engineered mouse models of pancreatic exocrine cancer: consensus report and recommendations. *Cancer Res* 2006;66:95–106.
22. Gore J, Craven KE, Wilson JL, Cote GA, Cheng M, Nguyen HV, et al. TCGA data and patient-derived orthotopic xenografts highlight pancreatic cancer-associated angiogenesis. *Oncotarget* 2015;6:7504–21.
23. Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell* 2014;26:605–22.
24. Maione F, Molla F, Meda C, Latini R, Zentilin L, Giacca M, et al. Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J Clin Invest* 2009;119:3356–72.
25. Jain RK, Martin JD, Stylianopoulos T. The role of mechanical forces in tumor growth and therapy. *Annu Rev Biomed Eng* 2014;16:321–46.
26. Beasley NJ, Wykoff CC, Watson PH, Leek R, Turley H, Gatter K, et al. Carbonic anhydrase IX, an endogenous hypoxia marker, expression in head and neck squamous cell carcinoma and its relationship to hypoxia, necrosis, and microvessel density. *Cancer Res* 2001;61:5262–7.
27. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, et al. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998;91:3527–61.
28. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, et al. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 1997;277:55–60.
29. Hammes HP, Lin J, Wagner P, Feng Y, Vom Hagen F, Krzizok T, et al. Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy. *Diabetes* 2004;53:1104–10.
30. Mazzieri R, Pucci F, Moi D, Zonari E, Ranghetti A, Berti A, et al. Targeting the ANG2/TIE2 axis inhibits tumor growth and metastasis by impairing angiogenesis and disabling rebounds of proangiogenic myeloid cells. *Cancer Cell* 2011;19:512–26.
31. Keskin D, Kim J, Cooke VG, Wu CC, Sugimoto H, Gu C, et al. Targeting vascular pericytes in hypoxic tumors increases lung metastasis via angiopoietin-2. *Cell Rep* 2015;10:1066–81.
32. Srivastava K, Hu J, Korn C, Savant S, Teichert M, Kapel SS, et al. Postsurgical adjuvant tumor therapy by combining anti-angiopoietin-2 and metronomic chemotherapy limits metastatic growth. *Cancer Cell* 2014;26:880–95.
33. Fiedler U, Augustin HG. Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* 2006;27:552–8.
34. Abramsson A, Lindblom P, Betsholtz C. Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J Clin Invest* 2003;112:1142–51.
35. Audero E, Cascone I, Zanon I, Previtali SC, Piva R, Schiffer D, et al. Expression of angiopoietin-1 in human glioblastomas regulates tumor-induced angiogenesis: *in vivo* and *in vitro* studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:536–41.
36. Sfiligoi C, de Luca A, Cascone I, Sorbello V, Fuso L, Ponzone R, et al. Angiopoietin-2 expression in breast cancer correlates with lymph node invasion and short survival. *Int J Cancer* 2003;103:466–74.
37. Cai J, Kehoe O, Smith GM, Hykin P, Boulton ME. The angiopoietin/Tie-2 system regulates pericyte survival and recruitment in diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008;49:2163–71.
38. Koay EJ, Truty MJ, Cristini V, Thomas RM, Chen R, Chatterjee D, et al. Transport properties of pancreatic cancer describe gemcitabine delivery and response. *J Clin Invest* 2014;124:1525–36.
39. Olive KP, Jacobetz MA, Davidson CJ, Gopinathan A, McIntyre D, Honess D, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* 2009;324:1457–61.
40. Destouches D, Sader M, Terry S, Marchand C, Maille P, Soyeux P, et al. Implication of NPM1 phosphorylation and preclinical evaluation of the nucleolin antagonist N6L in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016 Mar 14. [Epub ahead of print].
41. Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10:165–77.
42. Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, Hanahan D. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell* 2005;8:299–309.
43. Shchors K, Shchors E, Rostker F, Lawlor ER, Brown-Swigart L, Evan GI. The Myc-dependent angiogenic switch in tumors is mediated by interleukin 1beta. *Genes Dev* 2006;20:2527–38.
44. Dawson DW, Pearce SF, Zhong R, Silverstein RL, Frazier WA, Bouck NP. CD36 mediates the *In vitro* inhibitory effects of thrombospondin-1 on endothelial cells. *J Cell Biol* 1997;138:707–17.
45. Alessi P, Leali D, Camozzi M, Cantelmo A, Albini A, Presta M. Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist. *Eur Cytokine Netw* 2009;20:225–34.
46. Perollet C, Han ZC, Savona C, Caen JP, Bikfalvi A. Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization. *Blood* 1998;91:3289–99.
47. Garrido-Laguna I, Hidalgo M. Pancreatic cancer: from state-of-the-art treatments to promising novel therapies. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;8:319–34.
48. Rhim AD, Oberstein PE, Thomas DH, Mirek ET, Palermo CF, Sastra SA, et al. Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Cell* 2014;25:735–47.
49. Jacobetz MA, Chan DS, Neesse A, Bapiro TE, Cook N, Frese KK, et al. Hyaluronan impairs vascular function and drug delivery in a mouse model of pancreatic cancer. *Gut* 2012;62:112–20.
50. Serini G, Bussolino F, Maione F, Giraudo E. Class 3 semaphorins: physiological vascular normalizing agents for anti-cancer therapy. *J Intern Med* 2013;273:138–55.



# Cancer Research

The Journal of Cancer Research (1916–1930) | The American Journal of Cancer (1931–1940)

## Nucleolin Targeting Impairs the Progression of Pancreatic Cancer and Promotes the Normalization of Tumor Vasculature

Maud-Emmanuelle Gilles, Federica Maione, Mélissande Cossutta, et al.

*Cancer Res* 2016;76:7181-7193. Published OnlineFirst October 17, 2016.

**Updated version** Access the most recent version of this article at:  
doi:[10.1158/0008-5472.CAN-16-0300](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0300)

**Supplementary Material** Access the most recent supplemental material at:  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/suppl/2016/10/14/0008-5472.CAN-16-0300.DC1>

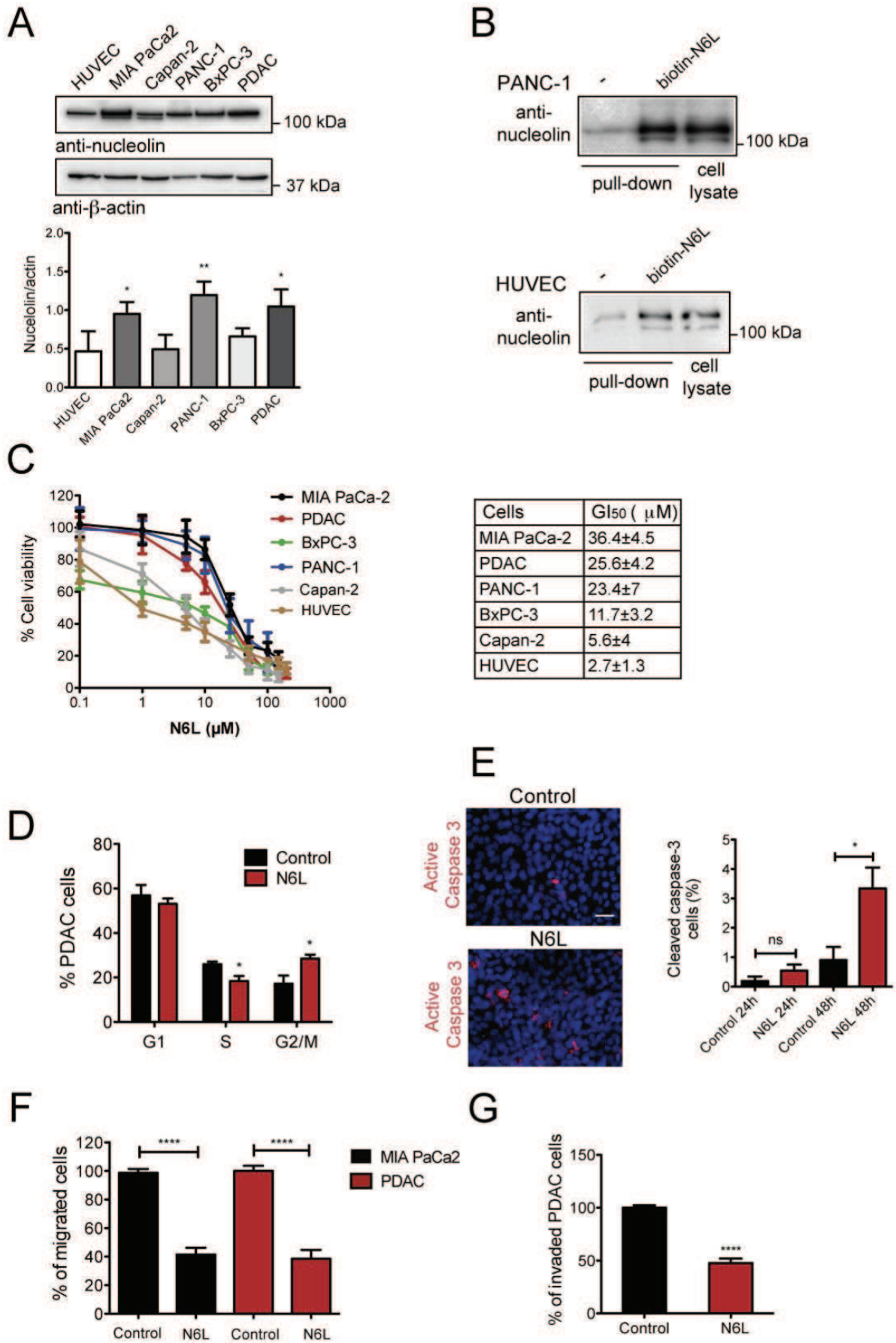
**Cited articles** This article cites 48 articles, 18 of which you can access for free at:  
<http://cancerres.aacrjournals.org/content/76/24/7181.full.html#ref-list-1>

**E-mail alerts** [Sign up to receive free email-alerts](#) related to this article or journal.

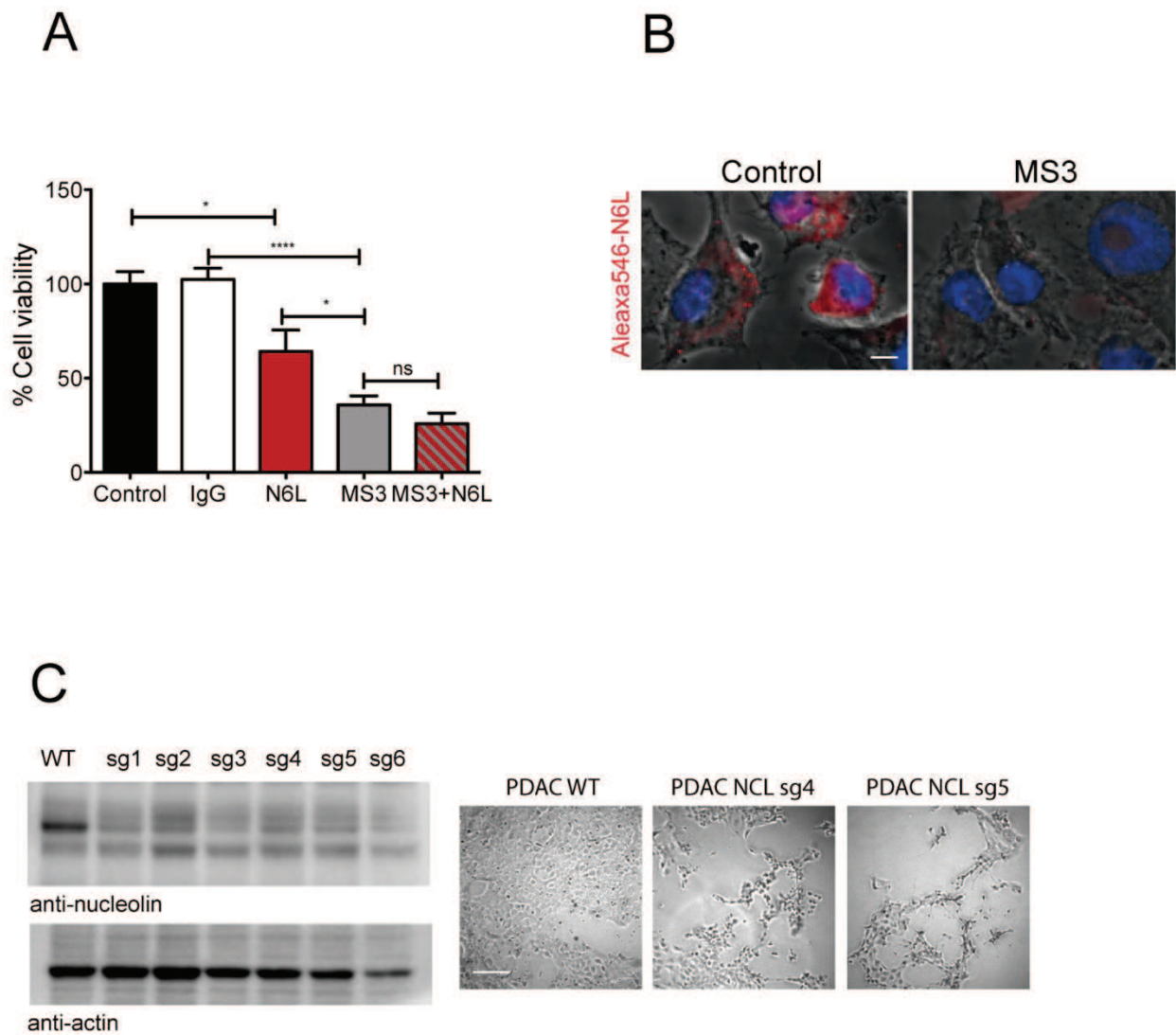
**Reprints and Subscriptions** To order reprints of this article or to subscribe to the journal, contact the AACR Publications Department at [pubs@aacr.org](mailto:pubs@aacr.org).

**Permissions** To request permission to re-use all or part of this article, contact the AACR Publications Department at [permissions@aacr.org](mailto:permissions@aacr.org).

## 5. Figures supplémentaires de l'Article 1

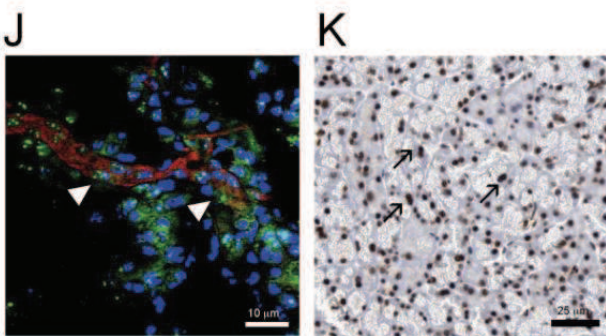
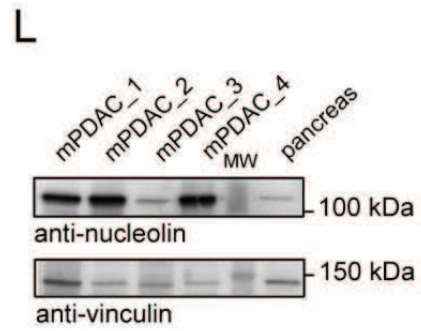
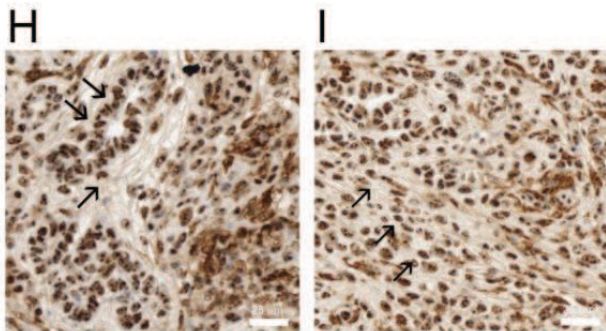
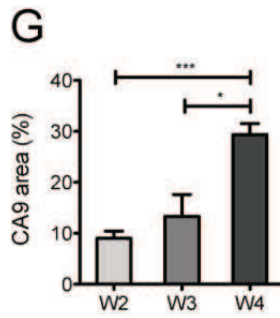
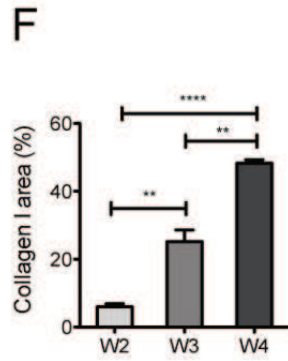
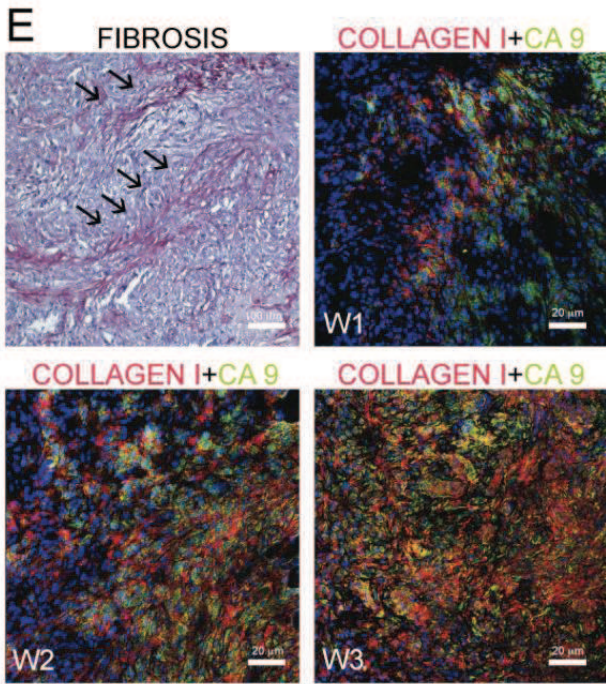
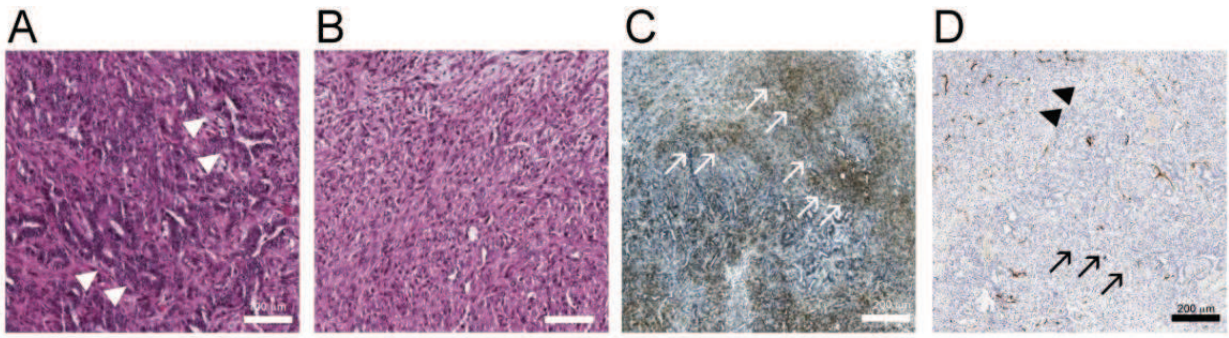


**Supplementary Figure 1: N6L inhibits PDAC proliferation and migration.** **(A)** Nucleolin protein levels of human pancreatic cells (BxPC-3, Capan-2, PANC-1, MIA PaCa-2), mPDAC and HUVEC were analyzed by Western Blotting of indicated human and murine cell lines.  $\beta$ -actin was used as a loading control. The graph shows the mean of the ratio of nucleolin/actin from the lysates of 3 independent cell culture experiments (Student *t*-test, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ). **(B)** PANC-1 or HUVEC were incubated with biotin-N6L. Interacting proteins were pull-downed by using avidin-beads and subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis using anti-nucleolin antibody. Control was avidin-beads without cell lysate (-). **(C)** The indicated cell lines were treated by N6L at increasing concentrations. After 72 hours cell growth was quantified by Blue Alamar assay. Curves represents % of cell growth relative to the values of control cells and are mean values  $\pm$  SD of results from 3 independent experiments.  $GI_{50}$  was calculated for each experiment and the value  $\pm$  SD are shown in the table. **(D)** PDAC cell were incubated with N6L for 24 hours and cell cycle progression was analyzed by BrdU incorporation, the % cells in each phase (G1, S, G2/K) is shown in the graph (Student *t*-test, \* $P < 0.05$ ,  $n=3$ ). **(E)** PDAC cells treated by N6L for 24 or 48 hours were fixed and stained with an anti-active caspase 3 antibody and the graph show the intensity of the staining normalized to the nuclei staining. Confocal quantitative analysis was performed on 5 fields of each slides from at least  $n=3$  independent experiments (Student *t*-test, \*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n=3$ ). **(F)** MIA PaCa-2 or PDAC cell migration was performed in transwell chambers. N6L inhibited cell migration at 50  $\mu$ M by 69% and by 72% respectively. The graph shows the % of migrated cells and values are mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments (Student *t*-test, \*\*\*\* $P < 0.0001$ ). **(G)** mPDAC cell invasion was performed in transwell chambers. The graph shows the % of invaded cells and values are mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments (Student *t*-test, \*\*\*\* $P < 0.0001$ ,  $n=3$ ).



**Supplementary Figure 2: NCL blocking antibody and *Ncl* deletion affect PDAC cell proliferation.** **(A)** PDAC cells were treated with N6L at 30  $\mu$ M or an anti-nucleolin antibody (MS3) at 0.2  $\mu$ M or pre-treated by MS3 for 30 minutes before adding N6L. After 72 hours cell growth was quantified by Blue Alamar assay. Histograms represents % of cell growth relative to the values of control cells and values are mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments (Student *t*-test, \*\*\*\* $P < 0.0001$ , \* $P < 0.05$ ,  $n = 3$ ). **(B)** PDAC cells pre-treated or not by MS3 0.2  $\mu$ M for 30 minutes and incubated with Alexa546-N6L for 1 hour. Cells were fixed and observed at confocal microscope. **(C)** *Ncl* gene was knocked out by transfecting PDAC cells with lentiCRISPRv2 containing 6 different sgRNA targeting *Ncl*. Immunoblotting was used to verify nucleolin protein expression after 9 days of puromycine selection and the pictures show representative images of sg4 and sg5 RNA transfected cells.

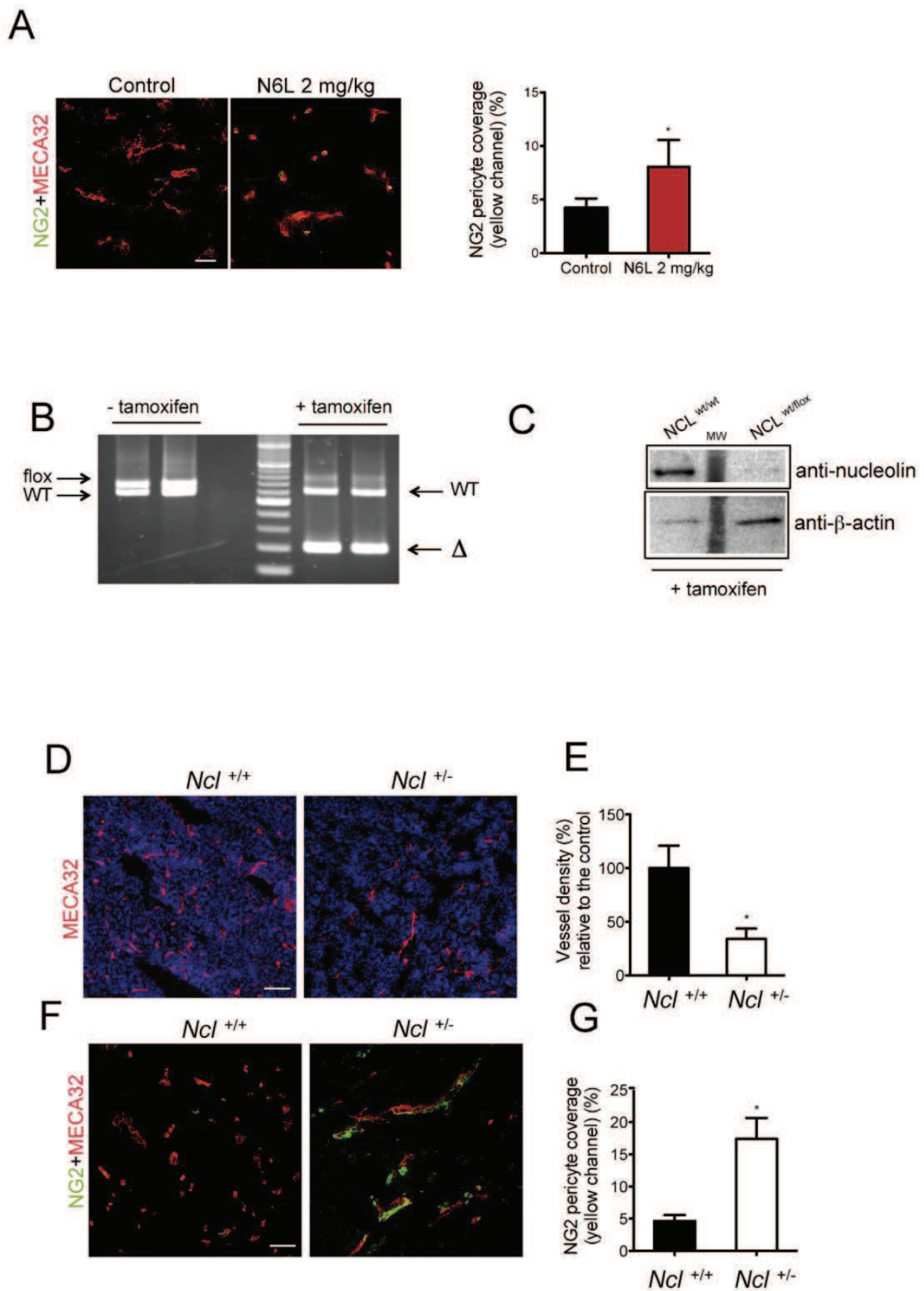






**Supplementary Figure 3: mPDAC orthotopic model characterization.**

Immunocompetent syngenic FVB/n mice were injected with mPDAC cells into the pancreas. The tumors developed with an average latency of 3-4 weeks, and mice were sacrificed at 4 weeks. Collected tumors were processed for hematoxylin phloxine saffron staining (**A, B**), or picrosirius hemalun (**E, arrows**) for fibrosis analysis. Tumors were immunostained by an anti-CD34 antibody (**D**), an anti-nucleolin antibody (**H, I**), an antibody recognizing the pimonidazole adducts (arrows) (**C**) to detect tumor hypoxia, or co-immunostained by an anti-nucleolin antibody and an anti-MECA32 antibody (**J**). Healthy pancreas was immunostained by an anti-nucleolin antibody (**K**). In (**E**) mPDAC bearing mice were sacrificed after 2 (W2), 3 (W3) or 4 (W4) weeks from the cell injection, and tumor slides were co-immunostained by an anti-collagen I and an anti-CA9 antibodies. The collagen I (**F**) or CA9 (**G**) were quantified and plotted as the % of the area occupied by the staining. Confocal quantitative analysis was performed on 5 fields of tissue sections from at least n=5 mice per stage (Student *t*-test, \*\*\*\*P<0.0001, \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05, n=3). (**L**) Nucleolin protein expression was analyzed by Western Blotting in protein extracts of mouse PDAC tumors (mPDAC) or healthy pancreas.

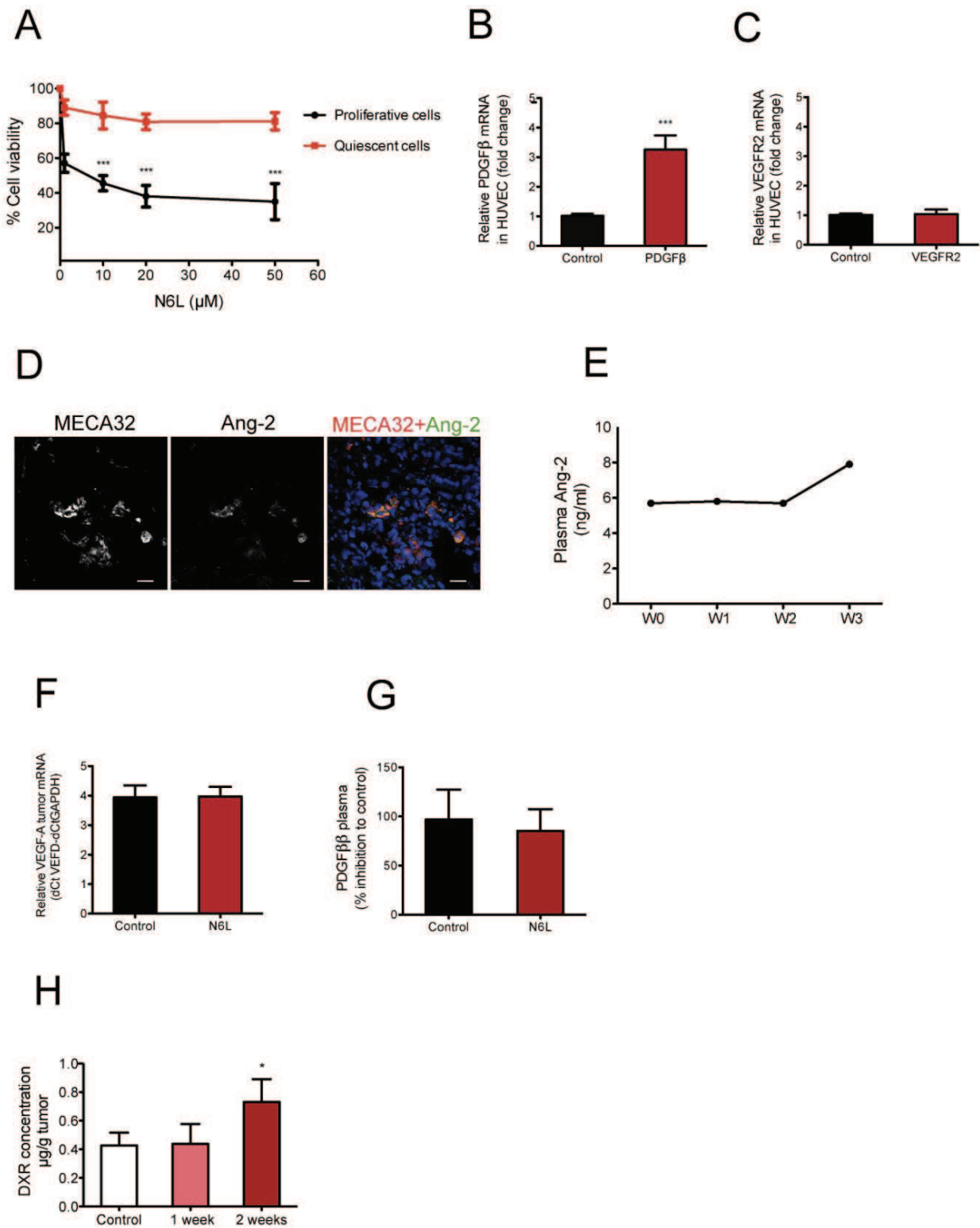


**Supplementary Figure 4: Stroma NCL inhibition increases pericyte coverage of tumor blood vessels. (A)** PDAC mice were treated or not with N6L 2 mg/kg for three weeks.

Tumor sections were immunostained by an anti-MECA32 and an anti-NG2 and the % of pericyte coverage was quantified and plotted as in Figure 2 (Student *t*-test \**P*<0.05; n=4).

**(B)** *Ncl*<sup>wt/flox</sup> C57/Bl6 mice were injected with tamoxifen to induce the deletion of one *Ncl* allele (*Ncl*<sup>-/+</sup>). Five days after the first day of injection, DNA was extracted from the liver of 2 mice of each group and genotyped with the Lf and Er oligonucleotides (see Supplementary Methods). Picture shows the wt and floxed allele in the untreated *Ncl*<sup>wt/flox</sup> mice (left panel). In the tamoxifen treated mice the floxed allele disappeared and the 402 bp fragment corresponding to the deleted allele is detected showing the efficient deletion (right panel).

**(C)** *Ncl*<sup>wt/wt</sup> or *Ncl*<sup>wt/flox</sup> mice were all treated by tamoxifen to generate *Ncl*<sup>+/+</sup> or *Ncl*<sup>-/+</sup> mice and injected with Panc-02 cells into the pancreas. After 3 weeks mice were sacrificed and nucleolin protein level was compared between the *Ncl*<sup>+/+</sup> or *Ncl*<sup>-/+</sup> mice from liver protein extracts. Tumor sections were immunostained by an anti-MECA32 antibody **(D)** or co-immunostained by the anti-MECA32 and anti-NG2 antibodies **(F)**. Scale bars: 100 μm in **(D)** and 20 μm in **(F)**. In **(E)** the % of the vessel density and in **(G)** the % of the NG2+ pericyte coverage were quantified as in Figure 2 and are shown (Student *t*-test \**P*<0.05; n=4 mice).



**Supplementary Figure 5: N6L and angiogenic molecule regulation.** (A) Proliferating (black curve) or quiescent ECs (red curve) were cultured for 3 days in the presence of increasing concentrations of N6L. Curves represent % of cell growth relative to the values of control cells. In (B) and (C) PDGFβ or VEGFR2 mRNA level of ECs treated by N6L were quantified by qPCR and normalized to the GAPDH mRNA level, histograms represent the

fold change relative to control cells ( $\pm$ SEM) of 3 independent experiments, calculated with the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (Student *t*-test, \*\*\* $P < 0.001$ ). **(D)** PDAC frozen tissue sections were co-immunostained with an anti-Ang-2 (green) and the anti-MECA32 (red) antibodies. Scale bars: 10  $\mu$ m. **(E)** FVB/n mice were injected with PDAC cells into the pancreas (W0) and blood samples were collected by the tail vein weekly until W3. A pool of  $n=4$  mice blood samples was analyzed at every time point. Ang-2 levels were quantified by ELISA assay in the plasma from each pool. **(F)** VEGF mRNA level of PDAC tissues were quantified by qPCR and normalized to the GAPDH mRNA level (CtAng-2-CtMECA32). Bars correspond to the mean  $\Delta Ct \pm$ SEM. of  $n=5$  mice. **(G)** PDGF $\beta$  protein levels were quantified from plasma of mPDAC mice treated or not by N6L as in Figure 6B. **(H)** Doxorubicin delivery was evaluated after 1 or 2 weeks of N6L treatment of BxPC-3 tumor bearing mice. Values are mean  $\pm$ SEM of  $n=6$  mice (Student *t*-test, \* $P < 0.05$ ) (see Methods).



**A**

Decreased Proteins	Protein functions	% fold change
Angiopoietin-2	Positive regulation of angiogenesis TIE2 receptor binding, pericyte loss	70
VEGF-C	Positive regulation of angiogenesis Growth factor, VEGFR receptor binding	78
FGF2	Positive regulation of angiogenesis Growth factor, FGFR activation	80
IL-1 $\beta$	Positive regulation of angiogenesis Interleukin superfamily, interleukin1-receptor binding	80
PDGF-AA	Growth factor, platelet-derived receptor binding	66
Plasminogen	Proteolytic factor, tissue remodelling, fibrinolysis	80
Endostatin/Collagen XVIII	Negative regulation of angiogenesis	44
Thrombospondin-2	Negative regulation of angiogenesis, heparin binding	36
Increased Proteins	Protein functions	% fold change
Thrombospondin-1	Negative regulation of angiogenesis heparin binding	204
Pentraxin 3 (PTX3)	Negative regulation of angiogenesis inflammatory response	175
Platelet factor 4 (PF4)	Negative regulation of angiogenesis heparin binding, blood coagulation	130
PDGF-AB/PDGF-BB	Growth factor activity, platelet-derived receptor binding, proliferation and recruitment of mural cells	186
Serpin E1	Negative regulation of blood coagulation	146
uPA	Negative regulation of blood coagulation	141
TIMP-1	Metalloproteinase inhibitor	137

**B**

Protein	% fold change
Amphiregulin	unchanged
Artemin	unchanged
FGF-acidic	unchanged
IGFBP-2	unchanged
IGFBP-3	unchanged
IL8	unchanged
LAP TGF beta1	unchanged
MCP-1	unchanged
PD-ECGF	unchanged
Persephin	unchanged
PIGF	unchanged
Prolactin	unchanged
VEGF	unchanged

**C**

Protein	Value
Activin A	ND
ADAMTS-1	ND
Angiogenin	ND
Angiopoietin-1	ND
Coagulation factor III	ND
CXCL16	ND
DPPIV	ND
EGF	ND
EG-VEGF	ND
Endoglin	ND
FGF-4	ND
FGF-7	ND
GDNF	ND
GM-CSF	ND
HB-EGF	ND
HGF	ND
IGFBP-1	ND
Leptin	ND
MIP-1 $\alpha$	ND
MMP-8	ND
MMP-9	ND
NRG1- $\beta$ 1	ND
Serpin B5	ND
Serpin F1	ND
TIMP-4	ND
Vasohibin	ND

**Supplementary Table 1: Proteome array analysis of angiogenic molecules secreted by ECs. ECs were treated or not by N6L for 5 hours before the addition of starving EGM-2**

medium for 1 hour. Conditioned medium was then collected to perform the analysis of secreted molecules by using a proteome angiogenesis antibody array (R&D Systems). The signal corresponding to each molecule was quantified with Multi Gauge software and the ratio between untreated and treated cells was calculated. In **(A)** the table shows proteins that were increased or decreased in the supernatant of N6L-treated ECs compared with control. In **(B)** the table shows the proteins that did not show any difference and in **(C)** the proteins whose signal was undetectable (ND). In **(A)** in green are the proteins decreased and in red increased by N6L. By using the Gene Ontology (GO) Enrichment tool (<http://geneontology.org>) we reported that the group of decreased genes had a relevant number of proteins classified in the category of “positive regulation of angiogenesis” with a p-value  $p < 4.37 \times 10^{-04}$ . The group of increased genes had a relevant number of proteins classified in the category of “negative regulation of angiogenesis” with a p-value  $p < 8.38 \times 10^{-03}$ .

## B. Seconde partie

# Rôle de l'exocytose des Corps de Weibel et Palade au cours de l'angiogenèse physiologique

### 1. Introduction

Les Corps de Weibel et Palade (WPBs) sont des organites de stockage spécifiques des cellules endothéliales (Weibel et Palade, 1964) formés par la polymérisation du facteur von Willebrand (vWF) (Wagner *et al.*, 1982) et pouvant contenir de nombreuses autres protéines, notamment des facteurs pro-inflammatoires (P-sélectine, IL-8) et des facteurs pro-angiogéniques (Ang-2). L'Ang-2 est contenue dans les WPBs et est rapidement sécrétée par l'exocytose des WPBs en réponse à divers *stimuli* tels que la thrombine ou l'histamine (Fiedler *et al.*, 2004). Les WPBs sont exocytés par les cellules endothéliales activées lors d'une blessure de l'endothélium, lors d'une réaction immunitaire ou au cours de l'angiogenèse. L'exocytose des WPBs permet la sécrétion locale de facteurs adaptés au contexte biologique. Lors d'une rupture de l'endothélium, la libération du vWF permet l'agrégation plaquettaire (Lahav et Hynes, 1981 ; Chen et López, 2005) et l'initiation de la cascade de la coagulation pour arrêter le saignement et rétablir l'homéostasie vasculaire. Dans un contexte inflammatoire, l'exocytose des WPBs permet la sécrétion de cytokines nécessaires à la réponse immunitaire et l'expression de la P-sélectine, impliquée dans l'extravasation des leucocytes, à la surface des cellules endothéliales (Fiedler *et al.*, 2004 ; Babich *et al.*, 2008). Si le rôle de l'exocytose des WPBs est bien caractérisé au cours de l'homéostasie vasculaire et de l'inflammation, son rôle dans l'angiogenèse et dans la régulation du stockage et de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques comme l'Ang-2 est peu connu.

### 2. Contexte et objectif de l'étude

Dans l'Article 1, nous avons montré que l'inhibition de l'activation endothéliale *via* le ciblage de la nucléoline inhibe l'exocytose des WPBs, diminue la sécrétion de l'Ang-2 et favorise le recrutement des péricytes sur les vaisseaux tumoraux normalisés. A la suite de

ces observations, nous avons souhaité **étudier l'importance des WPBs au cours de l'angiogenèse et le lien entre l'exocytose des WPBs et le recrutement des péricytes sur les vaisseaux.**

Pour cela, nous avons mis en place au laboratoire le modèle murin d'angiogenèse physiologique de la rétine au cours du développement et le modèle murin pathologique de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR), en collaboration avec l'équipe « Inflammation dans la dégénérescence neuronale et le remodelage vasculaire » codirigée par Michel PAQUES à l'Institut de la Vision (Paris, France). Chez la souris, la vascularisation de la rétine se développe pendant les premiers jours suivant la naissance, des jours P1 à P12 (Stahl *et al.*, 2010). Le réseau vasculaire se développe du nerf optique vers la périphérie du tissu selon un gradient de VEGF lié à l'hypoxie de la rétine, la région proche du nerf optique vascularisée contenant peu de VEGF et la périphérie de la rétine hypovascularisée contenant de fortes concentrations de VEGF (Gerhardt *et al.*, 2003). Ce modèle présente les avantages de permettre l'observation des différentes étapes de l'angiogenèse et de préserver l'organisation spatio-temporelle des différents types cellulaires mis en jeu. Au 6<sup>e</sup> jour après la naissance (P6), le réseau vasculaire est schématiquement divisé en une région mature (plexus mature) proche du nerf optique dans laquelle les vaisseaux sont stables et une région immature (plexus immature) à la périphérie de la rétine au niveau de laquelle les vaisseaux sont activement remodelés et instables en raison de la forte concentration de VEGF. Enfin, nous avons commencé à étudier l'effet de l'absence des WPBs sur l'angiogenèse et sur le recrutement des péricytes en utilisant des souris KO vWF<sup>-/-</sup> amicalement fournies par Cécile DENIS de l'Unité « Hémostase, Inflammation et Thrombose » (Inserm U1176, Le Kremlin-Bicêtre).

### **3. Résumé des résultats**

Au cours de ce travail soumis dans le journal *eLife*, nous avons montré pour la première fois que tous les types de vaisseaux de la rétine adulte contiennent des WPBs qui sont observables par immunofluorescence du vWF dans les artères, les veines, les artérioles, les veinules et les capillaires. Les objets identifiés dans les vaisseaux ont la morphologie allongée et la longueur moyenne de 1,5  $\mu\text{m}$  des WPBs décrits dans la littérature. Après avoir utilisé le même protocole de marquage dans les rétines angiogéniques de souris P6, nous avons observé que la densité vasculaire des WPBs est plus

faible dans les vaisseaux situés dans la partie angiogénique des rétines, exposés à de fortes concentrations de VEGF, que dans les vaisseaux proches du nerf optique, exposés à de faibles quantités de VEGF. De la même façon, nous avons montré que le recouvrement des vaisseaux par des péricytes est plus faible dans la partie angiogénique des rétines P6 que dans la partie stable proche du nerf optique où les vaisseaux sont totalement recouverts, suggérant un lien entre le gradient de VEGF, la densité des WPBs et la densité des péricytes sur les vaisseaux. Effectivement, nous avons pu montrer que les densités des WPBs et des péricytes sont spatialement corrélées dans les différentes régions de la rétine P6. Ces résultats suggéraient que le gradient de VEGF régule la densité des WPBs dans les différentes parties de la rétine au cours de l'angiogenèse. Pour étudier le rôle du VEGF sur la régulation de la densité des WPBs au cours de l'angiogenèse, nous avons développé un programme permettant de détecter et de mesurer la taille des objets vWF+Ang-2<sup>-</sup> (WPBs sans Ang-2), vWF-Ang-2<sup>+</sup> (Ang-2 non contenue dans des WPBs) et double marqués vWF+Ang-2<sup>+</sup> (WPBs contenant de l'Ang-2) dans des cellules endothéliales humaines. Nous avons montré *in vitro* que le VEGF induit la sécrétion de l'Ang-2 par les cellules endothéliales *via* l'exocytose spécifique des WPBs qui contiennent de l'Ang-2. De façon cohérente, l'inhibition *in vitro* du VEGF avec un anticorps soluble anti-VEGF inhibe l'exocytose des WPBs et favorise la migration des péricytes *via* l'inhibition de la sécrétion de l'Ang-2. *In vivo*, nous avons montré que la perturbation du gradient de VEGF par l'injection intravitréale du même anticorps anti-VEGF augmente les densités des WPBs et des péricytes dans la partie angiogénique de la rétine P6 mais n'a aucun effet dans les vaisseaux proches du nerf optique. L'ensemble de ces résultats suggère que le VEGF régule la sécrétion de l'Ang-2 *via* l'exocytose des WPBs et que l'Ang-2 sécrétée régule à son tour le recrutement des péricytes sur les nouveaux vaisseaux.

#### **4. Article 2 : Les Corps de Weibel et Palade sont régulés par le VEGF et organisent le recrutement des péricytes pendant l'angiogenèse**

Ce travail est actuellement soumis dans le journal *eLife*.



# **Weibel-Palade Bodies are regulated by VEGF and orchestrate pericyte recruitment during angiogenesis**

Short title: VEGF controls WPB exocytosis and pericyte coverage

Mélanie Cossutta,<sup>1</sup> Marie Darche,<sup>1</sup> Gilles Carpentier,<sup>1</sup> Claire Houppé,<sup>1</sup> Delphine Villain,<sup>1</sup> Emilie Picard,<sup>4</sup> Caterina Casari,<sup>5</sup> Cécile Denis,<sup>5</sup> Michel Paques,<sup>2,3</sup> José Courty,<sup>1</sup> and Ilaria Cascone<sup>1</sup>

<sup>1</sup> CNRS ERL 9215, CRRET laboratory, University of Paris-Est Creteil (UPEC), France; <sup>2</sup> Quinze Vingts National Ophthalmology Hospital, Paris, France; <sup>3</sup> Vision Institute, UPMC University, Paris, France; <sup>4</sup> Inserm, U1138, Team 17, Physiopathology of Ocular Diseases to Clinical Development, Université Paris Descartes Sorbonne Paris Cité, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France; <sup>5</sup> Inserm, UMR S1176, Paris-Sud University, Paris-Saclay University, 94276 Le Kremlin-Bicêtre, France

## **CORRESPONDING AUTHOR**

Ilaria Cascone

CRRET Laboratory (ERL-CNRS 9215)

University of Paris-Est Creteil (UPEC)

61 avenue du Général de Gaulle

94010 Créteil Cedex

E-mail: [ilaria.cascone@u-pec.fr](mailto:ilaria.cascone@u-pec.fr)

Phone: (33) 1 45 17 17 97

Fax: (33) 1 45 17 18 16

## **ABSTRACT**

Weibel-Palade Bodies (WPBs) are endothelial cell (EC) specific storage and secretory organelles. WPBs store von Willebrand Factor and other factors necessary for haemostatic and inflammatory responses. The pro-angiogenic factor Angiopoietin-2 (Ang-2) is also stored in WPBs. We characterized WPB behavior during mouse retinal angiogenesis. WPB vessel density decreased toward the angiogenic front and discriminated between immature

and mature plexuses. WPB vessel density and pericyte vessel coverage spatially correlated in the developing retina. Notably, perturbation of VEGF gradient increased WPB density and pericyte vessel coverage in the immature plexus but not in the mature vessels of the developing mouse retina. Mechanistically, VEGF induced WPB exocytosis and Ang-2 secretion by ECs. Coherently, inhibition of Ang-2 secretion by anti-VEGF improved pericyte migration and was rescued by recombinant Ang-2. In conclusion, WPB vessel density and pericyte vessel coverage are regulated by VEGF during retinal vessel angiogenesis. We propose a model in which VEGF gradient regulates WPB exocytosis and Ang-2 secretion that in turn affects pericyte recruitment.

## INTRODUCTION

Vascular network is remodelled during angiogenesis, a process allowing the formation of new vessels from pre-existing ones. In the mouse retina, blood vessels develop between the post-natal (P) days P1 and P12 from the optic nerve toward the periphery of the retina. A superficial layer of vessels first appears and develops following a scaffold composed of a pre-existing astrocyte plexus (Stone and Dreher, 1987; Fruttiger *et al.*, 1996) until day P6 before to sink into the thickness of the retina to form an intermediate layer and a deeper one (Stahl *et al.*, 2010). At day P6, the developing plexus is divided into a mature plexus close to the optic nerve and an immature plexus at the angiogenic front (Gomez Perdiguero *et al.*, 2011). Angiogenic sprouts are guided by a VEGF gradient whose main source is the astrocyte scaffold on which vascular network extends (Gerhardt *et al.*, 2003). Some works suggest that pericytes could guide endothelial sprouts but this remains controversial (Darland *et al.*, 2003; Ozerdem and Stallcup, 2004; Winkler *et al.*, 2011). VEGF regulates endothelial sprouts by promoting tip cell differentiation at the angiogenic front (Gerhardt *et al.*, 2003). The main angiogenic factors in the retina are the VEGF-A<sub>120</sub>, VEGF-A<sub>164</sub> and VEGF-A<sub>188</sub> isoforms that signal in ECs through the VEGFR-2 (Stalmans *et al.*, 2002). Pericytes are mural cells embedded in the basement membrane at the abluminal surface of blood vessels (Armulik *et al.*, 2011) and pericyte recruitment is indispensable for retinal vascular remodeling and establishment of a functional blood brain barrier (Park *et al.*, 2017). Weibel-Palade bodies (WPBs) are endothelial cell (EC) specific storage organelles, and appear, at electronic microscopy, as rod-shaped structures having a diameter of about 0.1  $\mu\text{m}$  and a length of up to 3  $\mu\text{m}$  (Weibel and Palade, 1964). WPBs store the polymerized von Willebrand Factor (vWF) (Wagner *et al.*, 1982). WPB exocytosis and vWF secretion are

induced by thrombin, secretagogues and hypoxia promoting EC activation, platelet adhesion and vascular repair (Lowenstein *et al.*, 2005; Metcalf *et al.*, 2008; Goligorsky *et al.*, 2009). vWF has been proposed to participate to physiological angiogenesis as loss of vWF results in enhanced vascularization possibly by promoting EC migration and proliferation (Starke *et al.*, 2011; Scheppke *et al.*, 2012). WPBs also contain the pro-angiogenic factor Angiopoietin-2 (Ang-2) (Fiedler *et al.*, 2004) but the role of WPB exocytosis in angiogenesis has never been described. Ang-2 expressed by angiogenic ECs acts as an antagonist of the Ang-1/Tie-2 signalling to induce vessel destabilization (Maisonpierre *et al.*, 1997; Augustin *et al.*, 2009). In retinal vessels, Ang-2 induces endothelium destabilization and pericyte detachment from vessels (Hammes *et al.*, 2004) while inhibition of Ang-2 secretion in tumor vessels induces pericyte recruitment and vessel normalization (Gilles *et al.*, 2016). VEGF-A<sub>165</sub> promotes vWF secretion by ECs *in vitro*, via a specific VEGFR-2 pathway (Xiong *et al.*, 2009), but its role on WPB exocytosis and Ang-2 secretion has never been clearly described.

In this study, we propose a model in which VEGF spatially controls WPB vessel density by regulating WPB exocytosis during retinal vessel angiogenesis. Moreover, a functional link between WPB exocytosis and pericyte coverage is explored.

## RESULTS

### WPB density in ECs is regulated during retinal angiogenesis.

We sought to characterize the distribution of Weibel-Palade Bodies (WPBs) in retinal vessels. WPBs are formed by the polymerization of intracellular von Willebrand Factor (vWF) (Wagner and Marder, 1984) and have been observed in different types of vessels by electron microscopy (Weibel and Palade, 1964; Warhol and Sweet, 1984). vWF is the main component of WPBs detected by immunofluorescence (Michaux *et al.*, 2006). To detect and quantify WPBs in retinal vessels, whole-mount retinas from young adult mice (9-weeks old) were co-stained by using an anti-vWF antibody and lectin-FITC (Fig. 1). vWF staining showed cellular tubular structures mostly elongated along the longitudinal axis of vessels and with a mean size of 1.5  $\mu\text{m}$  as previously described (Weibel, 2012) (arrows in inset of Fig. 1 A). Figure 1 B shows the higher magnification of different regions of the vasculature of Figure 1 A. WPBs were detectable in all types of retinal vessels of adult mice: capillaries (Fig. 1 B inset 1), venules (Fig. 1 B inset 2), veins (Fig. 1 B inset 3) and arteries (Fig. 1 B inset 4) while vWF knockout mice did not show any signal (Fig. 1 C). By calculating the vessel

area occupied by WPBs we observed that veins contained more WPBs than arteries and capillaries (Fig. 1 D).

In adult retina, the vascular network is established and endothelial cells (ECs) are quiescent (Stahl *et al.*, 2010). To study the behaviour of WPBs in activated ECs of angiogenic vessels, we analyzed the tissular distribution of WPBs in the mouse model of retinal vasculature development. The postnatal mouse retinal model of developmental angiogenesis has the advantage to allow examination of sprouting angiogenesis, vascular remodeling, and maturation in a single tissue (Stahl *et al.*, 2010). Postnatal P6 whole-mount mouse retinas were stained with an anti-vWF antibody and lectin-FITC (Fig. 2 A). Between the post-natal days P1 and P12, the superficial vascular network forms radially from the optic nerve toward the periphery of the tissue (Stahl *et al.*, 2010). Six days after birth (P6), the retinal vascular network is divided into a peripheral remodelling retinal vascular plexus (Fig. 2 A insets 1-3) and a mature plexus close to the optic nerve (Fig. 2 A insets 4, 5) (Gomez Perdiguero *et al.*, 2011). Figure 2 B shows the higher magnification of the different regions of the vasculature of Figure 2 A. vWF staining detected similar WPBs in vessels of the developing retina than in vessels of adult retina (Fig. 2 B, arrows in inset 5). WPBs were present in vessels of both mature and immature plexuses (Fig. 2 B, insets 4, 5 vs 1-3, respectively). In mature plexus, WPBs were clearly detectable as tubular structures in the longitudinal axis of vessels as in adult retina vessels (Fig. 2 B insets 4, 5), while in immature plexus WPBs were less orientated (Fig. 2 B insets 1-3). In some regions of the retina, vWF staining was localized outside the vessels (Fig. 2 B, arrowheads in inset 2). The vessel area occupied by WPBs was calculated by quantifying vWF and lectin areas of different P6 retinas (n=5) in remodelling and immature plexus (Fig. 2 B insets 1-3) and in mature plexus (Fig. 2 B insets 4, 5). The vessel area of WPBs in mature vascular plexus was of 13% (Fig. 2 C), and was significantly and strongly decreased in the immature plexus where only 4% of the vascular area contained WPBs (Fig. 2 C). WPBs undergo exocytosis during EC activation allowing the secretion of vWF and other WPB components (Galbusera *et al.*, 1997; Datta and Ewenstein, 2001). Since secreted vWF was observed outside the vessels (Fig. 2 B, arrowheads) we quantified the amount of secreted vWF, as described in Materials and Methods, and showed that it was higher in the immature plexus region of the retina compared to the mature plexus region (respectively 29% vs 7%, Fig. 2 D). We investigated the vessel distribution of WPBs in oxygen-induced retinopathy (OIR), a model of pathological angiogenesis in which neovascularization is induced by hypoxia (Stahl *et al.*, 2010). P12 mice were put in hyperoxia until P17 and then put back to normoxia. In this

model, vessel regression induces neovascularization between P17-P21 (Stahl *et al.*, 2010). The neovascularized area was analyzed at P17 (Fig. S1 A) and we observed a reduced tissular distribution of WPBs (Fig. S1 B, arrows) concomitant with an increase of secreted vWF (Fig. S1 B, arrowheads) in remodelling regions of the angiogenic front. The vessel network of control P17 pups did not have neovascularized area (Fig. S1 A) and the vessels located in the same region that in OIR-induced P17 had a WPB vessel density similar to adult retinal vessels of Figure 1 (Fig. S1 B). These results suggest that the tissular distribution of WPBs is regulated by exocytosis during physiological retinal vessel angiogenesis and neovascularization.

### **WPB density correlates with pericyte coverage of retinal vessels during angiogenesis.**

The retinal vascular network formation is accompanied by the development of a pericyte network (Stone and Dreher, 1987; Fruttiger *et al.*, 1996). Pericytes were stained by an anti-NG2 or an anti-PDGFR- $\beta$  antibody in vessels of the developing retina of P6 mice (Figs. 3 A and S2). The pericyte network closely follows the retinal vasculature (Fig. 3 A). However and coherently with published data showing that pericyte coverage of developing retinal vessels is delayed, NG2<sup>+</sup> pericyte signal close to vessels was stronger in mature plexus (Fig. 3 B inset 3) than in immature plexus (Fig. 3 B inset 2) and vascular front (Fig. 3 B inset 1). We sought to determine pericyte coverage in retinal vessel areas by quantifying the *ratio* between NG2 and lectin areas of different P6 retinas (n=5). Pericyte coverage amounted to 98% in mature plexus as described in adult vessels of different organs (Armulik *et al.*, 2011; Sims, 1986; Winkler *et al.*, 2014) but to only 40% in immature plexus (Fig. 3 C).

A possible correlation between WPB density and pericyte coverage of the developing vascular network in P6 mice was investigated. P6 whole-mount retinas were immunostained to detect WPBs (Fig. 4 A) and pericytes (Fig. 4 B). Pictures were taken with a Nanozoomer digital slide scanner. The vessel density of WPBs and pericyte coverage of the developing vascular network were quantified at fixed distances from the vascular front by following the same vessel branch. Starting from a distance of 400  $\mu$ m from the vascular front, each vessel branch (n=3) was divided into 5 slices of the same size (80  $\mu$ m) along the branching axis. Vessel area occupied by WPBs and pericyte coverage of vessels were quantified as the *ratio* between vWF or NG2 and lectin areas for each slice. Results are plotted in the same graph in Figure 4C in which the value of the more distant slice from the vascular front (400  $\mu$ m) was considered as 1 and the values of the other slices toward the



vascular front (80  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 240  $\mu\text{m}$ , 320  $\mu\text{m}$ ) were normalized to 1 and plotted in Figure 4C. The results showed that the curves of WPB density and pericyte coverage had similar trends and that they were statistically correlated with a  $r^2$  value of 0.85 (Fig. 4 C). WPB density and pericyte coverage were both at the minimum level starting from 160  $\mu\text{m}$  of the vascular front (Fig. 4 C). Coherently, vWF and PDGFR- $\beta$  co-staining clearly co-decreased in the same regions of vessels close to the vascular front and WPBs and pericytes were both absent in tip cells (Fig. S2, arrows).

### **VEGF regulates WPB exocytosis and Ang-2 secretion by ECs impacting pericyte recruitment.**

We showed a spatial distribution of WPB content and vWF secretion during retinal vessel angiogenesis in the developing mouse retina (Fig. 4). During retinal vessel angiogenesis, ECs at the vascular front respond to VEGF gradients by tip cell formation and guided migration (Gerhardt *et al.*, 2003). We sought to investigate the effect of VEGF stimulation on WPB exocytosis and Ang-2 secretion. Starved ECs were treated or not by 100 ng/mL recombinant VEGF-A<sub>165</sub> during 3 hours and stained by anti-vWF and anti-Ang-2 antibodies (Fig. 5 A). WPBs stained only by anti-vWF (Fig. 5 A, arrows) or co-stained by anti-vWF and anti-Ang-2 (Fig. 5 A, arrowheads) were observed within ECs. VEGF seemed to induce a decrease of both total vWF<sup>+</sup> and vWF<sup>+</sup>Ang-2<sup>+</sup> objects (Fig. 5 A). We developed an image analysis software described in Materials and Methods that detected vWF<sup>+</sup> and vWF<sup>+</sup>Ang-2<sup>+</sup> dots and quantified them as objects within ECs (Fig. 5 B). We investigated the distribution of the size of all vWF<sup>+</sup> objects (WPBs, Fig. 5 C), of vWF<sup>+</sup>Ang-2<sup>+</sup> objects (Ang-2<sup>+</sup> WPBs, Fig. 5 D) and of vWF<sup>-</sup>Ang-2<sup>+</sup> particles (Ang-2 that is not contained inside WPBs, Fig. 5 E). VEGF treatment induced a significant reduction of the number of both total WPBs and Ang-2<sup>+</sup> WPBs of 1-3  $\mu\text{m}^2$  area (Fig. 5 C and D). Similar results were obtained by stimulating cells with thrombin, as positive control of WPB exocytosis (Fiedler *et al.*, 2004) (Fig. S3 A and B). Moreover, we also analysed vWF<sup>-</sup>Ang-2<sup>+</sup> particles and we found that they had a smaller size of 1-2  $\mu\text{m}^2$ . While VEGF induced a significant increase of vWF<sup>-</sup>Ang-2<sup>+</sup> particles (Fig. 5 E), thrombin did not change the number of vWF<sup>-</sup>Ang-2<sup>+</sup> particles within ECs (Fig. S3 C). Total WPBs and Ang-2<sup>+</sup> WPBs detected in Fig. 5 A had therefore the expected size and were exocytosed by thrombin. We were therefore confident using our image analysis software to analyze the effect of VEGF stimulation on total WPB and Ang-2<sup>+</sup> WPB populations in ECs. The number of total WPBs per cell significantly decreased by 40% after VEGF stimulation (Fig. 5 F). The number of Ang-2<sup>+</sup> WBPs decreased by 45% after 3 hours of

VEGF stimulation (Fig. 5 G). Interestingly, Ang-2<sup>+</sup> WPB population accounted for the half of the total number of WPBs in control starving conditions (Fig. 5 F and G). To evaluate if the decrease of WPB populations was associated to vWF and Ang-2 secretion, protein levels were analysed by ELISA in the supernatant of ECs (Fig. 5 H and I). VEGF induced an increase of vWF and Ang-2 amount in the EC supernatants of 2-folds and 5-folds, respectively (Fig. 5H and I). All together these results demonstrate that VEGF induces Ang-2 secretion *via* specifically Ang-2<sup>+</sup> WPB exocytosis, and suggest that the activation of ECs by VEGF induces the mobilization of WPBs that contain Ang-2 in order to respond to a pro-angiogenic stimulus.

The importance of VEGF signalling pathway in the active exocytosis of WPBs was studied. Activated ECs were treated with an antibody directed against VEGF (anti-VEGF) for 5 hours. WPB exocytosis was analyzed by anti-vWF and anti-Ang-2 staining inside cultured ECs (Fig. 6 A). Anti-VEGF significantly increased the number of total WPBs by 1.9-fold (Fig. 6 B) and the number of Ang-2<sup>+</sup> WPBs in ECs by 1.6-fold (Fig. 6 C), suggesting that VEGF targeting inhibits WPB exocytosis. EC supernatant was analyzed by ELISA and we observed that anti-VEGF decreased of 29% the amount of secreted Ang-2 (Fig. 6 D) without changing the level of Ang-2 expression by ECs (Fig. 6 D). EC supernatant of ECs treated by anti-VEGF was also analyzed by using a proteome angiogenesis antibody array. Among several secreted pro-angiogenic factors, Ang-2 protein level was decreased in the supernatant of ECs treated with anti-VEGF compared to control (Table S1 A). On the contrary the protein level of PDGF-BB, a factor known to promote pericyte recruitment on vessels, was increased (Table S1 B). Some other proteins did not respond to anti-VEGF treatment (Table S1 C). These results were the same that the ones we obtained in ECs treated by nucleolin antagonist, N6L (Gilles *et al.*, 2016). In these settings, inhibition of Ang-2 secretion alone was sufficient to increase pericyte migration (Gilles *et al.*, 2016). Therefore, we investigated the effect of VEGF inhibition on pericyte recruitment. Pericytes were let to migrate for 3 hours in the presence of the conditioned medium of ECs treated with anti-VEGF. VEGF inhibition in ECs resulted in a significant increase of pericyte migration toward EC conditioned medium (Fig. 6 E). This effect was totally rescued by the addition of 400 ng/mL recombinant Ang-2. All together, these results showed that inhibition of VEGF impaired WPB exocytosis and confirmed that VEGF regulates Ang-2 secretion. Moreover, these results showed that the inhibition of Ang-2 secretion by anti-VEGF promoted pericyte migration.

## **VEGF gradient regulates WPB exocytosis and pericyte coverage in retinal vessels during angiogenesis.**

We analyzed the density of WPBs in the retinal vasculature of mice injected intravitreally by anti-VEGF for 72 hours (Fig. 7 A) or 5 hours (Fig. S4 A). Short-term anti-VEGF treatment was performed to mimic the experiment performed *in vitro* in Figure 6 and to avoid potential transcriptional effects of blocking VEGF pathway. After 72 hours of anti-VEGF, a 3-fold increase of WPB density was observed in immature plexus (1% in the control mice vs 3% in the treated mice, Fig. 7 B) but no effect was observed on the WPB density in mature plexus (Fig. 7 C). Short-term anti-VEGF treatment increased WPB density in the immature plexus as well (0.9% in the control mice vs 1.4% in the treated mice, Fig. S4 B). Ang-2 staining co-localized with vWF in WPBs enriched in immature plexus after anti-VEGF injection (Fig. S4 C). Since results of Figure 6 suggested that VEGF could regulate WPB exocytosis and pericyte recruitment during retinal angiogenesis, we also analyzed the effect of VEGF inhibition on pericyte density on retinal angiogenesis using an anti-NG2 staining (Fig. 7 D). A fold-increase of 1.75 of pericyte density was observed in the immature plexus of anti-VEGF treated retinas compared to control (33% in the control mice vs 58% in the treated mice, Fig. 7 E) but not in the mature plexus (Fig. 7 F). Therefore, all together these results demonstrate that the *in vivo* inhibition of VEGF resulted in an increase of WPB density and pericyte recruitment.

## **DISCUSSION**

Weibel-Palade bodies (WPBs) are endothelial cell (EC) organelles storing von Willebrand Factor (vWF) and pro-inflammatory factors that regulate coagulation and inflammatory responses (van Breevoort *et al.*, 2012; Randi *et al.*, 2013). WPBs also contain the pro-angiogenic factor Angiopoietin-2 (Ang-2). In this study, we demonstrate for the first time that during retinal angiogenesis, WPB density discriminates angiogenic vs mature vessels and is correlated to pericyte recruitment. We propose a model (Fig. 8) in which VEGF induces exocytosis of WPBs containing Ang-2 and regulates WPB density and pericyte coverage of remodelling vessels during retinal vessel angiogenesis.

WPBs are secretory granules whose presence has been described in 1964 in small arteries of various organs (Weibel and Palade, 1964). Then after, WPBs have been found both in veins and arteries in the systemic and pulmonary circulations with a size up to 20  $\mu\text{m}$  in diameter (Fuchs and Weibel, 1966). For the first time, we analyzed the distribution of

WPBs in stable and angiogenic vessels of mouse retinal model. The immunofluorescence using anti-vWF antibody on whole-mount retinas revealed that both veins and arteries present elongated cytoplasmic structures of a mean size of 1.5  $\mu\text{m}$  oriented along blood flow. WPBs are also present in capillaries of retinal vasculature while they have not been found in capillaries of vessels from other parts of the circulation of rats or frogs (Fuchs and Weibel, 1966). In mouse model of retinal vessel angiogenesis, at postnatal (P) day P6, the developing plexus is divided into a mature plexus close to the optic nerve and an immature plexus at the angiogenic front (Stahl *et al.*, 2010). We could show that WPB distribution in vessels is spatially regulated. The vascular density of WPBs clearly decreases gradually from mature vessels close to the optic nerve toward the immature plexus and the angiogenic front. During retinal angiogenesis, the vascular network forms toward the periphery and ECs grow onto a preexisting astrocytic template (Stone and Dreher, 1987; Fruttiger *et al.*, 1996). Differently from astrocytes, pericytes are recruited to the already preformed EC plexus (Park *et al.*, 2017). Our data describe and quantify the spatial pericyte coverage of retinal vessels during the vessel network development. Firstly, we could confirm that during angiogenesis, there is a developmental period during which the vessels lack pericytes (Benjamin *et al.*, 1998) and demonstrate that the amount of vessel area covered by pericyte indicate the degree of maturation of a vascular bed. In developing retinal vessels, pericyte coverage decreases gradually from the optic nerve, where stable vessels showed 98% of pericyte coverage, to the angiogenic front, where the immature plexus had 40% of pericyte coverage. Importantly, we could demonstrate that the spatial decrease of pericyte coverage of the retinal vessels correlates with the decrease in WPB vessel density. Importantly, we could observe that the decrease of WPB vessel density toward the angiogenic front is associated to an increase in the presence of vWF out of the vessels. These phenotypes were observed in physiological angiogenesis of developing retinal vascular network but also in pathological angiogenesis of retinas in oxygen-induced retinopathy models.

In vessel homeostasis, WPB exocytosis and consequently vWF secretion are stimulated by pro-thrombotic and pro-inflammatory *stimuli* upon EC activation (Lowenstein *et al.*, 2005; Goligorsky *et al.*, 2009; Rondaj *et al.*, 2006). VEGF-A distribution in the developing retina is highly regulated and forms a gradient with the highest concentration at the angiogenic front (Gerhardt *et al.*, 2003). *In vitro*, VEGF promotes vWF secretion by ECs, *via* a specific VEGFR-2 pathway (Xiong *et al.*, 2009) but the role of VEGF on WPB exocytosis and the implication of this process in angiogenesis had never been clearly

established. We therefore further studied the role of the main pro-angiogenic factor VEGF in WPB exocytosis. A home-made image analysis plugin was developed to quantify the number of WPBs present in each cell and to evaluate the density of WPBs in ECs stimulated by VEGF compared to thrombin, as positive control of WPB exocytosis (Rondaij *et al.*, 2006). VEGF-A<sub>165</sub> stimulation decreased the density of vWF-stained WPBs, in parallel to an important increase of vWF in the supernatant of ECs without regulating the total vWF protein level. The effect of VEGF-A<sub>165</sub> stimulation was similar to thrombin, both decreased of 40% a population of WPBs of a size between 1-3  $\mu\text{m}^2$ . This result clearly shows that vWF secretion induced by VEGF is due to a regulation of WPB exocytosis. Moreover, the efficiency of VEGF stimulation was similar to pro-thrombotic *stimuli*. Among the variety of molecules that are stored in WPBs, mostly pro-thrombotic and pro-inflammatory cargos (van Breevoort *et al.*, 2012; Rondaij *et al.*, 2006), there is the pro-angiogenic factor Ang-2 (Fiedler *et al.*, 2004). We could show by image analysis that Ang-2 is mainly localized inside WPBs while only 10% of the protein is detected in cytoplasmic vesicular structures. However, only 40% of the total WPB population contains Ang-2 in proliferating ECs and we could discriminate between WPB populations containing or not Ang-2. Here, we show for the first time that the pro-angiogenic factor VEGF specifically regulates exocytosis of WPBs containing Ang-2 in ECs. Our results demonstrate that VEGF promotes the decrease of WPBs containing Ang-2 in ECs, and similarly to vWF, the increase of Ang-2 level in cell supernatants. Moreover, blocking VEGF pathway decreases the exocytosis of Ang-2<sup>+</sup> WPBs. Recently we published that decreasing Ang-2 secretion by the inhibition of WPB exocytosis triggers a program of EC loss-of-activation that increases pericyte recruitment (Gilles *et al.*, 2016). Similarly, WPB exocytosis and Ang-2 secretion inhibited by anti-VEGF increased pericyte recruitment of 28%.

To establish a link between VEGF and WPB exocytosis *in vivo*, mice were injected by anti-VEGF. Anti-VEGF caused an increase of WPB vessel density in the angiogenic region as in ECs *in vitro*, without impacting stable vessels close to the optic nerve. Since anti-VEGF inhibits retinal angiogenesis (Gerhardt *et al.*, 2003) and to distinguish between the impact on angiogenesis and on WPB vessel density, we tested the effect of the anti-VEGF antibody at early time point (5 hours). Short VEGF blocking was also able to increase WPB vessel density at the angiogenic front without impacting stable vessels. These data, together with the *in vitro* data, suggest that VEGF inhibition increases WPB vessel density by blocking the exocytosis of these organelles in the retina. VEGF could therefore induce WPB exocytosis *in vivo* at the angiogenic front. The role of WPB exocytosis could be determined by the content



of WPB that is exocytosed. At the angiogenic front, a fine regulation of tip cell turnover coordinates the amount of sprouts during retinal vessel angiogenesis (Stenzel *et al.*, 2011). vWF has been described to inhibit EC migration and sprouting (Starke *et al.*, 2011). vWF secretion by WPB exocytosis could therefore participate in maintaining a balance between pro-angiogenic factors at the angiogenic front of retinal vessels. *In vitro*, we contributed to demonstrate that Ang-2 is mainly a content of WPBs secreted by WPB exocytosis. Ang-2 is strongly expressed at the vascular front of retinal vessels while decreases in confluent vs subconfluent monolayer of ECs (Felcht *et al.*, 2012). Once expressed, Ang-2 could therefore be stored in WPBs. However, in ECs only 40% of WPBs contain Ang-2 *in vitro* and WPB density is very low at the vascular front. Ang-2 staining inside WPBs appeared in retinal vessel after anti-VEGF treatment. At the vascular front of the retinal vessels, Ang-2 promotes vessel sprouting by binding to and activating angiogenic integrins (Felcht *et al.*, 2012), and our data suggest that this autocrine pathway is regulated by VEGF-induced WPB exocytosis and local Ang-2 secretion. Anti-VEGF treatment has a double effect, increasing both WPB vessel density and pericyte coverage of retinal vessels. Angiopoietins/Tie-2 system regulates vascular development and maturation (Augustin *et al.*, 2009). In the retina, Ang-2 induces the dropout of pericyte from vessels associated to diabetic retinopathies (Hammes *et al.*, 2004) while inhibition of Ang-2 function or secretion promotes pericyte recruitment (Hammes *et al.*, 2004; Srivastava *et al.*, 2014; Gilles *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2017). Inhibition of Ang-2 secretion by VEGF blocking antibody could thus promote pericyte coverage of retinal vessels *in vivo*. In conclusion, we elucidated a novel regulation of WPB exocytosis and Ang-2 secretion by VEGF and opened new insights in the control of pericyte recruitment during angiogenesis. Moreover, a speculation could be done on the importance of this process in pathological angiogenesis of retinal and tumor vessels.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Cell culture**

Human brain vascular pericytes (HBVP, ScienCell) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs, Lonza) were maintained, respectively, in Pericyte Medium phenol red free (PM-prf, ScienCell) and Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2, Lonza) containing appropriate supplements. Cells were cultured in 37°C and 5% CO<sub>2</sub> incubators. HUVECs and HBVPs were cultivated on dishes, flasks and plates coated with gelatin 1% and Poly-L-Lysine (2 µg/cm<sup>2</sup>) respectively.

## **Animals**

C57BL/6J mice from JANVIER (France) were used for this study. All animals were cared and handled according to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. For *in vivo* study of VEGF inhibition, P3 pups were injected using an ultrafine 30-gauge needle, passing through the sclera at the equator and injecting 0.5  $\mu$ L of anti-VEGF antibody (0.1 $\mu$ g/ $\mu$ L, R&D Systems 471-F1) or PBS buffer into the vitreous cavity. After 5h or 72h, pups were sacrificed and eyes were enucleated. For the oxygen-induced retinopathy (OIR) model, C57BL/6JRj pup mice with nursing mothers were exposed to 75% oxygen at postnatal (P) day P7 for 5 consecutive days, as previously reported (Connor *et al.*, 2009). At P12, mice were returned to room air and at P17, mice were sacrificed and eyes were enucleated.

## **Immunofluorescence of whole-mount retinas**

Eyes were fixed with 4% paraformaldehyde for 1 hour on ice. Retinas were isolated and permeabilized overnight in PBS-Triton 0.5% -BSA 0.2% at 4°C before to be incubated overnight with an anti-vWF antibody (Dako A0082, 1:500), an anti-NG2 antibody (Merck Millipore AB5320, 1:200), or an anti-PDGFR- $\beta$  antibody (R&D Systems AF1042, 1:50) and with lectin-FITC (Sigma Aldrich L2895, 1:100) diluted in PBS-Triton 1% (4°C). Alexa-labelled secondary antibodies (Invitrogen) diluted in PBS-Triton 1% were incubated for 75 minutes at RT and nuclei were stained with 1  $\mu$ g/mL DAPI (Sigma Aldrich D8417) for 30 minutes at RT. Retinas were fixed with 4% paraformaldehyde for 20 minutes at RT and flat-mounted in Prolong (Life Technologies P36934). Immunofluorescence pictures were acquired using a DSU IX81 spinning-disc confocal inverted microscope (Olympus) equipped with a 60x oil objective (NA. 1.25), a 5 channels Olympus FV1000 laser scanning confocal microscope equipped with a 40x oil objective (NA. 1.3) or using a Nanozoomer digital slide scanner (Hamamatsu) with a 40x objective.

## **Image analysis in whole-mount retinas**

Acquisitions were performed with the same settings on multiple retina samples and included negative controls for determination of background staining. For confocal analysis quantification, retinas were sampled in immature and mature plexuses. Stacks of 8 pictures with 0.5  $\mu$ m axial step were acquired with the same settings on multiple retina samples and experiments included negative controls for determination of background staining. For Nanozoomer analysis quantification, retina vascular trees were divided into 5 sections from

tip cell region to the optic nerve. In both types of analysis, WPB and pericyte densities were estimated by quantifying vWF and NG2 areas respectively using manual threshold. vWF and NG2 areas were reported to lectin area for each picture.

### **Immunofluorescence, ELISA and Western-Blotting of cultured endothelial cells**

For immunofluorescence analysis  $9 \times 10^4$  HUVECs were seeded on glass coverslips in 24-multiwell (Falcon 353047). The day after, cells were starved as indicated in EBM-2 before to be stimulated with 100 ng/mL recombinant VEGF-A<sub>165</sub> (R&D Systems 293-VE) (5 hours) or 20 ng/mL anti-VEGF antibody (R&D Systems 471-F1) (5 hours) or 1U thrombin (Sigma Aldrich T4393) (5 minutes). Cells were fixed in methanol for 10 minutes at -20°C. After saturation in PBS-BSA 3%, cells were incubated for 45 minutes at 37°C with an anti-Ang-2 antibody (R&D AF623, 1:50) diluted in PBS-BSA 0.3%. Cells were then incubated for 45 minutes at 37°C with an anti-vWF antibody (Dako A0082, 1:1000) diluted in PBS-BSA 0.3%. Cells were incubated for 45 minutes at 37°C with alexa-labelled secondary antibodies (Invitrogen) diluted in PBS-BSA 0.3% and nuclei were stained with 2 µg/mL DAPI (Sigma Aldrich D8417). Immunofluorescence pictures were acquired using a DSU IX81 spinning-disc confocal microscope (Olympus) with a 60x oil objective (NA. 1.25). For ELISA analysis,  $1.5 \times 10^5$  HUVECs per well were seeded in 12-multiwell plates (Falcon 353043) for VEGF-A<sub>165</sub> stimulation and  $2 \times 10^6$  HUVECs were seeded in 100 mm dishes (Falcon 353003) for anti-VEGF treatment. The day after, cells were starved as indicated in EBM-2 before to be stimulated for 5 hours with 100 ng/mL recombinant VEGF-A<sub>165</sub> or 20 ng/mL anti-VEGF antibody. Cell supernatants were harvested and cells were lysed with a lysis buffer containing 1V SDS 20% - 1V Tris 0.5M - 2V ddH<sub>2</sub>O. Ang-2 amount in cell supernatants was measured using a DuoSet ELISA Development Kit (R&D Systems DY623). For vWF ELISA, 96-well plates (Costar 3590) were incubated overnight with an anti-vWF antibody (Dako A0082, 1:800). Antibody-coated wells were washed 3 times with PBS-0.05% Tween 20 (washing buffer) and blocked with PBS - Tween 20 0.1% - gelatin 0.2% (blocking buffer) for 90 minutes at 37°C. EC supernatants were incubated for 90 minutes at 37°C. After washes wells were incubated with an HRP-conjugated anti-vWF antibody (Dako P0226, 1:4000) diluted in blocking buffer for 90 minutes at 37°C, revealed by the TMB Substrate Kit (Thermo Fisher) and the absorbance was measured at 450 nm. Ang-2 and vWF concentration was normalized to the total protein amount of cells in each well calculated by BCA assay (Pierce). Cell supernatants of HUVECs treated with anti-VEGF antibody were also analyzed using a Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit (R&D Systems ARY007).

For Ang-2 expression in cell lysates, protein samples were analyzed as previously described (Gilles *et al*, 2016) by using an anti-Ang-2 antibody (R&D Systems AF623) or an anti- $\beta$ -actine antibody (Sigma Aldrich A3854). Immunocomplexes were visualized by using the luminescence blotting substrate ECL Pierce or POD kit (Roche Applied Science). Chemiluminescence was imaged with an Odyssey Fc device (Li-Cor).

### **Image analysis of Weibel-Palade bodies in cultured endothelial cells**

Image processing and analysis were executed using the ImageJ software (Rasband, 1997). Stacks of 10 pictures with 0.5  $\mu\text{m}$  axial step were acquired with the same settings on multiple cell samples and experiments included negative controls for determination of background staining. In the aim to simplify the analysis, images representing the maximum projection of stacks were used for further analysis with an original ImageJ program shortly described below. Briefly, maximum projections were deblurred by a custom unsharp mask filter and denoised by removing outlier pixels. Small particles were detected by an optimized thresholding method. The sub-segmentation of the aggregates was then performed by using a watershed operation (Ferreira and Rasband, 2013). A final sorting of the segmented objects was performed by using a *ratio* signal/noise (*ratio* S/N) threshold. Ang-2 (red) and vWF (green) detected objects were then submitted to an overlapping analysis. Red and green juxtaposed objects were considered as in contact when their apparent edges overlapped more than an user defined value depending of the image resolution. This analysis can discriminate red and green objects which are alone or implicated in a group of particles. It can also detect objects representing overlapping areas of red and green objects ("sun flower"). Each object was characterized by its area, allowing frequency distribution analysis of apparent size of labelled objects and of their interactions. Counts of particles were normalized by the number of cells by automatic detection of nuclei on images. First, a detail extraction was performed by using an unsharp mask (sigma 50, step 1). Then, a variance filter (radius = 2) was applied to enhance edges of labelled structures. This image was then blended to the result of step 1, to close the lacunas of the DAPI staining. A final segmentation was performed by the so-called Huang thresholding method (Huang and Wang, 1995) and clusters were reduced by using a watershed sub-segmentation (Ferreira and Rasband, 2013). To conclude, our home-made ImageJ program allowed us to quantify the number and the size of (1) all WPBs (all vWF<sup>+</sup> objects), (2) Ang-2-containing WPBs (vWF<sup>+</sup>Ang-2<sup>+</sup> objects) and (3) Ang-2 particles (vWF<sup>-</sup>Ang-2<sup>+</sup> objects).

## **Pericyte motility**

HUVECs at  $3 \times 10^5$  cells per well were seeded in 6-well plates coated with gelatin 1%. The day after, HUVECs were treated with 20 ng/mL anti-VEGF antibody (R&D Systems 471-F1) diluted in EGM-2 for 5 hours at 37°C. HUVECs were washed and medium was replaced with EBM-2 for 1 hour at 37°C.  $2 \times 10^4$  HBVPs were seeded with or without 400 ng/mL recombinant Ang-2 (R&D Systems 623-AN) in the upper chamber of 8  $\mu$ m pore-sized Boyden chambers coated (BD Falcon 353097) with 1.5  $\mu$ g/mL collagen type I and the EC conditioned medium was added in the lower chamber. Pericytes were allowed to migrate for 3 hours before to be fixed with PBS - glutaraldehyde 2.5% and stained with crystal violet 0.2%. For each Boyden chamber, nuclei of cells from 5 fields were counted using Leica Aristoplan microscope equipped with a CoolSNAP CCD camera.

## **Statistical analysis**

Unless indicated otherwise, bars represent mean  $\pm$  Standard Error of Mean (S.E.M.) ( $n \geq 3$ ), P values have been calculated using a two-tailed or one-tailed unpaired *t*-test using GraphPad Prism software version 5.01. \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ .

## **ACKNOWLEDGMENTS**

This work was supported by grants from the French organization ANR “ANR-14-LE16-0023-NORMATHER” and “ANR THERANUC”. M.C. is granted by the French Ministry of Research.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

**Conception and design:** I. Cascone

**Development of methodology:** M. Cossutta, M. Darche, E. Picard, D. Villain, C. Houppe, G. Carpentier.

**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** M. Cossutta, M. Darche, M. Paques, C. Casari, C. Denis.

**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** M. Cossutta, M. Darche, I. Cascone.

**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** M. Cossutta, I. Cascone.

**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** M. Cossutta, M. Darche, C. Houppe, J. Courty, I. Cascone.

**Study supervision:** J. Courty, I. Cascone.



## CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURES

The authors declare no competing financial interests.

## REFERENCES

Armulik, A., G. Genové, and C. Betsholtz. 2011. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Dev. Cell.* 21:193-215. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2011.07.001>

Augustin, H.G., G.Y. Koh, G. Thurston, and K. Alitalo. 2009. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10:165-177. <http://dx.doi.org/doi:10.1038/nrm2639>

Benjamin, L.E., I. Hemo, and E. Keshet. 1998. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development.* 125:1591-1598.

Connor, K.M., N.M Krah, R.J Dennison, C.M Aderman, J. Chen, K.I Guerin, P. Sapienza, A. Stahl, K.L Willett, and L.E.H. Smith. 2009. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat. Protoc.* 4:1565-1573. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2009.187>

Darland, D.C., L.J. Massingham, S.R. Smith, E. Piek, M. Saint-Geniez, and P.A. D'Amore. 2003. Pericyte production of cell-associated VEGF is differentiation- dependent and is associated with endothelial survival. *Dev. Biol.* 264:275-288. [http://dx.doi.org/10.1016/S0012-1606\(03\)00492-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0012-1606(03)00492-5)

Datta, Y.H., and B.M. Ewenstein. 2001. Regulated Secretion in Endothelial Cells: Biology and Clinical Implications. *Thromb. Haemost.* 86:1148-1155.

Felcht, M., R. Luck, A. Schering, P. Seidel, K. Srivastava, J. Hu, A. Bartol, Y. Kienast, C. Vettel, E.K. Loos, S. Kutschera, S. Bartels, S. Appak, E. Besemfelder, D. Terhardt, E. Chavakis, T. Wieland, C. Klein, M. Thomas, A. Uemura, S. Goerdts, and H. G. Augustin. 2012. Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling. *J. Clin. Invest.* 122:1991-2005. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI58832>

Ferreira, T., and W. Rasband. 2013. ImageJ documentation, section 29.4 available at the <http://rsb.info.nih.gov/ij/docs/guide/146-29.html#toc-Subsection-29.4>.

Fiedler, U., M. Scharpfenecker, S. Koidl, A. Hegen, V. Grunow, J.M. Schmidt, W. Kriz, G. Thurston, and H. G. Augustin. 2004. The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood.* 103:4150-4156. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-10-3685>

Fruttiger, M., A.R. Calver, W.H. Krüger, H.S. Mudhar, D. Michalovich, N. Takakura, S. Ichi Nishikawa, and W.D. Richardson. 1996. PDGF Mediates a Neuron–Astrocyte Interaction in the Developing Retina. *Neuron*. 17:1117-1131.

Fuchs, A., and E.R. Weibel. 1966. Morphometrische untersuchung der verteilung einer spezifischen cytoplasmatischen organelle in endothelzellen der ratte. *Zeitschrift für Zellforschung*. 73:1-9

Galbusera, M., C. Zoja, R. Donadelli, S. Paris, M. Morigi, A. Benigni, M. Figliuzzi, G. Remuzzi, and A. Remuzzi. 1997. Fluid Shear Stress Modulates von Willebrand Factor Release From Human Vascular Endothelium. *Blood*. 90:1558-1564.

Gerhardt, H., M. Golding, M. Fruttiger, C. Ruhrberg, A. Lundkvist, A. Abramsson, M. Jeltsch, C. Mitchell, K. Alitalo, D. Shima, and C. Betsholtz. 2003. VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161:1163-1178. <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.200302047>

Gilles, M-E., F. Maione, M. Cossutta, G. Carpentier, L. Caruana, S. Di Maria, C. Houppe, D. Destouches, K. Shchors, C. Prochasson, F. Mongelard, S. Lamba, A. Bardelli, P. Bouvet, A. Couvelard, J. Courty, E. Giraudo, and I. Cascone. 2016. Nucleolin Targeting Impairs the Progression of Pancreatic Cancer and Promotes the Normalization of Tumor Vasculature. *Cancer Res*. 76:7181-7193. <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-0300>

Goligorsky, M.S., D. Patschan, and M-C. Kuo. 2009. Weibel–Palade bodies—sentinels of acute stress. *Nat. Rev. Nephrol.* 5:423-426. <http://dx.doi.org/10.1038/nrneph.2009.87>

Gomez Perdiguero, E., A. Galaup, M. Durand, J. Teillon, J. Philippe, D.M. Valenzuela, A.J. Murphy, G.D. Yancopoulos, G. Thurston, and S. Germain. 2011. Alteration of Developmental and Pathological Retinal Angiogenesis in angptl4-deficient Mice. *J. Biol. Chem.* 286:36841-36851. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.220061>

Hammes, H-P., J. Lin, P. Wagner, Y. Feng, F. vom Hagen, T. Krzizok, O. Renner, G. Breier, M. Brownlee, and U. Deutsch. 2004. Angiopoietin-2 Causes Pericyte Dropout in the Normal Retina. Evidence for Involvement in Diabetic Retinopathy. *Diabetes*. 53:1104-1110.

Huang, L-K., and M-J.J. Wang. 1995. Image thresholding by minimizing the measure of fuzziness. *Pattern Recogn.* 28:41-51.

Lowenstein, C.J., C.N. Morrell, and M. Yamakuchi. 2005. Regulation of Weibel–Palade Body Exocytosis. *Trends Cardiovasc. Med.* 15:302-308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2005.09.005>

Maisonpierre, P.C., C. Suri, P.F. Jones, S. Bartunkova, S.J. Wiegand, C. Radziejewski, D. Compton, J. McClain, T.H. Aldrich, N. Papadopoulos, T.J. Daly, S. Davis, T.N. Sato, and G.D. Yancopoulos. 1997. Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts *in vivo* Angiogenesis. *Science*. 277:55. <http://dx.doi.org/10.1126/science.277.5322.55>

Metcalf, D.J., T.D. Nightingale, H.L. Zenner, W.W. Lui-Roberts, and D.F. Cutler. 2008. Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J. Cell Sci.* 121:19-27. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.03494>

Michaux, G., K.B. Abbitt, L.M. Collinson, S.L. Haberichter, K.E. Norman, and D.F. Cutler. 2006. The Physiological Function of von Willebrand's Factor Depends on Its Tubular Storage in Endothelial Weibel-Palade Bodies. *Dev. Cell.* 10:223-232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2005.12.012>

Ozerdem, U., and W.B. Stallcup. 2004. Pathological angiogenesis is reduced by targeting pericytes via the NG2 proteoglycan. *Angiogenesis.* 7:269-276. <http://dx.doi.org/10.1007/s10456-004-4182-6>

Park, D.Y., J. Lee, J. Kim, K. Kim, S. Hong, S. Han, Y. Kubota, H.G. Augustin, L. Ding, J.W. Kim, H. Kim, Y. He, R.H. Adams, and G.Y. Koh. 2017. Plastic roles of pericytes in the blood-retinal barrier. *Nat. Commun.* 8:15296. <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15296>

Randi, A.M., M.A. Laffan, and R.D. Starke. 2013. Von Willebrand Factor, Angiodysplasia and Angiogenesis. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* 5:e2013060. <http://dx.doi.org/10.4084/MJHID.2013.060>

Rasband, W.S. 1997-2017. ImageJ website, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA. Available: <http://imagej.nih.gov/ij/>.

Rondaij, M.G., R. Bierings, A. Kragt, J.A. van Mourik, and J. Voorberg. 2006. Dynamics and Plasticity of Weibel-Palade Bodies in Endothelial Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 26:1002-1007. <http://dx.doi.org/10.1161/01.ATV.0000209501.56852.6c>

Schepke, L., E.A. Murphy, A. Zarpellon, J.J. Hofmann, A. Merkulova, D.J. Shields, S.M. Weis, T.V. Byzova, Z.M. Ruggeri, M.L. Iruela-Arispe, and D.A. Cheresh. 2012. Notch promotes vascular maturation by inducing integrin-mediated smooth muscle cell adhesion to the endothelial basement membrane. *Blood.* 119:2149-2158. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-04-348706>

Sims, D.E. 1986. The pericyte – A review. *Tissue Cell.* 18:153-174.

Srivastava, K., J. Hu, C. Korn, S. Savant, M. Teichert, S.S. Kapel, M. Jugold, E. Besemfelder, M. Thomas, M. Pasparakis, and H.G. Augustin. 2014. Postsurgical Adjuvant Tumor Therapy by Combining Anti-Angiopoietin-2 and Metronomic Chemotherapy Limits Metastatic Growth. *Cancer Cell.* 26:880-895. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2014.11.005>

Stahl, A., K.M. Connor, P. Sapieha, J. Chen, R.J. Dennison, N.M. Krah, M.R. Seaward, K.L. Willett, C.M. Aderman, K.I. Guerin, J.Hua, C. Löfqvist, A. Hellström, and L.E.H. Smith. 2010. The Mouse Retina as an Angiogenesis Model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 51:2813-2826. <http://dx.doi.org/10.1167/iovs.10-5176>

Stalmans, I., Y-S. Ng, R. Rohan, M. Fruttiger, A. Bouché, A. Yuce, H. Fujisawa, B. Hermans, M. Shani, S. Jansen, D. Hicklin, D.J. Anderson, T. Gardiner, H-P. Hammes, L. Moons, M. Dewerchin, D. Collen, P. Carmeliet, and P.A. D'Amore. 2002. Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J. Clin. Invest.* 109:327-336. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI200214362>

Starke, R.D., F. Ferraro, K.E. Paschalaki, N.H. Dryden, T.A.J. McKinnon, R.E. Sutton, E.M. Payne, D. O. Haskard, A.D. Hughes, D.F. Cutler, M.A. Laffan, and A.M. Randi. 2011. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Blood.* 117:1071-1080. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-01-264507>

Stenzel, D., C.A. Franco, S. Estrach, A. Mettouchi, D. Sauvaget, I. Rosewell, A. Schertel, H. Armer, A. Domogatskaya, S. Rodin, K. Tryggvason, L. Collinson, L. Sorokin, and H. Gerhardt. 2011. Endothelial basement membrane limits tip cell formation by inducing Dll4/Notch signalling *in vivo*. *EMBO Rep.* 12:1135-1143. <http://dx.doi.org/10.1038/embor.2011.194>

Stone, J., and Z. Dreher. 1987. Relationship Between Astrocytes, Ganglion Cells and Vasculature of the Retina. *J. Comp. Neurol.* 255:35-49.

van Breevoort, D., E.L. van Agtmaal, B.S. Dragt, J. Klein Gebbinck, I. Dienava-Verdoold, A. Kragt, R. Bierings, A.J.G. Horrevoets, K.M. Valentijn, J.C. Eikenboom, M. Fernandez-Borja, A.B. Meijer, and J. Voorberg. 2012. Proteomic Screen Identifies IGFBP7 as a Novel Component of Endothelial Cell-Specific Weibel-Palade Bodies. *J. Proteome Res.* 11:2925-2936. <http://dx.doi.org/10.1021/pr300010r>

Wagner, D.D., J.B. Olmsted, and V.J. Marder. 1982. Immunocolocalization of von Willebrand Protein in Weibel-Palade Bodies of Human Endothelial Cells. *J. Cell Biol.* 95:355-360.

Wagner, D.D., and V.J. Marder. 1984. Biosynthesis of von Willebrand Protein by Human Endothelial Cells: Processing Steps and Their Intracellular Localization. *J. Cell Biol.* 99:2123-2130.

Warhol, M.J., and J.M. Sweet. 1984. The Ultrastructural Localization of von Willebrand Factor in Endothelial Cells. *Am. J. Pathol.* 117:310-315.

Weibel, E.R., and G.E. Palade. 1964. New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J. Cell Biol.* 23:101-112.

Weibel, E.R. 2012. Fifty years of Weibel-Palade bodies: the discovery and early history of an enigmatic organelle of endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* 10:979-984. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1538-7836.2012.04718.x>

Winkler, E.A., R.D. Bell, and B.V. Zlokovic. 2011. Central nervous system pericytes in health and disease. *Nat. Neurosci.* 14:1398-1405. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.2946>

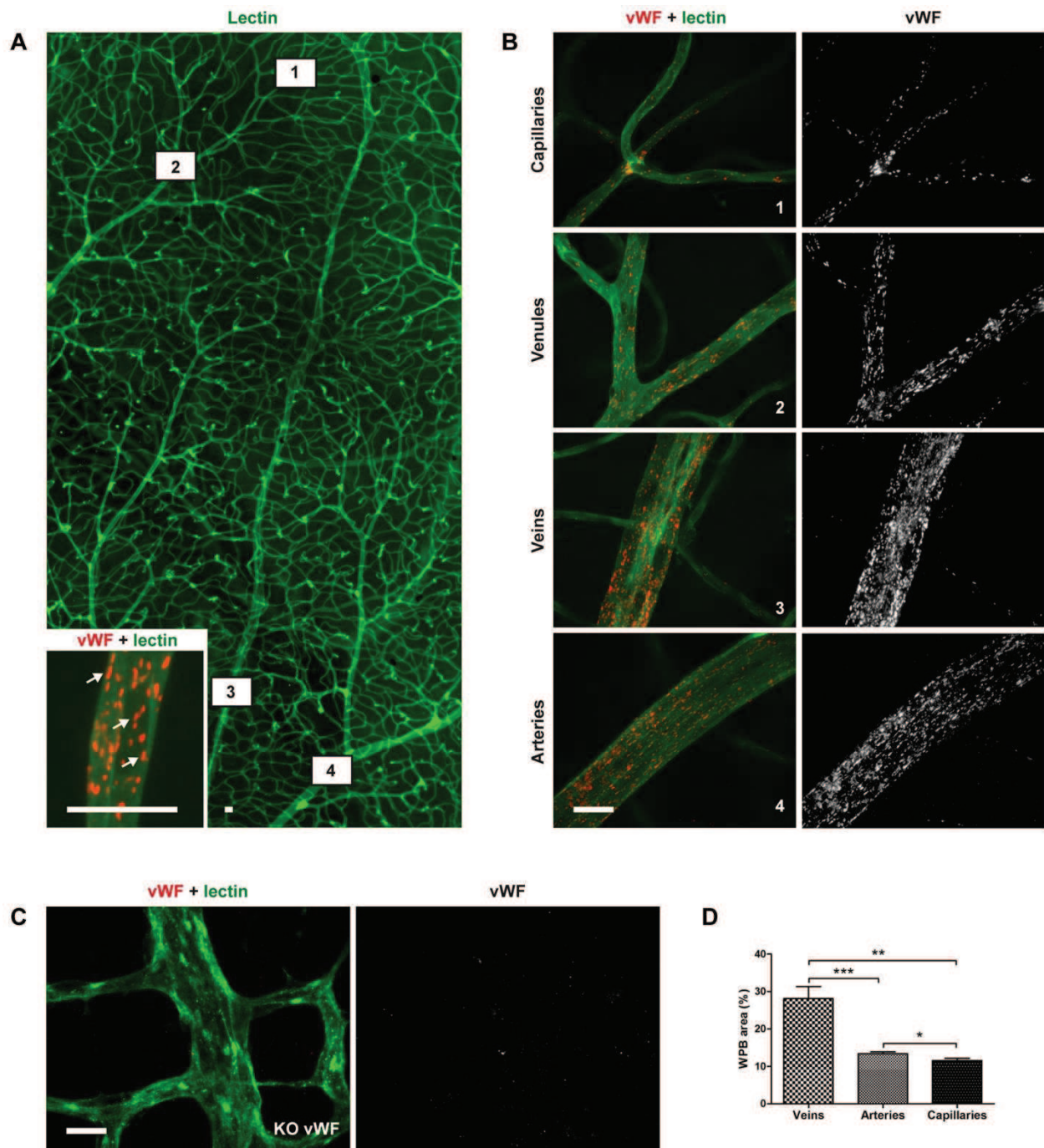
Winkler, E.A., A.P. Sagare, B.V. Zlokovic. 2014. The Pericyte: A Forgotten Cell Type with Important Implications for Alzheimer's Disease? *Brain Pathol.* 24:371-386. <http://dx.doi.org/doi:10.1111/bpa.12152>

Xiong, Y., Y. Huo, C. Chen, H. Zeng, X. Lu, C. Wei, C. Ruan, X. Zhang, Z. Hu, M. Shibuya, and J. Luo. 2009. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-2 Tyrosine 1175 Signaling Controls VEGF-induced von Willebrand Factor Release from Endothelial Cells via Phospholipase C- $\gamma$ 1- and Protein Kinase A-dependent Pathways. *J. Biol. Chem.* 284:23217-23224. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.019679>

#### **ABBREVIATIONS USED**

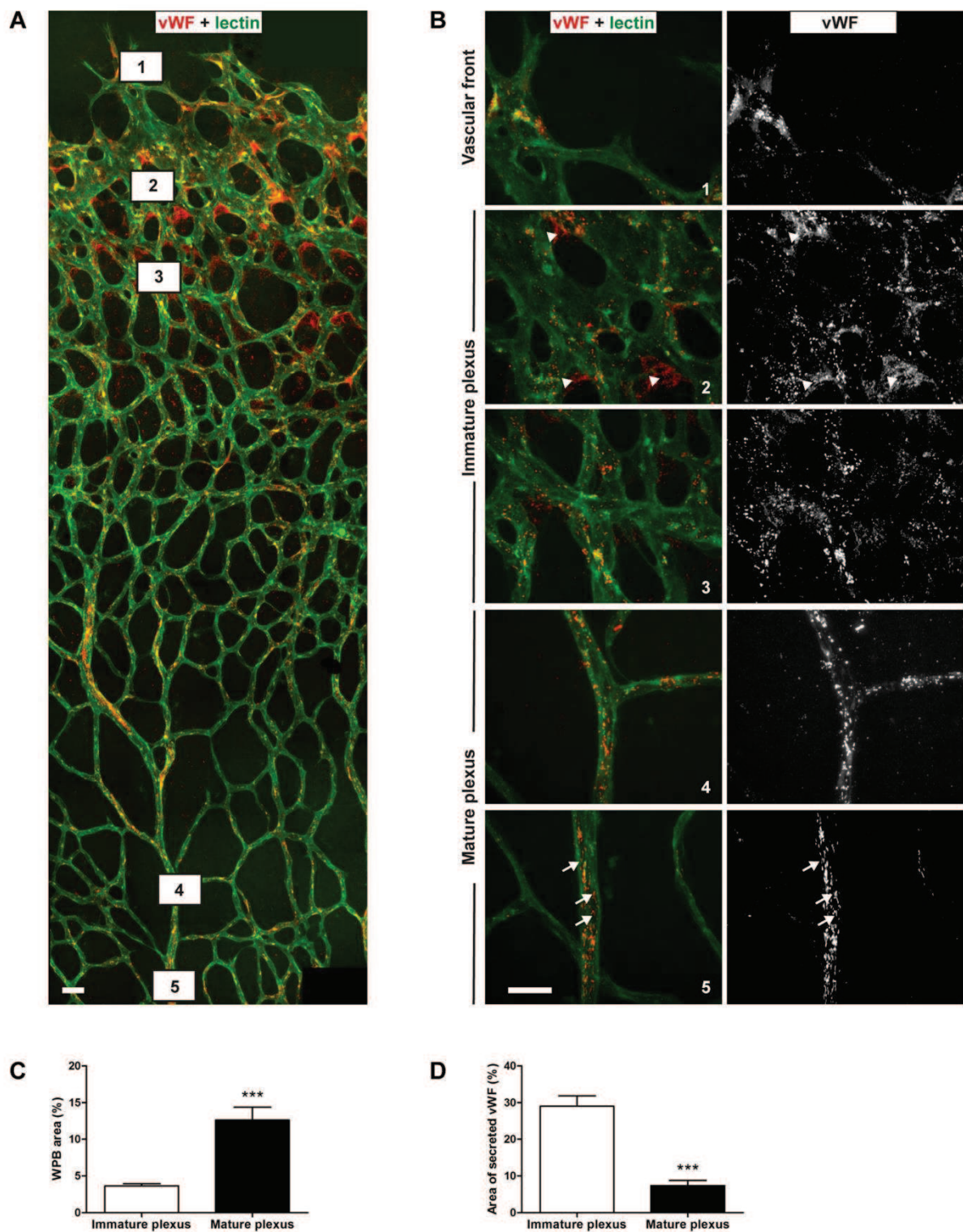
Ang-2, Angiopoietin-2; EC, endothelial cell; vWF, von Willebrand Factor; WPB, Weibel-Palade Body





**Figure 1. WPBs are detectable in all types of adult retinal vessels.**

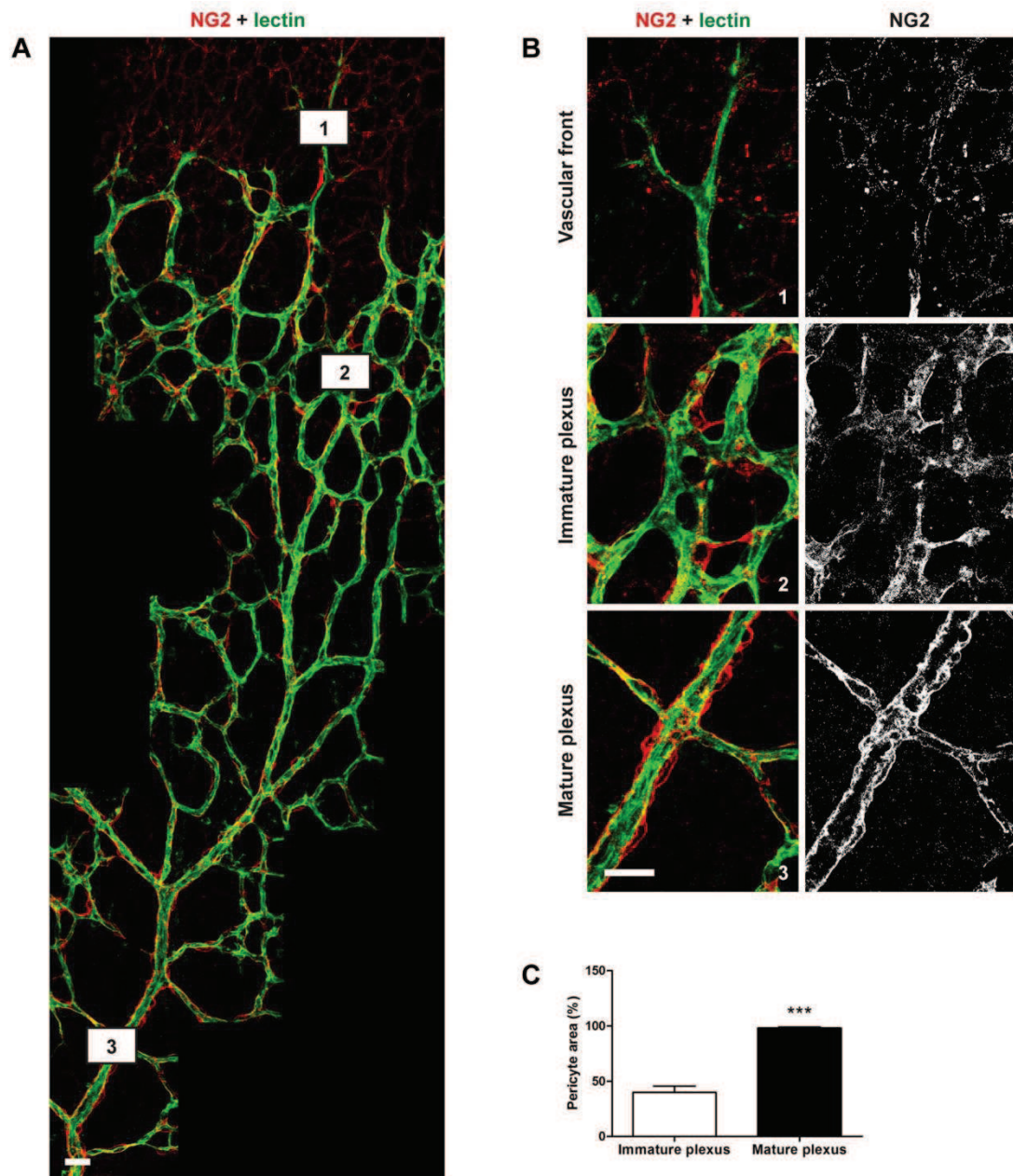
Retinas of 9-weeks old mice (A, B) or KO vWF, 9-weeks old mice (C) were stained with anti-vWF and lectin-FITC. An inset in (A) shows WPBs at higher magnification (arrows). Images were taken with a spinning-disk confocal microscope (A-C). (D) The graph shows the quantification of WPB density in veins, arteries and capillaries of (B) calculated as the *ratio* of vWF/lectin areas as described in Materials and Methods. A minimum of 3 fields/retina for each region were quantified and the average of 6 retinas is plotted (Student *t*-test, \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ). Scale bars: 20  $\mu\text{m}$  (A, B, C).



**Figure 2. WPB vessel density in the vascular network of the developing retina.**

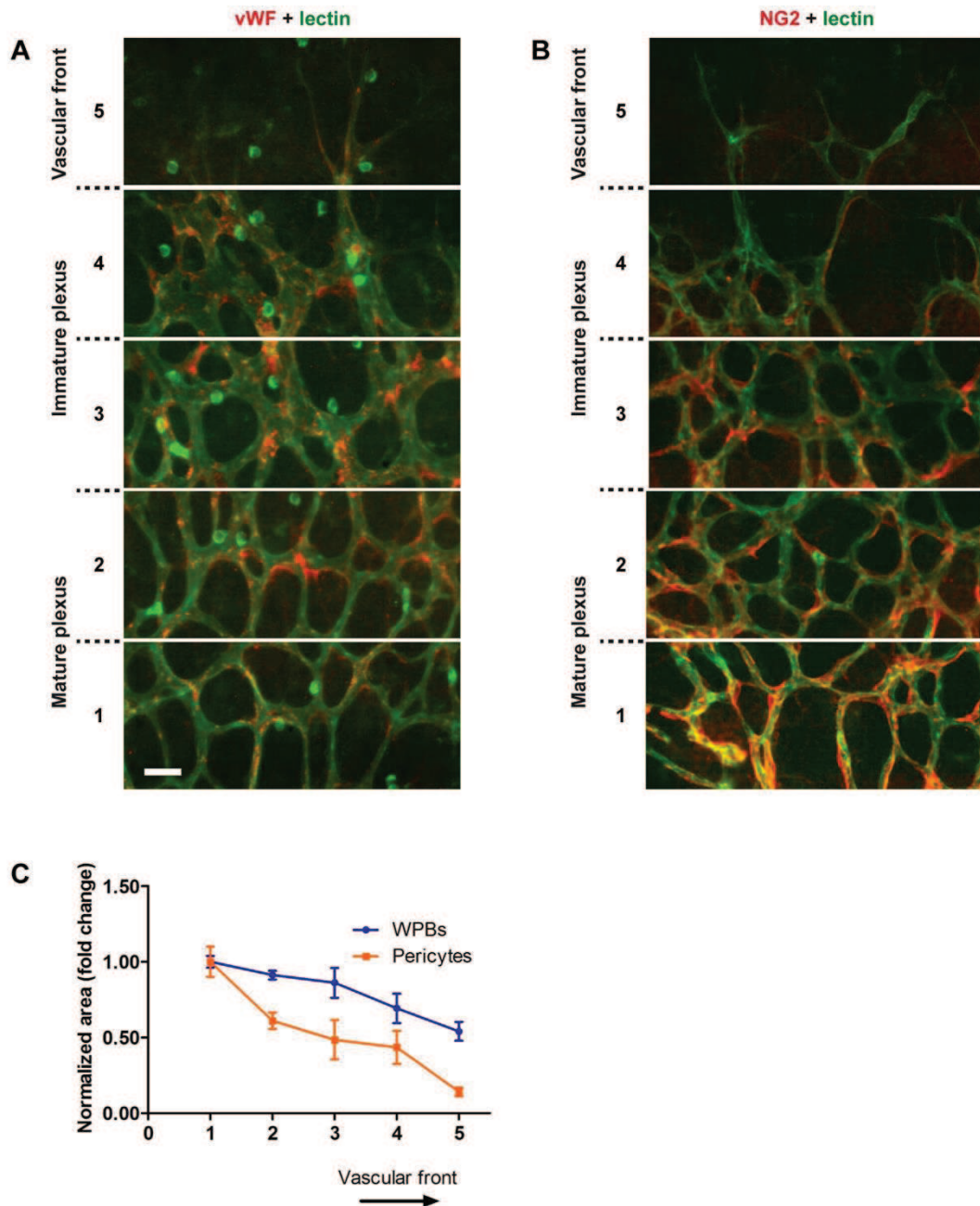
Retinas of WT, P6 mice (A, B) were stained with anti-vWF antibody and lectin-FITC. Images acquired with a spinning-disk confocal microscope (B) were used to quantify WPB area (C) and secreted vWF area (D) in the different regions of developing retina: tip cells (1), immature plexus (2, 3) and mature plexus (4, 5). WPB density in vessels (C) and secreted vWF (D) were calculated as the *ratio* of vWF/lectin areas as described in Materials and Methods. A minimum of 3 fields/retina for each region were quantified and the average of 5 retinas is plotted (Student *t*-test, \*\*\*,  $P < 0.001$ ). Scale bars: 20  $\mu\text{m}$  (A, B, E).





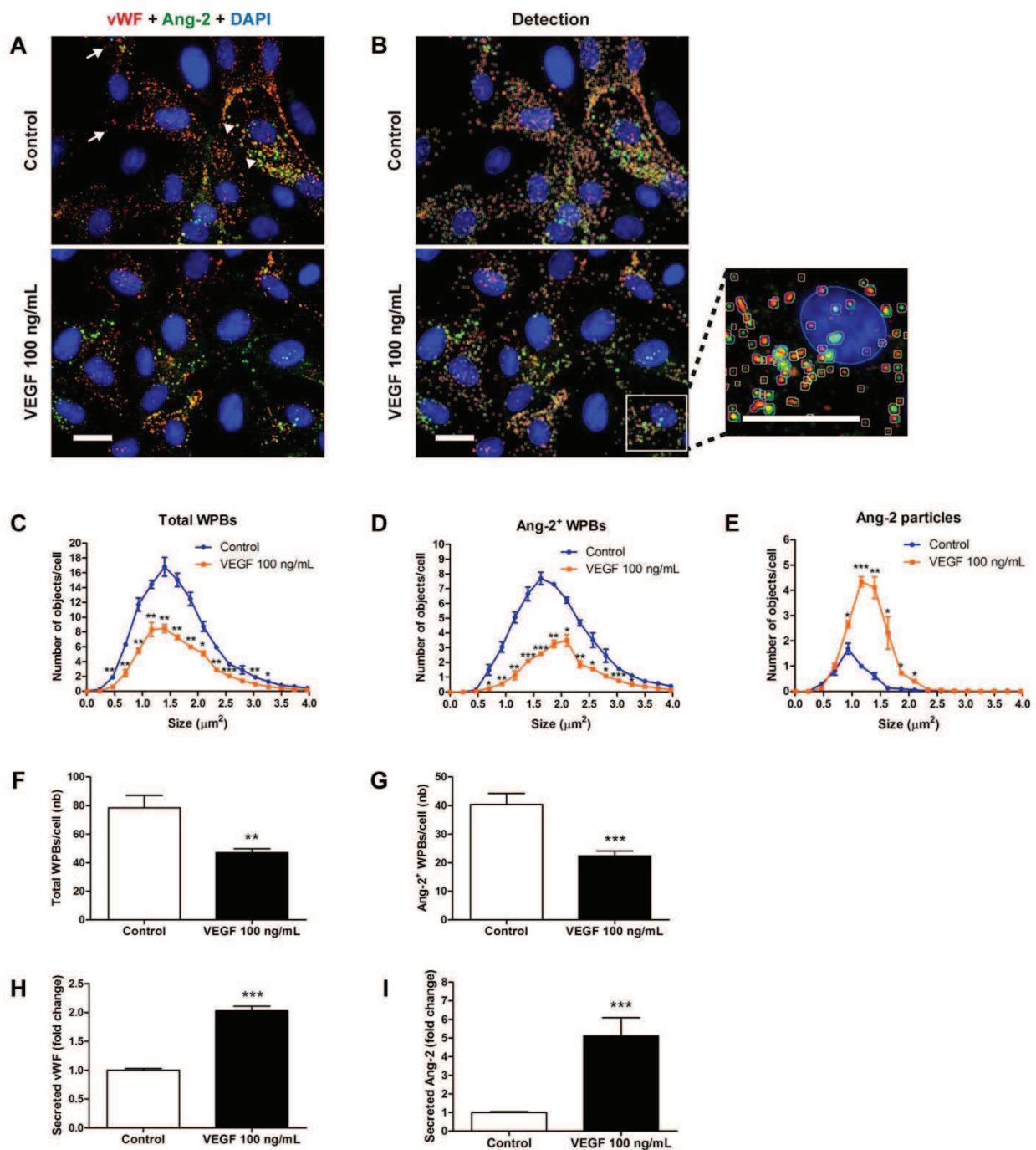
**Figure 3. Pericyte coverage of vessels in the vascular network of the developing retina.**

Retinas of P6 mice were stained with anti-NG2 and lectin-FITC and the structure of pericyte network was observed with a laser scanning confocal microscope (A, B). Images acquired with a spinning-disk confocal microscope were used to quantify pericyte area (C) in immature plexus (2) and in mature plexus (3). Pericyte coverage (C) was calculated as the *ratio* of NG2/lectin areas as described in Materials and Methods. 10 fields/retina for each region were quantified and the average of 5 retinas is plotted (Student *t*-test, \*\*\*,  $P < 0.001$ ). Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 4. WPB density and pericyte coverage of vessels spatially correlate in the developing retinal vascular network.**

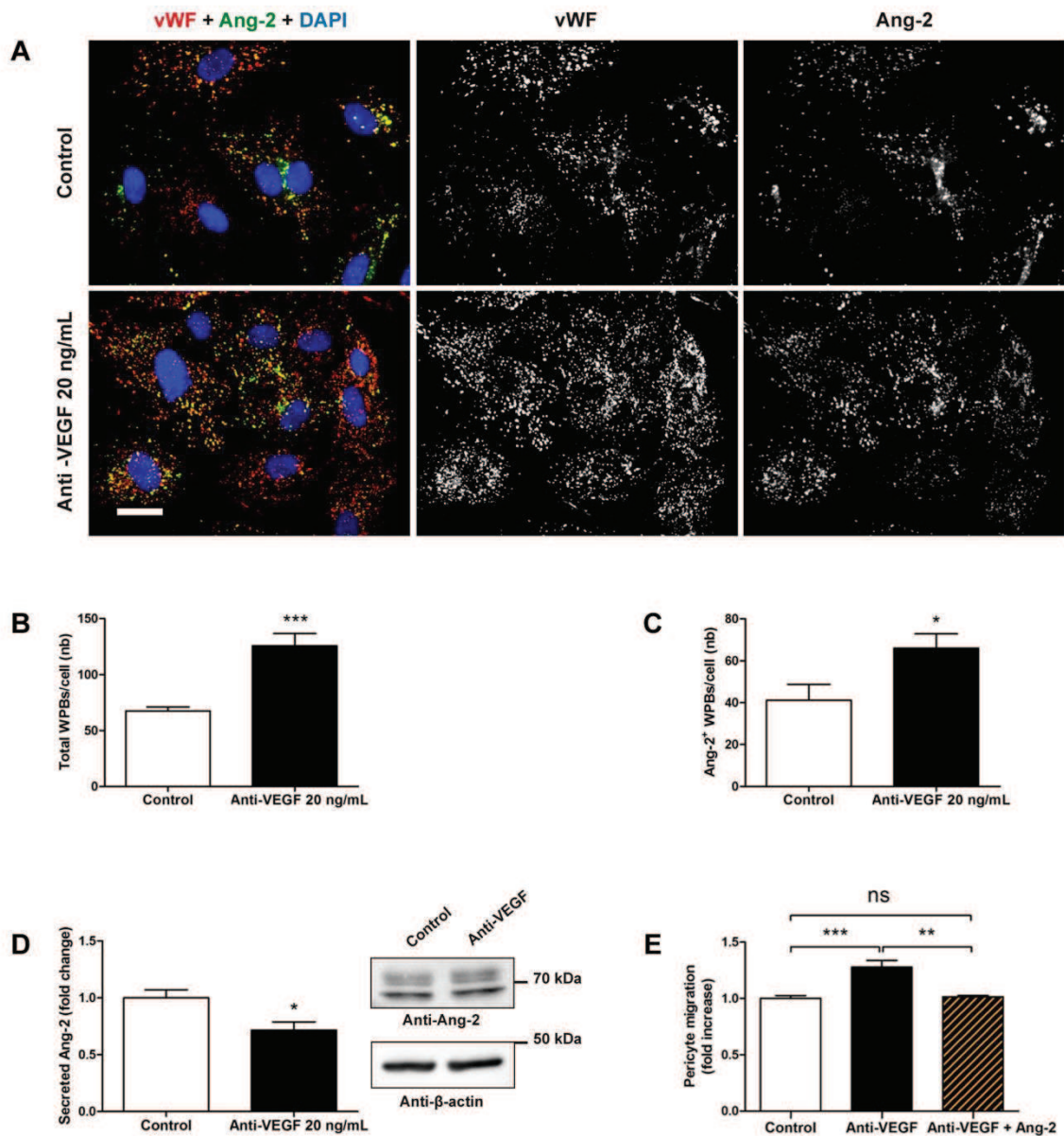
Retinas of P6 mice were stained with anti-vWF antibody (A) or with anti-NG2 antibody (B) and lectin-FITC. Images acquired with a Nanozoomer digital slide scanner (40X) were used to quantify WPB and pericyte area (C) from the vascular front: vascular front with tip cells and stalk cells (slice 5) and immature plexus (slices 1-4). Starting from a distance of 400  $\mu\text{m}$  from the vascular front, each vessel branch ( $n=3$ ) was divided into 5 slices of the same size (80  $\mu\text{m}$ ) along the branching axis. The value of the more distant slice from the vascular front (400  $\mu\text{m}$ ) was considered as 1 and the values of the other slices toward the vascular front (80  $\mu\text{m}$ , 160  $\mu\text{m}$ , 240  $\mu\text{m}$ , 320  $\mu\text{m}$ ) were normalized to 1 and plotted in Figure 4C. Vessel area occupied by WPBs and pericyte coverage of vessels were quantified as the *ratio* between the intensity of vWF or NG2 and lectin staining for each slice and plotted as normalized values of the vascular front. The average of 3 retinas is plotted. Correlation was evaluated with a Pearson test ( $r^2=0.85$  and \*,  $P<0.05$ ). Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ .



**Figure 5. VEGF induces WPB exocytosis and Ang-2-related secretion by ECs.**

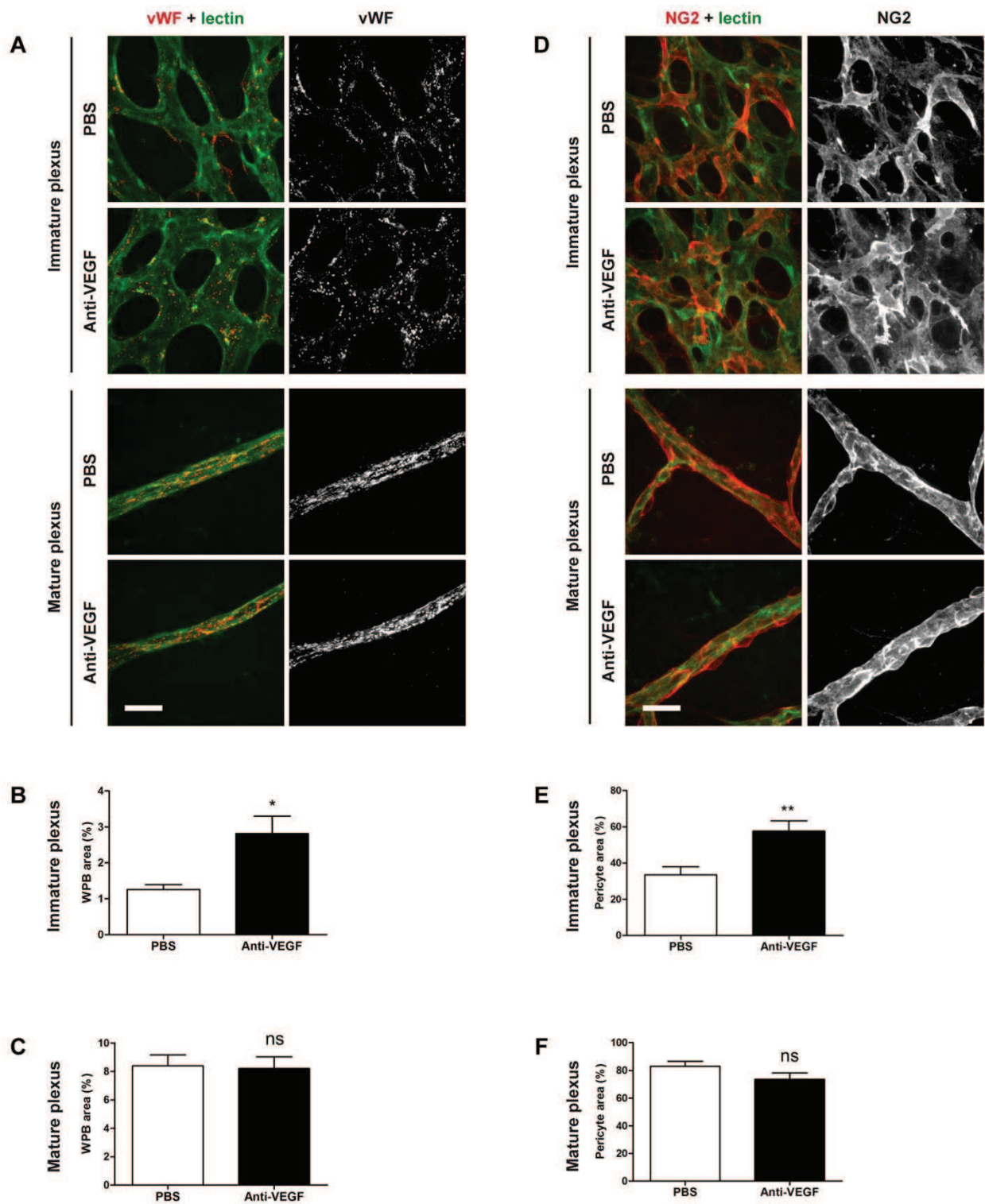
HUVECs were starved in EBM-2 for 5 hours and fresh EBM-2 containing 100 ng/mL VEGF<sub>165</sub> was added for 3 hours. HUVECs were stained with anti-vWF and anti-Ang-2 and pictures were acquired with a spinning-disk confocal microscope (A). Number of total WPBs (F) and Ang-2-positive WPBs (G) were quantified with an image analysis program as described in Materials and Methods (B). This program was also used to measure the size of total WPBs (C), Ang-2<sup>+</sup> WPBs (D) and Ang-2 particles (E). HUVEC supernatants were harvested to quantify secreted vWF (H) and secreted Ang-2 (I) by ELISA. The concentration of vWF and Ang-2 in EC supernatants was normalized to the whole protein amount of the corresponding cell lysates. A minimum of 10 fields/condition were quantified for each experiment and the average of 4 experiments is plotted (Student *t*-test, \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ). Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ .





**Figure 6. VEGF targeting inhibits WPB exocytosis and Ang-2 secretion by ECs and enhances pericyte motility.**

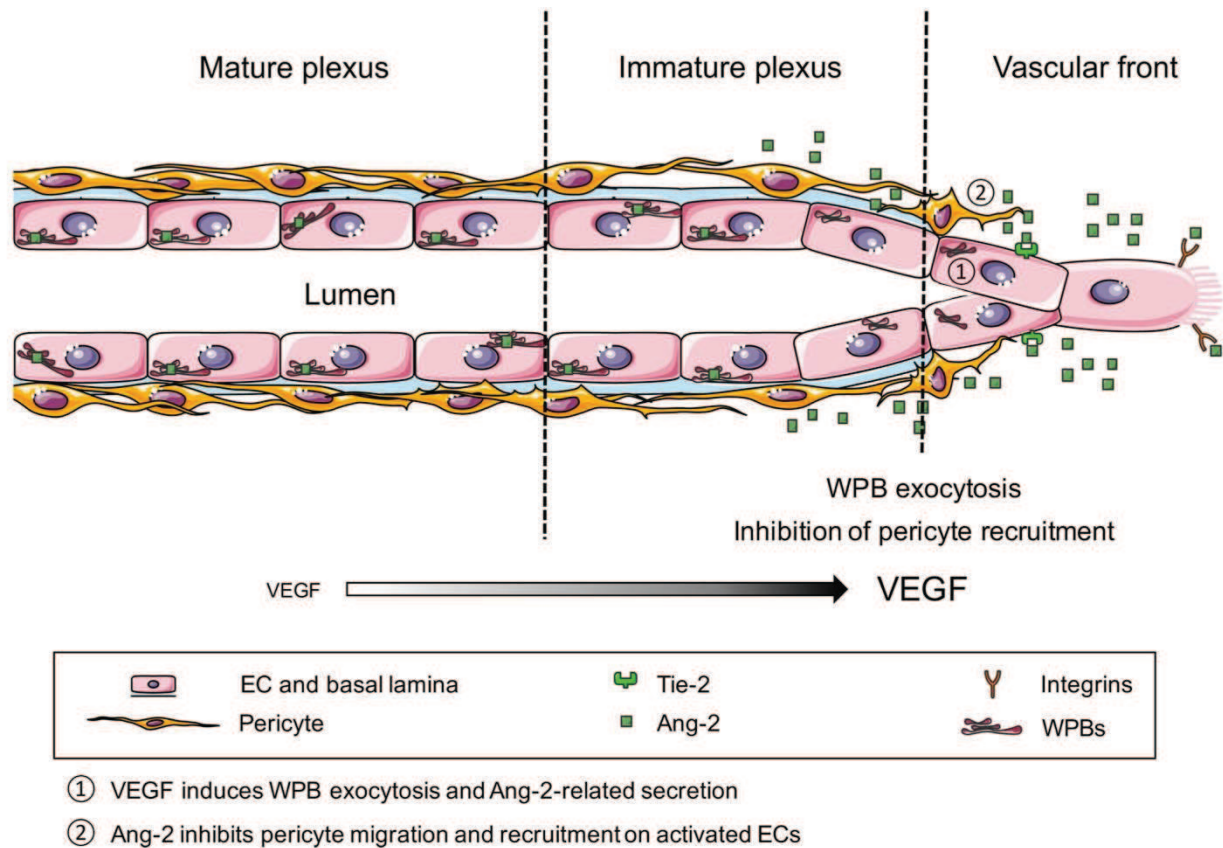
HUVECs were treated with EGM-2 containing 20 ng/mL of a soluble, anti-VEGF antibody for 5 hours. HUVECs were stained with anti-vWF and anti-Ang-2 and pictures were acquired with a spinning-disk confocal microscope (A). Total WPBs (B) and Ang-2-containing WPBs (C) were detected with the same image analysis program as in Figure 5. The graph shows the fold increase of pericyte migration relative to control cells. A minimum of 10 fields/condition were quantified for each experiment and the average of 3 experiments is plotted (Student *t*-test, \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*,  $P < 0.05$ ). Ang-2 secretion was quantified by ELISA. HUVEC supernatants were harvested to quantify secreted Ang-2 (D). The concentration of Ang-2 in EC supernatants was normalized to the whole protein amount of the corresponding cell lysates. Expression of Ang-2 by ECs was evaluated by Western-Blotting and normalized to  $\beta$ -actin. (E) HBVPs were allowed to migrate in the presence of supernatants of anti-VEGF-treated ECs. 400 ng/mL of recombinant Ang-2 was added as indicated. The graph shows the fold increase of pericyte migration relative to control cells. A minimum of 15 fields/condition were quantified for each experiment and the average of 4 experiments is plotted (Student *t*-test, \*\*\*,  $P < 0.001$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ). Scale bar: 20  $\mu$ m.



**Figure 7. VEGF targeting increases Weibel-Palade Body vessel density and pericyte coverage of remodeling vessels in the developing retina.**

P3 mice were intravitreally injected with 0.5  $\mu$ L/mice of 0.1  $\mu$ g/ $\mu$ L soluble, chimeric anti-VEGF antibody (anti-VEGF) or with 0.5  $\mu$ L/mice of PBS. Mice were euthanized after 72 hours and retinas were isolated to be stained with anti-vWF antibody and lectin-FITC (A). Images acquired with a spinning-disk confocal microscope (A) were used to quantify WPB area in immature plexus (B) and in mature plexus (C). Retinas of anti-VEGF injected P6 mice were stained with anti-NG2 and lectin-FITC (D). Images acquired with a spinning-disk confocal microscope (D)

were used to quantify pericyte area in immature plexus (E) and in mature plexus (F). WPB vessel density (B, C) and pericyte coverage (E, F) were calculated as the *ratio* of vWF/lectin and NG2/lectin areas respectively as described in Materials and Methods. A minimum of 3 fields/retina for each region were quantified and the average of at least 3 retinas is plotted (Student *t*-test, \*\*,  $P < 0.01$ ; \*,  $P < 0.05$ ). Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ .

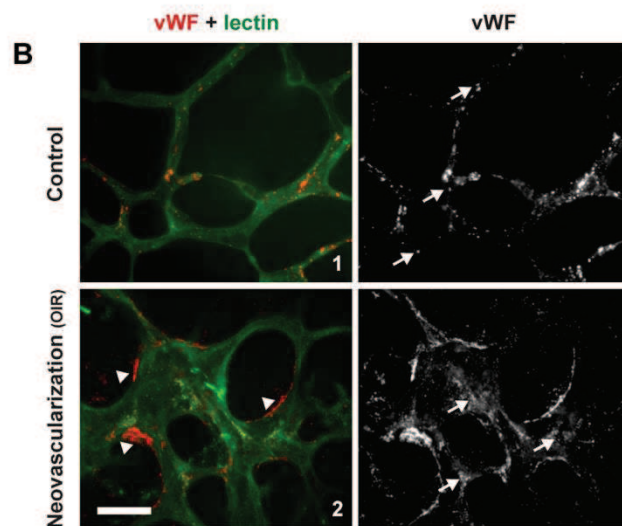
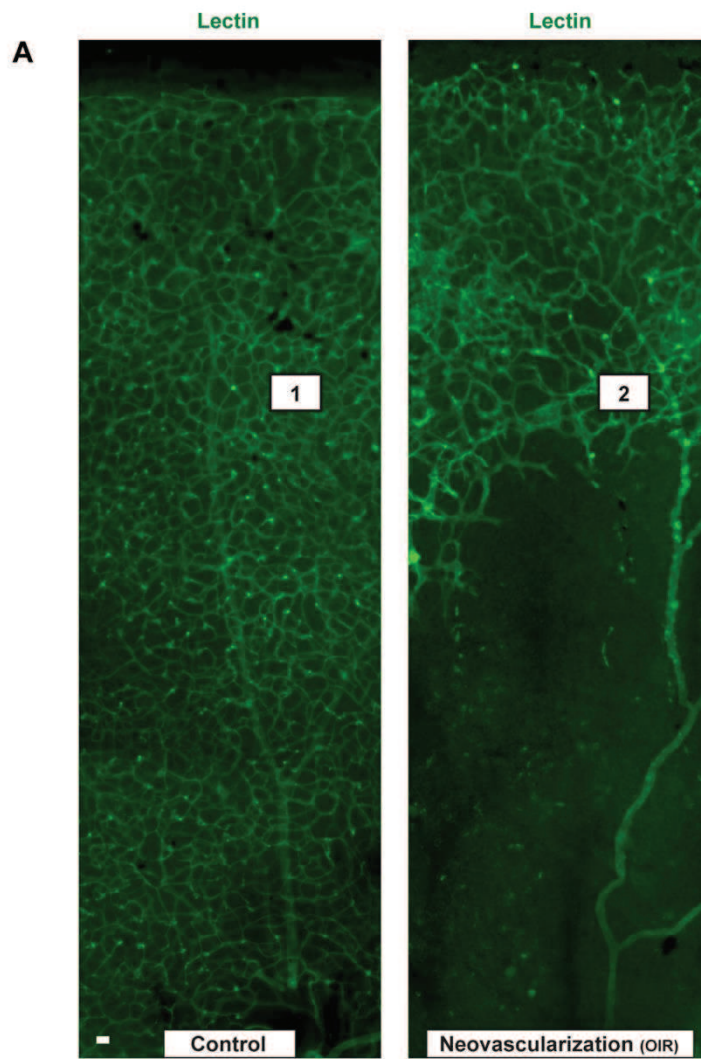


**Figure 8. VEGF induces WPB exocytosis and Ang-2-related secretion that in turn regulates pericyte recruitment: model.**

During retinal vessel angiogenesis, in the mature plexus, vessels are quiescent and abundantly covered by pericytes while at the angiogenic front, vessels are activated by high doses of VEGF. In this model we propose that VEGF induces WPB exocytosis at the angiogenic front. Secreted Ang-2 could in part induce tip cell migration (Felcht *et al.*, 2012), and in part inhibit pericyte recruitment on angiogenic vessels. Thus, we propose a model in which WPB exocytosis spatiotemporally regulates pericyte recruitment on the developing vasculature. Designed with templates modified from Servier (<http://smart.servier.com/>).

## 5. Figures supplémentaires de l'Article 2

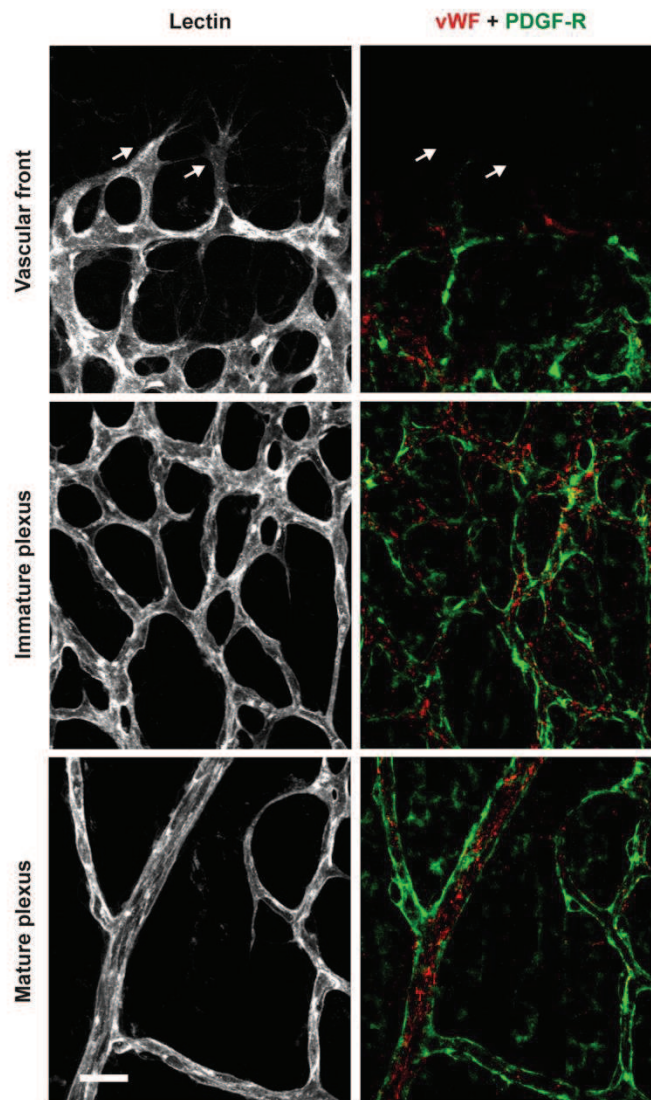




**Figure S1. Behavior of WPBs in the OIR model of neovascularization.**

Pup mice with nursing mothers were exposed to 75% oxygen at postnatal (P) day P7 for 5 consecutive days. At day P12, mice were returned to room air and at day P17, mice were sacrificed and eyes were enucleated. Retinas of control (1) and OIR-treated (2) mice were isolated to be stained with anti-vWF antibody and lectin-FITC (A, B). Images acquired with a

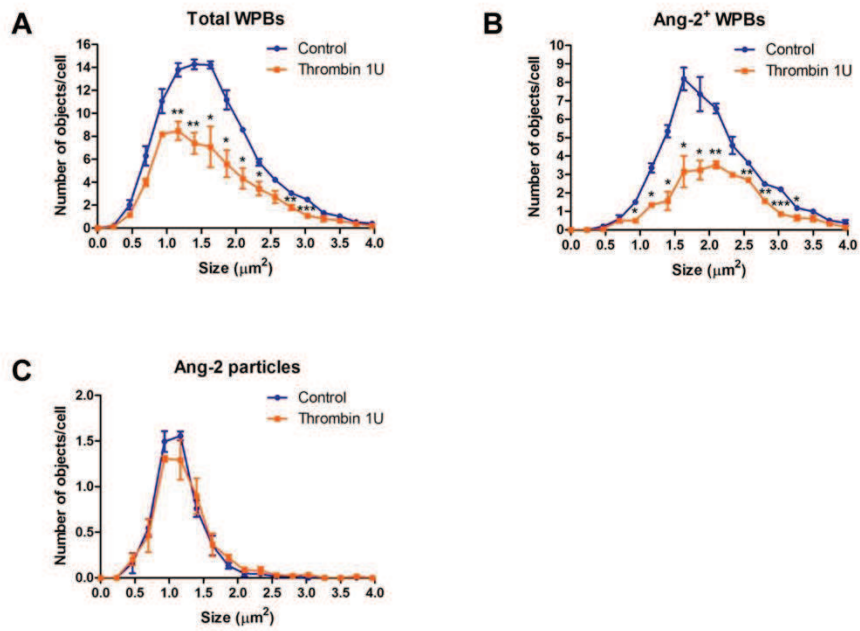
spinning-disk confocal microscope (B) show the tissular distribution of WPBs (arrows) and secreted vWF (arrowheads). Scale bars: 20  $\mu$ m.



**Figure S2. PDGFR- $\beta$  and vWF co-staining in retinal vessels of the developing retina.**

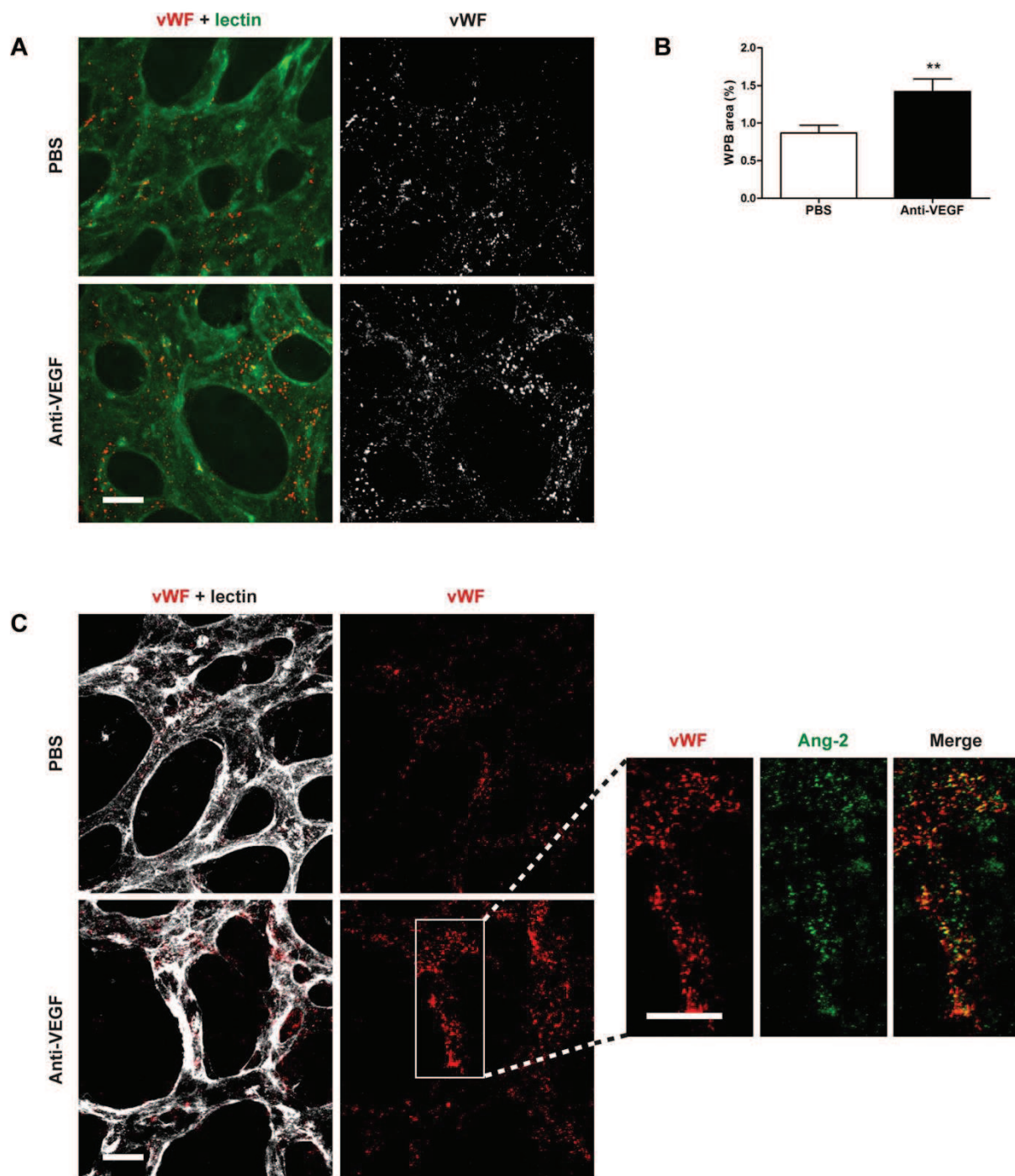
Retinas of P6 mice, were stained with anti-PDGFR- $\beta$  and anti-vWF antibodies and lectin-FITC. The localization of pericytes and WPBs were observed with a laser scanning confocal microscope in the different regions of developing retina: vascular front with tip cells and stalk cells, immature plexus and mature plexus. Arrows (vascular front) show tip cells that are not covered by pericytes. Scale bar: 20  $\mu$ m.





**Figure S3. Thrombin induces WPB exocytosis by ECs.**

HUVECs were starved in EBM-2 for 1 hour and fresh EBM-2 containing 1U thrombin was added for 5 minutes. ECs were stained with anti-vWF and anti-Ang-2 and pictures were acquired with a spinning-disk confocal microscope to measure the size of total WPBs (A), Ang-2<sup>+</sup> WPBs (B) and Ang-2 particles (C) using the same image analysis program as in Figure 5. (A-C) show averages of n=3 experiments (Student *t*-test, \*\*\*, P<0.001; \*\*, P<0.01; \*, P<0.05).



**Figure S4. VEGF targeting inhibits WPB exocytosis.**

(A) P6 mice were intravitreally injected with 0.5  $\mu\text{L}$ /mice of 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  soluble, chimeric anti-VEGF antibody (anti-VEGF) or with 0.5  $\mu\text{L}$ /mice of PBS. Mice were euthanized after 5 hours and retinas were isolated to be stained with anti-vWF and lectin-FITC (A). Images acquired with a spinning-disk confocal microscope were used to quantify WPB area in immature plexus (B). WPB vessel density (B) was calculated as the *ratio* of vWF/lectin areas as described in Materials and Methods. A minimum of 3 fields/retina were quantified and the average of at least 3 retinas is plotted (Student *t*-test, \*\*,  $P < 0.01$ ). (C) P3 mice were intravitreally injected with 0.5  $\mu\text{L}$ /mice of 0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  soluble, chimeric anti-VEGF antibody (anti-VEGF) or with 0.5  $\mu\text{L}$ /mice of PBS. Mice were euthanized after 5 hours and retinas were isolated to be stained with anti-vWF and anti-Ang-2 antibodies and lectin-FITC. Pictures were acquired with a scanning laser confocal microscope (A). Insets show Ang-2 and vWF colocalization in ECs. Scale bars: 20  $\mu\text{m}$ .

**A**

Decreased protein	Protein function	Fold change (%)
Angiopoietin-2	Positive regulation of angiogenesis ( $P < 5.09 \cdot 10^{-6}$ )	14
EGF	Positive regulation of angiogenesis ( $P < 5.09 \cdot 10^{-6}$ )	34
IL-1 $\beta$	Positive regulation of angiogenesis ( $P < 5.09 \cdot 10^{-6}$ )	18
FGF acidic	Positive regulation of cell migration ( $P < 4.53 \cdot 10^{-8}$ )	16
	Positive regulation of angiogenesis ( $P < 5.09 \cdot 10^{-6}$ )	
HGF	Positive regulation of cell migration ( $P < 4.53 \cdot 10^{-8}$ )	13
	Positive regulation of angiogenesis ( $P < 5.09 \cdot 10^{-6}$ )	
IL-8	Positive regulation of cell migration ( $P < 4.53 \cdot 10^{-8}$ )	12
	Positive regulation of angiogenesis ( $P < 5.09 \cdot 10^{-6}$ )	
Thrombospondin-1	Positive regulation of cell migration ( $P < 4.53 \cdot 10^{-8}$ )	15
	Positive regulation of angiogenesis ( $P < 5.09 \cdot 10^{-6}$ )	
VEGF-C	Positive regulation of cell migration ( $P < 4.53 \cdot 10^{-8}$ )	15
	Positive regulation of angiogenesis ( $P < 5.09 \cdot 10^{-6}$ )	
Endothelin-1	Positive regulation of cell migration ( $P < 4.53 \cdot 10^{-8}$ )	21
HB-EGF	Positive regulation of cell migration ( $P < 4.53 \cdot 10^{-8}$ )	17
MMP-8	Positive regulation of cell migration ( $P < 4.53 \cdot 10^{-8}$ )	26
MMP-9	Positive regulation of cell migration ( $P < 4.53 \cdot 10^{-8}$ )	23
Platelet Factor 4 (PF4)	Positive regulation of cell migration ( $P < 4.53 \cdot 10^{-8}$ )	19
uPA	Positive regulation of cell migration ( $P < 4.53 \cdot 10^{-8}$ )	18
IGFBP-1	Positive regulation of cell growth	13
IGFBP-3	Positive regulation of cell growth	22
Prolactin	Positive regulation of cell proliferation	12
Serpin B5	ECM organization	23
TIMP-1	Metalloproteinase inhibitor	20
Pentraxin 3 (PTX3)	Inflammatory response	11

**B**

Increased protein	Protein function	Fold change (%)
PDGF-AB/PDGF-BB	Chemotaxis	18,3
ADAMTS-1	Negative regulation of angiogenesis	60,6
Vasohibin	Negative regulation of angiogenesis	10,9
PD-ECGF	Positive regulation of angiogenesis	15,9
Activin A	Negative regulation of cell proliferation	21,9
Amphiregulin	Positive regulation of cell proliferation	14,1
FGF-4	Positive regulation of cell proliferation	23,1
NRG1- $\beta$ 1	Positive regulation of cell proliferation	58,9
GM-CSF	Inflammatory response	40,8

**C**

Unchanged protein	Fold change (%)	Unchanged protein	Fold change (%)
Angiogenin	Unchanged	IGFBP-2	Unchanged
Angiopoietin-1	Unchanged	LAP (TGF- $\beta$ 1)	Unchanged
Angiostatin/Plasminogen	Unchanged	Leptin	Unchanged
Artemin	Unchanged	MCP-1	Unchanged
Coagulation Factor III	Unchanged	MIP-1 $\alpha$	Unchanged
CXCL16	Unchanged	PDGF-AA	Unchanged
DPPIV	Unchanged	Persephin	Unchanged
EG-VEGF	Unchanged	PIGF	Unchanged
Endoglin	Unchanged	Serpin E1	Unchanged
Endostatin/Collagen XVIII	Unchanged	Serpin F1	Unchanged
FGF basic	Unchanged	TIMP-4	Unchanged
FGF-7	Unchanged	Thrombospondin-2	Unchanged
GDNF	Unchanged	VEGF	Unchanged

**Table S1. VEGF targeting modulates the secretory program of ECs.**

HUVECs were treated with EGM-2 containing 20 ng/mL of a soluble, chimeric anti-VEGF antibody for 5 hours before the addition of EBM-2 for 1 hour. EC supernatants were harvested to perform the analysis of secreted molecules by using a proteome angiogenesis antibody array (R&D Systems). The signal corresponding to each molecule was quantified with Image Lab software and the *ratio* between untreated and treated cells was calculated. (A) shows proteins that were decreased in the supernatant of ECs treated with anti-VEGF compared with control. (B) shows the proteins were decreased in the supernatant of ECs treated with anti-VEGF compared with control. (C) shows proteins that did not show any difference. By using the Gene Ontology (GO) Enrichment tool (<http://geneontology.org>) we reported that the group of decreased genes had a relevant number of proteins classified in the category of “positive regulation of angiogenesis” with a p-value  $p < 4.37 \times 10^{-04}$ . The group of increased genes had a relevant number of proteins classified in the category of “negative regulation of angiogenesis” with a p-value  $p < 8.38 \times 10^{-03}$ .

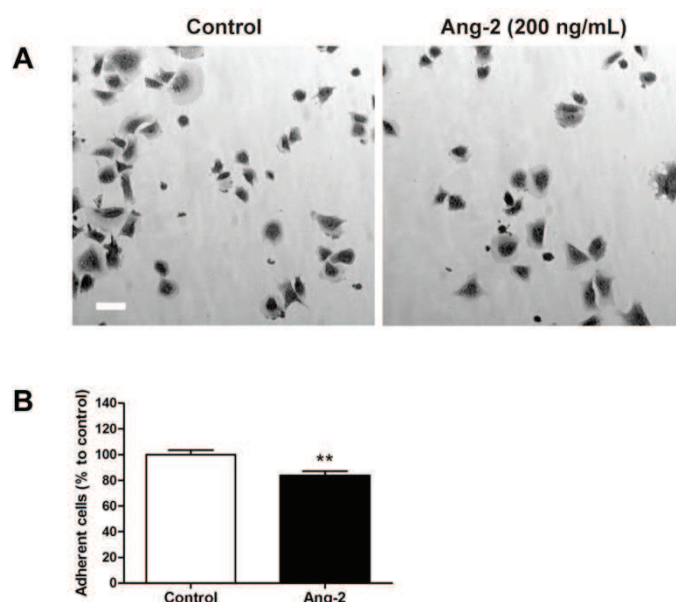
## 6. Résultats complémentaires

Dans le cadre de l'étude du lien entre l'activation endothéliale, l'exocytose des WPBs et le recrutement des péricytes au cours de l'angiogenèse physiologique, un ensemble de résultats non publiés ont été obtenus au cours de cette thèse et sont présentés succinctement dans cette partie.

### 6.1. Effet de l'Ang-2 sur l'adhérence des péricytes

Dans l'Article 2, nous avons montré que l'inhibition de l'activation endothéliale par l'anticorps l'anti-VEGF augmente le recrutement des péricytes dans la partie angiogénique des rétines (Figure 7) et nous avons observé *in vitro* que cet effet est lié à une inhibition de la sécrétion de l'Ang-2 par les cellules endothéliales (Figure 6A-5D) qui favorise la migration des péricytes (Figure 6E). Le recrutement des péricytes étant un mécanisme complexe mettant en jeu différents événements cellulaires, nous avons évalué l'effet de l'Ang-2 sur le mécanisme le plus précoce nécessaire à la motilité cellulaire : l'adhérence. Pour cela, les puits d'une plaque 96 puits sont coatés pendant une nuit avec 1,5 µg/mL de collagène de type I puis saturées pendant 2 heures avec du PBS-BSA 3%. Des péricytes humains ( $1,5 \times 10^4$  HBVP/puits) sontensemencés en présence ou non de 200 ng/mL d'Ang-2 recombinante humaine soluble et fixés environ 1 heure plus tard avec une solution de PBS-glutaraldéhyde 2,5% pendant 30 minutes. Après coloration au cristal violet, les puits sont photographiés et les cellules ayant adhéré sont comptées (Figure 25).





**Figure 25 : effet de l'Ang-2 sur l'adhérence des péricytes in vitro.** (A) Dans une plaque 96 puits coatée avec 1,5 µg/mL de collagène de type I, des péricytes humains (1,5 x 10<sup>4</sup> HBVP/puits) sont déposés en présence ou en absence de 200 ng/mL d'Ang-2 soluble puis fixés après environ 1 heure. Après coloration, les puits sont photographiés et les cellules ayant adhéré sont comptées. Barre d'échelle : 20 µm. (B) Le graphique montre la quantification du nombre de cellules adhérentes en présence ou en absence d'Ang-2. La moyenne des triplicatas de 3 expériences indépendantes est représentée pour chaque condition (Student t-test, \*\* P<0,01).

L'adhérence des cellules sur un support met en jeu des molécules d'adhérence telles que les intégrines. Le collagène de type I active la plupart des intégrines possédant une chaîne β1. La Figure 25 montre que l'ajout de 200 ng/mL d'Ang-2 soluble inhibe de 20% l'adhérence des péricytes sur le collagène de type I, ce qui suggère que l'Ang-2 pourrait avoir un effet direct sur le recrutement des péricytes en inhibant l'activation d'une ou de plusieurs intégrines β1.

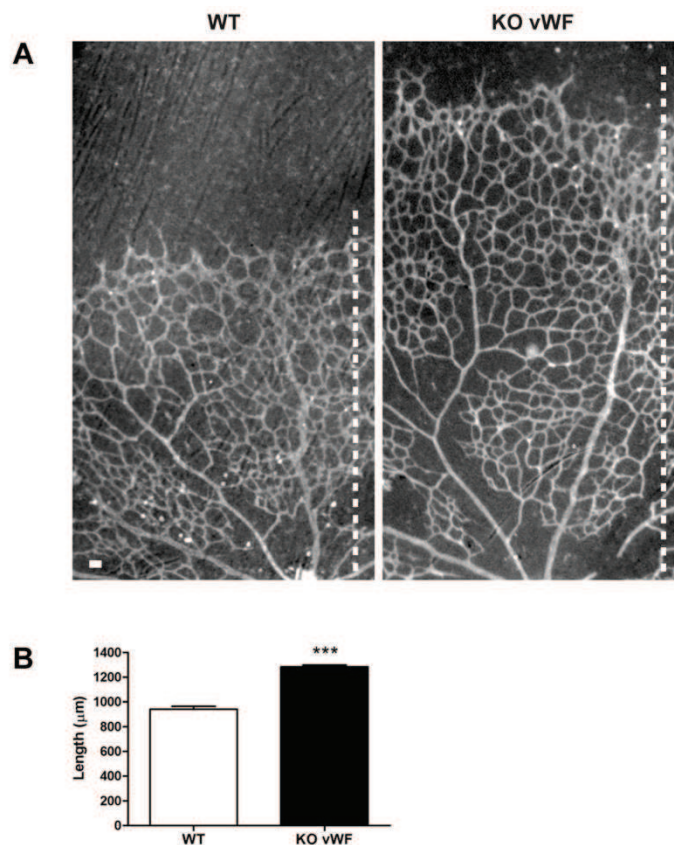
## 6.2. Effet de l'absence des WPBs sur l'angiogenèse

Dans le cadre de l'étude du rôle des WPBs au cours de l'angiogenèse physiologique, des souris KO vWF<sup>-/-</sup> nous ont été amicalement fournies par Cécile DENIS de l'Unité « Hémostase, Inflammation et Thrombose » (Inserm U1176, Le Kremlin-Bicêtre). Ce modèle est actuellement utilisé au laboratoire CRRET pour étudier l'effet de l'absence des WPBs sur l'angiogenèse dans un premier temps, et sur le recrutement des péricytes dans un second



temps. Dans l'Article 2, nous avons confirmé l'absence de WPBs dans les vaisseaux des rétines de souris adultes (Figure 1C). Nous avons évalué l'effet de l'absence des WPBs sur l'angiogenèse dans deux modèles d'angiogenèse physiologique : le modèle de la vascularisation de la rétine (Figure 26) et le modèle des anneaux aortiques (Figure 27).

L'effet de l'absence des WPBs sur l'angiogenèse physiologique de la rétine a été évalué par la quantification de la taille du réseau vasculaire. Pour cela, les rétines de souris WT et KO  $vWF^{-/-}$  P6 sont prélevées et le réseau vasculaire est marqué avec de la lectine-FITC comme indiqué dans la section Matériels et méthodes. Des mosaïques des rétines fluorescentes sont réalisées avec un microscope confocal inversé (Olympus) équipé d'un objectif 4x (NA 0.13) (Figure 26A). Pour la mesure de la taille du réseau, la distance entre le nerf optique et le front angiogénique (Figure 26A, pointillés) est mesurée sur les mosaïques avec le logiciel ImageJ ; les résultats sont présentés dans la Figure 26B.

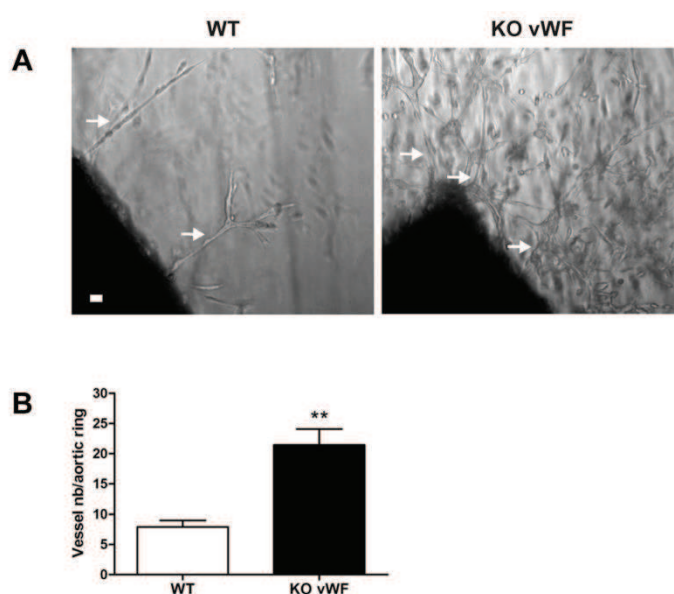


**Figure 26 : effet de l'absence des WPBs sur l'angiogenèse de la rétine.** (A) Les rétines de souris WT et KO vWF<sup>-/-</sup> P6 sont prélevées et le réseau vasculaire est marqué avec de la lectine-FITC. Des mosaïques des rétines sont réalisées avec un microscope confocal inversé et utilisées pour quantifier la taille du réseau vasculaire. Barre d'échelle : 20 µm. (B) Le graphique montre la quantification de la distance entre le nerf optique et le front angiogénique des rétines de souris WT et KO vWF<sup>-/-</sup> (pointillés). Pour chaque rétine, la distance des 4 pétales est mesurée et la moyenne de 14 rétines (WT) et de 15 rétines (KO vWF<sup>-/-</sup>) est représentée (Student t-test, \*\*\* P<0,001).

L'absence des WPBs perturbe le réseau vasculaire des rétines des souris KO vWF<sup>-/-</sup> P6 mis en place au cours de l'angiogenèse. La Figure 26B montre que la distance entre le nerf optique et le front angiogénique est 1,4 fois plus grande chez les souris KO vWF<sup>-/-</sup> que chez les souris WT (respectivement 1284 µm vs 940 µm), ce qui suggère que l'absence des WPBs augmente l'angiogenèse.

L'effet de l'absence des WPBs au cours de l'angiogenèse est évalué dans un second modèle d'angiogenèse physiologique : le modèle des anneaux aortiques. Pour cela, l'aorte de souris WT et KO vWF<sup>-/-</sup> adultes (9 semaines) est prélevée et coupée transversalement en

sections d'environ 1 mm d'épaisseur. Une goutte de Matrigel (100  $\mu$ L, BD Biosciences 356231) est déposée dans le fond des puits d'une plaque 48 puits. Après une incubation de 30 minutes à 37°C, l'anneau aortique est déposé transversalement sur la goutte de Matrigel polymérisé. Une nouvelle goutte de 100  $\mu$ L de Matrigel est déposée et incubée pour recouvrir l'anneau puis les puits sont remplis avec 300  $\mu$ L/puits de DMEM + 10% SVF + 1% P/S. Après 7 jours d'incubation à 37°C, les anneaux aortiques sont photographiés avec un système EVOS FLoid Cell Imaging Station (Figure 27A). La Figure 27B montre la quantification du nombre de vaisseaux se développant à partir des anneaux aortiques (flèches).



**Figure 27 : effet de l'absence des WPBs dans le modèle des anneaux aortiques.** (A) Les aortes de souris WT et KO  $vWF^{-/-}$  adultes (9 semaines) sont prélevées et coupées transversalement en sections d'1 mm d'épaisseur. Les anneaux aortiques sont mis en culture dans 300  $\mu$ L de DMEM + 10% SVF + 1% P/S et incubés pendant 7 jours à 37°C avant d'être photographiés. Barre d'échelle : 20  $\mu$ m. (B) Le graphique montre la quantification du nombre de vaisseaux se développant à partir des anneaux aortiques (flèches). La moyenne de 8 anneaux aortiques (WT) et de 7 anneaux aortiques (KO  $vWF^{-/-}$ ) est représentée (Student t-test, \*\*  $P < 0,01$ ).

La Figure 27 montre que le nombre de vaisseaux se développant à partir des anneaux aortiques est 2,6 fois plus élevé chez les souris KO  $vWF^{-/-}$  que chez les souris WT (respectivement 21 vaisseaux/anneau vs 8 vaisseaux/anneau), ce qui suggère une nouvelle

fois que l'absence des WPBs favorise l'angiogenèse et la formation de nouveaux vaisseaux. L'ensemble de ces résultats obtenus dans deux modèles d'angiogenèse physiologique montre que l'angiogenèse est augmentée chez les souris KO vWF<sup>-/-</sup>, ce qui est en accord avec des données de la littérature ayant montré une angiogenèse accrue dans le modèle de l'oreille de souris (Starke *et al.*, 2011). Dans cet article, l'équipe d'Anna Maria RANDI montre que le réseau vasculaire est plus dense dans les oreilles des souris KO vWF<sup>-/-</sup> que dans les oreilles des souris témoins.

L'effet de l'absence des WPBs sur le recrutement des péricytes au cours de l'angiogenèse est actuellement en cours d'investigation dans ce modèle.

## *VI. DISCUSSION*



L'activation endothéliale est une étape clé de l'angiogenèse physiologique et pathologique. Chez l'adulte, sous l'effet de facteurs environnementaux, les cellules endothéliales quiescentes dans les vaisseaux stables adoptent un phénotype activé qui se caractérise par la prolifération des cellules endothéliales, la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques comme l'Ang-2, l'exocytose des WPBs et la relocalisation à la surface cellulaire de protéines nucléaires comme la nucléoline. La déstabilisation de l'endothélium qui en résulte provoque un détachement des péricytes nécessaires au maintien de la quiescence et de la stabilité des vaisseaux. Ainsi, la perte des péricytes provoquée par l'activation endothéliale est un évènement important pour le remodelage du réseau vasculaire au cours de l'angiogenèse chez l'adulte. Si l'activation endothéliale est un phénomène transitoire dans l'angiogenèse physiologique, la persistance des *stimuli* pro-angiogéniques dans des contextes pathologiques comme les cancers est responsable du maintien de l'activation endothéliale. Il en résulte que les cellules endothéliales restent dans un état activé inhibant le recrutement des péricytes et donc la stabilisation des vaisseaux nouvellement formés. Ce manque de maturation et de stabilisation des néo-vaisseaux génère un réseau vasculaire désorganisé et peu fonctionnel provoquant de l'hypoxie et la persistance des signaux pro-angiogéniques contribuant au maintien de l'activation endothéliale. Au cours de l'angiogenèse tumorale, l'absence de maturation de l'endothélium limite la distribution des chimiothérapeutiques et des cellules immunitaires tout en favorisant l'intravasation des cellules tumorales et la formation de métastases. Ainsi, il apparaît que l'inhibition de l'activation endothéliale puisse être une stratégie innovante dans le traitement de pathologies associées à une dérégulation de l'angiogenèse comme les cancers mais également les rétinopathies. Dans cette optique, le but de cette thèse a été d'étudier les mécanismes responsables de cette activation et son inhibition. Dans ce contexte, nous avons choisi d'étudier le rôle des WPBs et de la nucléoline au cours de l'angiogenèse et d'évaluer les effets de leur ciblage.

## **1. Les mécanismes de l'activation endothéliale au cours de l'angiogenèse physiologique**

### **1.1. Le VEGF régule l'exocytose des WPBs et la sécrétion de l'Ang-2**

Nous avons montré *in vitro* que le VEGF induit une diminution de la densité des WPBs dans les cellules endothéliales et une augmentation importante de la quantité de vWF dans

le surnageant des cellules (Article 2, Figure 5). Ce résultat montre que le VEGF induit la sécrétion du vWF *via* la régulation de l'exocytose des WPBs. Les WPBs contiennent également le facteur pro-angiogénique Ang-2 (Fiedler *et al.*, 2004). Nous avons montré que la majorité de l'Ang-2 est contenue dans les WPBs et que seulement 10% de la quantité totale d'Ang-2 est présente sous forme de vésicules cytoplasmiques libres (Article 2, Figure 5). Nous avons également mis en évidence que les cellules endothéliales activées contiennent une population hétérogène de WPBs, 40% des WPBs contenant de l'Ang-2 et 60% des WPBs ne contenant pas d'Ang-2 (Article 2, Figure 5). De façon similaire aux résultats obtenus pour le vWF, nous avons montré que le VEGF induit une diminution de la densité des WPBs contenant de l'Ang-2 dans les cellules endothéliales et une augmentation de la quantité d'Ang-2 dans le surnageant des cellules (Article 2, Figure 5). S'il était déjà connu que le VEGF induit la sécrétion du vWF (Xiong *et al.*, 2009), nous avons clairement montré que le VEGF induit la sécrétion du vWF *via* l'exocytose des WPBs. De plus, le VEGF induit l'exocytose spécifique de WPBs contenant de l'Ang-2 (Article 2, Figure 5) tandis que l'inhibition de la voie de signalisation du VEGF par l'utilisation d'un anticorps anti-VEGF diminue l'exocytose des WPBs contenant de l'Ang-2 (Article 2, Figure 6). *In vivo* dans le modèle murin de l'angiogenèse au cours du développement de la rétine, la distribution du VEGF est spatialement régulée et forme un gradient avec la plus forte concentration au niveau du front angiogénique et du plexus immature (Gerhardt *et al.*, 2003). Dans ce modèle, nous avons montré que la distribution des WPBs dans le réseau vasculaire forme un gradient inversement corrélé au gradient de VEGF. La densité des WPBs est plus faible dans le plexus immature, exposé à de fortes concentrations de VEGF, que dans le plexus mature où le VEGF est moins abondant (Article 2, Figure 2). De façon cohérente, l'inhibition de la voie de signalisation du VEGF par l'injection d'un anticorps anti-VEGF perturbe la distribution des WPBs dans les vaisseaux de la rétine en développement. De façon similaire aux résultats obtenus *in vitro* dans les cellules endothéliales activées, l'inhibition du VEGF *in vivo* induit une augmentation de la densité des WPBs dans les vaisseaux angiogéniques sans modifier la densité des WPBs dans les vaisseaux stables près du nerf optique (Article 2, Figure 7). L'ensemble de ces résultats montre que l'inhibition du VEGF augmente la densité des WPBs dans les vaisseaux angiogéniques. Les résultats *in vitro* suggèrent que l'augmentation de la densité des WPBs pourrait être la conséquence d'une inhibition de l'exocytose. *In vivo*, nous ne pouvons pas corréler la densité des WPBs avec l'exocytose donc nous avons testé l'effet d'un traitement court avec l'anticorps anti-VEGF (5 heures) pour dissocier l'effet relativement rapide d'une inhibition de l'exocytose et les effets à plus long

terme comme des modifications d'expression génique ou l'inhibition de l'angiogenèse, sachant que les traitements prolongés avec l'anti-VEGF inhibent l'angiogenèse (Gerhardt *et al.*, 2003). Nous avons montré que l'inhibition du VEGF dans ces conditions induit également une augmentation de la densité des WPBs au niveau du front angiogénique mais n'a pas d'effet dans les vaisseaux stables (Article 2, Figures S4A et S4B). L'ensemble de ces données suggèrent que l'inhibition du VEGF augmente la densité vasculaire des WPBs en bloquant leur exocytose dans ce modèle. Ainsi, le VEGF pourrait induire l'exocytose des WPBs contenant de l'Ang-2 au niveau du front angiogénique.

## **1.2. Quelles voies de signalisation du VEGFR-2 pourraient réguler l'exocytose des WPBs contenant de l'Ang-2 ?**

L'équipe d'Hellmut G. AUGUSTIN a montré que le stockage de l'Ang-2 et de la P-sélectine dans les WPBs est mutuellement exclusif, ce qui confirme l'hétérogénéité des WPBs (Fiedler *et al.*, 2004). Puisque les WPBs sont impliqués dans des événements biologiques aussi variés que la coagulation, l'inflammation ou l'angiogenèse, il est possible que chaque population de WPBs réponde de manière préférentielle au *stimulus* correspondant. Par exemple, il est possible que les WPBs contenant la P-sélectine répondent fortement à l'histamine, un puissant médiateur de l'inflammation et des réponses d'hypersensibilité immédiate. De la même façon, nous avons montré que le VEGF induit l'exocytose des WPBs contenant de l'Ang-2 et la mobilisation des vésicules cytoplasmiques d'Ang-2 (Article 2, Figure 5). La sécrétion du vWF par le VEGF met en jeu la phosphorylation de la tyrosine 1175 du VEGFR-2 (Xiong *et al.*, 2009). Le VEGFR-2 activé mobilise ensuite au moins deux cascades de signalisation : la voie de la PLC- $\gamma$  et la voie de l'AC et de la PKA. Après la fixation du VEGF, la voie de la PLC- $\gamma$  activée par la phosphorylation Y1175 du VEGFR-2 met en jeu le Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Xiong *et al.*, 2009) et la PKC- $\delta$  (Lorenzi *et al.*, 2008) tandis que la voie de l'AC utilise l'AMPc (Xiong *et al.*, 2009). Par ailleurs, nous avons montré que la thrombine induit également l'exocytose des WPBs Ang-2<sup>+</sup> (Article 2, Figure S3B). La fixation de la thrombine sur les récepteurs PARs induit l'exocytose des WPBs *via* l'activation des voies de signalisation de l'AC (Cleator *et al.*, 2006) et de la PLC- $\gamma$  / Ca<sup>2+</sup> intracellulaire (Rondaij *et al.*, 2008 ; van den Biggelaar *et al.*, 2014). Ainsi, il est possible que l'exocytose des WPBs Ang-2<sup>+</sup> induite par le VEGF implique ces voies de signalisation. Des études complémentaires seraient nécessaires pour déterminer

avec certitude les voies de signalisation spécifiquement impliquées dans l'exocytose des WPBs Ang-2<sup>+</sup> induite par le VEGF au cours de l'angiogenèse physiologique.

### **1.3. L'Ang-2 pourrait-elle être sécrétée par d'autres voies que par l'exocytose des WPBs ?**

Nous avons montré que l'Ang-2 est sécrétée par les cellules endothéliales activées par le VEGF et que la sécrétion de l'Ang-2 est liée à l'exocytose des WPBs qui la contiennent. Cependant, nous avons également observé qu'une faible proportion de l'Ang-2 n'est pas contenue dans les WPBs et qu'elle est aussi présente sous la forme de vésicules cytoplasmiques libres, suggérant une autre voie de stockage et de sécrétion de l'Ang-2 que celle passant par les WPBs (Article 2, Figure 5). Il serait intéressant de compléter les analyses pour caractériser ces particules d'Ang-2. Une étude récente a montré une sécrétion basale de l'Ang-2 *via* des exosomes et la voie de signalisation PI3K/Akt/eNOS par des cellules endothéliales quiescentes (Ju *et al.*, 2014). Les exosomes sont de petites vésicules intracellulaires faisant l'objet d'un nombre grandissant d'études en raison de leur rôle majeur dans la communication intercellulaire. Nous avons observé *in vitro* que le traitement des cellules endothéliales avec du VEGF pendant 3 heures induit une augmentation du nombre de vésicules d'Ang-2 dans le cytoplasme, ces particules étant plus petites que les WPBs et non marquées par l'anticorps anti-vWF (Article 2, Figure 5). Il est envisageable que le VEGF puisse induire à la fois une sécrétion de l'Ang-2 *via* l'exocytose des WPBs qui la contiennent et une accumulation de l'Ang-2 dans d'autres types de vésicules pour un autre mode de sécrétion. Ainsi, la nature et le comportement de ces vésicules restent à caractériser. Il est également envisageable que le VEGF induise une concentration de l'Ang-2 dans ces vésicules qui pourront fusionner avec les WPBs pour enrichir la population de WPBs Ang-2<sup>+</sup> pour répondre efficacement à un *stimulus* pro-angiogénique. Enfin, il est possible que ce traitement relativement court des cellules endothéliales avec le VEGF suffise à initier l'augmentation de l'expression de l'Ang-2, sachant que le VEGF peut augmenter l'expression de l'Ang-2 (Mandriota et Pepper, 1998 ; Oh *et al.*, 1999). Quoiqu'il en soit, la sécrétion de l'Ang-2 *via* l'exocytose des WPBs est probablement la principale voie de sécrétion de l'Ang-2 par les cellules endothéliales activées étant donné que 90% de l'Ang-2 intracellulaire est contenue dans les WPBs et que la fraction non associée aux WPBs est largement minoritaire.

## 1.4. L'exocytose des WPBs inhibe le recrutement des péricytes sur les vaisseaux activés

Le recouvrement des vaisseaux par les péricytes a également été étudié dans le modèle du développement vasculaire de la rétine. Nous avons quantifié pour la première fois le recouvrement du réseau vasculaire de la rétine en développement par les péricytes. Nous avons montré que le recouvrement des vaisseaux est maximal dans le plexus mature (98% de recouvrement) et diminue graduellement vers le plexus immature où seulement 40% de l'aire vasculaire est recouverte par des péricytes (Article 2, Figure 3). Les péricytes ne sont pas détectables au niveau des « tip cells » (Article 2, Figures 3 et S2), un phénotype décrit dans la littérature comme une période de temps au cours du développement appelée fenêtre de plasticité pendant laquelle l'absence de péricytes permet aux cellules endothéliales activées d'être sensibles aux facteurs pro-angiogéniques et de remodeler le réseau vasculaire (Benjamin *et al.*, 1998). Ainsi, nous avons mis en évidence une corrélation spatiale entre la densité des WPBs et le recouvrement des vaisseaux par des péricytes au cours de l'angiogenèse physiologique, ce qui suggérait que le gradient de VEGF régule à la fois l'exocytose des WPBs et le recrutement des péricytes. L'inhibition du VEGF par l'injection intravitréenne d'un anticorps anti-VEGF augmente le recouvrement des vaisseaux par des péricytes dans le plexus immature mais n'a pas d'effet dans le plexus mature (Article 2, Figure 7), suggérant un lien fonctionnel entre l'exocytose des WPBs et le recrutement des péricytes sur les vaisseaux. *In vitro*, nous avons montré que l'inhibition de l'exocytose des WPBs et de la sécrétion liée d'Ang-2 par les cellules endothéliales traitées avec l'anti-VEGF favorise la migration des péricytes et que cet effet est perdu par l'ajout d'Ang-2 recombinante, suggérant que l'Ang-2 inhibe directement la motilité des péricytes (Article 2, Figure 6). Dans la rétine, l'Ang-2 induit un détachement des péricytes associé aux rétinopathies diabétiques (Hammes *et al.*, 2004) tandis que l'inhibition de l'Ang-2 favorise au contraire le recrutement des péricytes (Hammes *et al.*, 2004 ; Srivastava *et al.*, 2014 ; Park *et al.*, 2017). Ainsi, nous avons montré que le gradient de VEGF régule l'exocytose des WPBs contenant de l'Ang-2 puisque le traitement avec l'anti-VEGF provoque l'apparition de WPBs contenant de l'Ang-2 au niveau du plexus immature (Article 2, Figure S4C). Ces résultats suggèrent que l'Ang-2 libérée inhiberait le recrutement des péricytes pour maintenir la fenêtre de plasticité nécessaire au remodelage du réseau vasculaire au cours de l'angiogenèse physiologique (Article 2, Figure 8). Toutefois, l'observation par immunofluorescence de l'Ang-2 contenue dans les WPBs de la rétine est techniquement



compliquée, probablement parce qu'il s'agit d'une petite protéine relativement peu abondante.

### **1.5. Par quels mécanismes l'Ang-2 pourrait-elle réguler le recrutement des péricytes sur les vaisseaux ?**

Dans la rétine en développement, l'Ang-2 est fortement exprimée au niveau du front angiogénique, où elle participe à la migration des « tip cells » et à la prolifération des « stalk cells », tandis que son expression diminue significativement dans les monocouches confluentes de cellules endothéliales quiescentes (Felcht *et al.*, 2012). Il a été montré que les effets différents de l'Ang-2 entre les « tip cells » et les « stalk cells » dépendent des récepteurs activés par l'Ang-2. A la différence des « stalk cells », les « tip cells » n'expriment pas le récepteur Tie-2. Par conséquent, l'Ang-2 favorise la migration des « tip cells » en activant les intégrines  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$  et  $\alpha5\beta1$  (Brooks *et al.*, 1994 ; Koh *et al.*, 2010 ; Pan *et al.*, 2011 ; Felcht *et al.*, 2012) tandis que l'Ang-2 favorise la prolifération des « stalk cells » en se fixant sur le récepteur Tie-2 (Felcht *et al.*, 2012). Si l'Ang-2 agit de manière autocrine sur les cellules endothéliales activées en favorisant le « sprouting » et l'angiogenèse, des données suggèrent que l'Ang-2 pourrait aussi réguler le recrutement des péricytes. Nous avons *in vitro* montré que l'Ang-2 sécrétée par les cellules endothéliales activées inhibe l'adhérence (Figure 25) et la migration des péricytes (Article 2, Figure 6). Dans les rétines en développement, nous avons montré un lien fonctionnel entre l'exocytose des WPBs contenant de l'Ang-2 et le recouvrement des vaisseaux par les péricytes. L'ensemble de ces données suggèrent un effet direct de l'Ang-2 sur la régulation du recrutement des péricytes. Toutefois, les mécanismes moléculaires par lesquels l'Ang-2 régule le recrutement des péricytes ne sont pas encore totalement compris. Nous avons proposé que l'Ang-2 pourrait réguler directement le recrutement des péricytes en inhibant l'activation des intégrines  $\beta1$  par des protéines matricielles comme le collagène de type I (Figure 25). Des études complémentaires seraient à prévoir pour déterminer précisément les intégrines impliquées. Par ailleurs quelques groupes ont mis en évidence la présence du récepteur Tie-2 sur les péricytes (Cai *et al.*, 2008 ; Teichert *et al.*, 2017), suggérant un effet direct de l'Ang-2 sur les péricytes *via* Tie-2. L'équipe d'Hellmut G. AUGUSTIN a très récemment publié un article suggérant que l'Ang-2 inhibe la migration des péricytes en bloquant l'activation de Tie-2 par l'Ang-1, de façon similaire à la signalisation du système Angiopoïétines/Tie dans les cellules endothéliales (Teichert *et al.*, 2017). L'activation de Tie-2 par l'Ang-1 active la

voie de signalisation AKT responsable de la phosphorylation de FOXO3A, un facteur de transcription impliqué dans la migration et l'invasion. FOXO3A phosphorylé est retenu dans le cytoplasme et inactivé. Au contraire, l'inhibition de Tie-2 par l'Ang-2 empêcherait la phosphorylation de FOXO3A et favoriserait son accumulation dans le noyau des péricytes.

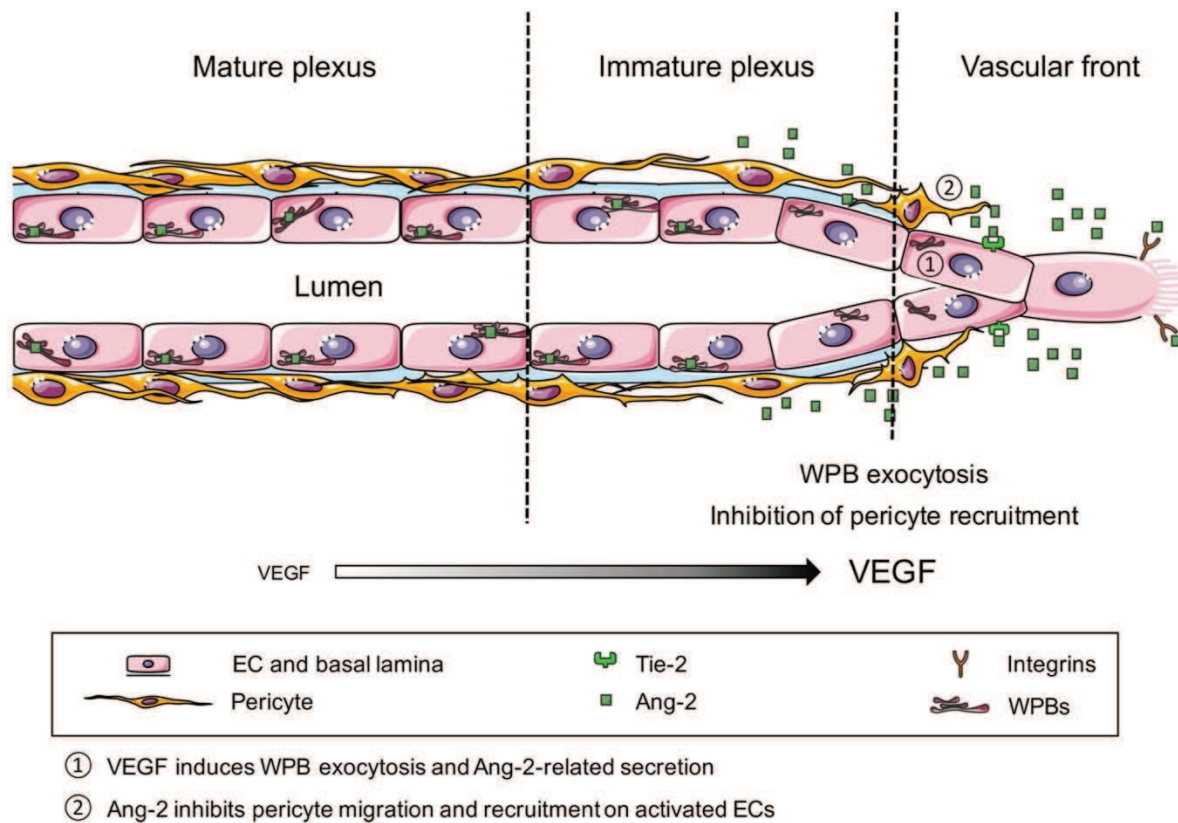
## **1.6. D'autres facteurs pourraient-ils réguler l'angiogenèse et le recrutement des péricytes sur les vaisseaux ?**

Plusieurs études suggèrent un rôle direct du vWF sur l'angiogenèse en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo* dans lesquels la déplétion du vWF par siRNA dans les cellules endothéliales en culture ou par manipulation génétique dans les souris KO vWF<sup>-/-</sup> résulte en l'absence de WPBs. L'équipe d'Anna M. RANDI a montré que la déplétion du vWF par siRNA dans des HUVECs inhibe les tests d'angiogenèse comme la formation de tubes, l'adhérence, la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Starke *et al.*, 2011), ce qui suggère que le vWF régule l'angiogenèse. Cette même équipe a montré *in vivo* que le réseau vasculaire de l'oreille est plus dense chez les souris KO vWF<sup>-/-</sup> que chez les animaux WT (Starke *et al.*, 2011), ce qui corrobore nos résultats obtenus dans le réseau vasculaire murin et dans le modèle des anneaux aortiques. En effet, nous avons montré que le réseau vasculaire de la rétine en développement est plus avancé chez les souris KO vWF<sup>-/-</sup> que chez les souris WT (Figure 26) et qu'il y a davantage de nouveaux vaisseaux se formant à partir des anneaux aortiques de souris KO vWF<sup>-/-</sup> (Figure 27). Une autre équipe a montré que le recrutement des péricytes sur les vaisseaux des rétines des souris KO vWF<sup>-/-</sup> est retardé puis compensé (Scheppke *et al.*, 2012), suggérant que l'absence des WPBs perturbe le recrutement des péricytes et que cet effet pourrait être directement lié à l'absence du vWF, montré pour favoriser l'adhérence des péricytes *via* l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  (Felcht *et al.*, 2012) ou indirectement lié à l'absence du vWF. En effet, la sécrétion de l'Ang-2 est augmentée dans les HUVECs déplétées en vWF par siRNA, suggérant que le vWF régule l'expression de l'Ang-2 ou que l'absence des WPBs perturbe la sécrétion de l'Ang-2 (Starke *et al.*, 2011). L'ensemble de ces données suggèrent que l'absence des WPBs pourrait entraîner une dérégulation de la sécrétion de l'Ang-2 et que l'exocytose des WPBs pourrait exercer une régulation fine et locale de la sécrétion de l'Ang-2 et du vWF participant à la régulation du recrutement des péricytes. S'il est probable que d'autres facteurs sécrétés par les cellules endothéliales soient impliqués dans le recrutement des péricytes, notamment le PDGFB, il est possible que le vWF lui-même joue un rôle dans le recrutement des péricytes. En effet,

l'exocytose des WPBs permet avant tout la sécrétion de relativement grandes quantités de vWF, en plus des autres facteurs que les WPBs peuvent contenir. Nous avons observé dans les rétines en développement marquées avec l'anticorps anti-vWF que le vWF sécrété en dehors des vaisseaux tend à s'accumuler au niveau des branchements vasculaires dans le plexus immature des rétines (Article 2, Figures 2 et 4). De façon intéressante, c'est à ce même niveau que nous observons la plus forte intensité de marquage avec l'anticorps anti-NG2 (Article 2, Figures 3 et 4), suggérant que le corps cellulaire des péricytes s'appose précisément à l'endroit où le vWF sécrété est concentré, ce qui suggère que le vWF sécrété pourrait favoriser l'adhérence des péricytes et que la régulation spatiale de l'exocytose des WPBs et de la sécrétion du vWF pourrait indiquer aux péricytes l'endroit où ils doivent se positionner pour stabiliser les nouvelles branches vasculaires. De façon cohérente, il a été montré que l'intégrine  $\alpha\beta3$  exprimée par les péricytes (Kappert *et al.*, 2001) peut se lier au vWF sécrété par les cellules endothéliales et que cette interaction pourrait favoriser le recrutement des péricytes et la maturation des vaisseaux sanguins (Scheppke *et al.*, 2012).

## 1.7. Conclusion

Ainsi, le recrutement des péricytes au cours de l'angiogenèse pourrait être régulé par un système complexe mettant en jeu un équilibre entre le vWF, l'Ang-2, le récepteur Tie-2, le PDGFB, le VEGFR-2 et des intégrines dont l'intégrine  $\alpha\beta3$  (Figure 28).



**Figure 28: modèle de régulation du recrutement des péricytes par l'exocytose des WPBs.** Pendant l'angiogenèse développementale de la rétine, les vaisseaux du plexus mature sont stables et abondamment recouverts par des péricytes tandis que les vaisseaux du front angiogénique sont activés par de fortes quantités de VEGF. Dans ce modèle, le VEGF induirait l'exocytose des WPBs au niveau du front angiogénique. L'Ang-2 sécrétée pourrait d'une part favoriser la migration des « tip cells » (Felcht *et al.*, 2012) et d'autre part inhiber le recrutement des péricytes sur les vaisseaux angiogéniques. Ainsi, nous proposons un modèle dans lequel l'exocytose des WPBs régule le recrutement des péricytes sur le réseau vasculaire en développement. Modèle présenté dans l'Article 2 (Figure 8).

L'Ang-2 induit une signalisation autocrine sur les cellules endothéliales *via* sa fixation sur le récepteur Tie-2 et favorise l'angiogenèse (Thomas *et al.*, 2009) et la déstabilisation des vaisseaux en synergie avec le VEGFR-2 (Felcht *et al.*, 2012 ; Daly *et al.*, 2013). Les WPBs pourraient participer à la régulation du stockage et de la sécrétion localisée de l'Ang-2, d'autant que des travaux récents ont montré qu'une sécrétion élevée localisée d'Ang-2 dans le cœur des souris KO *vWF*<sup>-/-</sup> s'accompagne de défauts morphologiques et fonctionnels vasculaires localisés tels que des microhémorragies (Yuan *et al.*, 2016). Nous pouvons par ailleurs supposer que la régulation de la sécrétion localisée de l'Ang-2 et du vWF par l'exocytose des WPBs régule l'angiogenèse mais aussi le recrutement des péricytes, puisque

le récepteur Tie-2 a été retrouvé sur les péricytes (Cai *et al.*, 2008 ; Teichert *et al.*, 2017) et que nous avons montré *in vitro* un effet inhibiteur direct de l'Ang-2 sur l'adhérence (Figure 25) et sur la migration (Article 2, Figure 6) des péricytes.

Cependant dans l'hypothèse où l'exocytose des WPBs régule directement le recrutement des péricytes *via* la régulation de la sécrétion du vWF et de l'Ang-2, nous nous retrouvons dans une situation où se trouvent sécrétés au même endroit et au même moment de l'Ang-2, qui inhiberait le recrutement des péricytes, et du vWF qui pourrait favoriser le recrutement des péricytes. Des études complémentaires sont à envisager pour clarifier ces évènements moléculaires et cellulaires survenant au cours de l'angiogenèse. Il est notamment possible que l'Ang-2 et le vWF sécrétés puissent former un complexe et entrer en compétition pour la signalisation sur l'intégrine  $\alpha v \beta 3$ , ou que les effets de chacune des protéines soit une question de cinétique. L'Ang-2 sécrétée pourrait dans un premier temps inhiber l'adhérence et la migration des péricytes pour laisser une fenêtre de plasticité ouverte permettant le remodelage vasculaire, puis l'Ang-2 pourrait être dégradée par les protéases matricielles ou totalement fixée sur les récepteurs Tie-2 et les intégrines des cellules endothéliales et des péricytes, laissant le vWF seul et rendant possible le recrutement des péricytes *via* la fixation de l'intégrine  $\alpha v \beta 3$  des péricytes sur le vWF sécrété.

## **2. L'inhibition de l'activation endothéliale au cours de l'angiogenèse tumorale**

### **2.1. Le ciblage de la nucléoline inhibe l'activation endothéliale**

La nucléoline est exprimée à la surface des cellules en prolifération, notamment les cellules tumorales (Hoja-Lukowicz *et al.*, 2009 ; Galzio *et al.*, 2012) et les cellules endothéliales activées (Christian *et al.*, 2003). Dans l'Article 1, nous avons étudié l'effet du ciblage de la nucléoline de surface par le peptide N6L sur les vaisseaux tumoraux et nous avons montré que l'inhibition de la nucléoline de surface par ce peptide présente des effets anti-tumoraux, anti-angiogéniques et normalisateurs des vaisseaux tumoraux. Dans les tumeurs, l'activation des cellules endothéliales par des facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF induit la prolifération des cellules endothéliales et la sécrétion de facteurs pro-



angiogéniques comme l'Ang-2 (Audero *et al.*, 2001). Dans les cellules endothéliales, nous avons montré que le ciblage de la nucléoline de surface par le N6L provoque d'une part un arrêt du cycle cellulaire et de la prolifération (Article 1, Figure 5A) et d'autre part une modification du profil de sécrétion *in vitro* (Article 1, Figure 5C et Tableau S1). Plusieurs études suggèrent un rôle de la nucléoline dans la régulation du cycle cellulaire, bien que les détails moléculaires ne soient pas encore totalement connus. Il a été montré notamment que les effets de la nucléoline sur le cycle cellulaire pourraient être liés à son rôle dans la régulation de la biogenèse des ribosomes (Roger *et al.*, 2003), à son interaction avec la protéine Rb impliquée dans la progression du cycle cellulaire (Grinstein *et al.*, 2006) ou encore à sa phosphorylation par les kinases CKII et Cdc2 (Srivastava et Pollard, 1999 ; Grinstein *et al.*, 2007). Il serait intéressant de déterminer si l'arrêt de la prolifération des cellules endothéliales induit par le ciblage de la nucléoline de surface par le N6L est lié à l'une de ces fonctions de la nucléoline. Par ailleurs, nous avons montré que le ciblage de la nucléoline de surface par le N6L diminue la sécrétion de l'Ang-2 par les cellules endothéliales *in vitro* (Article 1, Figures 5C et Tableau S1) et la quantité d'Ang-2 dans le plasma des souris traitées avec le N6L (Article 1, Figure 6B) alors même que la quantité plasmatique d'Ang-2 est augmentée par la présence de la tumeur (Article 1, Figure 6A). Comment l'inhibition de la nucléoline pourrait-elle réguler la sécrétion de l'Ang-2 ? L'Ang-2 étant stockée dans les WPBs (Fiedler *et al.*, 2004 ; Article 2, Figure 5D), nous avons observé l'effet de l'inhibition de la nucléoline par le N6L sur la densité des WPBs dans les cellules endothéliales et nous avons montré que le ciblage de la nucléoline par le N6L provoque une augmentation du nombre de WPBs dans les cellules endothéliales (Article 1, Figures 5D et 5E), ce qui suggère que le ciblage de la nucléoline inhibe l'exocytose des WPBs. L'ensemble de ces résultats suggèrent que l'inhibition de la nucléoline de surface inhibe l'activation endothéliale et favorise le retour des cellules endothéliales vers un phénotype quiescent.

## **2.2. Par quels mécanismes le ciblage de la nucléoline sur les cellules endothéliales pourrait-il inhiber la sécrétion de l'Ang-2 ?**

Concernant les mécanismes par lesquels la nucléoline pourrait réguler la sécrétion de l'Ang-2 par les cellules endothéliales, plusieurs hypothèses sont à vérifier. Nous avons montré que le traitement des cellules endothéliales avec le N6L pendant 5 heures induit une diminution de la sécrétion de l'Ang-2 (Article 1, Figures 5C et Tableau S1) et qu'un traitement de 72 heures induit une diminution de l'expression de la protéine (Article 1,

Figures 5H et 5I). Ces données suggèrent que l'inhibition de la nucléoline de surface par le N6L pourrait dans un premier temps inhiber l'exocytose des WPBs contenant de l'Ang-2 et dans un second temps modifier le niveau d'expression de l'Ang-2. Comment l'inhibition de la nucléoline pourrait-elle inhiber l'exocytose des WPBs ? Il a été montré que la nucléoline de surface exerce un rôle de transporteur pour de nombreux ligands qu'elle fixe à la surface et internalise vers le noyau ou le cytoplasme *via* le cytosquelette d'actine (Hovanessian *et al.*, 2000), assurant un rôle de navette. Or l'exocytose des WPBs est elle aussi dépendante du cytosquelette d'actine (de Wit et van Mourik, 2001 ; Manneville *et al.*, 2003 ; Rondaij *et al.*, 2006b ; Rojo Pulido *et al.*, 2011). Ainsi, l'inhibition de la nucléoline de surface pourrait inhiber l'exocytose des WPBs *via* le cytosquelette d'actine. Par ailleurs, il semble que l'exocytose des WPBs contenant de l'Ang-2 puisse être liée à l'activation de cascades de signalisation en aval du VEGFR-2 impliquant le  $Ca^{2+}$  intracellulaire, comme discuté plus haut. Une étude a montré que la nucléoline peut fixer le  $Ca^{2+}$  *via* son domaine N-terminal et qu'elle pourrait réguler des fonctions cellulaires associées à l'élévation du taux de  $Ca^{2+}$  intracellulaire ou l'expression de gènes (Gilchrist *et al.*, 2002). Il serait intéressant de voir si la nucléoline ne pourrait pas réguler l'exocytose des WPBs *via* la régulation de la quantité de  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Par ailleurs, nous avons montré dans l'Article 1 que l'inhibition de la nucléoline de surface par le N6L ou de la nucléoline totale par siRNA diminue l'expression de l'Ang-2 par les cellules endothéliales (Article 1, Figures 5F-5I). Il serait intéressant de vérifier plusieurs hypothèses d'un possible lien entre la nucléoline et l'expression de l'Ang-2. La nucléoline pourrait réguler indirectement l'expression de l'Ang-2 et la diminution de l'expression de l'Ang-2 observée pourrait être un effet aspécifique de l'inhibition des fonctions de la nucléoline dans la biogenèse des ribosomes et la traduction protéique ou bien la conséquence de l'arrêt du cycle cellulaire. Il a été montré que l'expression de l'Ang-2 est diminuée dans les cellules endothéliales quiescentes (Maisonpierre *et al.*, 1997, Augustin *et al.*, 2009). Puisque l'inhibition de la nucléoline induit un arrêt du cycle cellulaire et un blocage de la prolifération des cellules endothéliales (Article 1, Figure 5A), il est possible que la diminution observée de l'expression de l'Ang-2 puisse être expliquée par l'inhibition de l'activation endothéliale et le retour des cellules endothéliales vers un phénotype quiescent. Au contraire, la nucléoline pourrait directement réguler l'expression de l'Ang-2. Il a été montré que la nucléoline régule la durée de vie de nombreux ARNm (Abdelmohsen et Gorospe, 2012). Il est envisageable que la nucléoline puisse stabiliser l'ARNm de l'Ang-2 et que l'inhibition de la nucléoline favorise une dégradation précoce de

l'ARNm de l'Ang-2, expliquant les diminutions observées de la quantité de protéine (Article 1, Figure 5H) et d'ARNm (Article 1, Figure 5I).

### **2.3. Les effets du ciblage de la nucléoline sur les cellules endothéliales pourraient-ils être liés au VEGF ?**

Nous avons montré dans l'Article 1 que le ciblage de la nucléoline inhibe l'activation des cellules endothéliales, or l'activation endothéliale est intrinsèquement liée au VEGF. De plus, il a été montré que le VEGF favorise la relocalisation de la nucléoline du noyau vers la surface cellulaire où elle favorise la migration et la formation de tubes (Huang *et al.*, 2006), ce qui suggère une étroite relation entre la nucléoline et le VEGF. Enfin, il a été montré que la nucléoline peut se lier aux glycosaminoglycanes (GAGs), des récepteurs de faible affinité présents à la surface cellulaire (Liu et Yung, 1999 ; Joo *et al.*, 2005), ce qui suggère que la nucléoline à la surface des cellules endothéliales pourrait favoriser la fixation du VEGF sur le VEGFR-2 *via* un complexe avec des GAGs. Par conséquent, il est envisageable que les différents effets observés sur les cellules endothéliales puissent être liés à l'inhibition de la voie de signalisation du VEGF suite au ciblage de la nucléoline par le N6L. En effet, nous avons montré que l'inhibition de la nucléoline par le N6L inhibe la prolifération des cellules endothéliales (Article 1, Figure 5A). Or le VEGF favorise la prolifération des cellules endothéliales *via* le VEGFR-2 (Cross *et al.*, 2003). De plus, nous avons montré que le ciblage de la nucléoline par le N6L inhibe la sécrétion de l'Ang-2 probablement en inhibant l'exocytose des WPBs (Article 1, Figures 5C et Tableau S1). Nous avons montré dans l'Article 2 que le VEGF induit l'exocytose des WPBs contenant de l'Ang-2 et que la régulation spatio-temporelle de l'exocytose des WPBs au cours du développement pourrait permettre une régulation fine de la sécrétion de l'Ang-2 (Article 2, Figure 5). Enfin, nous avons montré que l'inhibition de la nucléoline peut diminuer l'expression de l'Ang-2 (Article 1, Figures 5H et 5I), par un mécanisme qui reste à déterminer. Toutefois, les mécanismes par lesquels l'inhibition de la nucléoline pourrait interférer avec la signalisation du VEGFR-2 ne sont pas encore clairs. Il a été montré dans des lignées tumorales que le ciblage de la nucléoline de surface par le N6L induit son internalisation (Destouches *et al.*, 2008 ; Destouches *et al.*, 2011). Ainsi, il est possible que le traitement des cellules endothéliales par le N6L induise l'internalisation de la nucléoline et que la disparition de la nucléoline de surface inhibe la fixation du VEGF sur le VEGFR-2. Il serait intéressant de vérifier si la nucléoline peut se lier

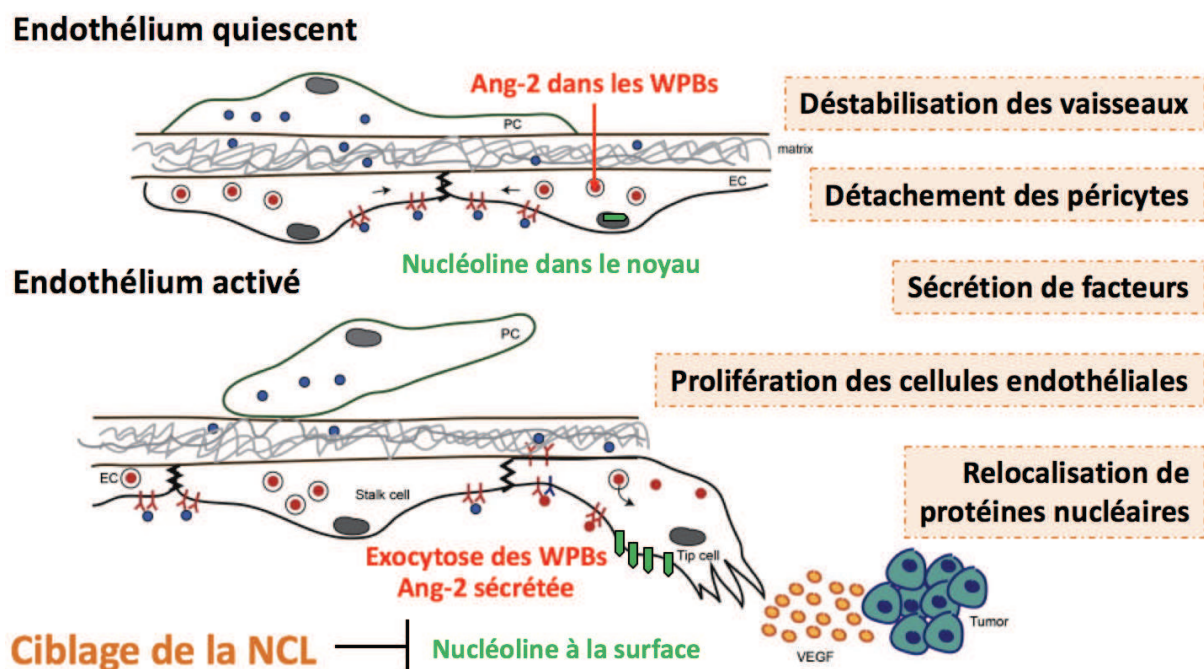
au VEGF et/ou au VEGFR-2 ou si le niveau de phosphorylation du VEGFR-2 est diminué dans des cellules endothéliales traitées avec du N6L.

## **2.4. L'inhibition de l'activation endothéliale favorise la normalisation des vaisseaux tumoraux**

Les résultats de l'Article 1 montrent que le ciblage de la nucléoline de surface par le N6L inhibe l'activation des cellules endothéliales et favorise la normalisation des vaisseaux dans les tumeurs PDAC. La normalisation des vaisseaux se traduit par une diminution de l'aire vasculaire (Article 1, Figures 3A et 3B), une augmentation du recouvrement des vaisseaux par des péricytes (Article 1, Figures 3A, 3D et 3E) et une amélioration des fonctions vasculaires comme le montrent la diminution de l'hypoxie (Article 1, Figures 3H et 3I) et la distribution plus efficace de la doxorubicine (Article 1, Figure 7A) dans les tumeurs traitées au N6L. De plus, le modèle orthotopique réalisé dans les souris KO NCL<sup>+/-</sup> nous a permis de montrer que ces effets vasculaires sont au moins en partie directement liés au ciblage de la nucléoline sur les cellules endothéliales puisque l'inhibition spécifique de la nucléoline dans le stroma tumoral a également induit une diminution de l'aire vasculaire (Article 1, Figures S4D et S4E) et une augmentation du recouvrement des vaisseaux tumoraux par des péricytes (Article 1, Figures S4F et S4G). Le ciblage de la nucléoline s'accompagnant d'une augmentation du recouvrement des vaisseaux par des péricytes, nous proposons que l'inhibition de l'activation endothéliale induite par le ciblage de la nucléoline permette le recrutement des péricytes et la normalisation des vaisseaux tumoraux *via* la régulation de la sécrétion de plusieurs cytokines par les cellules endothéliales, notamment l'Ang-2. L'Ang-2 est connue pour induire le détachement des péricytes des vaisseaux (Hammes *et al.*, 2004) et un ensemble de données présentées ci-dessus suggèrent que l'Ang-2 pourrait agir directement sur les péricytes *via* le récepteur Tie-2 et des intégrines. De façon cohérente, l'inhibition de la sécrétion de l'Ang-2 par les cellules endothéliales, par siRNA ou par traitement avec le N6L, augmente la migration des péricytes (Article 1, Figures 6D et 6E). Ces résultats suggèrent que l'inhibition de l'activation endothéliale *via* le ciblage de la nucléoline favorise le recrutement des péricytes sur les vaisseaux tumoraux et que cet effet est lié à l'inhibition de la sécrétion de l'Ang-2 par les cellules endothéliales. Par ailleurs, nous avons également montré que l'inhibition de l'activation endothéliale se traduit par une augmentation de la sécrétion du PDGFB par les cellules endothéliales (Article 1, Tableau S1), l'un des facteurs les plus abondamment décrit

dans la régulation positive du recrutement des péricytes *via* le PDGFR- $\beta$  (Hellström *et al.*, 2001). Cependant, nous n'avons pas observé d'augmentation de la quantité de PDGFB dans le plasma des souris porteuses de tumeurs PDAC et traitées au N6L, ce qui suggère que la régulation du recrutement des péricytes par le PDGFB n'est pas systémique mais plutôt finement régulée par la sécrétion locale de PDGFB. De plus, ce résultat suggère que l'inhibition de la nucléoline pourrait réguler plusieurs voies de sécrétion dans les cellules endothéliales, une voie dépendante des WPBs (sécrétion de l'Ang-2) et une voie indépendante des WPBs, le PDGFB n'étant pas un facteur contenu dans les WPBs.

Ainsi, l'ensemble de ce travail propose une stratégie d'inhibition de l'activation endothéliale *via* le ciblage de la nucléoline de surface à la surface des cellules endothéliales activées (Figure 29).



**Figure 29 : caractéristiques de l'activation endothéliale et stratégie d'inhibition par le N6L.** Pendant l'angiogenèse, l'activation endothéliale se traduit par la déstabilisation des vaisseaux s'accompagnant du détachement des péricytes, par la sécrétion de facteurs, par la prolifération des cellules endothéliales et par la relocalisation de protéines nucléaires comme la nucléoline à la surface cellulaire. Dans ce travail, nous avons montré que le ciblage de la nucléoline par le N6L inhibe l'activation endothéliale et favorise la normalisation des vaisseaux tumoraux. Modifié d'après Fagiani *et al.*, 2013.



Nous avons montré que le ciblage de la nucléoline à la surface des cellules activées diminue la croissance et l'angiogenèse tumorales (Article 1) et que ces effets sont dus à la fois au ciblage de la nucléoline sur les cellules tumorales et sur les cellules stromales activées - notamment les cellules endothéliales - comme le suggère l'inhibition spécifique de la nucléoline dans le stroma des souris KO NCL<sup>+/-</sup>. Par des mécanismes qui restent à explorer, le ciblage de la nucléoline favorise le retour des cellules endothéliales vers un phénotype quiescent qui s'accompagne d'une diminution de la sécrétion de l'Ang-2 et d'une augmentation de la sécrétion du PDGFB qui favorisent le recrutement des péricytes sur les vaisseaux et la normalisation des vaisseaux tumoraux. Ainsi, le ciblage de la nucléoline et l'inhibition de l'activation endothéliale semblent être une stratégie prometteuse dans le traitement de pathologies associées à une dérégulation de l'angiogenèse.

*VII. CONCLUSIONS ET  
PERSPECTIVES*

L'activation endothéliale est l'étape la plus précoce de l'angiogenèse dont la dérégulation est impliquée dans des pathologies associées à un déficit structural et fonctionnel du réseau vasculaire. L'inhibition de l'activation endothéliale lors de l'angiogenèse tumorale a été menée dans le modèle de l'adénocarcinome pancréatique ductal (PDAC) en ciblant la nucléoline. Deux approches de ciblage de la nucléoline ont été évaluées, d'une part en utilisant le peptide antagoniste synthétique N6L et d'autre part en induisant un KO hétérozygote de la nucléoline. Dans les deux cas, l'inhibition de la nucléoline a montré avoir un effet anti-tumoral et anti-angiogénique lié à un effet direct de l'inhibition de la nucléoline sur les cellules tumorales mais aussi à l'effet de l'inhibition de la nucléoline sur les cellules endothéliales activées. L'inhibition de l'activation endothéliale s'est traduite par une perte du phénotype activé des cellules endothéliales, à savoir (1) une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales activées traitées avec le N6L *in vitro* et (2) une inhibition de la sécrétion du facteur pro-angiogénique Ang-2 *in vitro* et *in vivo*. L'inhibition de l'activation endothéliale a permis le recrutement des péricytes et la normalisation des vaisseaux tumoraux. Le lien moléculaire entre l'activation endothéliale et le recrutement des péricytes a été étudié dans le modèle d'angiogenèse physiologique de la rétine. Dans ce modèle, ce travail a permis de montrer que le principal facteur pro-angiogénique, le VEGF, régule la sécrétion de l'Ang-2 *via* l'exocytose contrôlée de compartiments de stockages spécifiques des cellules endothéliales appelés Corps de Weibel et Palade (WPBs). Ce travail a permis de montrer pour la première fois un rôle des WPBs au cours de l'angiogenèse. La régulation de l'exocytose des WPBs participe à la régulation de la sécrétion de l'Ang-2 qui contrôle à son tour le recrutement des péricytes sur les vaisseaux au cours de l'angiogenèse. Ainsi, les cellules endothéliales soumises à de fortes concentrations de VEGF sécrètent de l'Ang-2 *via* l'exocytose des WPBs et l'Ang-2 inhibe le recrutement des péricytes en inhibant l'adhérence et la migration. La régulation de l'exocytose des WPBs permet de moduler une « fenêtre de plasticité » pendant laquelle l'absence des péricytes permet aux cellules endothéliales de remodeler le réseau vasculaire grâce à la migration des « tip cells ».

Si les effets de l'inhibition de l'activation endothéliale *via* le ciblage de la nucléoline ont été abondamment étudiés dans ce travail, les effets du ciblage de la nucléoline sont à intégrer dans la complexité du microenvironnement tumoral. En effet, il est probable que d'autres composants cellulaires du stroma tumoral soient impliqués dans la régulation de la croissance et de l'angiogenèse tumorales. Nous avons établi les effets de l'inhibition de la

nucléoline dans les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales activées dans les tumeurs PDAC, mais le rôle des autres composants reste à envisager, notamment les cellules immunitaires et les fibroblastes activés. Nous avons commencé à étudier l'effet de l'inhibition de la nucléoline sur les cellules immunitaires en collaboration avec Caroline PILON et José COHEN de l'équipe « Immunopathologie rénale et immunomodulation en transplantation » de l'Institut Mondor de Recherche Biomédicale (IMRB, Créteil). Au-delà de l'intérêt que suscitent ces études pour la compréhension des mécanismes fondamentaux, ces travaux sont nécessaires en vue de la progression du peptide N6L dans les phases d'essais cliniques. Les résultats préliminaires, présentés en annexe 3, indiquent un rôle probable des cellules immunitaires dans la régulation de la croissance tumorale des tumeurs PDAC. Par ailleurs, d'autres travaux réalisés dans des modèles ectopiques et orthotopiques de tumeurs du pancréas ont montré une potentialisation des effets anti-tumoraux et normalisateurs du N6L formulé en nanoparticules polyplexes. Ces résultats ont fait l'objet d'un article accepté tout récemment dans le journal *Oncotarget* et présenté en annexe 2.

Enfin, l'angiogenèse pathologique est également impliquée dans d'autres maladies comme les rétinopathies. Ilaria CASCONI a développé un projet collaboratif avec l'équipe de Michel PAQUES à l'Institut de la Vision (Paris) pour étudier les effets de l'inhibition de l'activation endothéliale par le N6L dans des modèles murins de rétinopathies. Les résultats obtenus avec Marie DARCHE ont montré que l'injection intrapéritonéale de N6L inhibe l'angiogenèse dans deux modèles d'angiogenèse pathologique de la rétine : le modèle de rétinopathie induite par l'oxygène (OIR) et le modèle de l'occlusion veineuse. Ces travaux encourageants pour le traitement des rétinopathies font l'objet d'un article en préparation.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abdelmohsen K., Gorospe M. **RNA-binding protein nucleolin in disease.** *RNA Biology* (2012) 9(6):799-808.
- Adams R.H., Alitalo K. **Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2007) 8:464-478.
- Affeldt S., Singh P.P., Cascone I., Selimoglu R., Camonis J., Isambert H. **Evolution and cancer: expansion of dangerous gene repertoire by whole genome duplications.** *Med. Sci. (Paris)* (2013) 29(4):358-361.
- Aird W.C. **Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms.** *Circ. Res.* (2007a) 100:158-173.
- Aird W.C. **Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds.** *Circ. Res.* (2007b) 100:174-190.
- Aird W.C. **Endothelial cell heterogeneity.** *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2012) 2:a006429.
- Andersen J.S., Wilkinson C.J., Mayor T., Mortensen P., Nigg E.A., Mann M. **Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling.** *Nature* (2003) 426(6966):570-574.
- Angelov D., Bondarenko V.A., Almagro S., Menoni H., Mongelard F., Hans F., Mietton F., Studitsky V.M., Hamiche A., Dimitrov S., Bouvet P. **Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes.** *EMBO J.* (2006) 25(8):1669-1679.
- Armulik A., Abramsson A., Betsholtz C. **Endothelial/pericyte interactions.** *Circ. Res.* (2005) 97:512-523.
- Armulik A., Genové G., Betsholtz C. **Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises.** *Dev. Cell* (2011) 21:193-215.
- Arnout J., Hoylaerts M.F., Lijnen H.R. *Handbook of Pharmacology: The vascular endothelium II.* (2006) 1-42.
- Arseneau K.O., Cominelli F. **Targeting leukocyte trafficking for the treatment of inflammatory bowel disease.** *Clin. Pharmacol. Ther.* (2015) 97(1):22-28.
- Audero E., Cascone I., Zanon I., Previtali S.C., Piva R., Schiffer D., Bussolino F. **Expression of angiopoietin-1 in human glioblastomas regulates tumor-induced angiogenesis: *in vivo* and *in vitro* studies.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2001) 21(4):536-41.
- Auerbach R., Lewis R., Shinnars B., Kubai L., Akhtar N. **Angiogenesis assays: a critical overview.** *Clin. Chem.* (2003) 49(1):32-40.
- Augustin H.G., Koh G.Y., Thurston G., Alitalo K. **Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2009) 10:165-177.



- Babich V., Meli A., Knipe L., Dempster J.E., Skehel P., Hannah M.J., Carter T. **Selective release of molecules from Weibel-Palade bodies during a lingering kiss.** *Blood* (2008) 111:5282-5290.
- Babich V., Knipe L., Hewlett L., *et al.* **Differential effect of extracellular acidosis on the release and dispersal of soluble and membrane proteins secreted from the Weibel-Palade body.** *J. Biol. Chem.* (2009) 284(18):12459-12468.
- Bardeesy N., DePinho R.A. **Pancreatic cancer biology and genetics.** *Nat. Rev. Cancer* (2002) 2:897-909.
- Barton W.A., Tzvetkova-Robev D., Miranda E.P., Kolev M.V., Rajashankar K.R., Himanen J.P., Nikolov D.B. **Crystal structures of the Tie2 receptor ectodomain and the angiotensin-2-Tie2 complex.** *Nat. Struct. Mol. Biol.* (2006) 13:524-532.
- Bates P.J., Laber D.A., Miller D.M., Thomas S.D., Trent J.O. **Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer.** *Exp. Mol. Pathol.* (2009) 86:151-164.
- Beenken A., Mohammadi M. **The FGF family: biology, pathophysiology and therapy.** *Nat. Rev. Drug Discov.* (2009) 8:235-253.
- Belenguer P., Baldin V., Mathieu C., Prats H., Bensaid M., Bouche G., Amalric F. **Protein kinase NII and the regulation of rDNA transcription in mammalian cells.** *Nucleic Acids Res.* (1989) 17(16):6625-6636.
- Benjamin L.E., Hemo I., Keshet E. **A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF.** *Development* (1998) 125:1591-1598.
- Bennett H.S., Luft J.H., Hampton J.C. **Morphological classifications of vertebrate blood capillaries.** *Am. J. Physiol.* (1959) 196(2):381-390.
- Berger C.M., Gaume X., Bouvet P. **The roles of nucleolin subcellular localization in cancer.** *Biochimie* (2015) 113:78-85.
- Bergers G., Song S. **The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance.** *Neuro-Oncology* (2005) 7:452-464.
- Bergers G., Hanahan D. **Modes of resistance to anti-angiogenic therapy.** *Nature Rev. Cancer* (2008) 8:592-603.
- Bernardo A., Ball C., Nolasco L., Choi H., Moake J.L., Dong J.F. **Platelets adhered to endothelial cell-bound ultra-large von Willebrand factor strings support leukocyte tethering and rolling under high shear stress.** *J. Thromb. Haemost.* (2005) 3:562-570.
- Birmpas C., Briand J-P., Courty J., Katsoris P. **Nucleolin mediates the antiangiogenesis effect of the pseudopeptide N6L.** *BMC Cell Biol.* (2012) 13:32.
- Blood C.H., Zetter B.R. **Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis.** *Biochim. Biophys. Acta* (1990) 1032:89-118.
- Bonfanti R., Furie B.C., Furie B., Wagner D. D. **PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells.** *Blood* (1989) 73:1109- 1112.

- Borer R.A., Lehner C.F., Eppenberger H.M., Nigg E.A. **Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm.** *Cell* (1989) 56:379-390.
- Bourbon H., Bugler B., Caizergues-Ferrer M., Amalric F. **Role of phosphorylation on the maturation pathways of a 100 kDa nucleolar protein.** *FEBS Lett.* (1983) 155(2):218-222.
- Bousquet C., Susini C. **Adénocarcinome ductal pancréatique et microenvironnement tumoral : rôle de la réaction desmoplasique fibreuse.** *Hépatogastro.* (2007) 14(3):231-238.
- Bouvet P., Diaz J.J., Kindbeiter K., Madjar J.J., Amalric F. **Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain.** *J. Biol. Chem.* (1998) 273(30):19025-19029.
- Bredt D.S., Snyder S.H. **Isolation of nitric oxide synthetase, a camodulin requiring enzyme.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1990) 87:682-686.
- Bredt T.B., Hwang P.M., Glatt C.E., Lowenstein C., Reed R.R., Snyder S.H. **Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase.** *Nature* (1991) 351:714-717.
- Brooks P.C., Montgomery A.M.P., Rosenfeld M., Reisfeld R.A., Hu T., Klier G., Cheresch D.A. **Integrin  $\alpha\beta 3$  antagonists promote tumor regression by inducing apoptosis of angiogenic blood vessels.** *Cell* (1994) 79:1157-1164.
- Brown K.J., Maynes S.F., Bezos A., Maguire D.J., Ford M.D., Parish C.R. **A novel *in vitro* assay for human angiogenesis.** *Lab. Invest.* (1996) 75(4):539-555.
- Bugler B., Caizergues-Ferrer M., Bouche G., Bourbon H., Amalric F. **Detection and localization of a class of proteins immunologically related to a 100-kDa nucleolar protein.** *Eur. J. Biochem.* (1982) 128:475-480.
- Buchbinder E.I., McDermott D.F. **Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen-4 blockade in melanoma.** *Clin. Ther.* (2015) 37:755-763.
- Bullard D.C., Kundel E.J., Kubo H., Hicks M.F., Lorenzo I., Doyle N.A., Doerschuk C.M., Ley K., Beaudet A.L. **Infectious susceptibility and severe deficiency of leukocyte rolling and recruitment in E-selectin and P-selectin double mutant mice.** *J. Exp. Med.* (1996) 183:2329-2336.
- Cai J., Kehoe O., Smith G.M., Hykin P., Boulton M.E. **The Angiopoietin/Tie-2 system regulates pericyte survival and recruitment in diabetic retinopathy.** *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2008) 49:2163-2171.
- Caizergues-Ferrer M., Belenguer P., Lapeyre B., Amalric F., Wallace M.O., Olson M.O. **Phosphorylation of nucleolin by a nucleolar type NII protein kinase.** *Biochemistry* (1987) 26(24):7876-7883.
- Callebaut C., Krust B., Jacotot E., Hovanessian A.G. **T cell activation antigen, CD26, as a cofactor for entry of HIV in CD4<sup>+</sup> cells.** *Science* (1993) 262(5142):2045-2050.

Callebaut C., Jacotot E., Guichard G., Krust B., Rey-Cuille M-A., Cointe D., Benkirane N., Blanco J., Muller S., Briand J-P., Hovanessian A.G. **Inhibition of HIV infection by pseudopeptides blocking viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion and cell death.** *Virology* (1996) 218:181-192.

Callebaut C., Jacotot E., Krust B., Guichard G., Blanco J., Valenzuela A., Svab J., Muller S., Briand J-P., Hovanessian A.G. **Pseudopeptide TASP inhibitors of HIV entry bind specifically to a 95-kDa cell surface protein.** *J. Biol. Chem.* (1997) 272(11):7159-7166.

Callebaut C., Blanco J., Benkirane N., Krust B., Jacotot E., Guichard G., Seddiki N., Svab J., Dam E., Muller S., Briand J-P., Hovanessian A.G. **Identification of V3 loop-binding proteins as potential receptors implicated in the binding of HIV particles to CD4 cells.** *J. Biol. Chem.* (1998) 273(34):21988-21997.

Carmeliet P. **Angiogenesis in health and disease.** *Nat. Med.* (2003) 9(6):653-660.

Carmeliet P., Jain R.K. **Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis.** *Nature* (2011a) 473:298-307.

Carmeliet P., Jain R.K. **Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases.** *Nat. Rev. Drug Discov.* (2011b) 10:417-427.

Cavallaro U., Dejana E. **Adhesion molecule signalling: not always a sticky business.** *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* (2011) 12:189-197.

Chantrain C.F., Henriot P., Jodele S., Emonard H., Feron O., Courtoy P.J., DeClerck Y. A., Marbaix E. **Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: A new role for metalloproteinases.** *Eur. J. Cancer* (2006) 42:310-318.

Chauhan V.P., Martin J.D., Liu H., Lacorre D.A., Jain S.R., Kozin S.V., Stylianopoulos T., Mousa A.S., Han X., Adstamongkonkul P., *et al.* **Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels.** *Nat. Commun.* (2013) 4:2516.

Chen J., López J.A. **Interactions of platelets with subendothelium and endothelium.** *Microcirculation* (2005) 12:235-246.

Chen J., Guo K., Kastan M.B. **Interactions of nucleolin and ribosomal protein L26 (RPL26) in translational control of human p53 mRNA.** *J. Biol. Chem.* (2012) 287(20):16467-16476.

Cheresh DA. **Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1987) 84(18):6471-6475.

Chi J.T., Chang H.Y., Haraldsen G., Jahnsen F.L., Troyanskaya O.G., Chang D.S., Wang Z., Rockson S.G., van de Rijn M., Botstein D. *et al.* **Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2003) 100:10623-10628.

Choi K., Kennedy M., Kazarov A., Papadimitriou J.C., Keller G. **A common precursor for hematopoietic and endothelial cells.** *Development* (1998) 125:725-732.

- Christian S., Pilch J., Akerman M.E., Porkka K., Laakkonen P., Ruoslahti E. **Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels.** *J Cell Biol.* (2003) 163(4):871-878.
- Cid-Arregui A., Juarez V. **Perspectives in the treatment of pancreatic adenocarcinoma.** *World J. Gastroenterol.* (2015) 21(31):9297-9316.
- Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., McEver R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., McCrae K.R., Hug B.A., Schmidt A-M., D.M. Stern. **Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders.** *Blood* (1998) 91(10):3527-3561.
- Cleator J.H., Zhu W.Q., Vaughan D.E., Hamm H.E. **Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP.** *Blood* (2006) 107:2736-2744.
- Collett G.D.M., Canfield A.E. **Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification.** *Circ. Res.* (2005) 96:930-938.
- Collo G., Pepper M.S. **Endothelial cell integrin alpha5beta1 expression is modulated by cytokines and during migration *in vitro*.** *J. Cell Sci.* (1999) 112(Pt 4):569-578.
- Cong R., Das S., Ugrinova I., Kumar S., Mongelard F., Wong J., Bouvet P. **Interaction of nucleolin with ribosomal RNA genes and its role in RNA polymerase I transcription.** *Nucleic Acids Res.* (2012) 40(19):9441-9454.
- Corbett T.H., Roberts B.J., Leopold W.R., Peckham J.C, *et al.* **Induction and chemotherapeutic response of two transplantable ductal adenocarcinomas of the pancreas in C57BL/6 mice.** *Cancer Res.* (1984) 44:717-726.
- Coughlin S.R. **Thrombin signalling and protease-activated receptors.** *Nature* (2000) 407:258-264.
- Courtoy P.J., Boyles J. **Fibronectin in the microvasculature: localization in the pericyte-endothelial interstitium.** *J. Ultrastruct. Res.* (1983) 83:258-273.
- Cramer E.M., Meyer D., le Menn R., Breton-Gorius J. **Eccentric localization of von Willebrand factor in an internal structure of platelet alpha-granule resembling that of Weibel-Palade bodies.** *Blood* (1985) 66(3):710-713.
- Cross M.J., Dixelius J., Matsumoto T., Claesson-Welsh L. **VEGF-receptor signal transduction.** *TRENDS Biochem. Sci.* (2003) 28(9):488-494.
- Cuevas P., Gutierrez-Diaz J.A., Reimers D., Dujovny M., Diaz F.G., Ausman J.I. **Pericyte endothelial gap junctions in human cerebral capillaries.** *Anat. Embryol.* (1984) 170:155-159.
- Daly C., Eichten A., Castanaro C., Pasnikowski E., Adler A., Lalani A.S., Papadopoulos N., Kyle A.H., Minchinton A.I., Yancopoulos G.D., Thurston G. **Angiopoietin-2 functions as a Tie2 agonist in tumor models, where it limits the effects of VEGF inhibition.** *Cancer Res.* (2013) 73(1):108-18.

D'Amore P.A., Thompson R.W. **Mechanisms of angiogenesis.** *Annu. Rev. Physiol.* (1987) 49:453-464.

Datta P., Ayan B., Ozbolat I.T. **Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication.** *Acta Biomater.* (2017) 51:1-20.

Davis S., Aldrich T.H., Jones P.F., Acheson A., Compton D.L., Jain V., Ryan T.E., Bruno J., Radziejewski C., Maisonpierre P.C., Yancopoulos G.D. **Isolation of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, by secretion-trap expression cloning.** *Cell* (1996) 87:1161-1169.

Davis S., Papadopoulos N., Aldrich T.H., Maisonpierre P.C., Huang T., Kovac L., Xu A., Leidich R., Radziejewska E., Rafique A., Goldberg J., Jain V., Bailey K., Karow M., Fandl F., Samuelsson S.J., Ioffe E., Rudge J.S., Daly T.J., Radziejewski C., Yancopoulos G.D. **Angiopoietins have distinct modular domains essential for receptor binding, dimerization and superclustering.** *Nat. Struct. Biol.* (2003) 10:38-44.

Day J.D., *et al.* **Immunohistochemical evaluation of HER-2/neu expression in pancreatic adenocarcinoma and pancreatic intraepithelial neoplasms.** *Hum. Pathol.* (1996) 27:119-124.

Deng J.S., Ballou B., Hofmeister J.K. **Internalization of anti-nucleolin antibody into viable HEp-2 cells.** *Mol. Biol. Rep.* (1996) 23(3-4):191-195.

Denis C.V., Andre P., Saffaripour S., Wagner D.D. **Defect in regulated secretion of P-selectin affects leukocyte recruitment in von Willebrand factor-deficient mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2001) 98:4072-4077.

DeRuiter M.C., Poelmann R.E., Van Munsteren J.C., Mironov V., Markwald R.R., Gittenberger-de Groot A.C. **Embryonic endothelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells expressing smooth muscle actins *in vivo* and *in vitro*.** *Circ. Res.* (1997) 80:444-451.

Destouches D., El Khoury D., Hamma-Kourbali Y., Krust B., Albanese P., Katsoris P., Guichard G., Briand J-P., Courty J., Hovanessian A.G. **Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin.** *PLoS One* (2008) 3(6):e2518.

Destouches D. **Ciblage de la nucléoline de surface par les pseudopeptides NucAnts dans l'inhibition de la croissance tumorale et de l'angiogénèse associée.** Thèse (2009)

Destouches D., Page N., Hamma-Kourbali Y., Machi V., Chaloin O., Frechault S., Birmpas C., Katsoris P., Beyrath J., Albanese P., Maurer M., Carpentier G., Strub J-M., Van Dorsselaer A., Muller S., Bagnard D., Briand J-P., Courty J. **A simple approach to cancer therapy afforded by multivalent pseudopeptides that target cell-surface nucleoproteins.** *Cancer Res.* (2011) 71(9):3296-3305.

Destouches D., Huet E., Sader M., Frechault S., Carpentier G., Ayoul F., Briand J-P., Menashi S., Courty J. **Multivalent pseudopeptides targeting cell surface nucleoproteins inhibit cancer cell invasion through tissue inhibitor of metalloproteinases 3 (TIMP-3) release.** *J. Biol. Chem.* (2012) 287(52):43685-43693.

de Wilde R.F., Edil B.H., Hruban R.H., *et al.* **Well-differentiated pancreatic neuroendocrine tumors: from genetics to therapy.** *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* (2012) 9:199-208.



- de Wit T.R., van Mourik J.A. **Biosynthesis, processing and secretion of von Willebrand factor: biological implications.** *Best Pract. Res. Clin. Haematol.* (2001) 14:241-255.
- Di Segni A., Farin K., Pinkas-Kramarski R. **Identification of nucleolin as new ErbB receptors-interacting protein.** *PLoS One* (2008) 3(6):e2310.
- Dong J.F., Moake J.L., Nolasco L., *et al.* **ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions.** *Blood* (2002) 100(12):4033-4039.
- Dore-Duffy P., Balabanov R., Beaumont T., Katar M. **The CNS pericyte response to low oxygen: early synthesis of cyclopentenone prostaglandins of the J-series.** *Microvasc. Res.* (2005) 69:79-88.
- Dragt B.S., van Agtmaal E.L., de Laat B., Voorberg J. **Effet of laminal shear stress on the distribution of Weibel-Palade bodies in endothelial cells.** *Thromb. Res.* (2012) 130:741-745.
- Duluc C., Moatassim-Billah S., Chalabi-Dchar M., Perraud A., Samain R., Breibach F., *et al.* **Pharmacological targeting of the protein synthesis mTOR/4E-BP1 pathway in cancer-associated fibroblasts abrogates pancreatic tumour chemoresistance.** *EMBO Mol. Med.* (2015) 7:735-753.
- Dumont D.J., Gradwohl G., Fong G.H., Puri M.C., Gertsenstein M., Auerbach A., Breitman M.L. **Dominant-negative and targeted null mutations in the endothelial receptor tyrosine kinase, tek, reveal a critical role in vasculogenesis of the embryo.** *Genes Dev.* (1994) 8:1897-1909.
- DuPage M. *et al.* **Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of Cre recombinase.** *Nat. Protoc.* (2009) 4:1064-1072.
- Eklund L., Bry M., Alitalo K. **Mouse models for studying angiogenesis and lymphangiogenesis in cancer.** *Mol. Oncol.* (2013) 7:259-282.
- El Khoury D., Destouches D., Lengagne R., Krust B., Hamma-Kourbali Y., Garcette M., Niro S., Kato M., Briand J-P., Courty J., Hovanessian A.G., Prévost-Blondel A. **Targeting surface nucleolin with a multivalent pseudo-peptide delays development of spontaneous melanoma in RET transgenic mice.** *BMC Cancer* (2010) 10:235.
- Erard M.S., Belenguer P., Caizergues-Ferrer M., Pantaloni A., Amalric F. **A major nucleolar protein, nucleolin, induces chromatin decondensation by binding to histone H1.** *Eur. J. Biochem.* (1988) 175(3):525-530.
- Erard M., Lakhdar-Ghazal F., Amalric F. **Repeat peptide motifs which contain beta-turns and modulate DNA condensation in chromatin.** *Eur. J. Biochem.* (1990) 191(1):19-26.
- Erent M., Meli A., Moiso N., *et al.* **Rate, extent and concentration dependence of histamine-evoked Weibel-Palade body exocytosis determined from individual fusion events in human endothelial cells.** *J. Physiol.* (2007) 583(Pt. 1):195-212.
- Escande M.L., Gas N., Stevens B.J. **Immunolocalization of the 100 kD nucleolar protein in CHO cells.** *Biol. Cell* (1985) 53(2):99-109.

- Esposito I, Konukiewitz B, Schlitter A.M., Klöppel G. **Pathology of pancreatic ductal adenocarcinoma: Facts, challenges and future developments.** *World J. Gastroenterol.* (2014) 20(38):13833-13841.
- Esser S, Wolburg K, Wolburg H, Breier G, Kurzchalia T, Risau W. **Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations *in vitro*.** *J. Cell Biol.* (1998) 140(4):947-959.
- Etchevers H.C., Vincent C., Le Douarin N.M., Couly G.F. **The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain.** *Development* (2001) 128:1059-1068.
- Ewenstein B.M., Warhol M.J., Handin R.I., Pober J.S. **Composition of the von Willebrand Factor storage organelle (Weibel-Palade Body) isolated from cultured human umbilical vein endothelial cells.** *J. Cell Biol.* (1987) 104:1423-1433.
- Fagiani E., Christofori G. **Angiopoietins in angiogenesis.** *Cancer Lett.* (2013) 328:18-26.
- Fantin A, Vieira J.M., Gestri G., Denti L., Schwarz Q., Prykhozhiy S., Peri F., Wilson S.W., Ruhrberg C. **Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction.** *Blood* (2010) 116:829-840.
- Farin K, Schokoroy S, Haklai R, Cohen-Or I, Elad-Sfadia G, Reyes-Reyes M.E., Bates P.J., Cox A.D., Kloog Y, Pinkas-Kramarski R. **Oncogenic synergism between ErbB1, nucleolin, and mutant Ras.** *Cancer Res.* (2011) 71(6):2140-2151.
- Feig C., Gopinathan A, Neesse A, Chan D.S., Cook N., Tuveson D.A. **The pancreas cancer microenvironment.** *Clin. Cancer Res.* (2012) 18(16):4266-4276.
- Felcht M, Luck R, Schering A, Seidel P, Srivastava K, Hu J, Bartol A, Kienast Y, Vettel C, Loos E.K., Kutschera S, Bartels S, Appak S, Besemfelder E, Terhardt D, Chavakis E, Wieland T, Klein C, Thomas M, Uemura A, Goerdt S, Augustin H.G. **Angiopoietin-2 differentially regulates angiogenesis through TIE2 and integrin signaling.** *J. Clin. Invest.* (2012) 122:1991-2005.
- Félétou M, Bonnardel E, Canet E. **Bradykinin and changes in microvascular permeability in the hamster cheek pouch: Role of NO.** *Br. J. Pharmacol.* (1996) 118:1371-1376.
- Félétou M, Staczek J, Duhault J. **VEGF and *in vivo* plasma extravasation in the hamster cheek pouch.** *Br. J. Pharmacol.* (2001) 132:1342-1348.
- Félétou M, Boulanger M, Staczek J, Broux O, Duhault J. **Fructose diet and VEGF-induced plasma extravasation in hamster cheek pouch.** *Acta. Pharmacol. Sin.* (2003) 24:207-211.
- Félétou M, Tang E.H., Vanhoutte P.M. **Nitric oxide the gatekeeper of endothelial vasomotor control.** *Front. Biosci.* (2008) 13:4198-4217.
- Feng D, Nagy J.A., Pyne K, Dvorak H.F., Dvorak A.M. **Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP.** *J. Exp. Med.* (1998) 187:903-915.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, Parkin D.M., Forman D, Bray F. **Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012.** *Int. J. Cancer.* (2015) 136:E359-E386.

Fiedler U., Scharpfenecker M., Koidl S., Hegen A., Grunow V., Schmidt J.M., Kriz W., Thurston G., Augustin H.G. **The Tie-2 ligand Angiopoietin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies.** *Blood* (2004) 103(11):4150-4156.

Fiedler U., Reiss Y., Scharpfenecker M., Grunow V., Koidl S., Thurston G., Gale N.W., Witzenrath M., Rosseau S., Suttrop N., Sobke A., Herrmann M., Preissner K.T., Vajkoczy P., Augustin H.G. **Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation.** *Nat. Med.* (2006) 12:235-239.

Fischer C., Schneider M., Carmeliet P. **Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis.** *Handbook of Pharmacology: The vascular endothelium II.* (2006) 157-212.

Fogal V., Sugahara K.N., Ruoslahti E., Christian S. **Cell surface nucleolin antagonist causes endothelial cell apoptosis and normalization of tumor vasculature.** *Angiogenesis* (2009) 12:91-100.

Folkman J. **The role of angiogenesis in tumor growth.** *Semin. Cancer Biol.* (1992) 3:65-71.

Folkman J., Shing Y. **Angiogenesis.** *J. Biol. Chem.* (1992) 267:10931-10934.

Fraenkel M., Kim M.K., Faggiano A., *et al.* **Epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours.** *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* (2012) 26:691-703.

Fruttiger M., Calver A.R., Krüger W.H., Mudhar H.S., Michalovich D., Takakura N., Ichi Nishikawa S., Richardson W.D. **PDGF mediates a neuron astrocyte interaction in the developing retina.** *Neuron* (1996) 17:1117-1131.

Fuchs A., Weibel E.R. **Morphometrische untersuchung der verteilung einer spezifischen cytoplasmatischen organelle in endothelzellen der ratte.** *Zeitschrift für Zellforschung.* (1966) 73:1-9.

Fukumura D., Duda D.G., Munn L.L., Jain R.K. **Tumor microvasculature and microenvironment: novel insights through intravital imaging in pre-clinical models.** *Microcirculation* (2010) 17:206-225.

Gaengel K., Genové G., Armulik A., Betsholtz C. **Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2009) 29:630-638.

Galbusera M., Zoja C., Donadelli R., Paris S., Morigi M., Benigni A., Fizgliuzzi M., Remuzzi G., Remuzzi A. **Fluid shear stress modulates von Willebrand factor release from human vascular endothelium.** *Blood* (1997) 90(4):1558-1564.

Gale N.W., Thurston G., Hackett S.F., Renard R., Wang Q., McClain J., Martin C., Witte C., Witte M.H., Jackson D., Suri C., Campochiaro P.A., Wiegand S.J., Yancopoulos G.D. **Angiopoietin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiopoietin-1.** *Dev. Cell* (2002) 3:411-423.

Galzio R., Rosati F., Benedetti E., Cristiano L., Aldi S., Mei S., D'Angelo B., Gentile R., Laurenti G., Cifone M.G., Giordano A., Cimini A. **Glycosilated nucleolin as marker for human gliomas.** *J. Cell. Biochem.* (2012) 113:571-579.

- Gaume X., Monier K., Argoul F., Mongelard F., Bouvet P. **In vivo study of the histone chaperone activity of nucleolin by FRAP.** *Biochem. Res. Int.* (2011) 2011:187624.
- Gazit Y., Baish J.W., Safabakhsh N., Leunig M., Baxter L.T., Jain R.K. **Fractal characteristics of tumor vascular architecture during tumor growth and regression.** *Microcirculation* (1997) 4:395-402.
- Gerhardt H., Wolburg H., Redies C. **N-cadherin mediates pericytic-endothelial interaction during brain angiogenesis in the chicken.** *Dev. Dyn.* (2000) 218:472-479.
- Gerhardt H., Golding M., Fruttiger M., Ruhrberg C., Lundkvist A., Abramsson A., Jeltsch M., Mitchell C., Alitalo K., Shima D., Betsholtz C. **VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia.** *J. Cell Biol.* (2003) 161(6):1163-1177.
- Gerhardt H. **VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting.** *Organogenesis* (2008) 4(4):241-246.
- Gerwins P., Skoldenberg E., Claesson-Welsh L. **Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis.** *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* (2000) 34(3):185.
- Ghisolfi L., Joseph G., Amalric F., Erard M. **The glycine- rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties.** *J. Biol. Chem.* (1992a) 267(5):2955-2959.
- Ghisolfi L., Kharrat A., Joseph G., Amalric F., Erard M. **Concerted activities of the RNA recognition and the glycine-rich C-terminal domains of nucleolin are required for efficient complex formation with pre-ribosomal RNA.** *Eur. J. Biochem.* (1992b) 209(2):541-548.
- Gilchrist J.S.C., Abrenica B., DiMario P.J., Czubryt M.P., Pierce G.N. **Nucleolin is a calcium-binding protein.** *J. Cell. Biochem.* (2002) 85:268-278.
- Ginisty H., Amalric F., Bouvet P. **Nucleolin functions in the first step of ribosomal RNA processing.** *EMBO J.* (1998) 17(5):1476-1486.
- Ginisty H., Serin G., Ghisolfi-Nieto L., Roger B., Libante V., Amalric F., Bouvet P. **Interaction of nucleolin with an evolutionarily conserved pre-ribosomal RNA sequence is required for the assembly of the primary processing complex.** *J. Biol. Chem.* (2000) 275(25):18845-18850.
- Ginisty H., Amalric F., Bouvet P. **Two different combinations of RNA-binding domains determine the RNA binding specificity of nucleolin.** *J. Biol. Chem.* (2001) 276(17):14338-14343.
- Goel S., Duda D.G., Xu L., Munn L.L., Boucher Y., Fukumura D., Jain K.R. **Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases.** *Physiol. Rev.* (2011) 91:1171-1121.
- Goldstein A.M., et al. **Increased risk of pancreatic cancer in melanoma-prone kindreds with p16INK4 mutations.** *N. Engl. J. Med.* (1995) 333:970-974.
- Greenberg J.I., Shields D.J., Barillas S.G., Acevedo L.M., Murphy E., Huang J., Schepke L., Stockmann C., Johnson R.S., Angle N., Cheresch D.A. **A role for VEGF as a negative regulator of pericyte function and vessel maturation.** *Nature* (2008) 456:809-813.

- Grinstein E., Shan Y., Karawajew L., Snijders P.J.F., Meijer C.J.L.M., Royer H-D., Wernet P. **Cell Cycle-controlled interaction of nucleolin with the retinoblastoma protein and cancerous cell transformation.** *J. Biol. Chem.* (2006) 281(31):22223-22235.
- Grinstein E., Du Y., Santourlidis S., Christ J., Uhrberg M., Wernet P. **Nucleolin regulates gene expression in CD34-positive hematopoietic cells.** *J. Biol. Chem.* (2007) 282:12439-12449.
- Grippio P.J., Tuveson D.A. **Deploying mouse models of pancreatic cancer for chemoprevention studies.** *Cancer Prev. Res.* (2010) 3:1382-1387.
- Guilleminault L., Carmier D., Heuze-Vourc'h N., Diot P., Pichon E. (2015). **Immunotherapy in non-small cell lung cancer: inhibition of PD1/PDL1 pathway.** *Rev. Pneumol. Clin.* (2015) 71:44-56.
- Hahn S.A., et al. **DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1.** *Science* (1996) 271:350-353.
- Halfdanarson T.R., Rubin J., Farnell M.B., et al. **Pancreatic endocrine neoplasms: epidemiology and prognosis of pancreatic endocrine tumors.** *Endocr. Relat. Cancer* (2008) 15:409-427.
- Hammes H.P., Lin J., Wagner P., Feng Y., Vom Hagen F., Krzizok T., Renner O., Breier G., Brownlee M., Deutsch U. **Angiopoietin-2 causes pericyte dropout in the normal retina: evidence for involvement in diabetic retinopathy.** *Diabetes* (2004) 53(4):1104-1110.
- Hanahan D. **Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/ simian virus 40 oncogenes.** *Nature* (1985) 315:115-122.
- Hanahan D. **Signaling vascular morphogenesis and maintenance.** *Science* (1997) 277:48-50.
- Hanahan D., Weinberg R.A. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell* (2011) 144(5):646-674.
- Hanahan D., Coussens L.M. **Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment.** *Cancer Cell* (2012) 20:309-322.
- Hanakahi L.A., Bu Z., Maizels N. **The C-terminal domain of nucleolin accelerates nucleic acid annealing.** *Biochemistry* (2000) 39(50):15493-15499.
- Hannah M.J., Skehel P., Erent M., et al. **Differential kinetics of cell surface loss of von Willebrand factor and its propolypeptide after secretion from Weibel-Palade bodies in living human endothelial cells.** *J. Biol. Chem.* (2005) 280(24):22827-22830.
- Harrison-Lavoie K.J., Michaux G., Hewlett L., Kaur J., Hannah M.J., Lui- Roberts W.W., Norman K.E., Cutler D.F. **P-selectin and CD63 use different mechanisms for delivery to Weibel-Palade bodies.** *Traffic* (2006) 7:647-662.
- Hellström M., Gerhardt H., Kalén M., LiX., Eriksson U., Wolburg H., Betsholtz C. **Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis.** *J. Cell Biol.* (2001) 153(3):543-553.
- Hendrickx J., Doggen K., Weinberg E.O., Van Tongelen P., Fransen P., De Keulenaer G.W. **Molecular diversity of cardiac endothelial cells *in vitro* and *in vivo*.** *Physiol. Genomics* (2004) 19:198-206.



- Herrera A.H., Olson M.O. **Association of protein C23 with rapidly labeled nucleolar RNA.** *Biochemistry* (1986) 25(20):6258-6264.
- Hingorani S.R., Petricoin E.F., Maitra A., *et al.* **Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse.** *Cancer Cell.* (2003) 4(6):437-450.
- Hirakawa S., Hong Y.K., Harvey N., Schacht V., Matsuda K., Libermann T., Detmar M. **Identification of vascular lineage-specific genes by transcriptional profiling of isolated blood vascular and lymphatic endothelial cells.** *Am. J. Pathol.* (2003) 162:575-586.
- Hodivala-Dilke K. **Alphavbeta3 integrin and angiogenesis: a moody integrin in a changing environment.** *Curr. Opin. Cell. Biol.* (2008) 20:514-519.
- Hoja-Gukowicz D., Przybyio M., Pochec E., Drabik A., Silberring J., Kremser M., Schadendorf D., Laidler P., Lityjska A. **The new face of nucleolin in human melanoma.** *Cancer Immunol. Immunother.* (2009) 58:1471-1480.
- Hovanessian A.G., Puvion-Dutilleul F., Nisole S., Svab J., Perret E., Deng J.S., Krust B. **The cell-surface-expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton.** *Exp. Cell Res.* (2000) 261(2):312-328.
- Hovanessian A.G., Soundaramourty C., El Khoury D., Nondier I., Svab J., Krust B. **Surface expressed nucleolin is constantly induced in tumor cells to mediate calcium-dependent ligand internalization.** *PLoS One* (2010) 5(12):e15787.
- Huang Y., Shi H., Zhou H., Song X., Yuan S., Luo Y. **The angiogenic function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin.** *Blood* (2006) 107(9):3564-3571.
- Huang J., Roth R., Heuser J.E., Sadler J.E. **Integrin alpha(v)beta(3) on human endothelial cells binds von Willebrand factor strings under fluid shear stress.** *Blood* (2009) 113(7):1589-1597.
- Huang H., Bhat A., Woodnutt G., Lappe R. **Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy.** *Nat. Rev. Cancer* (2010) 10:575-585.
- Huang Y., Goel S., Duda D.G., Fukumura D., Jain R.K. **Vascular normalization as an emerging strategy to enhance cancer immunotherapy.** *Cancer Res.* (2013) 73(10):2943-2948.
- Hungerford J.E., Little C.D. **Developmental biology of the vascular smooth muscle cell: building a multilayered vessel wall.** *J. Vasc. Res.* (1999) 36:2-27.
- Iivanainen E., Nelimarkka L., Elenius V., *et al.* **Angiopoietin-regulated recruitment of vascular smooth muscle cells by endothelial-derived heparin binding EGF-like growth factor.** *FASEB J.* (2003) 17:1609-1621.
- Iruela-Arispe M.L., Davis G.E. **Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation.** *Dev. Cell* (2009) 16:222-231.
- Ishimaru D., Zuraw L., Ramalingam S., Sengupta T.K., Bandyopadhyay S., Reuben A., Fernandes D.J., Spicer E.K. **Mechanism of regulation of bcl-2 mRNA by nucleolin and A+U-rich element-binding factor 1 (AUF1).** *J. Biol. Chem.* (2010) 285(35):27182-27191.

- Jain R.K., Schlenger K., Höckel M., Yuan F. **Quantitative angiogenesis assays: progress and problems.** *Nat. Med.* (1997) 3(11):1203-1208.
- Jain R.K. **Molecular regulation of vessel maturation.** *Nature Med.* (2003) 9:685-693.
- Jain R.K. **Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy.** *Science* (2005) 307:58-62.
- Jamieson G.A. **Pathophysiology of platelet thrombin receptors.** *Thromb. Haemost.* (1997) 78:242-246.
- Joo E.J., ten Dam G.B., van Kuppevelt T.H., Toida T., Linhardt R.J., *et al.* **Nucleolin: acharan sulfate-binding protein on the surface of cancer cells.** *Glycobiology* (2005) 15(1):1-9.
- Ju R., Zhuang Z.W., Zhang J., Lanahan A.A., Kyriakides T., Sessa W.C., Simons M. **Angiopietin-2 secretion by endothelial cell exosomes. Regulation by the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and syndecan-4/syntenin pathways.** *J. Biol. Chem.* (2014) 289(1):510-519.
- Junttila M.R., de Sauvage F.J. **Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response.** *Nature* (2013) 501:346-354.
- Kalebic T., Garbisa S., Glaser B. **Basement membrane collagen degradation by migrating endothelial cells.** *Science* (1983) 221:281-284.
- Kappert K., Blaschke F., Meehan W.P., *et al.* **Integrins  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$  and  $\alpha\text{v}\beta\text{5}$  mediate VSMC migration and are elevated during neointima formation in the rat aorta.** *Basic Res. Cardiol.* (2001) 96(1):42-49.
- Kim I., Kim H.G., So J.N., Kim J.H., Kwak H.J., Koh G.Y. **Angiopietin-1 regulates endothelial cell survival through the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway.** *Circ. Res.* (2000) 86:24-29.
- Kim K.Y., Jeong S.Y., Won J., Ryu P.D., Nam M.J. **Induction of angiogenesis by expression of soluble type II transforming growth factor-beta receptor in mouse hepatoma.** *J. Biol. Chem.* (2001) 276(42):38781-38786.
- Kim K.T., Choi H.H., Steinmetz M.O., Maco B., Kammerer R.A., Ahn S.Y., Kim H.Z., Lee G.M., Koh G.Y. **Oligomerization and multimerization are critical for angiopietin-1 to bind and phosphorylate Tie2.** *J. Biol. Chem.* (2005) 280:20126-20131.
- Kindler H.L., Niedzwiecki D., Hollis D., Sutherland S., *et al.* **Gemcitabine plus bevacizumab compared with gemcitabine plus placebo in patients with advanced pancreatic cancer: phase III trial of the cancer and leukemia group B (CALGB 80303).** *J. Clin. Oncol.* (2010) 28:3617-3622.
- Klagsbrun M., D'Amore P.A. **Regulators of angiogenesis.** *Annu. Rev. Physiol.* (1991) 53:217-239.
- Koay E.J., Truty M.J., Cristini V., Thomas R.M., Chen R., Chatterjee D., Kang Y., Bhosale P.R., Tamm E.P., Crane C.H., *et al.* **Transport properties of pancreatic cancer describe gemcitabine delivery and response.** *J. Clin. Invest.* (2014) 124(4):1525-1536.

- Koch S., Claesson-Welsh L. **Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors.** *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* (2012) 2:a006502.
- Koh Y.J., *et al.* **Double antiangiogenic protein, DAAP, targeting VEGF-A and angiopoietins in tumor angiogenesis, metastasis, and vascular leakage.** *Cancer Cell.* (2010) 18(2):171-184.
- Kojima K., Vickers S.M., Adsay N.V., *et al.* **Inactivation of Smad4 accelerates Kras(G12D)-mediated pancreatic neoplasia.** *Cancer Res.* (2007) 67(17):8121-8130.
- Korc M. **Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer.** *Mol. Cancer* (2003) 2:8.
- Koutsoumpa M., Drosou G., Mikelis C., Theochari K., Vourtsis D., Katsoris P., Giannopoulou E., Courty J., Petrou C., Magafa V., Cordopatis P., Papadimitriou E. **Pleiotrophin expression and role in physiological angiogenesis *in vivo*: potential involvement of nucleolin.** *Vasc. Cell* (2012a) 4:4.
- Koutsoumpa M., Polytarchou C., Courty J., Zhang Y., Kieffer N., Mikelis C., Skandalis S.S., Hellman U., Iliopoulos D., Papadimitriou E. **Interplay between  $\alpha_v\beta_3$  integrin and nucleolin regulates human endothelial and glioma cell migration.** *J. Biol. Chem.* (2012b) 288(1):343-354.
- Krust B., El Khoury D., Nondier I., Soundaramourty C., Hovanessian A.G. **Targeting surface nucleolin with multivalent HB-19 and related Nucant pseudopeptides results in distinct inhibitory mechanisms depending on the malignant tumor cell type.** *BMC Cancer* (2011) 11:333.
- Lahav J., Hynes R.O. **Involvement of fibronectin, von Willebrand factor, and fibrinogen in platelet interaction with solid substrata.** *J. Sup. Struct. Cell. Bioch.* (1981) 17:299-311.
- Larrucea S., Gonzalez-Rubio C., Cambronero R., Ballou B., Bonay P., Lopez-Granados E., Bouvet P., Fontan G., Fresno M., Lopez-Trascasa M. **Cellular adhesion mediated by factor J, a complement inhibitor. Evidence for nucleolin involvement.** *J. Biol. Chem.* (1998) 273(43):31718-31725.
- Lawrence B., Gustafsson B.I., Chan A., *et al.* **The epidemiology of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors.** *Endocrinol. Metab. Clin. North. Am.* (2011) 40:1-18.
- Legrand D., Vigie K., Said E.A., Ellass E., Masson M., Slomianny M.C., Carpentier M., Briand J.P., Mazurier J., Hovanessian A.G. **Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells.** *Eur. J. Biochem.* (2004) 271(2):303-317.
- Leitinger N., Wesierka-Gadek J. **ADP-ribosylation of nucleolar proteins in HeLa tumor cells.** *J. Cell. Bioch.* (1993) 52:153-158.
- Lenting P.J., Casari C., Christophe O.D., Denis C.V. **von Willebrand factor: the old, the new and the unknown.** *J. Thromb. Haemost.* (2012) 10:2428-2437.
- Levéen P., Pekny M., Gebre-Medhin S., Swolin B., Larsson E., Betsholtz C. **Mice deficient for PDGFB show renal, cardiovascular, and hematological abnormalities.** *Genes Dev.* (1994) 8:1875-1887.
- Ley K., Reutershan J. **Leukocyte-endothelial interactions in health and diseases.** *Handbook of Pharmacology: The vascular endothelium II.* (2006) 97-133.
- Li D., Dobrowolska G., Krebs E.G. **The physical association of casein kinase 2 with nucleolin.** *J. Biol. Chem.* (1996) 271(26):15662-15668.

- Li J., Zhang Y.P., Kirsner R.S. **Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and the extracellular matrix.** *Microsc. Res. Tech.* (2003) 60(1):107-114.
- Lischwe M.A., Richards R.L., Busch R.K., Busch H. **Localization of phosphoprotein C23 to nucleolar structures and to the nucleolus organizer regions.** *Exp. Cell Res.* (1981) 136(1):101-109.
- Lischwe M.A., Roberts K.D., Yeoman L.C., Busch, H. **Nucleolar specific acidic phosphoprotein C23 is highly methylated.** *J. Biol. Chem.* (1982) 257(24):14600-14602.
- Liu H.T., Yung B.Y. **In vivo interaction of nucleophosmin/B23 and protein C23 during cell cycle progression in HeLa cells.** *Cancer lett.* (1999) 144(1):45-54.
- Lopes da Silva M., Cutler D.F. **von Willebrand factor multimerization and the polarity of secretory pathways in endothelial cells.** *Blood* (2016) 128(2):277-285.
- Lorenzi O., Frieden M., Villemin P., Fournier M., Foti M., Vischer U.M. **Protein kinase C- $\delta$  mediates von Willebrand factor secretion from endothelial cells in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) but not histamine.** *J. Thromb. Haemost.* (2008) 6:1962-1969.
- Losfeld M-E., Leroy A., Coddeville B., Carpentier M., Mazurier J., Legrand D. **N-glycosylation influences the structure and self-association abilities of recombinant nucleolin.** *FEBS J.* (2011) 278:2552-2564.
- Lucke S., Levkau B. **Endothelial functions of sphingosine-1-phosphate.** *Cell. Physiol. Biochem.* (2010) 26:87-96.
- Lui-Roberts W.W., Collinson L.M., Hewlett L.J., Michaux G., Cutler D.F. **An AP-1/clathrin coat plays a novel and essential role in forming the Weibel-Palade bodies of endothelial cells.** *J. Cell Biol.* (2005) 170:627-636.
- Lui-Roberts W.W., Ferraro F., Nightingale T.D., Cutler D.F. **Aftiphilin and gamma-synergin are required for secretagogue sensitivity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells.** *Mol. Biol. Cell* (2008) 19:5072-5081.
- Lunardi S., Muschel R.J., Brunner T.B. **The stromal compartments in pancreatic cancer: Are there any therapeutic targets?** *Cancer Lett.* (2014) 343:147-155.
- Lyons C.R., Orloff G.J., Cunningham J.M. **Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line.** *J. Biol. Chem.* (1992) 267:6370-6374.
- Ma N., Matsunaga S., Takata H., Ono-Maniwa R., Uchiyama S., Fukui K. **Nucleolin functions in nucleolus formation and chromosome congression.** *J. Cell Sci.* (2007) 120:2091-2105.
- Maisonpierre P.C., Suri C., Jones P.F., Bartunkova S., Wiegand S.J., Radziejewski C., Compton D., McClain J., Aldrich T.H., Papadopoulos N., Daly T.J., Davis S., Sato T.N., Yancopoulos G.D. **Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis.** *Science* (1997) 277:55-60.

- Makanya A.N., Hlushchuk R., Djonov V.G. **Intussusceptive angiogenesis and its role in vascular morphogenesis, patterning, and remodeling.** *Angiogenesis* (2009) 12:113-123.
- Mamrack M.D., Olson M.O., Busch H. **Amino acid sequence and sites of phosphorylation in a highly acidic region of nucleolar nonhistone protein C23.** *Biochemistry* (1979) 18(15):3381-3386.
- Mandriota S.J., Pepper M.S. **Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia.** *Circ. Res.* (1998) 83:852-859.
- Manneville J.B., Etienne-Manneville S., Skehel P., Carter T., Ogden D., Ferenczi M. **Interaction of the actin cytoskeleton with microtubules regulates secretory organelle movement near the plasma membrane in human endothelial cells.** *J. Cell Sci.* (2003) 116:3927-3938.
- Matouk C.C., Marsden P.A. **Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression.** *Circ. Res.* (2008) 102:873-887.
- Matsushita K., Yamakuchi M., Morrell C.N., Ozaki M., O'Rourke B., Irani K., Lowenstein C.J. **Vascular endothelial growth factor regulation of Weibel-Palade-body exocytosis.** *Blood* (2005) 105:207-214.
- McKenna L.R., Edil B.H. **Update on pancreatic neuroendocrine tumors.** *Gland Surgery* (2014) 3(4):258-275.
- McNiff J.M., Gil J. **Secretion of Weibel-Palade bodies observed in extra-alveolar vessels of rabbit lung.** *J. Appl. Physiol.* (1983) 54(5):1284-1286.
- Merchant N.B., Rymer J., Koehler E.A., Ayers G.D., Castellanos J., Kooby D.A., Weber S.H., Cho C.S., Schmidt C.M., Nakeeb A., *et al.* (2009). **Adjuvant chemoradiation therapy for pancreatic adenocarcinoma: who really benefits?** *J. Am. Coll. Surg.* (2009) 208:829-838.
- Metcalf D.J., Nightingale T.D., Zenner H.L., Lui-Roberts W.W., Cutler D.F. **Formation and function of Weibel-Palade bodies.** *J. Cell Sci.* (2008) 121:19-27.
- Michaux G., Cutler D.F. **How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of Weibel-Palade Bodies.** *Traffic* (2004) 5:69-78.
- Michel C.C., Curry F.E. **Microvascular permeability.** *Physiol. Rev.* (1999) 79:703-761.
- Minshall R.D., Malik A.B. **Transport across the endothelium: regulation of endothelial permeability.** *Handbook of Pharmacology: The vascular endothelium I.* (2006) 107-144.
- Monahan-Earley R., Dvorak A.M., Aird W.C. **Evolutionary origins of the blood vascular system and endothelium.** *J. Thromb. Haemost.* (2013) 11(Suppl. 1):46-66.
- Motz G.T., Coukos G. **The parallel lives of angiogenesis and immunosuppression: cancer and other tales.** *Nat. Rev. Immunol.* (2011) 11:702-711.
- Nagy J.A., Vasile E., Feng D., Sundberg C., Brown L.F., Detmar M.J., Lawitts J.A., Benjamin L., Tan X., Manseau E.J., Dvorak A.M., Dvorak H.F. **Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis.** *J. Exp. Med.* (2002) 196:1497-1506.



Nagy J.A., Chang S.H., Dvorak A.M., Dvorak H.F. **Why are tumour blood vessels abnormal and why is it important to know?** *Br. J. Cancer* (2009) 100:865-869.

Nicosia R.F., Lin Y.J., Hazelton D., Qian X.H. **Endogenous regulation of angiogenesis in the rat aorta model. Role of vascular endothelial growth factor.** *Am. J. Pathol.* (1997) 151(5):1379-1386.

Nightingale T., Cutler D. **The secretion of von Willebrand factor from endothelial cells; an increasingly complicated story.** *J. Thromb. Haemost.* (2013) 11(Suppl. 1):192-201.

Nishishita T., Lin P.C. **Angiopoietin 1, PDGF-B, and TGF-beta gene regulation in endothelial cell and smooth muscle cell interaction.** *J. Cell Biochem.* (2004) 91:584-593.

Nisole S., Krust B., Callebaut C., Guichard G., Muller S., Briand J-P., Hovanessian A.G. **The anti-HIV pseudopeptide HB-19 forms a complex with the cell-surface-expressed nucleolin independent of heparan sulfate proteoglycans.** *J. Biol. Chem.* (1999) 274(39):27875-27884.

Nisole S., Krust B., Dam E., Bianco A., Seddiki N., Loaec S., Callebaut C., Guichard G., Muller S., Briand J-P., Hovanessian A.G. **The HB-19 pseudopeptide 5[Kc(CH<sub>2</sub>N)PR]-TASP inhibits attachment of T lymphocyte- and macrophage-tropic HIV to permissive cells.** *AIDS Res. Hum. Retroviruses* (2000) 16(3):237-249.

Nisole S., Said E.A., Mische C., Prevost M-C., Krust B., Bouvet P., Bianco A., Briand J-P., Hovanessian A.G. **The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 binds the C-terminal end of nucleolin and prevents anchorage of virus particles in the plasma membrane of target cells.** *J. Biol. Chem.* (2002) 277:20877-20886.

Norrby K. **In vivo models of angiogenesis.** *J. Cell. Mol. Med.* (2006) 10(3):588-612.

Oh H., Takagi H., Suzuma K., Otani A., Matsumura M., Honda Y. **Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells.** *J. Biol. Chem.* (1999) 274:15732-15739.

Olive K.P., Jacobetz M.A., Davidson C.J., Gopinathan A., McIntyre D., Honess D., Madhu B., Goldgraben M.A., Caldwell M.E., Allard D., *et al.* **Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer.** *Science* (2009) 324(5933):1457-1461.

Olson M.O., Ezrailson E.G., Guetzow K., Busch H. **Localization and phosphorylation of nuclear, nucleolar and extranucleolar non-histone proteins of Novikoff hepatoma ascites cells.** *J. Mol. Biol.* (1975) 97(4):611-619.

Olson M.O., Thompson B.A. **Distribution of proteins among chromatin components of nucleoli.** *Biochemistry* (1983) 22(13):3187-3193.

Orrick L.R., Olson M.O.J., Busch H. **Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* (1973) 70(5):1316-1320.

Otake Y., Soundararajan S., Sengupta T.K., Kio E.A., Smith J.C., Pineda-Roman M., Stuart R.K., Spicer E.K., Fernandes D.J. **Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA.** *Blood* (2007) 109(7):3069-3075.

- Oynebraten I, Bakke O, Brandtzaeg P, Johansen F. E., Haraldsen G. **Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments.** *Blood* (2004) 104:314-320.
- Palmieri D, Richmond T, Piovan C, Sheetz T, Zanesi N, Troise F, James C, Wernicke D, Nyei F, Gordon T.J., Consiglio J, Salvatore F, Coppola V, Pichiorri F, De Lorenzo C.,f,1, Croce C.M. **Human anti-nucleolin recombinant immunoagent for cancer therapy.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2015) 112(30):9418-9423.
- Pan D., *et al.* **Molecular photoacoustic imaging of angiogenesis with integrin-targeted gold nanobeacons.** *FASEB J.* (2011) 25(3):875-882.
- Pardali E, Goumans M.J., ten Dijke P. **Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease.** *Trends Cell Biol.* (2010) 20:556-567.
- Park Y.S., Kim N.H., Jo I. **Hypoxia and vascular endothelial growth factor acutely up-regulate angiopoietin-1 and Tie2 mRNA in bovine retinal pericytes.** *Microvasc. Res.* (2003) 65:125-131.
- Park J-S., Kim I-K., Han S., Park I., Kim C., Bae J., Oh S.J., Lee S., Kim J.H., Woo D-C., He Y., Augustin H.G., Kim I., Lee D., Koh G.Y. **Normalization of tumor vessels by tie2 activation and ang2 inhibition enhances drug delivery and produces a favorable tumor microenvironment.** *Cancer Cell* (2016) 30:953-967.
- Park D.Y., Lee J., Kim J., Kim K., Hong S., Han S., Kubota Y., Augustin H.G., Ding L., Kim J.W., Kim H., He Y., Adams R.H., Koh G.Y. **Plastic roles of pericytes in the blood retinal barrier.** *Nat. Commun.* (2017) 8:15296.
- Partanen J., Puri M.C., Schwartz L., Fischer K.D., Bernstein A., Rossant J. **Cell autonomous functions of the receptor tyrosine kinase TIE in a late phase of angiogenic capillary growth and endothelial cell survival during murine development.** *Development* (1996) 122:3013-3021.
- Partecke L.I., Sendler M., Kaeding A., *et al.* **A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines.** *Eur. Surg. Res.* (2011) 47:98-107.
- Pegon J.N., Kurdi M., Casari C., Odouard S., Denis C.V., Christophe O.D., Lenting P.J. **Factor VIII and von Willebrand factor are ligands for the carbohydrate-receptor Siglec-5.** *Haematologica* (2012) 97(12):1855-1863.
- Pendu R., Terraube V., Christophe O.D., Gahmberg C.G., de Groot P.G., Lenting P.J., Denis C.V. **P-selectin glycoprotein ligand 1 and beta2- integrins cooperate in the adhesion of leukocytes to von Willebrand factor.** *Blood* (2006) 108:3746-3752.
- Peter M., Nakagawa J., Doree M., Labbe J.C., Nigg E.A. **Identification of major nucleolar proteins as candidate mitotic substrates of cdc2 kinase.** *Cell* (1990) 60(5):791-801.
- Petri B., Broermann A., Li H., Khandoga A.G., Zarbock A., Krombach F., Goerge T., Schneider S.W., Jones C., Nieswandt B., Wild M.K., Vestweber D. **von Willebrand factor promotes leukocyte extravasation.** *Blood* (2010) 116:4712-4719.
- Phng L.K., Gerhardt H. **Angiogenesis: a team effort coordinated by notch.** *Dev. Cell* (2009) 16:196-208.

Pollock J.S., Fostermann U., Mitchell J.A., Warner T.D., Schmidt H.H., Nakane M., Murad F. **Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine endothelial cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (1991) 88:10480-10484.

Potente M., Gerhardt H., Carmeliet P. **Basic and therapeutic aspects of angiogenesis.** *Cell* (2011) 146:873-887.

Prestayko A.W., Klomp G.R., Schmoll D.J., Busch H. **Comparison of proteins of ribosomal subunits and nucleolar preribosomal particles from Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis.** *Biochemistry* (1974) 13(9):1945-1951.

Procopio W.N., Pelavin P.I., Lee W.M., Yeilding N.M. **Angiopoietin-1 and -2 coiled coil domains mediate distinct homo-oligomerization patterns, but fibrinogen-like domains mediate ligand activity.** *J. Biol. Chem.* (1999) 274:30196-30201.

Puri M.C., Rossant J., Alitalo K., Bernstein A., Partanen J. **The receptor tyrosine kinase TIE is required for integrity and survival of vascular endothelial cells.** *EMBO J.* (1995) 14:5884-5891.

Pusztaszeri M.P., Seelentag W., Bosman F.T. **Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues.** *J. Histochem. Cytochem.* (2006) 54:385-395.

Raica M., Cimpean A.M. **Platelet-derived growth factor (PDGF)/PDGF receptors (PDGFR) axis as target for antitumor and antiangiogenic therapy.** *Pharmaceuticals* (2010) 3:572-599.

Rajantie I., Ilmonen M., Alminaita A., Ozerdem U., Alitalo K., Salven P. **Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells.** *Blood* (2004) 104:2084-2086.

Rakocevic J., Orlic D., Mitrovic-Ajtic O., Tomasevic M., Dobric M., Zlatic N., Milasinovic D., Stankovic G., Ostojić M., Labudovic-Borovic M. **Endothelial cell markers from clinican's perspective.** *Exp. Mol. Pathol.* (2017) 102:303-313.

Randi A.M. **Endothelial dysfunction in von Willebrand disease: angiogenesis and angiodysplasia.** *Thromb. Res.* (2016) 141S2:S55-S58.

Rao S.V., Mamrack M.D., Olson M.O. **Localization of phosphorylated highly acidic regions in the NH2-terminal half of nucleolar protein C23.** *J. Biol. Chem.* (1982) 257(24):15035-15041.

Raymond E., Dahan L., Raoul J.L., *et al.* **Sunitinib malate for the treatment of pancreatic neuroendocrine tumors.** *N. Engl. J. Med.* (2011) 364:501-513.

Rhim A.D., Stanger B.Z. **Molecular biology of pancreatic ductal adenocarcinoma progression: aberrant activation of developmental pathways.** *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* (2010) 97:41-78.

Rhim A.D., Oberstein P.E., Thomas D.H., Mirek E.T., Palermo C.F., Sastra S.A., Dekleva E.N., Saunders T., Becerra C.P., Tattersall I.W., *et al.* **Stromal elements act to restrain, rather than support, pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Cancer Cell* (2014) 25(6):735-747.

Rickards B., Flint S.J., Cole M.D., LeRoy G. **Nucleolin is required for RNA polymerase I transcription *in vivo***. *Mol. Cell. Biol.* (2007) 27(3):937-948.

Robinson C.J., Stringer S.E. **The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors**. *J. Cell Sci.* (2001) 114:853-865.

Roger B., Moisand A., Amalric F., Bouvet P. **Nucleolin provides a link between RNA polymerase I transcription and pre-ribosome assembly**. *Chromosoma* (2003) 111:399-407.

Rojo Pulido I., Nightingale T.D., Darchen F., Seabra M.C., Cutler D.F., Gerke V. **Myosin Va acts in concert with Rab27a and MyRIP to regulate acute von Willebrand factor release from endothelial cells**. *Traffic* (2011) 12:1371-1382.

Romani de Wit T., de Leeuw H.P., Rondaij M.G., de Laaf R.T., Sellink E., Brinkman H.J., Voorberg J., van Mourik J.A. **Von Willebrand factor targets IL-8 to Weibel-Palade bodies in an endothelial cell line**. *Exp. Cell Res.* (2003a) 286:67-74.

Romani de Wit T., Rondaij M.G., Hordijk P.L., Voorberg J., van Mourik J.A. **Real-time imaging of the dynamics and secretory behavior of Weibel-Palade bodies**. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2003b) 23(5):755-761.

Rondaij M.G., Bierings R., Kragt A., van Mourik J.A., Voorberg J. **Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells**. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2006a) 26:1002-1007.

Rondaij M.G., Bierings R., Kragt A., Gijzen K.A., Sellink E., van Mourik J.A., Fernandez-Borja M., Voorberg J. **Dynein-dynactin complex mediates protein kinase A-dependent clustering of Weibel-Palade bodies in endothelial cells**. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (2006b) 26:49-55.

Rondaij M.G., Bierings R., van Agtmaal E.L., Gijzen K.A., Sellink E., Kragt A., Ferguson S.S.G., Mertens K., Hannah M.J., van Mourik J.A., Fernandez-Borja M., Voorberg J. **Guanine exchange factor RalGDS mediates exocytosis of Weibel-Palade bodies from endothelial cells**. *Blood* (2008) 112:56-63.

Rosenberg J.E., Bambury R.M., Van Allen E.M., Drabkin H.A., Lara Jr P.N., Harzstark A.L., Wagle N., Figlin R.A., Smith G.W., Garraway L.A., Choueiri T., Erlandsson F., Laber D.A. **A phase II trial of AS1411 (a novel nucleolin-targeted DNA aptamer) in metastatic renal cell carcinoma**. *Invest. New Drugs* (2014) 32:178-187.

Rothberg K.G., Heuser J.E., Donzell W.C., Ying Y.S., Glennery J.R., Anderson R.G. **Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats**. *Cell* (1992) 68:673-682.

Rozenblum E., *et al.* **Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma**. *Cancer Res.* (1997) 57:1731-1734.

Rucker H.K., Wynder H.J., Thomas W.E. **Cellular mechanisms of brain pericytes**. *Brain Res. Bull.* (2000) 51:363-369.

Sader M., Couleaud P., Carpentier G., Gilles M-E., Bousserhine N., Livet A., Cascone I., Destouches D., Cortajarena A.L., Courty J. **Functionalization of iron oxide magnetic nanoparticles with the multivalent pseudo-peptide N6L for breast tumor targeting**. *J. Nanomed. Nanotechnol.* (2015) 6(4):299.

- Sadler J.E. **Biochemistry and genetics of von Willebrand factor.** *Annu. Rev. Biochem.* (1998) 67:395-424.
- Sadler J.E., Budde U., Eikenboom J.C., et al. **Working party on von Willebrand disease classification. Update on the pathophysiology and classification of von Willebrand disease: a report of the subcommittee on von Willebrand factor.** *J. Thromb. Haemost.* (2006) 4(10):2103-2114.
- Saharinen P., Kerkela K., Ekman N., Marron M., Brindle N., Lee G.M., Augustin H., Koh G.Y., Alitalo K. **Multiple angiopoietin recombinant proteins activate the Tie1 receptor tyrosine kinase and promote its interaction with Tie2.** *J. Cell Biol.* (2005) 169:239-243.
- Said E.A., Courty J., Svab J., Delbe J., Krust B., Hovanessian A.G. **Pleiotrophin inhibits HIV infection by binding the cell surface-expressed nucleolin.** *FEBS J.* (2005) 272(18):4646-4659.
- Sankar S., Mahooti-Brooks N., Bensen L., McCarthy T.L., Centrella M., Madri J.A. **Modulation of transforming growth factor beta receptor levels on microvascular endothelial cells during *in vitro* angiogenesis.** *J. Clin. Invest.* (1996) 97(6):1436-1446.
- Sato T.N., Tozawa Y., Deutsch U., Wolburg-Buchholz K., Fujiwara Y., Gendron-Maguire M., Gridley T., Wolburg H., Risau W., Qin Y. **Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation.** *Nature* (1995) 376:70-74.
- Sato N., et al. **Correlation between centrosome abnormalities and chromosomal instability in human pancreatic cancer cells.** *Cancer Genet. Cytogenet.* (2001) 126:13-19.
- Sauer G., Korner R., Hanisch A., Ries A., Nigg E.A., Sillje H.H. **Proteome analysis of the human mitotic spindle.** *Mol. Cell. Proteomics* (2005) 4:35-43.
- Scheppke L., Murphy E.A., Zarpellon A., et al. **Notch promotes vascular maturation by inducing integrin-mediated smooth muscle cell adhesion to the endothelial basement membrane.** *Blood* (2012) 119:2149-2158.
- Schokoroy S., Juster D., Kloog Y., Pinkas-Kramarski R. **Disrupting the oncogenic synergism between nucleolin and Ras results in cell growth inhibition and cell death.** *PLoS One* (2013) 8(9):e75269.
- Semenkovich C.F., Ostlund R.E. Jr., Olson M.O., Yang J.W. **A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin.** *Biochemistry* (1990) 29(41):9708-9713.
- Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., et al. **Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid.** *Science* (1983) 219:983-985.
- Sengupta T.K., Bandyopadhyay S., Fernandes D.J., Spicer E.K. **Identification of nucleolin as an AU-rich element binding protein involved in bcl-2 mRNA stabilization.** *J. Biol. Chem.* (2004) 279(12):10855-10863.
- Serin G., Joseph G., Faucher C., Ghisolfi L., Bouche G., Amalric F., Bouvet P. **Localization of nucleolin binding sites on human and mouse pre-ribosomal RNA.** *Biochimie* (1996) 78(6):530-538.



- Serin G., Joseph G., Ghisolfi L., Bauzan M., Erard M., Amalric F., Bouvet P. **Two RNA-binding domains determine the RNA-binding specificity of nucleolin.** *J. Biol. Chem.* (1997) 272(20):13109-13116.
- Sessa W.C., Harrison J.K., Barber C.M., Zeng D., Durieux M.E., D'Angelo D.D., Lynch K.R., Peach M.J. **Molecular cloning and expression of a cDNA encoding endothelial cell nitric oxide synthase.** *J. Biol. Chem.* (1992) 267:15274-15278.
- Seufferlein T., Bachet J.B., Van Cutsem E., Rougier P. **Pancreatic adenocarcinoma: ESMO-ESDO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up.** *Annals of Oncology* (2012) 23(Supplement 7):vii33-vii40.
- Shepro D., Morel N.M.L. **Pericyte physiology.** *FASEB J.* (1993) 7:1031-1038.
- Sherr C.J. **The INK4A/ARF network in tumour suppression.** *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* (2001) 2:731-737.
- Shi H., Huang Y., Zhou H., Song X., Yuan S., Fu Y., Luo Y. **Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin.** *Blood* (2007) 110(8):2899-2906.
- Shibata Y., Muramatsu T., Hirai M., Inui T., Kimura T., Saito H., McCormick L.M., Bu G., Kadomatsu K. **Nuclear targeting by the growth factor midkine.** *Mol. Cell. Biol.* (2002) 22(19):6788-6796.
- Song N., Ding Y., Zhuo W., He T., Fu Z., Chen Y., Song X., Fu Y., Luo Y. **The nuclear translocation of endostatin is mediated by its receptor nucleolin in endothelial cells.** *Angiogenesis* (2012) 15:697-711.
- Soriano P. **Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice.** *Genes Dev.* (1994) 8:1888-1896.
- Sounni N.E., Devy L., Hajitou A., Frankenne F., *et al.* **MT1-MMP expression promotes tumor growth and angiogenesis through an up-regulation of vascular endothelial growth factor expression.** *FASEB J.* (2002) 16:555-564.
- Srivastava M., Fleming P. J., Pollard H. B., Burns A. L. **Cloning and sequencing of the human nucleolin cDNA.** *FEBS Lett.* (1989) 250(1):99-105.
- Srivastava M., McBride O.W., Fleming P. J., Pollard H.B., Burns A.L. **Genomic organization and chromosomal localization of the human nucleolin gene.** *J. Biol. Chem.* (1990) 265(25):14922-14931.
- Srivastava M., Pollard H.B. **Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights.** *FASEB J.* (1999) 13:1911-1922.
- Srivastava K., Hu J., Korn C., Savant S., Teichert M., Kapel S.S., Jugold M., Besemfelder E., Thomas M., Pasparakis M., Augustin H.G. **Postsurgical adjuvant tumor therapy by combining anti-angiopoietin-2 and metronomic chemotherapy limits metastatic growth.** *Cancer Cell.* (2014) 26:880-895.

- Stahl A., Connor K.M., Sapieha P., Chen J., Dennison R.J., Krah N.M., Seaward M.R., Willett K.L., Aderman C.M., Guerin K.I., Hua J., Löfqvist C., Hellström A., Smith L.E.H. **The mouse retina as an angiogenesis model.** *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2010) 51(6):2813-2826.
- Starke R.D., Ferraro F., Paschalaki K.E., Dryden N.H., McKinnon T.A.J., Sutton R.E., Payne E.M., Haskard D.O., Hughes A.D., Cutler D.F., Laffan M.A., Randi A.M. **Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis.** *Blood* (2011) 117(3):1071-1080.
- Starke R.D., Paschalaki K.E., Dyer C.E., Harrison-Lavoie K.J., Cutler D.F., McKinnon T.A., *et al.* **Defective angiopoietin-2 release from von Willebrand disease patients' blood outgrowth endothelial cells.** *J. Thromb. Haemost.* (2013) 11.
- Staton C.A., Reed M.W.R., Brown N.J. **A critical analysis of current *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assays.** *Int. J. Exp. Path.* (2009) 90(3):195-221.
- Stegemann J.P., Kaszuba S.N., Rowe S.L. **Review: advances in vascular tissue engineering using protein-based biomaterials.** *Tissue Eng.* (2007) 13:2601-2613.
- Stone J., Dreher Z. **Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina.** *J. Comp. Neurol.* (1987) 255:35-49.
- Stylianopoulos T., Jain R.K. **Combining two strategies to improve perfusion and drug delivery in solid tumors.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2013) 110(46):18632-18637.
- Suburo A.M., D'Amore P.A. **Development of the endothelium.** *Handbook of Pharmacology: The vascular endothelium I.* (2006) 71-106.
- Sumpio B.E., Riley J.T., Dardik A. **Cells in focus: endothelial cell.** *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2002) 34:1508-1512.
- Sundberg C., Ivarsson M., Gerdin B., Rubin K. **Pericytes as collagen-producing cells in excessive dermal scarring.** *Lab. Invest.* (1996) 74:452-466.
- Suri C., Jones P.F., Patan S., Bartunkova S., Maisonpierre P.C., Davis S., Sato T.N., Yancopoulos G.D. **Requisite role of angiopoietin-1, a ligand for the TIE2 receptor, during embryonic angiogenesis.** *Cell* (1996) 87:1171-1180.
- Swift M.R., Weinstein B.M. **Arterial-venous specification during development.** *Circ. Res.* (2009) 104:576-588.
- Takagi M., Absalon M.J., McLure K.G., Kastan M.B. **Regulation of p53 translation and induction after DNA damage by ribosomal protein L26 and nucleolin.** *Cell* (2005) 123(1):49-63.
- Tate A., Isotani S., Bradley M.J., Sikes R.A., Davis R., Chung L.W., Edlund M. **Met-independent hepatocyte growth factor-mediated regulation of cell adhesion in human prostate cancer cells.** *BMC Cancer* (2006) 6:197.
- Teichert M., Milde L., Holm A., *et al.* **Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation.** *Nat. Commun.* (2017) 8:16106.
- Tennant M., McGeachie J.K. **Blood vessel structure and function: a brief update on recent**

**advances.** *Aust. N.Z. J. Surg.* (1990) 60:747-753.

Thomas M., Augustin H.G. **The role of the Angiopoietins in vascular morphogenesis.** *Angiogenesis* (2009) 12:125-137.

Thurston G., Suri C., Smith K., McClain J., Sato T.N., Yancopoulos G.D., McDonald D.M. **Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1.** *Science* (1999) 286:2511-2514.

Thurston G., Noguera-Troise I., Yancopoulos G.D. **The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth.** *Nat. Rev. Cancer* (2007) 7:327-331.

Tilton R.G., Kilo C., Williamson J.R. **Pericyte-endothelial relationships in cardiac and skeletal muscle capillaries.** *Microvasc. Res.* (1979) 18:325-335.

Timmermans F., Plum J., Yöder M.C., Ingram D.A., Vandekerckhove B., Case J. **Endothelial progenitor cells: identity defined?** *J. Cell. Mol. Med.* (2009) 13(1):87-102.

Tirziu D., Simons M. **Endothelium as master regulator of organ development and growth.** *Vascul. Pharmacol.* (2009) 50:1-7.

Torres M.P., Rachagani S., Soucek J.J., *et al.* **Novel pancreatic cancer cell lines derived from genetically engineered mouse models of spontaneous pancreatic adenocarcinoma: applications in diagnosis and therapy.** *PLoS ONE* (2013) 8(11):e80580.

Ucuzian A.A., Gassman A.A., East A.T., Greisler H.P. **Molecular mediators of angiogenesis.** *J. Burn. Care Res.* (2010) 31(1):158.

Ugrinova I., Monier K., Ivaldi C., Thiry M., Storck S., Mongelard F., Bouvet P. **Inactivation of nucleolin leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest and defects in centrosome duplication.** *BMC Mol. Biol.* (2007) 8:66.

Uribe D.J., Guo K., Shin Y.-J., Sun D. **Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and nucleolin as transcriptional activators of the vascular endothelial growth factor promoter through interaction with Secondary DNA structures.** *Biochemistry* (2003) 50:3796-3806.

Utgaard J.O., Jahnsen F.L., Bakka A., Brandtzaeg P., Haraldsen, G. **Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells.** *J. Exp. Med.* (1998) 188:1751-1756.

Valentijn K.M., Valentijn J.A., Jansen K.A., Koster A.J. **A new look at Weibel-Palade body structure in endothelial cells using electron tomography.** *J. Struct. Biol.* (2008) 161:447-458.

Valentijn K.M., van Driel L.F., Mourik M.J., *et al.* **Multigranular exocytosis of Weibel Palade bodies in vascular endothelial cells.** *Blood* (2010) 116(10):1807-1816.

Valentijn K.M., Sadler J.E., Valentijn J.A., Voorberg J., Eikenboom J. **Functional architecture of Weibel-Palade Bodies.** *Blood* (2011) 117(19):5033-5043.

van Breevoort D., van Agtmaal E.L., Dragt B.S., Klein Gebbinck J., Dienava-Verdoold I., Kragt A., Bierings R., Horrevoets A.J.G., Valentijn K.M., Eikenboom J.C., Fernandez-Borja M., Meijer A.B.,

- Voorberg J. **Proteomic screen identifies IGFBP7 as a novel component of endothelial cell-specific Weibel-Palade bodies.** *J. Proteome Res.* (2012) 11:2925-2936.
- van den Biggelaar, Hernández-Fernaud J.R., van den Eshof B.L., Neilson L.J., Meijer A.B., Mertens K., Zanivan S. **Quantitative phosphoproteomics unveils temporal dynamics of thrombin signaling in human endothelial cells.** *Blood* (2014) 123(12):e22-e36.
- van Hinsbergh V.W.M. **Endothelial permeability for macromolecules: mechanistic aspects of pathophysiological modulation.** *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* (1997) 17:1018-1023.
- Veikkola T., Alitalo K. **Dual role of Ang2 in postnatal angiogenesis and lymphangiogenesis.** *Dev. Cell* (2002) 3:302-304.
- Verhamme P., Hoylaerts M.F. **The pivotal role of the endothelium in haemostasis and thrombosis.** *Acta. Clin. Belg.* (2006) 61:212-218.
- von Tell D., Armulik A., Betsholtz C. **Pericytes and vascular stability.** *Exp. Cell Res.* (2006) 312:623-629.
- Vrancken Peeters M.P., Gittenberger-de Groot A.C., Mentink M.M., Poelmann R.E. **Smooth muscle cells and fibroblasts of the coronary arteries derive from the epithelial-mesenchymal transformation of the epicardium.** *Anat. Embryol. (Berl).* (1999) 199:367-378.
- Wagner D.D., Olmsted J.B., Marder V.J. **Immunocolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells.** *J. Cell Biol.* (1982) 95:355-360.
- Wagner DD. **The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin.** *Thromb. Haemost.* (1993) 70: 105-110.
- Wang J-W., Bouwens E.A.M., Pintao M.C., Voorberg J., Safdar H., Valentijn K.M., de Boer H.C., Mertens K., Reitsma P.H., Eikenboom J. **Analysis of the storage and secretion of von Willebrand factor in blood outgrowth endothelial cells derived from patients with von Willebrand disease.** *Blood* (2013) 121(14):2762-2772.
- Weibel E.R., Palade G.E. **New cytoplasmic components in arterial endothelia.** *J. Cell Biol.* (1964) 23:101-112.
- Weibel, E.R. **Fifty years of Weibel-Palade bodies: the discovery and early history of an enigmatic organelle of endothelial cells.** *J. Thromb. Haemost.* (2012) 10:979-984.
- Weidenhofer J., Colvin E.K., Bond D.R., Scarlett C.J. **Animal models of pancreatic cancer and their application in clinical research.** *Gastrointest. Cancer* (2016) 6:31-39.
- Weiner L.M., Belldegrun A.S., Crawford J., Tolcher A.W., Lockbaum P., Arends R.H., Navale L., Amado R.G., Schwab G., Figlin R.A. **Dose and schedule study of panitumumab monotherapy in patients with advanced solid malignancies.** *Clin. Cancer Res.* (2008) 14:502-508.
- Weinstat-Saslow D., Steeg P.S. **Angiogenesis and colonization in the tumor metastatic process: basic and applied advances.** *FASEB J.* (1994) 8:401-407.
- Whatcott C.J., Han H., Posner R.G., Von Hoff D.D. **Tumor-stromal interactions in pancreatic cancer.** *Crit. Rev. Oncog.* (2013) 18:135-151.

- Whelan A.J., Bartsch D., Goodfellow P.J. **Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene.** *N. Engl. J. Med.* (1995) 333:975-977.
- Wise J.F., Berkova Z., Mathur R., Zhu H., Braun F.K., Tao R.H., Sabichi A.L., Ao X., Maeng H., Samaniego F. **Nucleolin inhibits Fas ligand binding and suppresses Fas-mediated apoptosis *in vivo* via a surface nucleolin-Fas complex.** *Blood* (2013) 121(23):4729-4739.
- Wolff B., Burns A.R., Middleton J., Rot A. **Endothelial cell “memory” of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies.** *J. Exp. Med.* (1998) 188:1757-1762.
- Xiong Y., Huo Y., Chen C., Zeng H., Lu X., Wei C., Ruan C., Zhang X., Hu Z., Shibuya M., Luo J. **Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 tyrosine 1175 signaling controls VEGF-induced von Willebrand factor release from endothelial cells *via* phospholipase C- $\gamma$ 1- and protein kinase A-dependent pathways.** *J. Biol. Chem.* (2009) 284:23217-23224.
- Xu Y., Yu Q. **Angiopoietin-1, unlike angiopoietin-2, is incorporated into the extracellular matrix *via* its linker peptide region.** *J. Biol. Chem.* (2001) 276:34990-34998.
- Yamamoto K. **Ultrastructural study on the venous sphincter in the sublobular vein of the canine liver.** *Microvasc. Res.* (1998) 55:215-222.
- Yuan H.T., Khankin E.V., Karumanchi S.A., Parikh S.M. **Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium.** *Mol. Cell. Biol.* (2009) 29:2011-2022.
- Yuan L., Chan G.C., Beeler D., Janes L., Spokes K.C., Dharaneeswaran H., *et al.* **A role of stochastic phenotype switching in generating mosaic endothelial cell heterogeneity.** *Nat. Commun.* (2016) 7:10160.
- Yui Y., Hattori R., Kosuga K., Eizawa H., Hiki K., Kawai C. **Purification of nitric oxide synthase from rat macrophages.** *J. Biol. Chem.* (1991) 266:12544-12548.
- Zeeb M., Strilic B., Lammert E. **Resolving cell-cell junctions: lumen formation in blood vessels.** *Curr. Opin. Cell Biol.* (2010) 22:626-632.
- Zenner H.L., Collinson L.M., Michaux G., Cutler D.F. **High-pressure freezing provides insights into Weibel-Palade body biogenesis.** *J. Cell Sci.* (2007) 120:2117-2125.
- Zhang J., Tsapralis G., Bowden G.T. **Nucleolin stabilizes Bcl-X<sub>L</sub> messenger RNA in response to UVA irradiation.** *Cancer Res.* (2008) 68(4):1046-1054.



## ANNEXES

### Annexe 1 : Matériels et méthodes supplémentaires de l'Article 1

#### Cell culture

Human PDAC cells lines were obtained and authenticated by ATCC. PANC-1 and MIA PaCa-2 cells were obtained in 2011, Capan-2 cells in 2014 and frozen in aliquots. Fresh aliquots were used for each experiment of Supplementary Fig. 1. PANC-1, BxPC-3, MIA PaCa-2 and PDAC were cultured in DMEM 10% FBS, Capan-2 were cultured in McCoy's 5A with 10% FBS. Murine pancreatic cancer cell line (Panc-02) was kindly provided by R. Ronca (University of Brescia) in 2016. Panc-02 cells were injected into the pancreas to generate a PDAC orthotopic mouse model as previously described (1) (Supplementary methods) showing similar tumor growth and histology.

#### Antibodies

Antibodies used in Western-Blotting were directed against nucleolin (rabbit polyclonal, Abcam ab22758), Ang-2 (goat polyclonal, R&D Systems AF623),  $\beta$ -tubulin (rabbit polyclonal, Abcam ab6046), GAPDH (mouse monoclonal, Invitrogen AM4300, clone 6C5), vinculine (mouse monoclonal, Sigma Aldrich V9131, clone hVIN-1) or  $\beta$ -actin (mouse monoclonal, Sigma Aldrich A3854, clone AC-15). Antibodies used for immunofluorescence were directed against nucleolin (rabbit polyclonal, Abcam ab22758), MECA32 (rat monoclonal, BD Pharmingen 550563, clone MECA-32), NG2 (rabbit polyclonal, Chemicon AB5320), PDGFR- $\beta$  (goat polyclonal, R&D Systems AF1042), cleaved-caspase-3 (rabbit polyclonal, Cell signaling 9661), Ki67 (Pierce), human Ang-2 (goat polyclonal, R&D Systems AF623), mouse Ang-2 (goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology sc-7015), vWF (rabbit polyclonal, DAKO A0082), collagen-I (goat polyclonal, Santa Cruz Biotechnology sc-8784) and CA9 (Novus biologicals).

#### siRNA sequences

Nucleolin siRNA sequence: CCACAAGGAAAGAagacgaag. Ang-2 siRNA sequence: ACUGCAAUCUGACAGUUUATT.

## Peptide constructs

Synthesis of N6L is described in detail in Supplementary Methods of (2). Briefly, the lysine-rich template is a  $3_{10}$  helical matrix composed respectively of 6 Lys-Aib-Gly repeats. The pseudotriptide N6L is composed of 6 Lys $\psi$ [CH<sub>2</sub>N]Pro-Arg grafted onto the  $\epsilon$  NH<sub>2</sub> of the matrix Lys residues.

## Isolation of murine pancreatic ductal pancreatic cells (mPDAC)

mPDAC cells were isolated from PDAC tumor-bearing mice. The pancreatic cancer GEMM model was from FVB/n background. The combined *p53* point mutant and *INK4a/Arf* floxed mice - *KIAPP48Cre* had the following genetic make-up: *p48<sup>cre</sup>*, *Kras<sup>LSL-G12D</sup>*, *p53<sup>R172H/+</sup>*, *Ink4a/Arf<sup>lox/+</sup>*. Note that, the wild-type allele of corresponding tumor suppressor gene is lost under way to tumor formation. Mice were housed, fed, and treated in accordance with protocols approved by the committee for animal research at canton Vaud, Switzerland. Tumors were excised, minced and incubated at 37°C in stirring container for 20 minutes in 5 mL of collagenase cocktail [collagenase cocktail: 25 mg collagenase type II (17101015, Gibco), 25 mg collagenase type IV (C5138, Sigma Aldrich), and 5 mg DNase I (DP, Worthington) dissolved in 25 mL of DMEM (41965-039, Gibco)]. At the end of the incubation period the cells were filtered over a 70  $\mu$ m mesh cell strainer (93070, SPL life sciences) into DMEM supplemented with 10% FBS. The cells were washed twice in DMEM (5 minutes at 300g at room temperature). The supernatant was discarded, the pellet was resuspended in DMEM with 10% FBS supplemented with penicillin, streptomycin and plated on collagen-coated plates. All cell lines were maintained in DMEM with 10% FBS on plastic.

## Cell proliferation and tumor cell migration and invasion

Cells ( $1 \times 10^4$ ) treated with N6L or pretreated by 0.2  $\mu$ M of NUCLEOLIN antibody (MS3 clone Santa Cruz) for 30 minutes were analyzed for cell viability (alamar blue, Invitrogen), by using the TECAN Infinite M1000 plate reader (Tecan, Durham, NC). For cell cycle analysis, cells were labeled with BrdU and processed for Milteny FACScan (FITC-BrdU flow kit, BD Bioscience Pharmingen). Cell cycle analysis was made on MACSQuantify™ software version 2.4.

Tumor cell migration and invasion was performed as previously described (3). For cell invasion, the upper chamber was incubated with 1% of Matrigel (BD Biosciences) before the experiment.

### **ELISA, Western blotting and affinity isolation experiments**

HUVECs ( $15 \times 10^4$ ) were seeded in 12-well plate. The day after, cells were stimulated with N6L at the indicated concentrations for 5 hours in EGM-2 medium (Lonza). Starving medium was then added for 1 hour in presence or absence of N6L and cell supernatants were collected and cells were lysed. Ang-2 in cell lysates was analyzed by Western blotting. Ang-2 levels in cell supernatants were measured by using DuoSet methodology ELISA (R&D Systems DY623) and the TECAN Infinite M1000 plate reader (Tecan, Durham, NC). Ang-2 amount in cell supernatants was normalized to the total protein amount of cells in each well calculated by BCA dosage (Pierce). HUVEC supernatants were also analyzed by Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit (ARY007, R&D Systems). Plasmatic Ang-2 levels were analyzed by using Angiopoietin-2 mouse ELISA kit (Abcam) and von Willebrand factor as previously described (4). Ang-2 levels were normalized to von Willebrand factor plasmatic levels. Plasmatic PDGF- $\beta\beta$  levels were measured by using DuoSet methodology ELISA (R&D Systems DY8464-05) and normalized to the amount of secreted vWF in the corresponding mouse plasma.

Cell lysates were prepared in RIPA buffer and protein extraction from liver, tumor or healthy pancreas was performed with TRIzol. Protein samples were separated by SDS-PAGE transferred onto a 0.45  $\mu\text{m}$  Immobilon-P membrane (Millipore) following standard protocols. Membranes were blocked with blocking buffer (Thermo scientific) and incubated with the indicated antibodies. Immunocomplexes were visualized by using the luminescence blotting substrate ECL Pierce or POD kit (Roche Applied Science). Chemiluminescence was imaged by an imager system (Biorad).

For affinity isolation, cells were treated as previously described (Page N 2009). Biotin-labeled N6L (10  $\mu\text{M}$ ) was incubated with HUVECs or PANC-1 cells. The complexes formed between biotin-labeled N6L and interacting proteins were isolated by purification of the lysates (Pierce, Thermo Fisher Scientific). The purified proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis by using anti-nucleolin antibody.

### **CRISPR/Cas9 mediated knockout of *Ncl***

To knockout the *Ncl* gene we used genome editing, one vector system (lentiCRISPRv2) was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid # 52961). sgRNAs were designed using the

CRISPRtool (<http://crispr.mit.edu>) to minimize potential off-target effects. sgRNA sequences are: sgRNA\_1 CCGTTCTTAGCCCCCTTAGC; sgRNA\_2 GGGAGCTGCCACTCCAGCTA; sgRNA\_3 TTGTAGGCTGGCAAAACCCA; sgRNA\_4 GAACCTGTAAAGCAGCACC; sgRNA\_5 GAAAATGGCTCCTCTCCAA; sgRNA\_6 TTCAGGGGCTTCTTTCTGCT. Annealed sgRNA oligonucleotides targeting the murine *Ncl* were cloned into Bsmbl (Thermoscientific) opened lentiCRISPR-v2 plasmid as described previously in (5). Ligated plasmids were transformed into competent Stbl3 cells (Invitrogen). For each construct, 3-5 individual colonies were picked grown in LB ampicillin media overnight. Plasmid from each colony was then isolated using a DNA miniprep kit (Qiagen) and sequenced using hU6-forward primer for validating the right integration.

PDAC cells were transfected with plasmids at approximately 80 % confluence using Lipofectamine® 3000 Reagent (Thermo Fischer Scientific). We used puromycin (P9620 Sigma Aldrich) treatment to select CRISPR/CAS9 transfected cells.

### **Conditional Knockout of *Ncl***

The conditional *Ncl* allele was obtained by floxing the third exon of the gene in a C57BL/6 background. These mice were then crossed with the ubiquitously expressing, inducible Cre deleter strain C57BL/6-*Gt(ROSA)26Sortm9(Cre/ESR1)<sup>Arte</sup>* (abbreviated as *Cre*) in order to get *Ncl<sup>fl/WT</sup>;Cre<sup>+/-</sup>* and *Ncl<sup>fl/fl</sup>;Cre<sup>+/-</sup>* mice. *Ncl<sup>WT/WT</sup>;Cre<sup>+/-</sup>* were used as the controls. To induce deletion, mice were injected with 100 µL tamoxifen (10 mg/mL) in canola oil for 5 consecutive days.

For genotyping of the mice and to detect the deletion of the floxed exon, we used the oligonucleotides Lf 4783 (5'GGAGTAGTACATAGTGAAACCTTGTCT 3') and Er 4784 (5' TCCTCCTCAGCCACACTCTTGGC 3') located at the 5' and 3' side of the floxed exon respectively. Using this pair of oligonucleotides, the wild type allele gives a fragment of 1226 pb, the floxed allele: 1412 bp and the deleted allele a 402 bp fragment.

Under these conditions, highly effective deletion is observed at the fifth day of injection and the *Ncl<sup>fl/fl</sup>;Cre<sup>+/-</sup>* mice do not survive more than a few days, whereas the *Ncl<sup>fl/WT</sup>;Cre<sup>+/-</sup>* mice do not show any visible changes after a month of observation.

*Ncl<sup>wt/wt</sup>* or *Ncl<sup>wt/flox</sup>* mice were all treated by tamoxifen to generate *Ncl<sup>+/+</sup>* or *Ncl<sup>-/-</sup>* mice and injected with Panc-02 (10<sup>5</sup> cells/mouse in 50 µL) into the pancreas. After 3 weeks mice were sacrificed and tumors or liver tissues were frozen.

### **BxPC-3 mouse model**

Subcutaneous xenograft BxPC-3 mice were generated by subcutaneously injecting BxPC-3 cells ( $10^5$  cells/mouse) into the right posterior flanks of 4 week-old *nu/nu* immunodeficient mice. Tumor growth was monitored twice a week, and when reached a volume of approximately 150-200 mm<sup>3</sup>, mice were randomized into the different treatment groups. At the end of the treatment the delivery of doxorubicin was performed and analyzed as detailed in the methods section.

### **Measurement of tumor delivery of doxorubicin and vessel perfusion**

To measure the tumor delivery of doxorubicin mice were injected with 10 mg/kg doxorubicin hydrochloride (Sigma Aldrich) via the lateral tail vein 4 hours before sacrifice. Tumors and kidneys as controls were collected from each mouse and weighted. Samples were resuspended in a lysis buffer (0.25 M sucrose, 5 mM TrisHCl pH 7.6, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) and homogenized in an ice-cold Potter homogenizer. 200  $\mu$ L of each homogenate was placed into a new microcentrifuge tube containing 10% Triton X-100 and 1.5 mL acidified isopropanol, mixed and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$  overnight. Samples were centrifuge at 15,000 *g* for 20 minutes. Doxorubicin was quantified by spectrophotometric analysis at 590 nm using TECAN Infinite M1000 plate reader (Tecan, Durham, NC). These values were calculated as the fluorescence/weight *ratio* of the tumor divided by the fluorescence/weight *ratio* of the kidney and expressed as  $\mu$  equivalents/g tissue of doxorubicin. Data are mean  $\pm$  SD of triplicate aliquots from tumor homogenates.

### **Tumor hypoxia analysis**

Tumor hypoxic areas were detected as previously described (6). Mice were injected with 60 mg/kg pimonidazole hydrochloride (HP2-100 Hypoxyprobe Kit-Plus; Natural Pharmacia International Inc) 2 hours before sample collection. Pictures were taken with a Leica Aristoplan microscope equipped with a CoolSNAP CCD camera. Hypoxic cells were detected by performing immunofluorescence staining of frozen sections using an anti-CA9.

### **RNA extraction and quantification by real-time quantitative PCR**

Total RNA from cells or tumors was extracted using the PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. One microgram of total RNA was reverse transcribed using the SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using TaqMan Expression Assays and TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems,



Alameda, CA, USA) on a AriaMX Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Data were analyzed using Agilent AriaMX version 1.0 software (Agilent Technologies) and normalized to GAPDH or to MECA32 mRNA level. Fold changes were calculated using the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.

### **Immunofluorescence staining**

Frozen tumor sections were processed for immunofluorescence as previously described (Maione F., 2009). Sections were air-dried, fixed in zinc fixative (6.05g Tris, 0.35g Ca (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 2.5g Zn(C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)<sub>2</sub>, 2.5g ZnCl, 3.8 mL HCl 37%) for 10 minutes, saturated with BSA 3% for 1 hour at room temperature and incubated in primary antibodies, as indicated in figure legends, for 1 hour at room temperature. After washing, sections were incubated with secondary anti-rat, anti-rabbit or anti-mouse Alexa Fluor-488 or Alexa Fluor-594 antibodies (Life technologies). Nuclei were stained with DAPI (Invitrogen). Fibrosis was stained as indicated in corresponding figure legend.

For apoptosis in PDAC cells, cells were seeded on glass coverslips and fixed with paraformaldehyde (PAF) 4% 10 minutes and processed for cleaved caspase-3 similarly to PDAC tumor sections. For Alexa-546-N6L delivery, PDAC cells were pretreated or not with the nucleolin antibody (MS3 clone Santa Cruz), incubated with 1  $\mu$ M of Alexa-546-N6L for 1 hours and fixed by PAF 4% before microscope observations. For WPB staining in EC, HUVECs were seeded on glass coverslips. After N6L treatment, cells were fixed with methanol for 10 minutes (-20°C) and saturated with PBS-BSA 3% for 30 minutes (37°C). Anti-Ang-2 and anti-vWF primary antibodies were incubated for 45 minutes (37°C). Secondary antibodies were then incubated for 45 minutes (37°C) with 1  $\mu$ g/mL DAPI to stain nuclei. Coverslips were mounted with Prolong (Molecular Probes) for long-term storage.

### **Confocal microscopy quantifications**

Immunofluorescence images of tumor sections and PDAC were captured by using a FV1000 IX81 laser-scanning confocal microscope (Olympus), with a 10x or 40x oil objective (NA 1.3). Acquisitions were performed with the same settings on multiple tissue sections (5 fields per mouse, n= 5 to 7) and included negative controls for determination of background staining, which was negligible.

For pericyte coverage, confocal analysis quantification was performed as follow by a home-made plugin for the ImageJ software (7). Red and green channels were segmented by using

a « Max Entropy » threshold (8). Blue channel corresponding to DAPI staining was threshold using the « Triangle » method (9). Overlapping of the binary areas obtained from the red and green channels resulted to the yellow area, the apparent collocation of juxtaposed red and green area. The yellow area divided by the vessel area (red area) was plotted as the percentage of pericyte coverage. ImageJ software was used to obtain the binary area of Ki67, cleaved caspase-3 or CA9 staining.

For vessel branching quantification, tumor frozen sections of 20 µm were immunostained for vessel detection as indicated in Figure legends. Images were taken in Z every 0.5 µm and 3D reconstruction was done by the Olympus software. The number of branches and of vessels was counted for each field.

For the analysis of Ang-2 and Weibel-Palade body staining, images were captured by using a DSU IX81 microscope (Olympus) with a 40x oil objective (NA 1.3). vWF or Ang-2 positive objects were detected by threshold and quantified as the area of vWF or Ang-2 staining normalized to nuclei number.

## Références

- (1) Partecke LI, Sandler M, Kaeding A, Weiss FU, Mayerle J, Dummer A, *et al.* A syngeneic orthotopic murine model of pancreatic adenocarcinoma in the C57/BL6 mouse using the Panc02 and 6606PDA cell lines. *Eur Surg Res.* 2011;47:98-107.
- (2) Destouches D, Page N, Hamma-Kourbali Y, Machi V, Chaloin O, Frechault S, *et al.* A simple approach to cancer therapy afforded by multivalent pseudopeptides that target cell-surface nucleoproteins. *Cancer Res.* 2011;71:3296-305.
- (3) Destouches D, El Khoury D, Hamma-Kourbali Y, Krust B, Albanese P, Katsoris P, *et al.* Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin. *PLoS One.* 2008;3:e2518.
- (4) de Leeuw HP, Fernandez-Borja M, Reits EA, Romani de Wit T, Wijers-Koster PM, Hordijk PL, *et al.* Small GTP-binding protein Ral modulates regulated exocytosis of von Willebrand factor by endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:899-904.
- (5) Sanjana NE, Shalem O, and Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods.* 2014;11:783-4.
- (6) Maione F, Molla F, Meda C, Latini R, Zentilin L, Giacca M, *et al.* Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J Clin Invest.* 2009;119:3356-72.
- (7) Rasband WS. *ImageJ, U S National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA.*
- (8) Kapur J, Sahoo P, and Wong A. A New Method for Gray-Level Picture Thresholding Using the Entropy of the Histogram. *Graphical Models and Image Processing* 1985;29: 273-285.
- (9) Zack GW, Rogers WE, and Latt SA. Automatic measurement of sister chromatid exchange frequency. *J Histochem Cytochem.* 1977;25:741-53.

## **Annexe 2 : Des polyplexes pseudopeptidiques cationiques multivalents pour le traitement du cancer (Article 3)**

Ce travail a été publié le 30 Septembre 2017 dans le journal *Oncotarget*.

## Multivalent cationic pseudopeptide polyplexes as a tool for cancer therapy

Zoi Diamantopoulou<sup>1,\*</sup>, Maud-Emmanuelle Gilles<sup>1,\*</sup>, Maha Sader<sup>1</sup>, Méli ssande Cossutta<sup>1</sup>, Benoit Vallée<sup>1</sup>, Claire Houppé<sup>1</sup>, Damien Habert<sup>1</sup>, Blandine Brissault<sup>2</sup>, Eric Leroy<sup>2</sup>, Federica Maione<sup>3</sup>, Enrico Giraudo<sup>3</sup>, Damien Destouches<sup>1</sup>, Jacques Penelle<sup>2</sup>, José Courty<sup>1,\*\*</sup> and Iliaria Cascone<sup>1,\*\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Growth, Reparation and Tissue Regeneration (CRRET), University of Paris Est, ERL-CNRS 9215, 94010 Créteil, France

<sup>2</sup>East Paris Institute of Chemistry and Materials Science, CNRS & University Paris-Est, 94320 Thiais, France

<sup>3</sup>Department of Oncological Sciences and Laboratory of Transgenic Mouse Models, Institute for Cancer Research and Treatment, University of Torino School of Medicine, I-10060 Candiolo, Torino, Italy

\*These authors have contributed equally to this work

\*\*These authors are considered as co-senior author

Correspondence to: José Courty, email: courty@u-pec.fr

Keywords: nanoparticles, antitumour activity, polyplex, nucleolin, pancreatic ductal adenocarcinoma

Received: June 21, 2017

Accepted: August 27, 2017

Published: September 30, 2017

Copyright: Diamantopoulou et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License 3.0 (CC BY 3.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

### ABSTRACT

**In this study, a novel anticancer reagent based on polyplexes nanoparticles was developed. These nanoparticles are obtained by mixing negatively charged polyelectrolytes with the antitumour cationically-charged pseudopeptide N6L. Using two *in vivo* experimental tumor pancreatic models based upon PANC-1 and mPDAC cells, we found that the antitumour activity of N6L is significantly raised *via* its incorporation in polyplexed nanoparticles. Study of the mechanism of action using affinity isolation and si-RNA experiments indicated that N6L-polyplexes are internalized through their interaction with nucleolin. In addition, using a very aggressive model of pancreatic cancer in which gemcitabine, a standard of care for this type of cancer, has a weak effect on tumour growth, we observed that N6L-polyplexes administration has a stronger efficacy than gemcitabine. Biodistribution studies carried out in tumour-bearing mice indicated that N6L-polyplexes localises in tumour tissue, in agreement with its antitumour effect. These results support the idea that N6L nanoparticles could develop into a promising strategy for the treatment of cancer, especially hard-to-treat pancreatic cancers.**

### INTRODUCTION

Nanomedicine, the implementation of nanotechnology-based principles and materials in the medical area, opens new fields of multidisciplinary investigations that could potentially offer innovative sets of diagnostic and therapeutic tools adaptable to several diseases such as cancer. This strategy opens new avenues for better, more adapted or improved treatments of patients. In drug delivery, nanocarriers have been developed that

are conventionally defined as engineered structures of nanometric sizes having the ability to carry and release therapeutic molecules to specific disease-related sites. Over the past few years, polymeric nanostructures from natural or synthetic polymers have been extensively investigated in order to develop an effective cancer drug delivery system, which yields a higher therapeutic index of the drug with lower toxicity towards normal tissues, with a few formulations tested under phase I/II human trials [1]. In cancers indeed, due to the high production of



proangiogenic factors, tumour vasculature is abnormal with leaky vessels displaying highly tortuous geometries and hyperpermeabilities [2, 3]. These vascular anomalies result in large-size pores in the tumour vasculature as compared to normal tissues, opening a way for nanoparticles to preferentially accumulate in solid tumours [4], ultimately yielding higher therapeutic index of the drug linked to the nanoparticles, and sometimes providing lower toxicities toward normal cells as well.

Up to now, developed nanoparticles have been designed to release the active drug according to two mechanisms, by progressive physicochemical release of the drug encapsulated in the nanoparticle, or as the result of a cleavage reaction involving a covalent bond between the active species and an inert polymer included in the particle, namely the polymer prodrug approach [5]. An alternate design could also be considered, if a particle can be built whose surface is decorated by multiple copies of a substructure acting as a ligand according to a multivalent drug approach. N6L is an anticancer drug developed by our group whose oligomeric structure is made of identical tripeptide repeat units (KΨPR) and whose activity is known to depend upon the number of these units [6]. In this context, the hexamer named N6L, currently investigated under phase IIa trial for cancer therapy, corresponds to a compromise between improved activities, mounting purification difficulties and higher production cost. The above multivalent pseudo-peptides target cell surface nucleolin (NCL) and induces apoptosis of tumour cells [6, 7]. N6L decreases the tumour growth of pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) and reprograms the angiogenesis process by inhibiting angiopoietin-2 [8]. In addition to its effect on tumour growth, N6L also inhibits the migration and invasion of melanoma and PDAC cells [9]. Moreover, high affinity binding of N6L was demonstrated for sulfated glycosaminoglycans (GAG), as well as a displacement of GAG-bound tissue inhibitor of metalloproteinases-3, emphasizing that N6L binds to sulfated GAG [10].

In the present study, we aimed at testing whether higher multivalencies of N6L can be obtained *via* a simple polyplex-based synthesis of nanoparticles acting as scaffolds to display even larger number of active ligands at their surface. An alternative approach to drug-delivery nanoparticles is proposed that explores whether the nanoparticle itself can be used as the active ingredient rather than as a carrier whose sole mission is to transport the active ingredient and to release it over time.

## RESULTS

### Synthesis of N6L Polyplexes

It is well known that mixing opposite charged polyelectrolytes results in the formation of small particles of nano- to micrometric sizes [11]. These particles, usually referred to as polyplexes, are colloidally stable, and in most cases, do not aggregate due to repulsive force. In

biomedicine, these polyplexes have mostly been used as carriers to deliver therapeutic nucleic acids [12]. In a previous study, we reported that N6L, which under physiological pH is a highly-charged oligomer with 24 positive charges distributed over a small volume, shows a high affinity interaction for heparin [6]. In this study, we sought to test whether the interaction of N6L with heparin or other sulfated glycoaminoglycans could lead to the formation of nanostructure such as polyplexes.

To test whether N6L could yield polyplexes with heparin, an aqueous solution containing both N6L and heparin was prepared and added to a dynamic light scattering (DLS) cuvette after mixing to reveal the presence of nanoparticles. Results indicated that a monodisperse size distribution is observed, with an average particle diameter of  $194 \pm 3$  nm at final concentrations of  $14.7 \mu\text{M}$  and  $100 \mu\text{g/mL}$  in N6L and heparin, respectively (Supplementary Figure 2). An additional measurement after 24 h at room temperature led to an equally monodisperse nanoparticle, with a diameter of  $193 \pm 10$  nm (not shown).

To validate these data, similar experiments were performed using another sulfated glycosaminoglycan, chondroitin sulphate C (CS-C), as the polyanionic macromolecule, at 10 or 1000  $\mu\text{g/mL}$  and  $73 \mu\text{M}$  for CS-C and N6L, respectively. A monodisperse hydrodynamic size distribution was observed with an average diameter of  $279 \pm 11$  nm, at concentrations of  $10 \mu\text{g/mL}$  and  $73 \mu\text{M}$  in CS-C and N6L, respectively (Figure 1A). When higher concentrations of CS-C (1000  $\mu\text{g/mL}$ ) were used, relatively large and polymodal size distributions were observed, with average diameters at  $228 \pm 25$  and  $973 \pm 187$  nm for the two major populations (Figure 1B). Confirming the data presented in Figure 1A, we observed by transmission electronic microscopy (TEM) that nanoparticles obtained by mixing a solution of  $10 \mu\text{g/mL}$  CS-C and  $73 \mu\text{M}$  N6L have a particles diameter of about 100 nm (Figure 1C). We next studied the stability of these N6L-polyplexes over 24 hours periods by measuring the change in particle hydrodynamic size. As shown in Table 1, while N6L-polyplexes obtained with 1000  $\mu\text{g/mL}$  CS-C remained relatively stable over a period of 4 hours, a significant size increase of N6L-polyplexes obtained with  $10 \mu\text{g/mL}$  CS-C could be observed 8 hours after the polyplex formation, reaching a diameter of  $381 \pm 88$  nm. Determination of the zeta potential indicated that polyplexed N6L obtained from  $73 \mu\text{M}$  N6L mixed with 10 and 1000  $\mu\text{g/mL}$  of CS-C display values of  $+34.2 \pm 6.5$  mV and  $-38.1 \pm 7.3$  mV, respectively, numbers that remained stable over at least 24 h (Figure 1D).

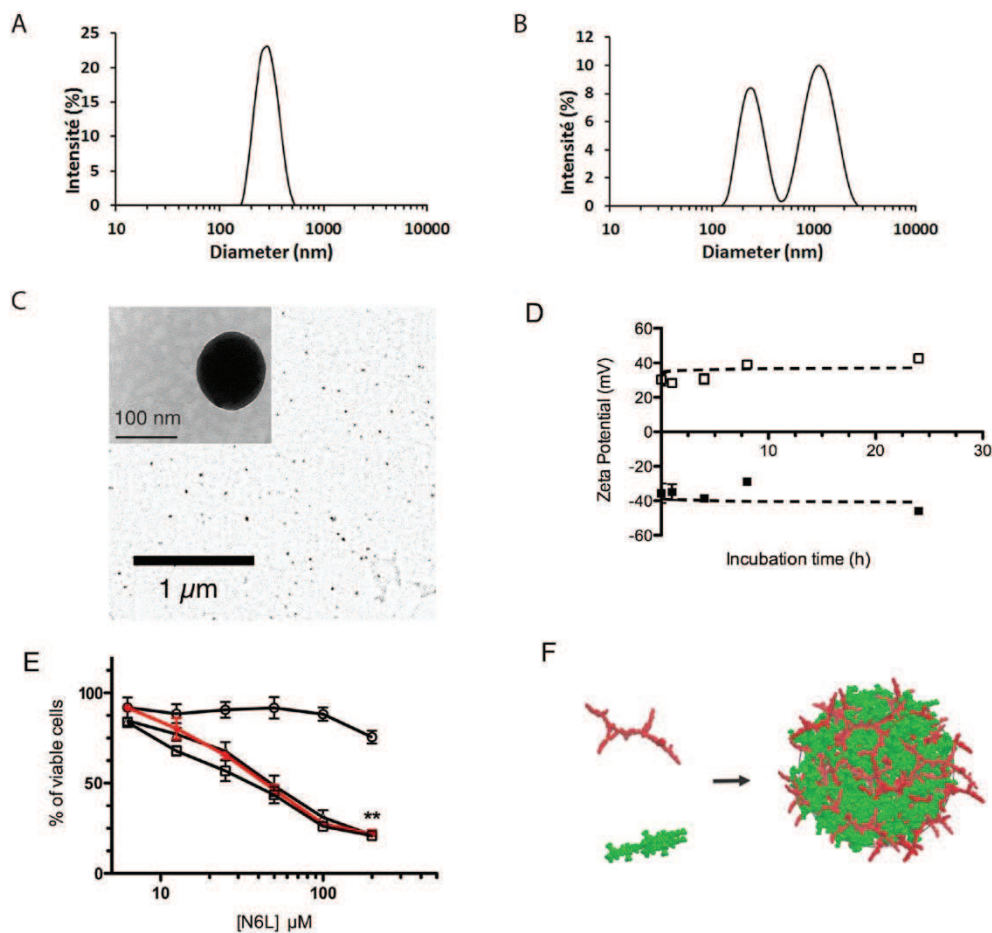
To examine the potential anticancer activity of N6L-polyplexes, we tested its effect on the viability of the well-established human pancreatic cancer cell line PANC-1. Cells were treated with several concentrations of N6L ranging from 4.6 to  $147 \mu\text{M}$ , alone or in the presence of several concentrations of CS-C. As shown in Figure 1E, as compared to the treatment of cells with N6L alone, N6L-polyplexes obtained at CS-C concentrations lower



than 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (*i.e.*, at 100 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) displayed a similar effect to those observed for N6L used alone (Figure 1E). No effects on the cell viability could be observed whatever the concentration of CS-C used in the experiment (Supplementary Figure 3).

Taken together, all these observations provide evidences that mixing N6L with sulfated

glycoaminoglycans like CS-C induces the formation of polyplexed nanoparticles, according to a global aggregation mechanism schematized in Figure 1F. For the rest of the study, we decided to investigate the properties of N6L-polyplexes obtained by mixing N6L with 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of CS-C.



**Figure 1: N6L and anionically charged polyelectrolytes spontaneously assemble into functional polyplexed nanoparticles.**

(A and B) DLS measurement of particle size distribution measured after mixing chondroitine sulphate (CS-C) with N6L in water at 23°C (final concentrations for CS-C of 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (A) or 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (B), and 73  $\mu\text{M}$  for N6L in both cases). These data are representative results obtained from three consecutive measurements of 15 runs each; (C) typical scanning transmission electron microscope (TEM) image of polyplexed particles obtained after mixing 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CS-C with 73  $\mu\text{M}$  N6L in water; (D) Zeta potential determination of N6L polyplexes: the charge of the polyplexes obtained with 73  $\mu\text{M}$  N6L and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of CS-C (black square) or with 73  $\mu\text{M}$  N6L and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  CS-C (open square) were measured as a function of the incubation time ranging from 0 to 24 hours. Data smoothing using the GraphPad software indicates that potentials resulting from polyplexed N6L (73  $\mu\text{M}$  N6L) were stable over a period of 24 hours, with value of  $34.2 \pm 6.5$  mV and  $-38.1 \pm 7.3$  mV for CS-C 1000 and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , respectively; (E) PANC-1 cells were treated with concentration of N6L ranging from 4.6  $\mu\text{M}$  to 147  $\mu\text{M}$ , alone or polyplexed by adding CS-C at concentrations of 1000 (black circle), 100 (black triangle) and 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (black square). After 72 hours, cell growth was quantified by AlamarBlue assay according to the recommended procedure. Histograms represent the percentage of cell growth relative to the values of untreated cells (indicated values are means  $\pm$  SEM of 3 independent experiments (Student *t*-test,  $n=3$ )); (F) schematic illustration for the obtained polyplexed structure (red: N6L building blocks, green: CS-C octamer used as a model for fully developed CS-C).

**Table 1: Evolution of polyplex sizes as a function of time**

Polyplex CS/N6L (mg/ $\mu$ M)	Time (h)	Size 1 (nm)	Size 2 (nm)
1000/73	0*	187 $\pm$ 15	1190 $\pm$ 420
	1	245 $\pm$ 85	1150 $\pm$ 245
	4	228 $\pm$ 25	973 $\pm$ 187
	8	nv	nv
	24	nv	nv
10/73	0*	nv	nv
	1	nd	-
	4	279 $\pm$ 11	-
	8	460 $\pm$ 24	56 $\pm$ 37
	24	616 $\pm$ 88	97 $\pm$ 1

The sizes of the particles were determined by DLS as described in Materials and Methods. nv: not validated; nd: not determined. (\*) Size determination was measured 15 minutes after having mixed N6L and CS-C.

### Molecular functionality of N6L-polyplexes

Previous studies have shown that N6L interacts with nucleolin [6]. To address whether the inhibitory effect of the N6L-polyplexes is linked to their interaction to nucleolin, we performed streptavidin pull-down assays using PANC-1 cell lysates incubated with biotin-labelled N6L-polyplexes. As shown in Figure 2A, N6L-polyplexes interact with nucleolin in a similar way to N6L alone, suggesting that nucleolin might be responsible for the anti-tumoural effect of the N6L-polyplexes.

According to our previous study in which we clearly showed that the mechanism of action of N6L occurs through its internalization in target cells [6], we next investigated the cell internalization of N6L-Alexa fluor 488 in its polyplexed form. As shown in Figure 2B and 2C, 10 minutes after the addition above polyplexes, fluorescence could be detected inside the cells. These data were reinforced by observations carried out when invalidating nucleolin expression. Efficiency of si-nucleolin (siNCL) is shown by Western blot analysis (Figure 2B). As evidenced when compared to a control (SiCtrl alexa N6L-polyplex), inhibition of nucleolin expression (siNCL alexa N6L-polyplex) prevented N6L-polyplex internalisation (Figure 2C). Taken together, these data indicated that N6L-polyplex is rapidly internalized into the cell through nucleolin.

### *In vivo* anti-tumoural and anti-metastatic effect of N6L polyplexes

*In vivo* anti-tumour activity of N6L polyplexes was then analysed using subcutaneous tumor xenograft of PANC-1 cells. As shown in Figure 3, treatments with N6L alone had no significant effect on PANC-1 xenograft

tumour growth. In sharp contrast, N6L polyplexes significantly inhibited tumour growth by 85% ( $p < 0.05$ ) (Figure 3). No significant effect of CS-C alone could be observed. Immunohistological analysis of tumour indicated that treatment with N6L polyplexes significantly decreased Ki67 positive cells by 53 % ( $p < 0.001$ ) (Figure 4A). Moreover, the area occupied by the tumour vasculature decreased by 70 % ( $p < 0.001$ ) (Figure 4B).

All animals were closely monitored during the treatment and no toxicity could be evidenced in the various groups involved in the experiments, including the group treated with the N6L polyplexes (data not shown).

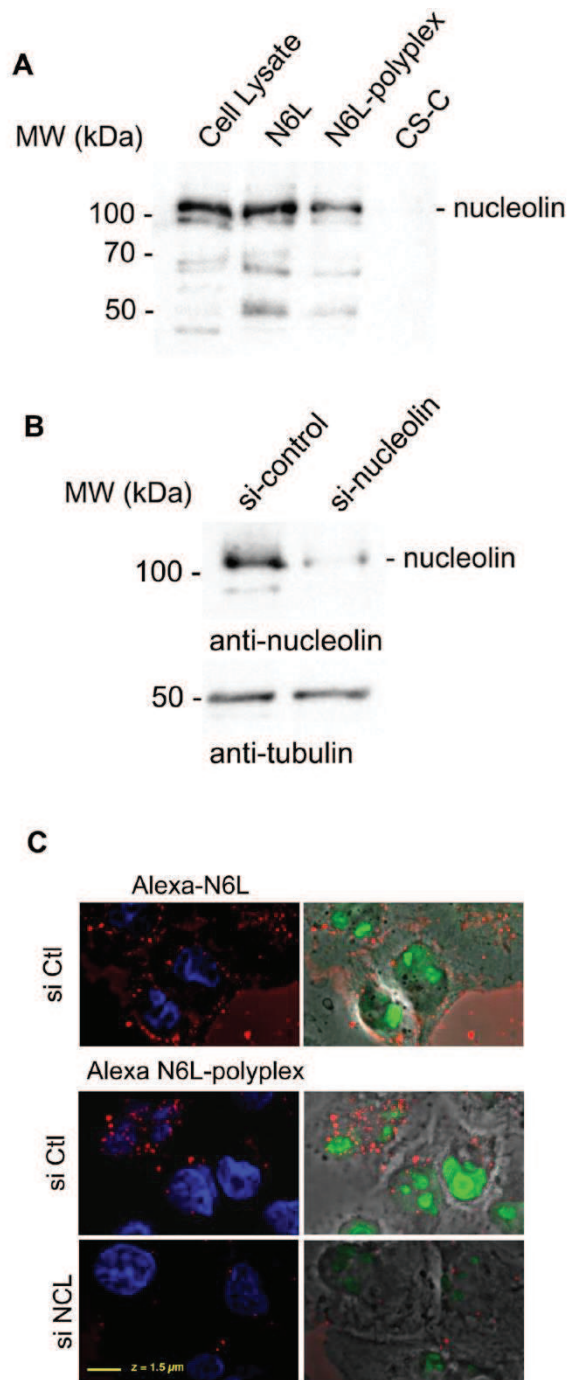
We then evaluated the antitumour effect of N6L polyplexes in the mPDAC orthotopic model in which N6L inhibited tumor growth [8]. After 3 weeks of treatment, N6L decreased the tumour volume by 42 % ( $p < 0.001$ ), a value close to the literature value obtained when using gemcitabine (45 % ( $p < 0.01$ )) [8]. Interestingly, N6L polyplexes displayed a greater antitumour activity compared to gemcitabine by significantly reducing tumour burden by 72 % (Figure 5). A treatment with CS used as a single agent did not exert significant inhibitory effect on PDAC tumours (not shown).

Collectively, these results demonstrated that N6L polyplexes have a much stronger antitumoural effect than N6L used alone.

### Biodistribution of N6L and N6L-polyplex

We sought to correlate the effects of N6L polyplexes with the ability to be delivered to the tumour in the mPDAC model. In order to reach this objective, we performed comparative tissues distribution studies using injections of fluorescent N6L polyplexes and fluorescent N6L alone. Pancreas cancer tissues from mPDAC mice



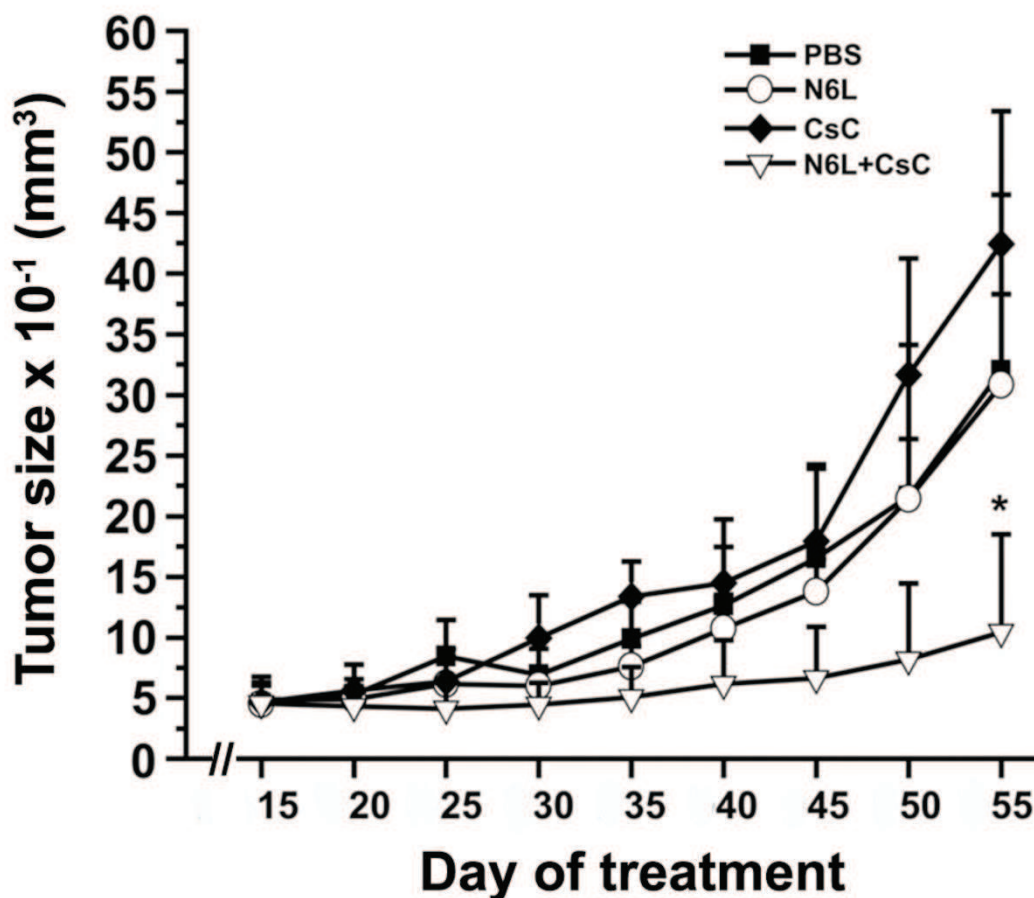


**Figure 2: Biological properties of N6L-polyplexes.** (A) Polyplexed N6L interacts with nucleolin. PANC-1 cells were incubated (lane N6L and N6L-polyplex) with 5  $\mu$ M of biotin-labeled N6L in soluble (lane N6L) or polyplexed form (N6L-polyplex) or CS-C as a control (lane CS-C) for 1 h. N6L-interacting proteins were isolated by incubating cell lysates with avidin-agarose beads. Samples were analysed by SDS-PAGE, and Western blotting performed by using an anti-nucleolin antibody. (B and C) PANC-1 cells pre-treated (or not) with nucleolin siRNA (siNCL N6L-polyplex), GFP siRNA (siCtl – N6L-polyplex), as described in Materials and Methods, were incubated for 10 min with 2  $\mu$ M of polyplexed N6L-Alexa fluor 588. Cells were then fixed in paraformaldehyde, stained with diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes), and analysed. The efficiency of si-nucleolin is shown in the figure by immunohistology using anti-nucleolin antibody and (B) by Western blot analysis.

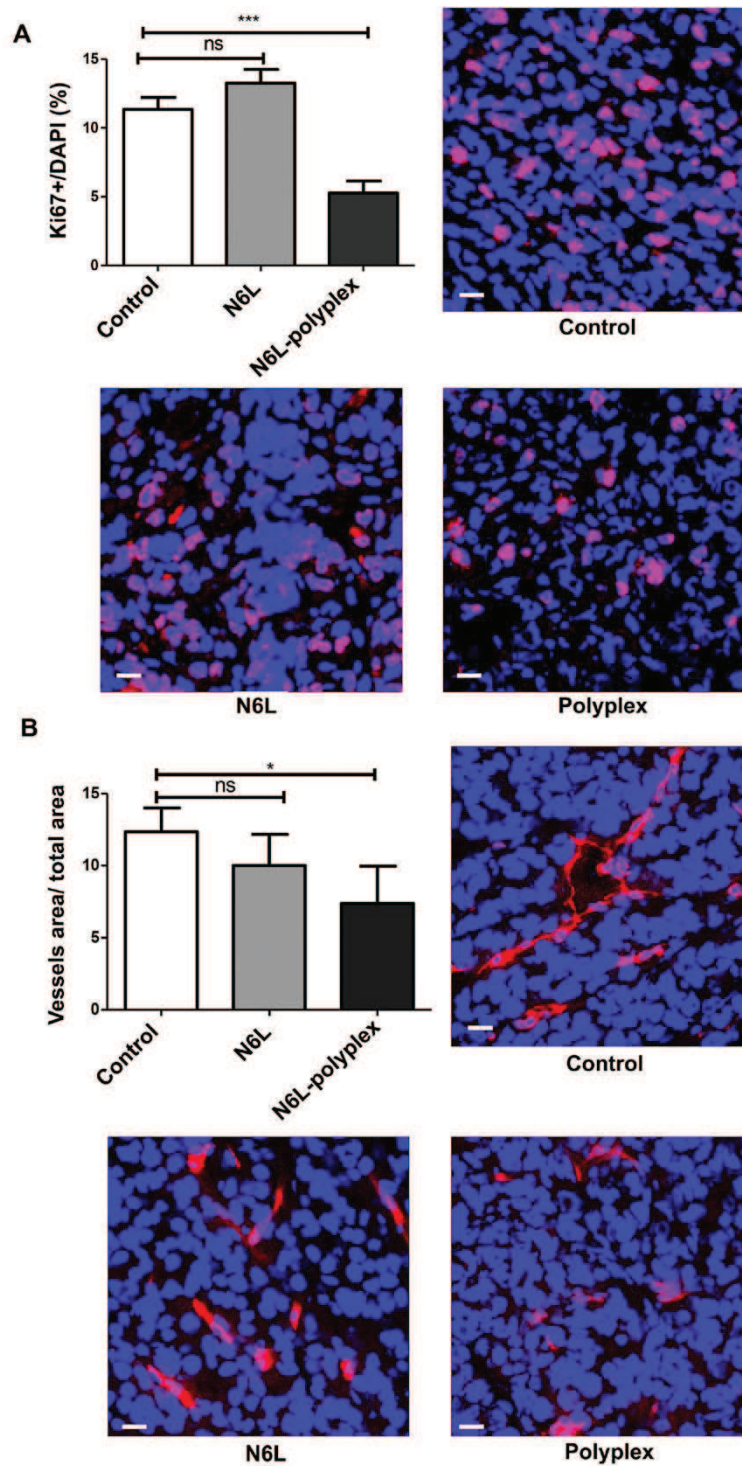
were examined 6 and 12 hours after intravenous injection of either polyplexed N6L-alexa 488 or N6L-alexa 488 used alone. A strong fluorescent signal was observed in sections of pancreatic cancer tissues of mice injected with the polyplexed N6L-alexa 488 (Figure 6A and 6B). Fluorescence could be observed starting from 6 hours after the injection of N6L polyplexes (Figure 6A) to 12 hours (Figure 6B). The fluorescent signal was much higher in tumours treated by N6L polyplexes than N6L alone (Figure 6D and 6E). Whatever the molecular form of N6L-alexa fluor 488 injected, it is noteworthy that no fluorescence could be observed in sections of normal pancreatic tissue (Figure 6C and 6F).

## DISCUSSION

Polyplexed nanoparticles have been already used in cancer therapies, not only in research but also increasingly in clinical trials. However, most of these studies are based on the use of polyplexes made from DNA and polycations of different natures in the perspectives of non-viral delivery systems for cancer gene therapy. Due mainly to their instability, few studies have been reported on the therapeutical use of polyplexes other than the DNA-based ones. In this study, a stable polyplex nanoparticles with antitumour activities were obtained through self-assembly



**Figure 3: N6L polyplexes inhibit tumour growth of N6L-resistant tumours.** Athymic mice were subcutaneously injected with PANC-1 cells. Ten days after cell injection, mice were treated with intraperitoneal injections of either N6L (2 mg/kg of body weight) or N6L polyplexes (2 mg/kg, ratio CS-C/N6L of 1/8 w/w), CS-C (0.26 mg/kg of body weight), or PBS as control, three times per week. The tumour volume was measured as described in Materials and Methods. Bars  $\pm$  SEM (n = 9 per group).



**Figure 4: Effect of N6L-polyplexes on tumour proliferation and vascularisation.** Frozen tumour sections were fixed, saturated with BSA 3% for 1 h at room temperature, and incubated with anti-ki67 (A) or anti-MECA32 (B). After washing, sections were incubated with anti IgG Alexa Fluor-555. Nuclei were stained with DAPI, and immunofluorescence images were captured by confocal microscopy. Acquisitions were carried out on multiple tissue sections (5 field per mouse, n = 5), and quantification analysis was performed by the ImageJ software.

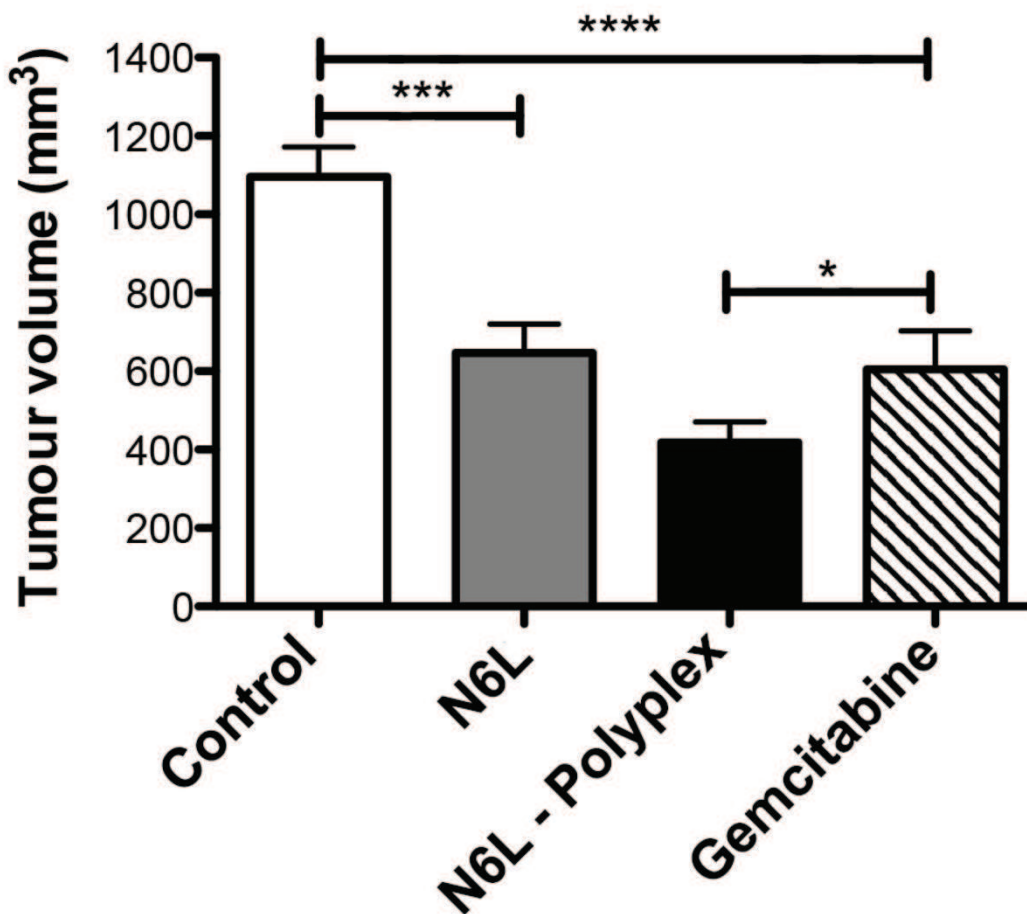


between N6L and sulfated glycosaminoglycans used as anionic polymers.

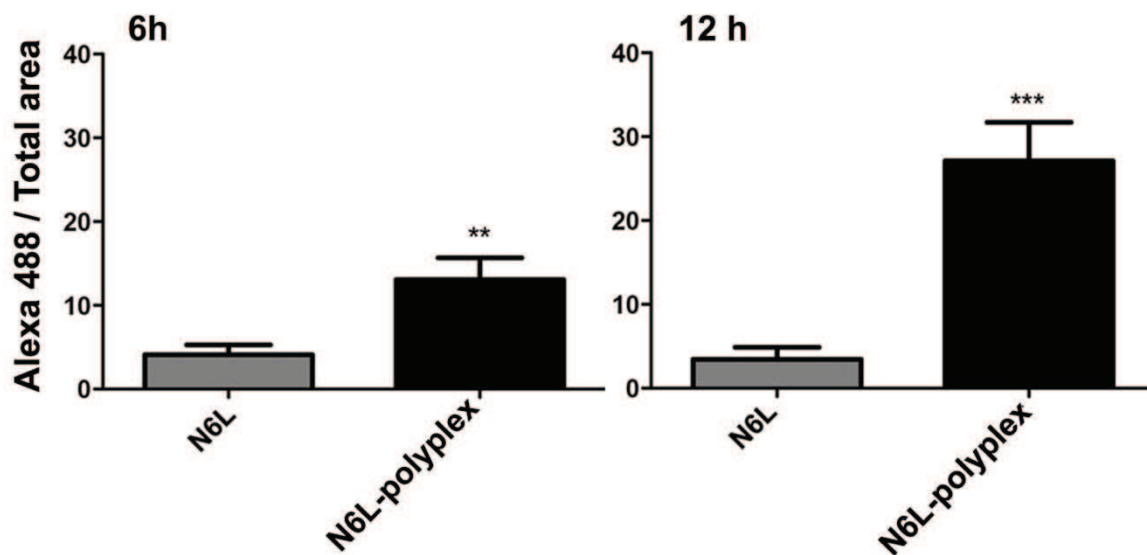
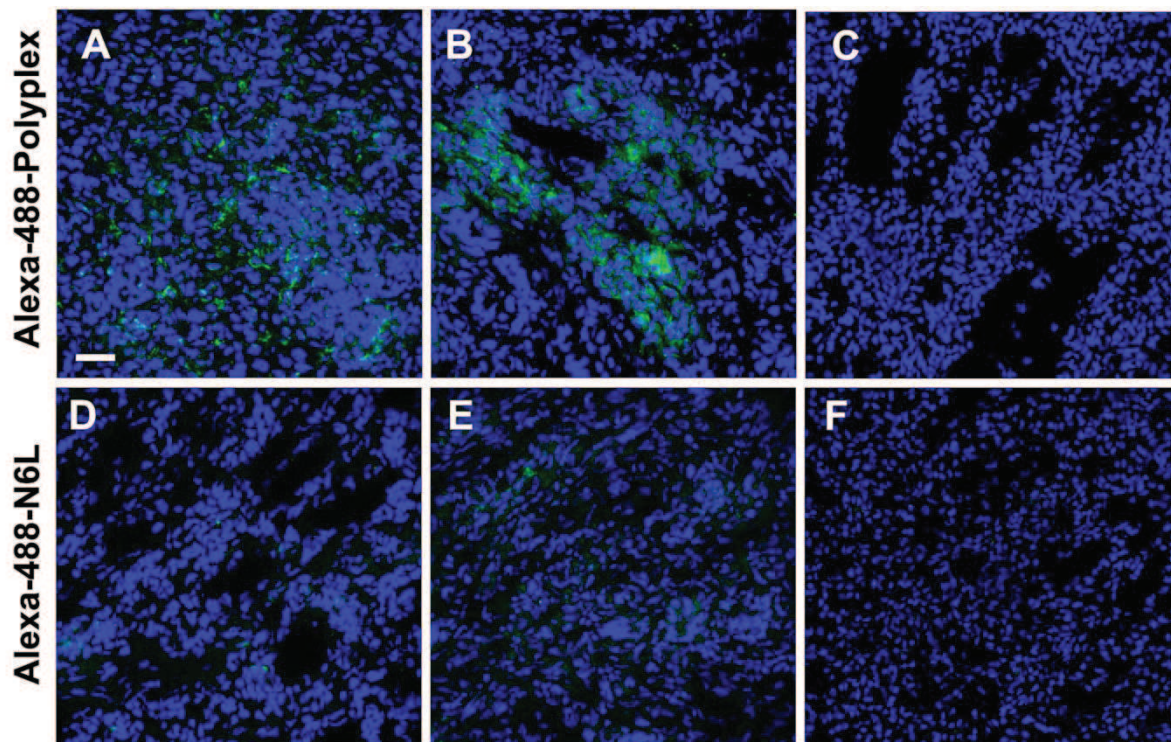
From a physic-chemical perspective, polyplexes are particles of small sizes suspended in water that form as the result of strong attractive electrostatic interactions between charged polymers of opposite charges in aqueous solutions [13]. Their sizes, typically in the nanometric range, depends very much on both the nature of the involved polyelectrolytes and the mixing conditions (e.g., the molar ratio between the partners, their initial concentrations, the presence of other species or the temperature) [14, 15]. As indicated above, DNA/RNA-based polyplexes with various positively charged polyelectrolytes have been particularly investigated in the past few decades as a

potential non-viral delivery method for gene therapy [16]. As heparin is characterized by a highly negatively charged polysaccharide backbone comprised of sulfated uronic acid-(1→4)-D-glucosamine repeat units, and N6L displays 24 positive charges at physiological pH, it is tempting to assume polyplexes would be formed when mixing cationically-charged heparin and negatively-charged N6L together.

Investigated polyplexes were formed according to two sets of preparation conditions (i.e., in water and in a cell culture medium) that had been selected to mimic those used in the *in vitro* experiments. Unfortunately, it was impossible to obtain dependable results in a cell culture medium. The high concentration of proteins in such media



**Figure 5: N6L polyplexes reduce PDAC tumour growth.** Immuno-competent syngenic FVB/n mice were injected with PDAC cells into the pancreas. One week later, either N6L alone (10 mg/kg) or N6L polyplexes (10 mg/kg) were injected (i.p.) three times a week. Control were carried out by injection of gemcitabine (100 mg/kg) two times a week. After three weeks of treatment, mice were sacrificed, and tumour volumes were measured (n = 10, student *t*-test, \*\*\* P < 0.001; \* P < 0.05).



**Figure 6: N6L polyplexes target tumour tissue.** (A) N6L-polyplex targets pancreatic tumour tissues more efficiently than N6L alone. Mice with established PDAC tumours (A, B, D and E) or mice without tumours (C and F) were injected with Alexa-488-stained N6L, alone or in a polyplexed form, and sacrificed after 6 hours (A and D) or 12 hours (B, C, E and F). Tumours were recovered, and confocal analysis was performed on tissue sections. Images are representative of 5 fields observed. N6L fluorescence intensity was quantified and plotted (n = 5 at least; student *t*-test, treated vs. not-treated, \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $P < 0.01$ ). Alexa-488 N6L was not detected in normal pancreas (C and F).



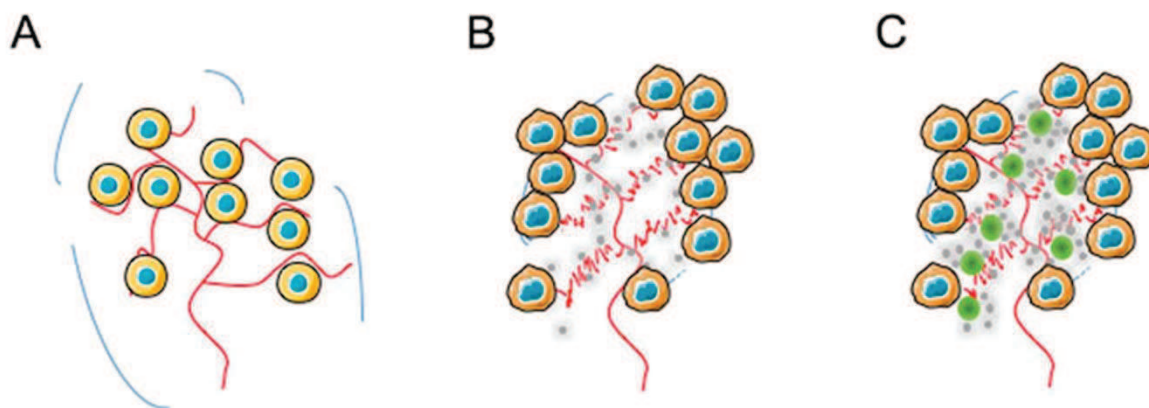
generates indeed a large scattering signal, the high number of small-size light-scatterers compensating for their much lower scattering power with respect to the one generated by much larger polyplex particles. This background scattering induces a major difficulty when attempts are made to mathematically generate a unique, statistically robust solution from the autocorrelation function from a single-angle scattering measurement [17, 18].

From these experiments, the conclusion could be reached that CS-C undeniably induces the easy formation of polyplexes when mixed with N6L, whatever the preparation conditions. In addition, the above experiments supported the assumption that the bulk of the bioactive N6L ingredient used in the upcoming *in vivo* and *in vitro* experiments should be located in the aggregated polyplexed particles, at least initially.

A remarkable feature of the results presented in this study is that a polyplexed structure of N6L improved drastically the antitumour response of N6L compared to N6L used alone. This effect was demonstrated using several tumour growth models of human pancreatic tumours, using heterotopic and orthotopic grafting experiments. Pancreatic cancer had been selected because they are very difficult to cure and, despite the intensive research efforts that have been developed so far, remains resistant to the majority of cytotoxic drug currently used as well as to conventional radiochemotherapeutical treatment [19]. It is noteworthy that, in the above models, the therapeutic effect of polyplexed N6L is better than those obtained with a sub-toxic dose of gemcitabine, which is the current reference treatment for this type of cancer. In

addition and as previously described with N6L used alone, no toxicity of the polyplexed N6L could be observed when used at therapeutic doses. As previously described for N6L, the antitumour activity of N6L-polyplex is not specific for pancreatic cancer because antitumour effect of N6L-polyplex is also observed using U87 cells as target cells [20].

It is now well-established that, under certain pathophysiological circumstances like tumour development, tumour blood vessels become more permeable than under normal physiological conditions [21], resulting in their barriers becoming leaky. Under such conditions, large molecules and particles until 500 nm in size can leave the vessel and accumulate inside the interstitial tissue of the tumour [22]. Among the various parameters modulating this effect, the most important appears to have biocompatible molecules displaying molecular weights larger than 40 kDa. In the light of our accumulated data, the enhancement in antitumour efficacy for N6L in a polyplexed form compared to N6L used alone could be rationalized according to the so-called EPR (Enhanced Permeability and Retention) effect, which a model is presented in Figure 7. Hence, whatever the N6L formulation injected to the mice, no N6L retention could be observed in normal pancreas tissues (Figure 7A), where lymphatic clearance and the absence of nucleolin expression at endothelial cell surfaces in normal vessels simultaneously occurred. Interestingly, as described for mice bearing MDA-MB 231 tumours [6] in *in vivo* imaging experiments, administration of N6L to animal bearing pancreatic tumours induced N6L localization



**Figure 7: Illustration of a possible mechanism for tumour bioavailability based on N6L-polyplexes.** In the light of our accumulated data, the enhancement in antitumour efficacy for N6L in a polyplexed form compared to N6L used alone could be explained by EPR effect. In normal pancreas (A) in which lymphatic clearance occurs, and nucleolin expression at the cell surface of endothelial cells from normal vessel does not whatever the N6L formulation injected, no retention of N6L in the tissue could be observed (see Figure 6C and 6F). (B) In contrast, administration of N6L alone (grey circles) to animals bearing pancreatic tumour localizes into tumour tissues (Figure 6E and 7B) in which high expression of nucleolin had been observed [8]. (C) When N6L-polyplexes were administered (green and grey circles), it can be assumed that N6L nanoparticles are concentrated by the EPR effect to the tumour microenvironment, increasing N6L bioavailability for the tumour as shown in Figure 6A and 6B.



in the tumour tissue (Figure 7B) where high nucleolin expression has been observed [8]. In the case of N6L-polyplex administration, it can be assumed that N6L nanoparticles are concentrated in the tumour according to the EPR effect, increasing its bioavailability (Figure 7C) as compared to an administration of N6L alone. Under these conditions, we can assume that N6L diffuses from the nanoparticles to the tumour environment. This possibility is consistent with the observation that polyplexed N6L can cross a dialysis membrane with a molecular cut-off of 8,000 Da according to the law of mass action (Supplementary Figure 4). Taken together, these data suggest that N6L polyplexes could be considered as a reservoir system for N6L. Surprisingly, although N6L binds to sulfated glycoaminoglycans with high affinity, N6L polyplexed with CS or heparin (not shown), retained its ability to inhibit the tumour cell proliferation and to induce apoptosis. However, it is noteworthy, that the biological effect of polyplexed N6L is a function of the CS concentration used to form the nanoparticles. As presented in this study, high concentration of CS inhibited the biological activity of N6L. This observation suggests that the functional domains in polyplexed N6L are constituted by the positive charges of KPR domains in N6L, which are neutralized by the negative charges in CS. This hypothesis is conformed by the fact that the specific activity of the multivalent pseudopeptide N6L is dependent upon the number of KPR tripeptides present as lateral branches (see Supplementary Figure 1) [6].

Sulfated glycoaminoglycans are natural polysaccharides present in mammalian tissues. They contribute to critical functions in the physiological and pathological mechanisms involved in maintaining homeostasis [23]. Interestingly, these polysaccharides have already been used as pharmacological agents in cancer therapies. Even if our models do not suggest any antitumour effect of CS alone, it cannot be excluded that the use of other natural or synthetic polyanionic molecules displaying both a high affinity for N6L and antitumour activities could not induce better results than those obtained with CS. In this context, it can be noted that modified CS like neoglycans induce apoptosis in myeloma cells, [24] and reduce or even fully prevent the growth of breast cancer in a xenograft model without apparent toxic effect. Also, highly sulfated polysaccharides isolated from sea cucumber display antimetastatic activity through the binding to P-selectin [25]. Moreover, it has been shown that acharan sulfate, a glycoaminoglycan isolated from the giant African snail, inhibits tumour growth in Lewis lung carcinoma without toxicity or resistance effects [26]. Other studies have indicated that a treatment of human bladder cancer cells with a combination of CS and either gemcitabine or mitomycin-C results in a marked synergic antitumoural effect [27]. These data suggest that it could be very interesting to use polyplexed N6L as a nanoparticles platform for synergistic chemotherapeutic

drugs delivery. This possibility is currently under investigation using both natural and synthetic polyanionic molecules. Another advantage of the N6L polyplexes shown in this study is the ability of these nanoparticles to target tumour cells after their administration through the blood stream. This property has been already observed using other molecules targeting cell surface nucleolin such as AS1411 aptamer [28] and the F3 peptide [29], validating this molecular target. Recently, these molecules have been used to develop a nanopatform to codeliver several anticancer drugs and improve the delivery of these molecules to cancer cells [30–33]. In previous studies, we have developed iron oxide nanoparticles functionalized by the multivalent pseudopeptide N6L that target breast tumor by binding to nucleolin and sulfate glycoaminoglycans. However, due mainly to the amount of N6L linked to the magnetic nanoparticles, although these nanoparticles target tumor, no effect on the viability of tumor cells have been observed [34]. From these studies, it is noteworthy that the combination of magnetic nanoparticles with sulfate glycoaminoglycans as a binding site for N6L will be interesting both for tumor targeting properties as well as antitumor activity. In addition, as previously mentioned [35], using N6L-polyplex approach combining magnetic hyperthermia and chemotherapy will represent an interesting therapeutic strategy for cancer treatment.

In conclusion, the development of theragnostic, which is a strategy that combines therapeutics with diagnostics constitutes a promising approach that we currently develop with N6L-polyplexes [34].

## MATERIALS AND METHODS

### Preparation of peptide constructs and N6L-polyplexes

The synthesis of N6L was performed as previously described [6]. A fluorescent conjugate and biotin conjugate were prepared from the N6L-Cys derivative as previously described [6]. The conjugates were purified by high-performance liquid chromatography and lyophilized. Polyplexed N6L nanoparticles aimed at biological testing were produced before each experiment by mixing equal volumes of 4 mM N6L and 20 mg/mL heparin (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France) or chondroitin sulfate C (Cs-C) (Baccinex, Courroux, Switzerland) solutions. After 15 minutes, an opalescent solution could be observed. Nanoparticles were diluted at the concentrations indicated in the figure captions.

### Design of N6L polyplexes for structural characterization

Dynamic light scattering measurements were obtained at a 173° angle with a Nano-ZS Zetasizer from the Malvern company, equipped with a 4 mW He-Ne



laser at 633 nm. Measurements were obtained in triplicate (each measurement was the average of fifteen 10 seconds runs). The data were analyzed using Malvern Zetasizer Series Software v7.11. A Malvern Instruments dip cell was used for zeta potential measurements, each sample being measured in automatic mode, with an imposed maximum of 100 runs. For the DLS experiments, samples were prepared as follows. Stock solutions of N6L (2.8 mM in water), of heparin (19.6 mg/mL in water), and of Cs-C under three conditions (20 mg/mL in water, 1 mg/mL in water, and 1 mg/mL in a culture medium) were prepared. In the case of heparin, polyplexes were produced by mixing equal volumes of N6L and heparin solutions. After 15 minutes, the obtained mixture was diluted 100-fold in water. In the case of Cs-C, polyplexes were produced by mixing equal volumes of N6L and Cs-C (20 mg/mL in water solutions). After 15 minutes, the mixtures were diluted by a ten-fold factor, either in water or in the above culture medium, as indicated in the text or in figure captions. The obtained diluted solutions were further diluted by a two-fold factor, using either one of the following Cs-C stock solutions (i.e., 1 mg/mL in water or 1 mg/mL in the culture medium), as indicated in the text or in figure captions.

Transmission Electron Microscopy (TEM) images were obtained using a FEI Tecnai F20 microscope operating at an acceleration voltage of 200 kV. Bright Field images were recorded using a Gatan Orius 1000 CCD camera. The experiments were carried out at room temperature. Samples were prepared as follows. A drop of the polyplex solution was applied on a 400 mesh copper grid covered by a Formvar/C membrane, which had previously been treated by air plasma to make the surface hydrophilic. After 1 minute, the excess liquid was removed with adsorbent paper and stained with a 0.7 % (w/w) water solution of uranyl acetate. The grid was subsequently dried in air at room temperature.

### Cell culture and treatments

Human pancreatic carcinoma cell line (PANC-1; ATCC® CRL-1469™) was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in DMEM 10% FCS. For viability experiments,  $1.5 \times 10^5$  PANC-1 cells per  $\text{cm}^2$  were plated at day 0 on 48-wells cell culture plate (Falcon). At 24 h, cells were treated by the investigated molecules in DMEM 5% FCS. Quantification of cells was performed using the blue Alamar assay (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France). Small interfering RNA transfection was performed using RNAiMAX kit (Invitrogen) and 20 nM of nucleolin siRNA (sequence: CCACAAGGAAAGAAGACGAAG, Abnova corporation, France) or GFP siRNA, which was used as nontargeting control siRNA (Ambion, Thermofisher Scientific). Efficiency of si-nucleolin was controlled by Western blot analysis and by immunohistology as previously described [8]. Mouse

pancreatic ductal adenocarcinoma (mPDAC) were kindly provided by Douglas Hanahan's group (ISREC of Lausanne, Switzerland) [36], and cultivated as previously described [8].

### N6L-fluorescent conjugate uptake and immunofluorescence

PANC-1 cells were plated at 80% of confluence on slides in 24 wells, and treated with 2  $\mu\text{M}$  of N6L-alexa fluor 588 alone or in a polyplexed form for 10 minutes at 37°C. Cells were fixed in paraformaldehyde 4% for 10 minutes at room temperature, and cell nuclei were stained with diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Molecular Probes). Cells were analyzed by using a Leica SPEII confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems).

### Affinity isolation experiments

Affinity isolation experiments were performed as previously described [6]. Briefly, PANC-1 cells were plated on dishes (Falcon), and grown to at least 80% cells confluence. Biotin-labeled N6L (5  $\mu\text{M}$ , alone or in a polyplexed form) was diluted in DMEM supplemented with 5 % FCS and incubated with cells for 1 hour at 37°C and 5%  $\text{CO}_2$ . After washing the cells once in PBS, cell extracts were prepared in lysis buffer containing 20 mM Tris-HCl (pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ), 1  $\mu\text{L}/\text{mL}$  protease inhibitors obtained from Sigma-Aldrich, 0.5% Triton X100, 1 mM NaF, and 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . The complexes formed between biotin-labeled N6L and interacting proteins were isolated by purification of the extracts, using 100  $\mu\text{L}$  avidin-agarose (Pierce, Thermo Fisher Scientific) in PBS containing 1 mM EDTA, 1 mM NaF, and 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ . After overnight incubation at 4°C, the samples were washed extensively with the same buffer. The purified proteins were subjected to SDS-PAGE and Western blot analysis using anti nucleolin antibody (rabbit polyclonal, Abcam ab22758).

### In vivo experiments

Experiments with human solid tumour xenografts in nude mice were carried out as previously described [9]. Athymic 4-week-old Nu-NU mice (Janvier Labs, Le Genest St Isle), were subcutaneously injected with either  $5 \times 10^6$  PANC-1 cells or  $1.5 \times 10^6$  U87-MG cells. When the tumour reached about 40  $\text{mm}^3$ , the mice were separated randomly in several groups, then treated with an intraperitoneal injection of either N6L (2 mg/kg of body weight) or N6L polyplexes (2 mg/kg, ratio CS-C/N6L of 1/8 w/w), CS-C (0.26 mg/kg of body weight) or PBS as control, three times per week. The tumour volume was measured along two major axes with calipers. Tumour volumes ( $\text{mm}^3$ ) were calculated as follows:  $V = 4/3 \times \pi \times R_1^2 \times R_2$ , where  $R_1$  is radius 1,  $R_2$  is radius 2 and  $R_1 < R_2$ . The mouse model of pancreatic



ductal adenocarcinoma was obtained by injecting orthotopically in a cohort of FVB/n syngenic mice clonal tumour lines ( $0.5 \times 10^3$  cells/mouse) isolated from the p48-Cre, LSL-KRasG12D; p53flox/wt and the p48-Cre, LSL-KRasG12D; Ink4a/Arfflox/wt transgenic PDAC models. These cells are mutated for KRas and p53 and are null for Ink4a/Arf. When injected into the pancreas of immuno-competent FVB/n mice, these lines were able to form tumours that recapitulated many features of the spontaneous tumour microenvironment with an average latency of 3-4 weeks. One week after cell inoculation, PDAC mice were treated 3 times/week for a total of 3 weeks with an intraperitoneal injection of either N6L (10 mg/kg) or N6L polyplexes (10 mg/kg, ratio CS-C/N6L of 1/8 w/w) or vehicle (saline solution) as control. Pancreas from mice were dissected and collected. The total tumour burden was quantified by measuring with a caliper and estimating the volume of individually excised macroscopic tumours ( $>1 \text{ mm}^3$ ) with the formula:  $V = a \times b^2 \times 0.52$ , where a and b represent the longer and shorter diameter of the tumour, respectively. All animal procedures had been approved by the Ethical Commission of the University of Paris Est-Créteil, the University of Turin, and by the French and Italian Ministries of Health in compliance with international laws and policies. All *in vivo* experiments were carried out with the approval of the appropriate ethical committees, and under conditions established by the European Union.

### Immunostaining of tumour sections

Frozen tumour sections were processed for immunofluorescence as previously described [37]. Sections were air-dried, fixed in zinc fixative for 10 minutes, saturated with BSA 3 %, 1 hour at RT, and incubated with either anti-ki67 (DAKO, M0722) or anti-MECA32 (rat monoclonal, BD Pharmingen 550563, clone MECA-32). After washing, sections were incubated with anti IgG Alexa Fluor-555 (Life Technology). Nuclei were stained with DAPI, and immunofluorescence images were captured by confocal microscopy. Acquisitions were carried out on multiple tissue sections (5 field per mouse,  $n = 5$ ), and quantification analysis was performed with the ImageJ software.

### Bio-distribution assay

In order to assess the capability of N6L and N6L polyplexes to reach and distribute into the malignant lesions, a bio-distribution experiment in tumour-bearing PDAC mice was performed using green fluorescent compounds. N6L-alexa fluor 488 or N6L-alexa fluor polyplexes were injected in the tail vein, and mice were sacrificed 6 and 12 hours afterward. Pancreas, liver and kidney, as control, were excised from each mouse, and freshly included in OCT (Tissue Tek). Ten micrometer-thick sections were cut using a Leica CM1900 cryostat.

Sections were air-dried, fixed in a zinc fixative (6.05g Tris, 0.35g Ca ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ )<sub>2</sub>, 2.5g Zn( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ )<sub>2</sub>, 2.5g ZnCl<sub>2</sub>, 3.8 mL HCl 37%) for 10 minutes, and the nuclei were counterstained with diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Invitrogen). Stainings were analyzed by using a Leica SPEII confocal laser-scanning microscope (Leica Microsystems).

### Statistics analysis

Unless indicated otherwise, bars represent mean  $\pm$  Standard Error Mean (S.E.M.;  $n \geq 3$ ), p values have been calculated using a two-tailed or one-tailed unpaired t test using GraphPad Prism software. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

### Abbreviations

N6L: Nucleolin ANTAGONIST; GAG: glycoaminoglycans; DLS: dynamic light scattering; CS-C: chondroitin sulphate C; TEM: transmission electronic microscopy; PANC-1: human pancreatic carcinoma cell line; U87-MG: human glioblastoma cell line; mPDAC: murine pancreatic ductal adenocarcinoma.

### Author contributions

M.E.G. and Z.P. contributed equally to this work. JC and IC: Co-senior author.

### ACKNOWLEDGMENTS

Aurélien Julien performed a few preliminary tests to determine the size of the nanoparticles by dynamic laser light scattering. We thank Doug Hanahan for insightful suggestions on the orthotopic mouse model and for providing mPDAC cells.

### CONFLICTS OF INTEREST

A potential conflict of interests could exist related to this study, since José Courty is a co-author of an existing patent on the use of N6L in the treatment of cancer.

### FUNDING

This work was supported by grants from the "ANR NORMATHER and THERANUC"; by the Italian Association for Cancer Research (AIRC-IG grants # 15645).

### REFERENCES

1. Nazir S, Hussain T, Ayub A, Rashid U, MacRobert AJ. Nanomaterials in combating cancer: therapeutic applications and developments. *Nanomedicine*. 2014; 10:19-34.



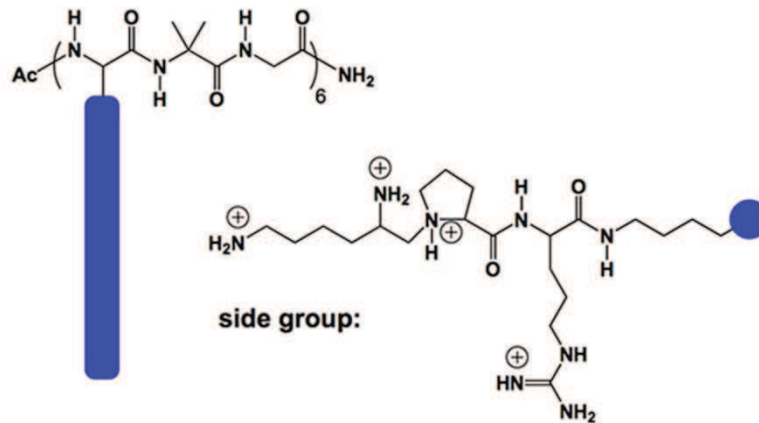
2. Danquah MK, Zhang XA, Mahato RI. Extravasation of polymeric nanomedicines across tumor vasculature. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63:623-39.
3. Jain RK. Antiangiogenesis strategies revisited: from starving tumors to alleviating hypoxia. *Cancer Cell.* 2014; 26:605-22.
4. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res.* 1986; 46:6387-92.
5. Brannon-Peppas L, Blanchette JO. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Adv Drug Deliv Rev.* 2004; 56:1649-59.
6. Destouches D, Page N, Hamma-Kourbali Y, Machi V, Chaloin O, Frechault S, Birmpas C, Katsoris P, Beyrath J, Albanese P, Maurer M, Carpentier G, Strub JM, et al. A simple approach to cancer therapy afforded by multivalent pseudopeptides that target cell-surface nucleoproteins. *Cancer Res.* 2011; 71:3296-305.
7. Destouches D, El Khoury D, Hamma-Kourbali Y, Krust B, Albanese P, Katsoris P, Guichard G, Briand JP, Courty J, Hovanessian AG. Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin. *PLoS One.* 2008; 3:e2518.
8. Gilles ME, Maione F, Cossutta M, Carpentier G, Caruana L, Di Maria S, Houppé C, Destouches D, Shchors K, Prochasson C, Mongelard F, Lamba S, Bardelli A, et al. Nucleolin Targeting Impairs the Progression of Pancreatic Cancer and Promotes the Normalization of Tumor Vasculature. *Cancer Res.* 2016; 76:7181-93.
9. El Khoury D, Destouches D, Lengagne R, Krust B, Hamma-Kourbali Y, Garcette M, Niro S, Kato M, Briand JP, Courty J, Hovanessian AG, Prevost-Blondel A. Targeting surface nucleolin with a multivalent pseudopeptide delays development of spontaneous melanoma in RET transgenic mice. *BMC Cancer.* 2010; 10:325.
10. Destouches D, Huet E, Sader M, Frechault S, Carpentier G, Ayoul F, Briand JP, Menashi S, Courty J. Multivalent pseudopeptides targeting cell surface nucleoproteins inhibit cancer cell invasion through tissue inhibitor of metalloproteinases 3 (TIMP-3) release. *J Biol Chem.* 2012; 287:43685-93.
11. Prabhu RH, Patravale VB, Joshi MD. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights. *Int J Nanomedicine.* 2015; 10:1001-18.
12. Démouilins T, Milona P, Englezou PC, Ebensen T, Schulze K, Suter R, Pichon C, Midoux P, Guzmán CA, Ruggli N, McCullough KC. Polyethylenimine-based polyplex delivery of self-replicating RNA vaccines. *Nanomedicine.* 2016; 12:711-22.
13. Favretto ME, Krieg A, Schubert S, Schubert US, Brock R. Multifunctional poly(methacrylate) polyplex libraries: A platform for gene delivery inspired by nature. *J Control Release.* 2015; 209:1-11.
14. Clima L, Ursu EL, Cojocaru C, Rotaru A, Barboiu M, Pinteala M. Experimental design, modeling and optimization of polyplex formation between DNA oligonucleotides and branched polyethylenimine. *Org Biomol Chem.* 2015; 13:9445-56.
15. Lu M, Ho YP, Grigsby CL, Nawaz AA, Leong KW, Huang TJ. Three-dimensional hydrodynamic focusing method for polyplex synthesis. *ACS Nano.* 2014; 8:332-39.
16. Lachelt U, Wagner E. Nucleic Acid Therapeutics Using Polyplexes: A Journey of 50 Years (and Beyond). *Chem Rev.* 2015; 115:11043-78.
17. Clementi LA, Vega JR, Gugliotta LM. Particle Size Distribution of Multimodal Polymer Dispersions by Multiangle Dynamic Light Scattering. Solution of the Inverse Problem on the Basis of a Genetic Algorithm. *Particle & Particle Systems Characterization.* 2012; 27:146-57.
18. Zhu XJ, Shen J, Song LM. Accurate Retrieval of Bimodal Particle Size Distribution in Dynamic Light Scattering. *IEEE Photonics Technol Lett.* 2016; 28:311-14.
19. Paulson AS, Tran Cao HS, Tempero MA, Lowy AM. Therapeutic advances in pancreatic cancer. *Gastroenterology.* 2013; 144:1316-26.
20. Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas: a clinical review. *JAMA.* 2013; 310:1842-50.
21. Torchilin V. Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011; 63:131-5.
22. Jain RK. Transport of molecules, particles, and cells in solid tumors. *Annu Rev Biomed Eng.* 1999; 1:241-63.
23. Afratis N, Gialeli C, Nikitovic D, Tseggenidis T, Karousou E, Theocharis AD, Pavao MS, Tzanakakis GN, Karamanos NK. Glycosaminoglycans: key players in cancer cell biology and treatment. *FEBS J.* 2012; 279:1177-97.
24. Pumphrey CY, Theus AM, Li S, Parrish RS, Sanderson RD. Neoglycans, carbodiimide-modified glycosaminoglycans: a new class of anticancer agents that inhibit cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Cancer Res.* 2002; 62:3722-8.
25. Borsig L, Wang L, Cavalcante MC, Cardilo-Reis L, Ferreira PL, Mourao PA, Esko JD, Pavao MS. Selectin blocking activity of a fucosylated chondroitin sulfate glycosaminoglycan from sea cucumber. Effect on tumor metastasis and neutrophil recruitment. *J Biol Chem.* 2007; 282:14984-91.
26. Lee YS, Yang HO, Shin KH, Choi HS, Jung SH, Kim YM, Oh DK, Linhardt RJ, Kim YS. Suppression of tumor growth by a new glycosaminoglycan isolated from the African giant snail *Achatina fulica*. *Eur J Pharmacol.* 2003; 465:191-8.
27. Ferro M, Giuberti G, Zappavigna S, Perdona S, Facchini G, Sperlongano P, Porto S, Di Lorenzo G, Buonerba C, Abbruzzese A, Altieri V, Caraglia M. Chondroitin sulphate enhances the antitumor activity of gemcitabine



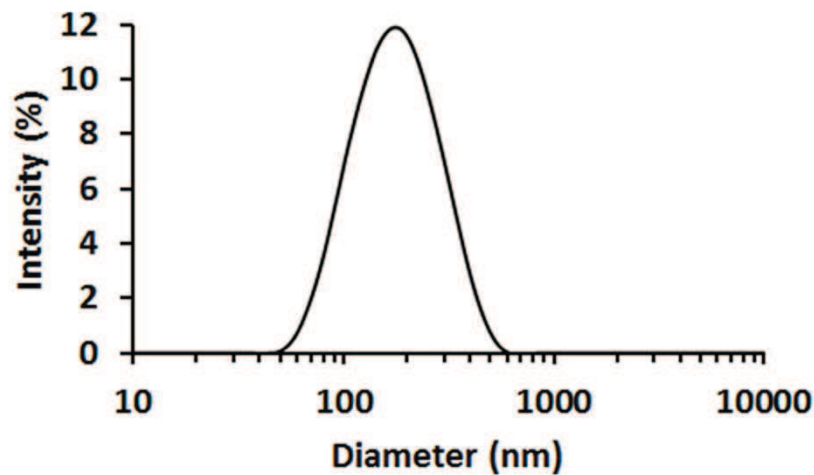
- and mitomycin-C in bladder cancer cells with different mechanisms. *Oncol Rep.* 2012; 27:409-15.
28. Bates PJ, Laber DA, Miller DM, Thomas SD, Trent JO. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Pathol.* 2009; 86:151-64.
  29. Porkka K, Laakkonen P, Hoffman JA, Bernasconi M, Ruoslahti E. A fragment of the HMGN2 protein homes to the nuclei of tumor cells and tumor endothelial cells *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99:7444-9.
  30. Hu Q, Gu G, Liu Z, Jiang M, Kang T, Miao D, Tu Y, Pang Z, Song Q, Yao L, Xia H, Chen H, Jiang X, et al. F3 peptide-functionalized PEG-PLA nanoparticles co-administrated with tLyp-1 peptide for anti-glioma drug delivery. *Biomaterials.* 2013; 34:1135-45.
  31. Li J, Zheng H, Bates PJ, Malik T, Li XF, Trent JO, Ng CK. Aptamer imaging with Cu-64 labeled AS1411: preliminary assessment in lung cancer. *Nucl Med Biol.* 2014; 41:179-85.
  32. Reyes-Reyes EM, Teng Y, Bates PJ. A new paradigm for aptamer therapeutic AS1411 action: uptake by macropinocytosis and its stimulation by a nucleolin-dependent mechanism. *Cancer Res.* 2010; 70:8617-29.
  33. Zhang Y, Yang M, Park JH, Singelyn J, Ma H, Sailor MJ, Ruoslahti E, Ozkan M, Ozkan C. A surface-charge study on cellular-uptake behavior of F3-peptide-conjugated iron oxide nanoparticles. *Small.* 2009; 5:1990-6.
  34. Sader M, Couleaud P, Carpentier G, Gilles ME, Bousserhine N. A. L., Cascone I, Destouches D, Cortajarena AL, Courty J. Functionalization of Iron Oxide Magnetic Nanoparticles with the Multivalent Pseudopeptide N61 for Breast Tumor Targeting. *J Nanomed Nanotechnol.* 2015; 6:1-8.
  35. Kossatz S, Grandke J, Couleaud P, Latorre A, Aires A, Crosbie-Staunton K, Ludwig R, Dahring H, Ettelt V, Lazaro-Carrillo A, Calero M, Sader M, Courty J, et al. Efficient treatment of breast cancer xenografts with multifunctionalized iron oxide nanoparticles combining magnetic hyperthermia and anti-cancer drug delivery. *Breast Cancer Res.* 2015; 17:66.
  36. Nolan-Stevaux O, Lau J, Truitt ML, Chu GC, Hebrok M, Fernandez-Zapico ME, Hanahan D. GLI1 is regulated through Smoothed-independent mechanisms in neoplastic pancreatic ducts and mediates PDAC cell survival and transformation. *Genes Dev.* 2009; 23:24-36.
  37. Maione F, Molla F, Meda C, Latini R, Zentilin L, Giacca M, Seano G, Serini G, Bussolino F, Giraudo E. Semaphorin 3A is an endogenous angiogenesis inhibitor that blocks tumor growth and normalizes tumor vasculature in transgenic mouse models. *J Clin Invest.* 2009; 119:3356-72.

## Multivalent cationic pseudopeptide polyplexes as a tool for cancer therapy

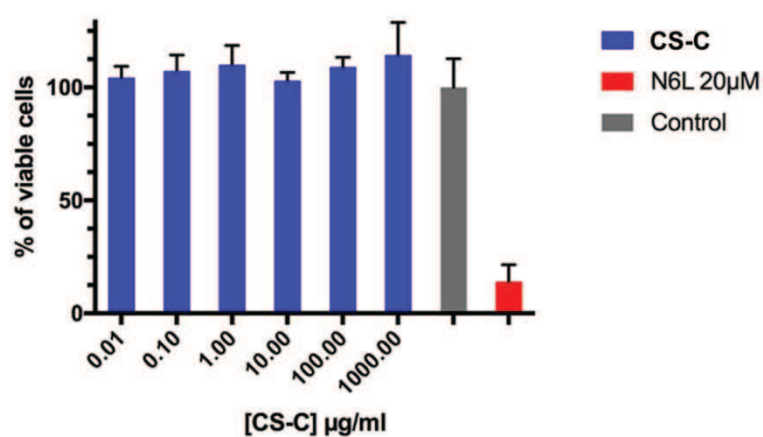
### SUPPLEMENTARY MATERIALS



Supplementary Figure 1: Chemical structure of the N6L pseudopeptide, with the K $\psi$ PR side chains portrayed as blue cylinders (counterions are acetate anions); the exact structure of the K $\psi$ PR subunits is provided on the right side, with the attachment point to the backbone indicated by a blue full circle.

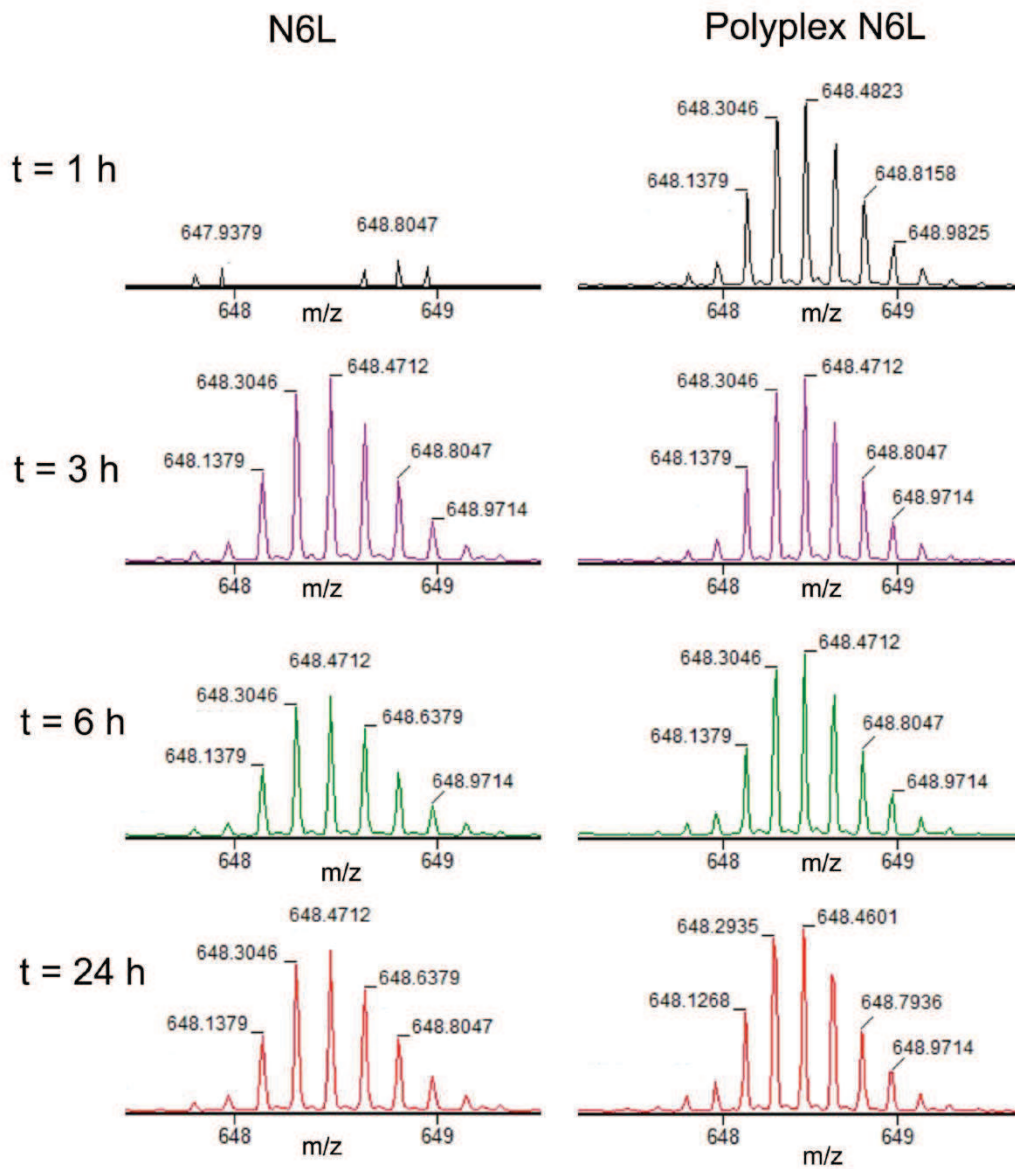


Supplementary Figure 2: Dynamic light scattering (DLS) measurements. Dynamic light scattering (DLS) measurement of particle size distribution measured after mixing heparin with N6L in water at 23°C (final concentrations of 14.7  $\mu$ M and 100  $\mu$ g/mL for N6L and heparin, respectively); representative results from three consecutive measurements of 15 runs each.



**Supplementary Figure 3: Effect of CS-C on the PANC-1 viability.** PANC-1 cells were treated with various concentration of CS-C ranging from 0.01 to 1000 µg/ml. After 72 hours, cell growth was quantified by AlamarBlue assay according to the recommended procedure. Histograms represent the percentage of cell growth relative to the values of untreated cells.





**Supplementary Figure 4: MS determination of N6L presence in the dialysate.** A solution of 1 mL of 73  $\mu$ M N6L or of 1 mL of polyplexed N6L, with final concentrations of 73  $\mu$ M and 10  $\mu$ g/mL in N6L and CS-C, respectively, were independently dialyzed against 100 mL of water. 1-mL aliquots were taken at times indicated in the figure, and analysed by mass spectrometry. The peptide with m/z equal to 648.637 was identified as N6L.

## Annexe 3 : Effet du N6L sur les cellules immunitaires dans les tumeurs PDAC

Le ciblage de la nucléoline par le N6L dans le modèle murin orthotopique mPDAC présente des effets anti-tumoraux, anti-angiogéniques et normalisateurs des vaisseaux tumoraux. Dans l'Article 1, nous avons montré que ces effets sont liés à un ciblage des cellules tumorales mais aussi des cellules endothéliales, confirmé par le modèle murin orthotopique PANC-02 dans les souris KO NCL<sup>+/-</sup>. Cependant, il reste à envisager l'effet du ciblage de la nucléoline par le N6L sur les autres composants cellulaires du microenvironnement tumoral comme les cellules immunitaires ou les fibroblastes activés. Si nous avons clairement montré l'effet direct du N6L sur les cellules endothéliales, il est possible qu'une partie de ces effets vasculaires soit liée à une modification des communications intercellulaires. De plus, dans la perspective de l'utilisation du peptide N6L dans le traitement de patients atteints de tumeurs PDAC, l'effet du N6L sur la réponse immunitaire au sein des tumeurs reste à caractériser. Si le traitement N6L venait à inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale, il faudrait alors envisager de l'associer à une immunothérapie favorisant la réponse immunitaire.

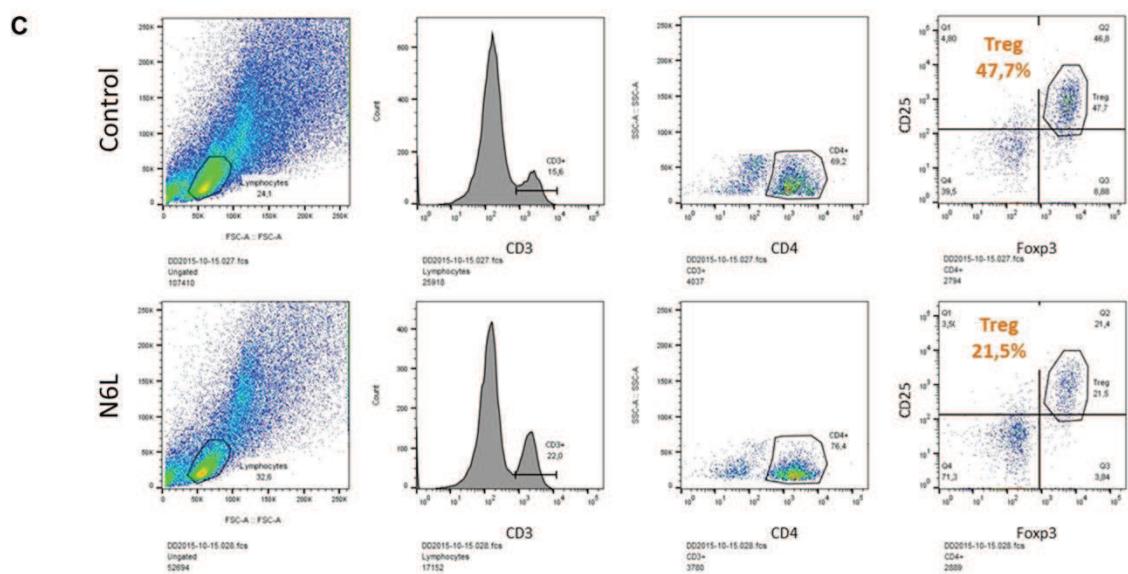
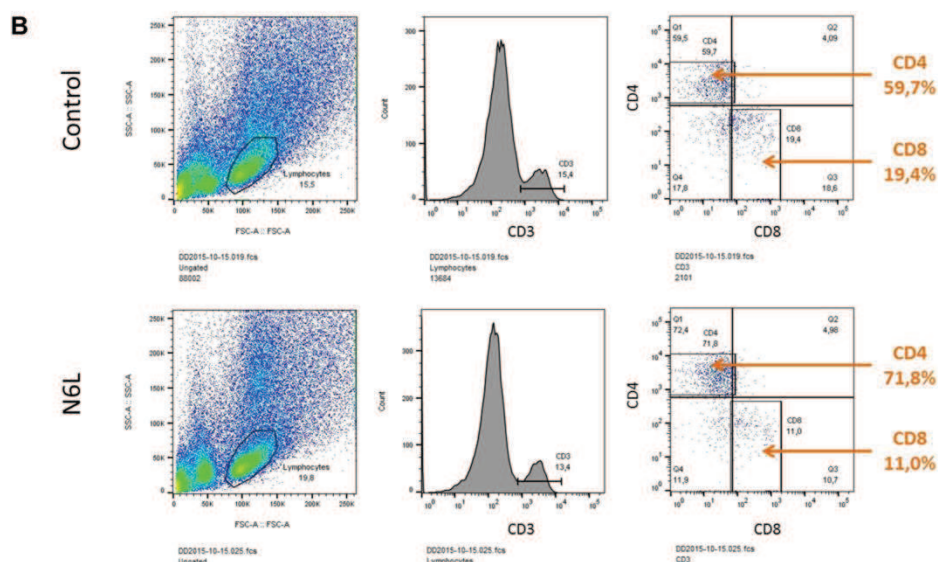
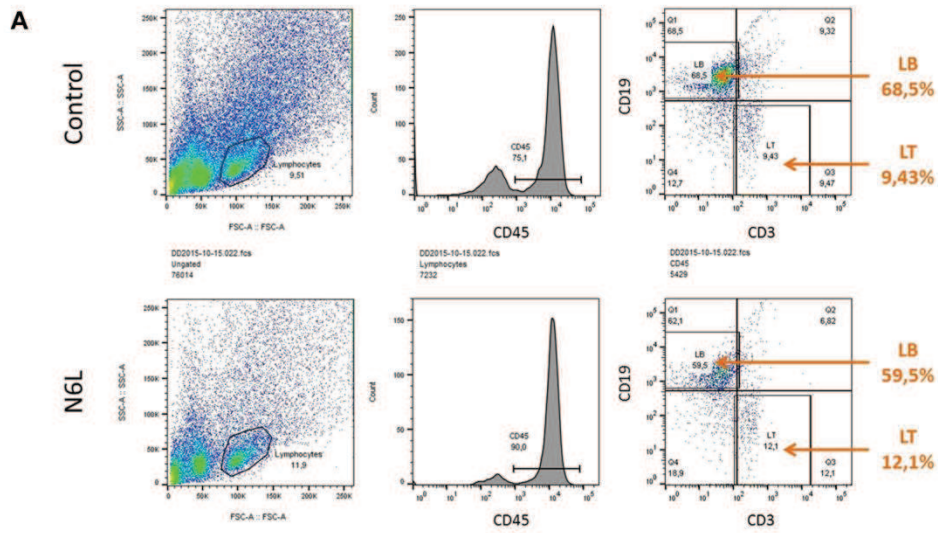
Dans cette optique, Ilaria CASCONE s'est rapprochée de l'équipe « Immunopathologie rénale et immunomodulation en transplantation » dirigée par José COHEN (IMRB, France) pour adresser la question de l'effet du N6L sur les cellules inflammatoires et plus généralement sur la réponse immunitaire dans les tumeurs PDAC. Des expériences *in vitro* réalisées avec Caroline PILON à l'IMRB ont montré par cytométrie de flux que la nucléoline est exprimée à la surface des lymphocytes activés par un anticorps anti-CD3 qui stimule la prolifération clonale des lymphocytes, alors que la protéine est absente à la surface des lymphocytes non activés. De plus, le traitement des lymphocytes activés avec des doses croissantes de N6L (10  $\mu$ M et 50  $\mu$ M) induit une disparition dose-dépendante de la nucléoline de surface. Enfin, le traitement N6L inhibe de façon dose-dépendante la prolifération des lymphocytes activés par l'anticorps anti-CD3. Ces résultats ont été reproduits dans des lymphocytes murins.

En parallèle, nous avons mis au point une méthode d'extraction et de caractérisation des cellules inflammatoires présentes dans les tumeurs orthotopiques mPDAC pour évaluer l'effet du traitement N6L sur les populations immunitaires *in vivo*. Très brièvement, les

tumeurs prélevées au terme des 4 semaines sont dissociées mécaniquement puis digérées pendant 1 heure dans du RPMI 10% FBS + 1,5 mg/mL de collagénase IV + 0,1 mg/mL de DNase I (37°C). La suspension cellulaire obtenue est filtrée par centrifugation dans des tamis cellulaires de 70 µm puis les cellules sont purifiées sur un gradient de Ficoll à raison de 20 mL de suspension cellulaire déposés sur 15 mL de Ficoll. Après 40 minutes de centrifugation à 400g, l'anneau de cellules immunitaires est récupéré, rincé et resuspendu dans du RPMI 10% FBS. Les populations immunitaires sont marquées avec des mix d'anticorps fluorescents reconnaissant des épitopes caractéristiques de chaque type cellulaire. Le marquage des épitopes de surface sont réalisés par incubation des cellules vivantes avec les mix d'anticorps pendant 30 minutes (4°C) puis les cellules sont fixées et perméabilisées pour procéder au marquage des épitopes intracellulaires. Enfin, les cellules marquées sont analysées par cytométrie de flux (MACSQuant, Miltenyi Biotec). Les populations de lymphocytes B, de lymphocytes T effecteurs et de lymphocytes T régulateurs ont été détectées par le marquage des épitopes suivants :

- ❖ Détection des lymphocytes B : CD45, CD19
- ❖ Détection des lymphocytes T totaux : CD45, CD3
- ❖ Détection des lymphocytes T CD8 : CD45, CD3, CD8
- ❖ Détection des lymphocytes T CD4 effecteurs : CD45, CD3, CD4
- ❖ Détection des lymphocytes T CD4 régulateurs : CD45, CD3, CD4, Foxp3, CD25

La Figure 30 montre les proportions des populations de lymphocytes B, de lymphocytes T effecteurs et de lymphocytes T régulateurs obtenues dans une expérience représentative. Les mêmes analyses ont été réalisées sur trois expériences *in vivo* indépendantes et les résultats présentés dans le Figure 30 ont été reproduits.





**Figure 30 : détection des cellules immunitaires dans les tumeurs mPDAC.** Après dissociation des tumeurs témoins injectées avec du PBS (Control) ou traitées avec du N6L 10 mg/kg, les cellules immunitaires purifiées sont marquées avec des anticorps fluorescents et analysées par cytométrie de flux. (A) Proportions de lymphocytes B (LB) et lymphocytes T (LT) détectés respectivement avec les marqueurs  $CD19^+CD3^-$  et  $CD19^-CD3^+$ , parmi toutes les cellules immunitaires  $CD45^+$ . (B) Détection des LT  $CD4^+$  et  $CD8^+$  parmi les lymphocytes T  $CD3^+$ . (C) Détection des LT régulateurs  $CD25^+ Foxp3^+$  parmi les CT  $CD4^+$ . Cette figure montre les résultats d'une expérience représentative reproduite deux fois.

Les premières analyses des cellules immunitaires dans les tumeurs PDAC montrent une modification des populations immunitaires en réponse au traitement N6L. Ces données sont à confirmer et font l'objet du travail de thèse de Matteo PONZO dirigé par Ilaria CASCONE mais les résultats préliminaires que j'ai pu obtenir pendant ma thèse semblent indiquer que l'inhibition de la nucléoline par le N6L induit une diminution des lymphocytes B et une augmentation des lymphocytes T. De plus, nous avons observé une augmentation des lymphocytes T  $CD4^+$  et une diminution des lymphocytes T  $CD8^+$ , ce qui suggère que l'inhibition de la nucléoline par le N6L ne favorise pas la réponse immunitaire anti-tumorale exercée par les lymphocytes T  $CD8^+$ . Enfin, nous avons observé une diminution des lymphocytes T régulateurs, probablement corrélée à une augmentation des lymphocytes T effecteurs. Ces données restent à confirmer, de même que la polarisation des macrophages résidents vers un phénotype anti-tumoral de type M1 ou pro-tumoral de type M2. De même, si nous avons montré que l'inhibition de la nucléoline induit une normalisation vasculaire efficace s'accompagnant d'une réduction des métastases hépatiques et d'une augmentation de la perfusion et de la distribution des chimiothérapeutiques, il reste à vérifier si la normalisation induite par l'inhibition de la nucléoline favorise l'infiltration leucocytaire dans le modèle de tumeurs PDAC.

## RESUME

L'angiogenèse est le processus biologique par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir du réseau vasculaire pré-existant. Sa première étape, l'activation endothéliale, est caractérisée par la prolifération des cellules endothéliales, la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques comme l'Angiopoïétine-2 (Ang-2) et la relocalisation de la nucléoline du noyau vers la surface cellulaire. Dans les vaisseaux matures, les cellules endothéliales sont quiescentes et l'endothélium est recouvert de péricytes. L'activation endothéliale induit un détachement des péricytes favorisant le remodelage du réseau vasculaire. L'objectif de cette thèse est d'étudier les mécanismes de l'activation endothéliale au cours de l'angiogenèse physiologique et d'évaluer les effets de son inhibition dans un contexte d'angiogenèse tumorale. Des études *in vivo* dans la rétine de souris et *in vitro* sur des cellules endothéliales humaines ont montré que le VEGF régule l'exocytose des Corps de Weibel et Palade (WPBs), des compartiments cytoplasmiques spécifiques des cellules endothéliales pouvant contenir de l'Ang-2. Ce travail suggère que l'exocytose des WPBs induite par le VEGF régule la sécrétion de l'Ang-2 par les cellules endothéliales activées et que l'Ang-2 sécrétée régule à son tour le recrutement des péricytes sur les vaisseaux. Le ciblage de la nucléoline dans un modèle de cancer du pancréas a inhibé l'activation endothéliale et cette inhibition a diminué la croissance et l'angiogenèse tumorales tout en favorisant le recrutement des péricytes et la normalisation des vaisseaux tumoraux. La normalisation vasculaire induite par l'inhibition de l'activation endothéliale *via* le ciblage de la nucléoline représente une stratégie prometteuse pour le traitement de pathologies associées à une dérégulation de l'angiogenèse comme les cancers ou les rétinopathies.

## ABSTRACT

Angiogenesis is the biological process of new blood vessel formation from the pre-existing vascular network. Its first step, endothelial activation, is characterized by endothelial cell proliferation, the secretion of pro-angiogenic factors such as Angiopoietin-2 (Ang-2) and the relocation of nucleolin from the nucleus to the cell surface. In the mature vessels, endothelial cells are quiescent and the endothelium is covered by pericytes. Endothelial activation induces pericyte detachment which promotes the remodeling of the vascular network. The aim of this thesis is to study the mechanisms of endothelial activation during physiological angiogenesis and to evaluate the effects of its inhibition in a context of tumor angiogenesis. *In vivo* studies in mouse retina and *in vitro* studies on human endothelial cells showed that VEGF regulates the exocytosis of Weibel-Palade bodies (WPB), cytoplasmic compartments specific for endothelial cells that may contain Ang-2. This work suggests that the exocytosis of WPBs induced by VEGF regulates the secretion of Ang-2 by activated endothelial cells and that secreted Ang-2 regulates the recruitment of pericytes on the vessels. Nucleolin targeting in a pancreatic cancer model inhibited endothelial activation and this inhibition decreased tumor growth and angiogenesis while promoting recruitment of pericytes and normalization of tumor vessels. Vascular normalization induced by the inhibition of endothelial activation *via* nucleolin targeting may be a promising strategy for the treatment of pathologies associated with dysregulation of angiogenesis, such as cancers or retinopathies.