

Laboratoire d'angiogenèse moléculaire
GIGA-Research
Faculté des Sciences
Promoteurs : Dr. I. Struman
Pr. J.A. Martial



Détermination du rôle
de l'interactome
PAI-1/uPA/uPAR
dans l'angiogenèse



Stéphanie Herkenne

Thèse soumise en vue de l'obtention
du grade de Docteur en Sciences

Année académique 2012-2013

Arrivée au terme de ce travail, il m'est agréable de remercier les nombreuses personnes qui, de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de cette thèse de doctorat.

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur Joseph A. Martial pour m'avoir accordé sa confiance en m'accueillant au sein de son laboratoire. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir donné la chance de mener ce projet à bien. Je vous remercie également pour l'intérêt particulier que vous avez toujours porté à mon travail.

Je remercie ensuite chaleureusement le docteur Ingrid Struman pour sa confiance ainsi que la liberté et l'autonomie dont j'ai pu bénéficier tout au long de ce projet. Je tiens également à te remercier pour ta disponibilité, ta franchise et tes nombreux conseils avisés.

J'aimerais encore remercier tout particulièrement Tina alias Mamy, Mamy Titi ou N-cougou pour la bonne humeur et la sérénité que tu as apportées dans le groupe. Merci de t'être plongée dans le « Signaling » et d'avoir été aussi disponible durant toute ma thèse. Je te remercie également pour tes nombreuses relectures durant toutes ces années.

Cécile, tout d'abord merci pour tout le travail que tu as effectué et pour la relecture de cette thèse. D'un point de vue plus personnel, merci pour ta simplicité, la bonne humeur que tu as amenée dans le groupe et nos nombreuses discussions scientifiques et autres.

Séba, merci pour nos nombreuses discussions, tes conseils et de m'avoir fait partager ton expérience. Je te remercie également de m'avoir boostée.

Je remercie Khalid pour m'avoir permis d'être autonome et indépendante au cours de ma thèse.

Oli, merci pour ta disponibilité, tes encouragements et pour tout le travail que tu as effectué. Merci également d'avoir guidé mes premiers pas en souris malgré ma peur d'avoir peur d'une souris. Je te remercie également de m'avoir modernisé en m'initiant au langage geek !

Mimi, merci pour ta gentillesse, ton soutien, nos nombreuses discussions et ta précieuse aide dont j'ai pu bénéficier dès mes premiers pas dans le laboratoire. Je tiens également à te remercier pour ton dévouement tout particulièrement dans la production de la 16K.

Maintenant, je tiens à remercier tous les membres de l'équipe 16K pour la bonne ambiance qu'il y règne. Merci à toi, Nico (le « futuriste »), pour nos longues conversations au sujet du dernier scoop, nos fous rires et nos bêtises qui ont égayé la vie du labo au quotidien surtout ces derniers mois. Marie, je te remercie pour tes conseils informatiques mais également de m'avoir fait découvrir le roller derby et le krav maga. Merci également au petit dernier, Benoît (Bebe), qui j'en suis sûre fera très prochainement partie de l'équipe des doctorants, pour ta contribution à l'ambiance du labo.

Je remercie également les anciens du groupe 16K qui ont eu une grande importance dans ma thèse. Merci à JYC, pour ton aide si précieuse lors de mes transferts en sous-marins mais surtout pour ton humour pince sans rire. Vino, mon voisin de bureau, merci pour nos nombreux fous rires surtout en réunion. Ton côté décontracté m'a souvent apaisé, c'était un plaisir de t'avoir dans le groupe PAI-1. Merci également à Julie (Reinette) pour nos

conversations du vendredi après midi qui commençaient parfois le mardi ! Céline, merci tout d'abord d'avoir suivi mes premiers pas dans le laboratoire mais surtout pour ton soutien dans cette fin de thèse! Je remercie également Vivi, Momo, Karo et Ludo !

Merci à tous les membres du LBMGG pour la bonne ambiance qui règne au sein du laboratoire, pour nos rires et nos discussions. Merci à tous d'avoir comblé ma recherche du dernier scoop ! Je remercie particulièrement François Naye pour ses remarques judicieuses, ses conseils ainsi que sa gentillesse. Marc, merci également pour ton aide, tes remarques et nos longues conversations à côté de la machine à café ou sur le balcon. Merci aussi à Benoît, Yoann, Nath, Vi, David, Justine et Auré. Je remercie également mes « voisins de bureau » Ben et Delphine ! Finalement, merci aux labos du GIGA de m'avoir partagé leurs connaissances, leurs matériels mais également pour les nombreux encouragements.

Je voudrais également remercier mes parents sans qui rien n'aurait été possible. Merci de m'avoir toujours poussée à aller plus loin. Je remercie également mon frère et ma sœur pour leur soutien tout au long de mes études. .

Oli, Merci!

Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
aFGF	<i>acidic Fibroblast Growth Factor</i>
Ang	Angiopoïétine
AP-1	Protéine Activatrice 1
AP-2	Protéine Activatrice 2
ATF	<i>Amino Terminal Fragment</i>
BAD	<i>Bcl-2 Associated Death promoter</i>
BBCE	<i>Bovine Brain Capillary Endothelial cell</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
CAM	<i>chick ChorioAllantoic Membrane</i>
Cdc 42	<i>Cell division cycle 42</i>
Cox-2	Cyclooxygénase 2
Dab-1	<i>Disabled-1</i>
DAG	DiAcylGlycérol
Dll	<i>Delta-Like Ligand</i>
EE	<i>Early Endosome</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGR	<i>Early Growth Response</i>
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor receptor</i>
flt	<i>fms-like tyrosine kinase</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i>
GFD	<i>Growth Factor Domain</i>
GH	<i>Growth Hormone</i> ou hormone de croissance
GPI	<i>Glycosylphosphatidylinositol</i>
Grb2	<i>Growth Factor Receptor Bound 2</i>
HBMEC	<i>Human Brain Microvascular Endothelial Cell</i>
HDMVEC	<i>Human Dermal MicroVascular Endothelial Cell</i>
HGF	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HIF-1 α	<i>Hypoxia Inducible Factor 1α</i>
hnRNPC	<i>Heterogeneous Nuclear RiboNucleoProtein C</i>
hPRL	<i>human Prolactin</i> ou prolactine humaine
HRE	<i>Hypoxia Response Element</i> ou <i>Elément de réponse à l'hypoxie</i>
HS	<i>Heparan Sulfate</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
IAP	<i>Inhibitor Apoptosis Protein</i>
ICAM-1	<i>InterCellular Adhesion Molecule 1</i>
iNOS	<i>Oxide Nitrique Synthétase Inductible</i>
IP3	<i>Inositol 1,4,5-triPhosphate</i>

IRF-1	<i>Interferon Regulatory Factor-1</i>
JAK	<i>JAnus Kinase</i>
kDa	KiloDALton
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LPS	LipoPolySacharide
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEC	Matrice ExtraCellulaire
miARN	microARN
MMP	<i>Matrix MetalloProteinases</i>
NF- κ B	<i>Nuclear Factor κB</i>
NO	Oxyde Nitrique
NRP	Neuropiline
PAK-2	<i>P21 Activated Protein Kinase-2</i>
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor 1</i>
PC	péricyte
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PDGFR	<i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor</i>
PECAM1	<i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
PI3K	PhosphatidyInositol 3-Kinases
PIP2	PhosphatidyInositol 4,5-biPhosphate
PL	<i>PLacental hormone</i> ou hormone placentaire
Plg	Plasminogène
PPCM	<i>PeriPartum CardioMyopathy</i> ou cardiomyopathie du péripartum
PRL	Prolactine
PRL 16K	fragment N-terminal de 16 kDa de la prolactine
PRLR	récepteur à la prolactine
PSD95	<i>PostSynaptic Density protein 95</i>
PTP1b	<i>Protein Tyrosine Phosphatase 1b</i>
qRT-PCR	<i>Quantitative Real-Time PCR</i>
RAP	<i>Receptor Associated Protein</i>
RCL	<i>Reactive Center Loop</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
S1P	<i>sphingosine-1-phosphate</i>
S1PR	<i>sphingosine-1-phosphate receptor</i>
Shc	<i>Src-Homology-2-Containing</i>
siARN	<i>small interfering RNA</i>
SMC	<i>Smooth Muscle Cell</i> ou cellules musculaires lisses
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
SP1	<i>Specificity Protein 1</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor α</i>
TSP-1	Thrombospondine 1

tPA	<i>tissue Plasminogen Activator</i>
uPA	<i>urokinase Plasminogen Activator</i>
uPAR	<i>urokinase plasminogen activator receptor</i>
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>
VE	<i>Vascular Endothelial</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor Receptor</i>
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i>

Table des matières

INTRODUCTION.....	1
1. L'angiogenèse	1
1.1 Généralités	1
1.2 Initiation du réseau vasculaire.....	1
1.3 Développement du réseau vasculaire	2
1.4 Les différentes étapes de l'angiogenèse	3
1.4.1 Vasodilatation et perméabilité vasculaire.....	4
1.4.2 La dégradation de la matrice.....	4
1.4.3 L'élongation des vaisseaux	4
1.4.4 La formation du lumen.....	6
1.4.5 La maturation des vaisseaux sanguins	6
1.5 La régulation de l'angiogenèse.....	7
1.6 L'angiogenèse tumorale	9
1.7 La thérapie anti-angiogène.....	10
2. La famille Prolactine/Hormone de Croissance/Lactogène Placentaire (PRL/GH/PL)	13
2.1 Généralités	13
2.2 La Prolactine (PRL).....	13
2.2.1 La structure de la PRL.....	13
2.2.2 La régulation de la synthèse et de la sécrétion de la PRL.....	14
2.2.3 Les fonctions biologiques de la PRL.....	15
2.3 La Prolactine 16K	16
2.3.1 Clivage de la PRL.....	16
2.3.2 Effets anti-angiogènes de la PRL 16K	17
2.3.3 Mode d'action de la PRL 16K.....	17
2.3.4 Effets <i>in vivo</i> de la hPRL 16K.....	20
2.3.5 Effets de la PRL 16K associés à des pathologies	21
3. Le système VEGF-A/VEGFR-2	22
3.1 Le VEGF-A	22
3.2 Le VEGFR-2.....	24
3.2.1 Activités du VEGFR-2	26
3.2.1.1 Perméabilité.....	28
3.2.1.2 La dégradation matricielle.....	29
3.2.1.3 La migration	29
3.2.1.4 La prolifération.....	30
3.2.1.5 La survie	30
3.2.2 Les Co-Récepteurs du VEGFR-2	30
3.2.2.1 Les Neuropilines (NRP)	30
3.2.2.2 L'Héparan Sulfate (HS).....	32
3.2.2.3 Les intégrines	33

3.2.2.4	Les VE-cadhérines.....	35
3.2.2.5	Les autres co-récepteurs	35
3.2.3	L'internalisation du VEGFR-2.....	36
3.2.3.1	Rôle de l'internalisation du VEGFR-2	36
3.2.3.2	Régulation de l'internalisation du VEGFR-2	37
4.	Les acteurs du système plasminogène-plasmine	39
4.1	Le système plasminogène-plasmine.....	39
4.2	PAI-1	40
4.2.1	Généralités biochimiques de PAI-1	40
4.2.2	Régulation de l'expression de PAI-1.....	41
4.2.3	Rôles de PAI-1.....	42
4.2.3.1	La migration cellulaire	42
4.2.3.2	L'adhésion cellulaire	43
4.2.3.3	L'apoptose	44
4.2.3.4	L'angiogenèse et la croissance tumorale.....	44
4.2.3.5	La fibrinolyse	45
4.3	L'uPA.....	45
4.4	uPAR	46
4.4.1	Structure de la protéine	46
4.4.2	Régulation de l'expression	46
4.4.3	L'interactome uPAR.....	47
4.4.3.1	Les intégrines	48
4.4.3.2	LRP-1	49
4.4.3.3	EGFR.....	51
4.4.4	Rôle de l'uPAR dans l'angiogenèse.....	54
BUT DU TRAVAIL	56	
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	58	
1. Souris.....	58	
2. Cellules	58	
3. Réactifs.....	59	
4. Transfections des siARN dans les cellules ABAE et HUVEC.....	59	
5. Analyse quantitative de l'expression des gènes par qRT PCR.....	60	
6. Essais angiogènes <i>in vitro</i>.....	60	
6.1	Analyse de la Prolifération cellulaire	60
6.2	Analyse de la migration cellulaire.....	61
6.3	Analyse de la perméabilité	61
7. Immunofluorescence.....	61	

8. Proximity ligation assay, PLA.....	62
9. La cytométrie de flux	63
10. Biotinylation des protéines de surface.....	63
11. Co-immunoprécipitation	64
12. Préparation des extraits protéiques et Western Blotting	64
13. Test de l'activité de NF-κB.....	65
14. Croissance tumorale en modèle murin.....	65
15. Modèle d'angiogenèse rétinienne murine	66
16. Analyses statistiques	66
17. Séquences des siARN et amorces utilisés	67
17.1 Séquence des siARN utilisés	67
17.2 Séquences des oligonucléotides utilisés pour la qRT PCR	67

RÉSULTATS ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

PARTIE I : DÉTERMINATION DU MÉCANISME D'ACTION DE LA PRL 16K ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.

- 1. PAI-1 est un partenaire de liaison de la Prolactine 16K** Erreur ! Signet non défini.
 - 1.1 Interaction *in vitro* entre la PRL 16K et PAI-1 **Erreur ! Signet non défini.**
 - 1.2 La PRL 16K interagit avec PAI-1 à la surface des cellules endothéliales et au sein des tumeurs. **Erreur ! Signet non défini.**
- 2. Les effets de la PRL 16K requièrent PAI-1** Erreur ! Signet non défini.
 - 2.1 PAI-1 est nécessaire aux effets anti-angiogènes de la PRL 16K *in vitro*..... **Erreur ! Signet non défini.**
 - 2.2 Les effets *in vivo* de la PRL 16K requièrent PAI-1 **Erreur ! Signet non défini.**
- 3. La PRL 16K inhibe l'angiogenèse via le complexe PAI-1/uPA/uPAR... Erreur ! Signet non défini.**
 - 3.1 La PRL 16K interagit avec le complexe PAI-1/uPA/uPAR..... **Erreur ! Signet non défini.**
 - 3.2 Le complexe uPA/uPAR est essentiel aux effets anti-angiogènes de la PRL 16K..... **Erreur ! Signet non défini.**
 - 3.2.1 La PRL 16K requiert uPA pour inhiber l'angiogenèse **Erreur ! Signet non défini.**
 - 3.2.2 La PRL 16K requiert uPAR pour inhiber l'angiogenèse..... **Erreur ! Signet non défini.**
 - 3.2.3 uPAR ne permet pas uniquement la localisation cellulaire de la PRL 16K **Erreur ! Signet non défini.**
- 4. La PRL 16K inhibe l'angiogenèse via le complexe PAI-1/uPA/uPAR/intégrine β 1/EGFR/LRP-1** Erreur ! Signet non défini.

4.1	La PRL 16K induit la formation du complexe uPAR/intégrine β 1/EGFR/LRP-1.....	Erreur ! Signet non défini.
4.2	L'expression d'EGFR est nécessaire aux effets anti-angiogènes <i>in vitro</i> de la PRL 16K	Erreur ! Signet non défini.
4.3	La PRL 16K requiert LRP-1 pour inhiber la migration et activer la voie NF- κ B	Erreur ! Signet non défini.
5.	La PRL 16K active la voie PI3K/AKT	Erreur ! Signet non défini.
5.1	L'activation de la voie PI3K/AKT est nécessaire à l'effet de la PRL 16K sur la voie NF- κ B	Erreur ! Signet non défini.
5.2	La PRL 16K phosphoryle AKT	Erreur ! Signet non défini.
 PARTIE II : RÔLE DE L'UPAR DANS LES EFFETS DU VEGFR-2..... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.		
1.	VEGF₁₆₅ induit la formation du complexe VEGFR-2/uPAR/intégrine β1/ LRP-1 à la surface cellulaire.....	Erreur ! Signet non défini.
2.	VEGF₁₆₅ requiert uPAR pour induire l'angiogenèse <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .	Erreur ! Signet non défini.
2.1	VEGF ₁₆₅ requiert uPAR pour induire l'angiogenèse <i>in vitro</i>	Erreur ! Signet non défini.
2.2	uPAR est requis à l'angiogenèse rétinienne induite par le VEGF ₁₆₅	Erreur ! Signet non défini.
3.	uPAR est nécessaire à la voie de signalisation induite par le VEGFR-2	Erreur ! Signet non défini.
4.	VEGF₁₆₅ induit l'internalisation du complexe VEGFR-2/uPAR/intégrine β1/ LRP-1.....	Erreur ! Signet non défini.
5.	VEGF₁₆₅ requiert l'internalisation dépendante de LRP-1 pour induire ses effets angiogènes	Erreur ! Signet non défini.
6.	uPAR est le médiateur de l'internalisation de VEGFR-2	Erreur ! Signet non défini.
 CONCLUSIONS, DISCUSSION ET PERSPECTIVES..... ERREUR ! SIGNET NON DEFINI.		
 BIBLIOGRAPHIE 68		
 LISTE DES PUBLICATIONS 85		

Introduction

1. L'angiogenèse

1.1 Généralités

Chez les mammifères, durant le développement embryonnaire, le système cardiovasculaire composé du cœur, du sang et des vaisseaux sanguins, est le premier à se former et à fonctionner, ce qui témoigne de son importance. En effet, le sang, via les vaisseaux sanguins transporte l'oxygène des poumons aux organes distants. Le transport d'oxygène n'est pas son unique rôle, il transporte également les nutriments aux tissus et permet l'élimination des déchets métaboliques (Carmeliet 2000).

1.2 Initiation du réseau vasculaire

Durant l'embryogenèse, les vaisseaux sanguins se forment tout d'abord par **vasculogenèse**. Durant ce processus, les angioblastes (cellules précurseurs indifférenciées) se différencient en cellules endothéliales qui s'assemblent en un réseau vasculaire primitif. Après la phase de vasculogenèse, commence **l'angiogenèse**. Historiquement, le terme angiogenèse était utilisé pour décrire la croissance des bourgeons endothéliaux à partir de vénules pré-existantes. Maintenant, ce terme est généralement utilisé pour décrire la croissance et les processus de remodelage du réseau primitif en un réseau plus complexe. Finalement, les vaisseaux sanguins sont recouverts de cellules murales composées de cellules musculaires lisses (*Smooth muscle cells*, SMC) et de péricytes (PC), apportant une stabilité au nouveau réseau vasculaire établi (**Figure 1**).

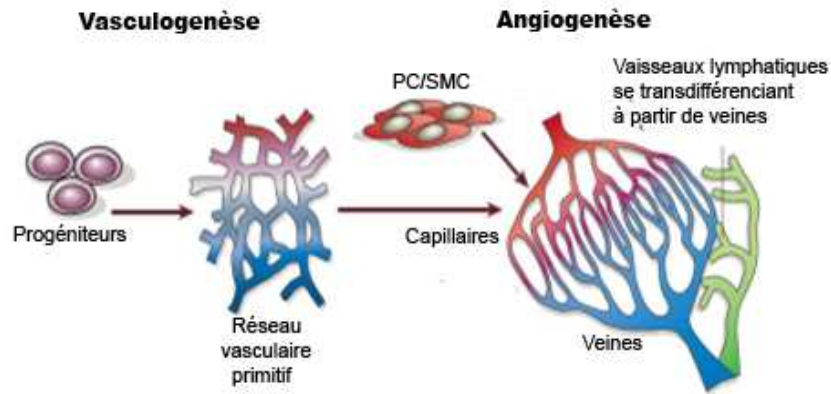


Figure 1 : Développement du système vasculaire. Durant la vasculogenèse, les progéniteurs endothéliaux donnent naissance au réseau vasculaire primitif d'artères et de veines. Pendant l'angiogenèse, le réseau s'agrandit et les péricytes (PC) et les cellules musculaires lisses (SMCs) couvrent les canaux endothéliaux naissants, ce qui donne le réseau vasculaire mature. Le réseau lymphatique se développe par transdifférenciation des veines. Adapté de (Carmeliet 2005).

1.3 Développement du réseau vasculaire

L'angiogenèse peut se dérouler selon trois mécanismes principaux. Il y a tout d'abord l'angiogenèse dite de « *sprouting* », pendant laquelle les vaisseaux sanguins sont formés par bourgeonnement. Cette angiogenèse est relativement lente car elle dépend de la prolifération des cellules endothéliales activées par différents facteurs tels que le *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ou le *Fibroblast Growth Factor* (FGF). Le deuxième type est l'angiogenèse par intussusception, pendant laquelle les vaisseaux sont formés par élargissement et séparation des vaisseaux déjà formés. Le troisième type est le *bridging*, séparation par les cellules poussant à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés (Risau 1997; Carmeliet 2000; Carmeliet *et al.* 2011). (**Figure 2**)

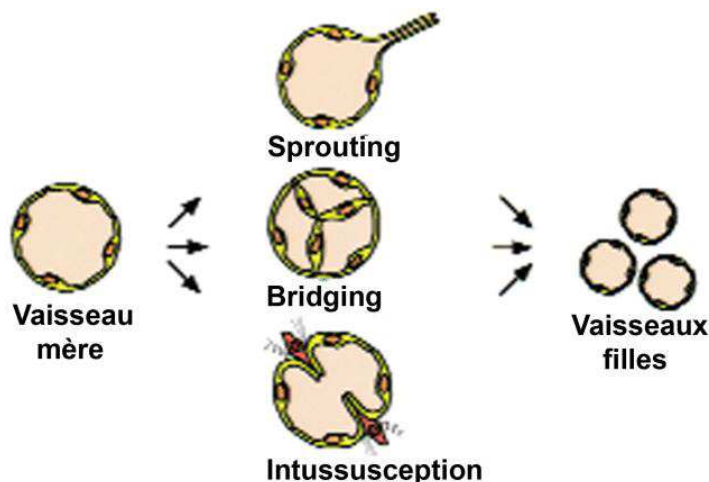


Figure 2 : Mécanisme d'angiogenèse. La formation des vaisseaux peut avoir lieu par *sprouting*, par élargissement et séparation des vaisseaux sanguins formés (intussusception) ou par séparation des vaisseaux déjà formés pour créer des canaux vasculaires séparés (*bridging*). Figure adaptée de (Carmeliet 2000).

1.4 Les différentes étapes de l'angiogenèse

Lors de la croissance tissulaire, les vaisseaux sanguins existants ne sont plus suffisants pour fournir l'oxygène et les nutriments à toutes les cellules. Les cellules dites alors en hypoxie expriment le facteur de transcription HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor*), ce qui active l'angiogenèse. L'activité transcriptionnelle d'HIF-1 α est induite par sa dimérisation avec le facteur HIF-1 β constitutivement exprimé. En se liant aux éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) au niveau du promoteur, le dimère HIF-1 α /HIF-1 β induit la transcription de ses gènes cibles tels que celui du VEGF (Milkiewicz *et al.* 2006) (Semenza 2001). Le VEGF est le facteur clé impliqué dans la plupart des événements morphogénétiques de l'angiogenèse et contrôle la perméabilité, la migration, la prolifération et la survie des cellules endothéliales (Affolter *et al.* 2009).

Bien qu'il existe trois types d'angiogenèse, l'angiogenèse par bourgeonnement (*sprouting*) est de loin le mécanisme le plus étudié. Cette dernière est caractérisée par plusieurs étapes (**Figure 3**).

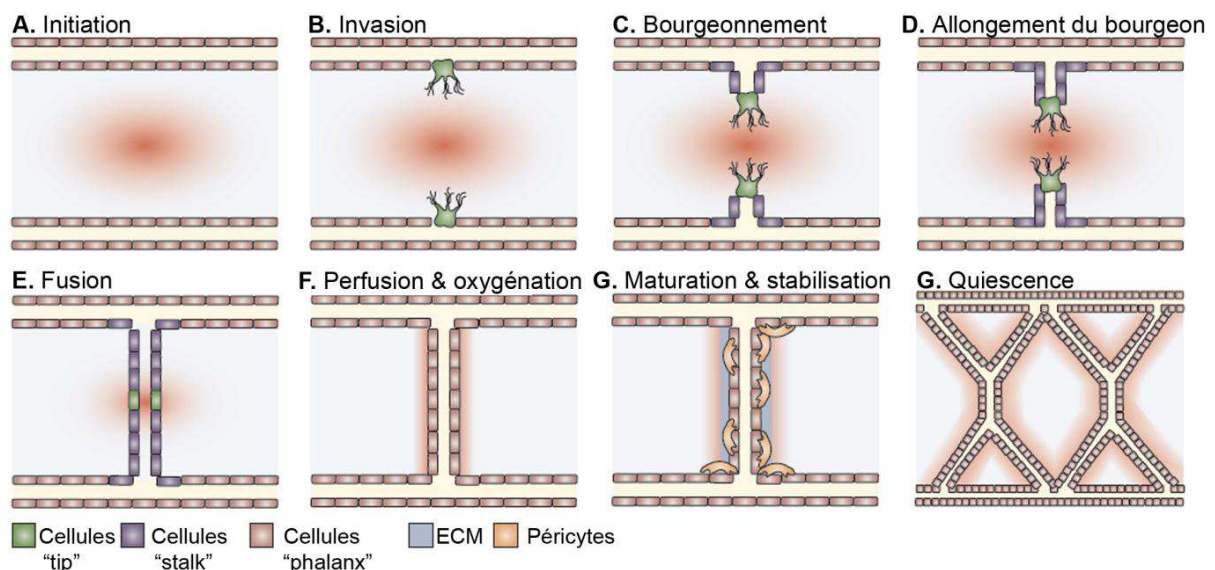


Figure 3 : Formation de nouveaux vaisseaux. **A** Réponse à l'hypoxie ; les cellules non vascularisées déposent le VEGF en gradient. **B** La cellule endothéliale exposée à la plus haute concentration de VEGF est sélectionnée pour devenir une cellule « tip ». **C** La cellule « tip » dirige le bourgeonnement et envahit le tissu environnant en étendant ses nombreux filopodes. **D** Le bourgeon s'allonge via la prolifération des cellules « stalk » derrière la cellule « tip ». **E** Le nouveau vaisseau se connecte avec les autres via la fusion des cellules « tip ». **F** La formation du lumen vasculaire permet l'initiation du flux sanguin, qui à son tour, entraîne l'oxygénation du tissu, ce qui réduit le niveau de VEGF. **G** La maturation et la stabilisation du plexus naissant sont liées au recrutement des péricytes et au dépôt de matrice extracellulaire. **H** Dans le réseau établi, les cellules endothéliales adoptent un phénotype quiescent de type « phalanx ». Abbréviation : MEC : matrice extracellulaire. Figure adaptée de (Carmeliet *et al.* 2009).

1.4.1 Vasodilatation et perméabilité vasculaire

La phase d'initiation de l'angiogenèse est marquée par une augmentation de la perméabilité vasculaire, dépendante de l'oxyde nitrique (NO) en réponse au VEGF. Cette augmentation de la perméabilité est causée par la formation de fenestrations, d'organelles vésiculo-vacuolaires et par la dissociation des molécules d'adhésion telles que PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell adhesion molecule*) et VE (*Vascular Endothelial*)-cadhérine. La perméabilité vasculaire est également augmentée par l'angiopoïétine 2 (Ang2), un inhibiteur de la voie de signalisation Tie2. L'Ang2 déstabilise les vaisseaux sanguins en induisant le détachement de la matrice et des péricytes, permettant ainsi la migration des cellules endothéliales.

1.4.2 La dégradation de la matrice

La dégradation de la matrice extracellulaire implique une série de MMPs (*Matrix Metalloproteinases*), produites ou non par les cellules endothéliales. Ces protéases agissent sur l'angiogenèse en libérant les cellules endothéliales migrantes mais également en activant ou libérant les facteurs de croissance (bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*), VEGF,...) séquestrés dans la matrice extracellulaire (Coussens *et al.* 1999).

Un autre acteur impliqué dans la dégradation matricielle est le système plasminogène/plasmine. La plasmine, enzyme active, participe à la protéolyse extracellulaire soit directement en dégradant les protéines de la matrice, soit indirectement en activant plusieurs MMPs (Tkachuk *et al.* 2009). Le système plasminogène/plasmine sera vu plus en détail dans le point 4.1.

1.4.3 L'élongation des vaisseaux

La prolifération et la migration des cellules endothéliales permettent toutes deux l'élongation du vaisseau néoformé. Tout d'abord, une sous-population de cellules endothéliales va acquérir un phénotype particulier requis pour la migration. Ces cellules sont appelées les cellules « tip » et sont localisées à l'extrémité du vaisseau. En réponse au VEGF-A, elles produisent de nombreux filopodes sondant l'environnement afin d'induire la migration vers le gradient de facteurs de croissance (Phng *et al.* 2009). Dans les vaisseaux migrants, les cellules endothéliales situées derrière les cellules « tip » sont appelées les cellules « stalk ». Celles-ci ont la caractéristique de produire peu de filopodes et de ne pas migrer mais de proliférer sous l'effet du VEGF-A (Gerhardt *et al.* 2003).

Les cellules « tip » et « stalk » possèdent également d'autres caractéristiques qui sont reprises dans le **tableau 1**.

Cellule « Tip »	Cellule « Stalk »
Cellule endothéliale hautement polarisée	Prolifère suite à une stimulation au VEGF-A
Nombreux filopodes riches en actine	Forme le lumen vasculaire
Induite par le VEGF-A	Etablit des jonctions adhérentes
Expression de VEGFR-2 sur les filopodes	Dépôt de membranes basales
Absence de lumen vasculaire	Très haute expression de Jagged 1, Robo 4 et VEGFR-1
Expression accrue de PDGF-B, Dll4, VEGFR-2, VEGFR-3,.....	
Spécialisée dans la guidance de la migration	Peut être induite pour devenir une cellule «Tip »
Peu proliférative	

Tableau 1 : Caractéristiques des cellules endothéliales « Tip » et « Stalk ». Tableau adapté de (Phng *et al.* 2009).

La spécification des cellules endothéliales en cellules «tip» ou «stalk» est contrôlée par la voie de signalisation Notch (Hellstrom *et al.* 2007; Phng *et al.* 2009; Eilken *et al.* 2010). En réponse au VEGF-A, les cellules « tip » expriment très fortement le ligand de Notch, Dll4 (*Delta-like ligand 4*), qui lie le récepteur Notch présent à la surface des cellules adjacentes (future cellule « stalk »). Ainsi, l'expression du récepteur au VEGF, le VEGFR2, est réduite, ce qui supprime le phénotype « tip ». Le phénotype cellule « stalk » est alors spontanément induit (**Figure 4**) (Hellstrom *et al.* 2007; De Smet *et al.* 2009).

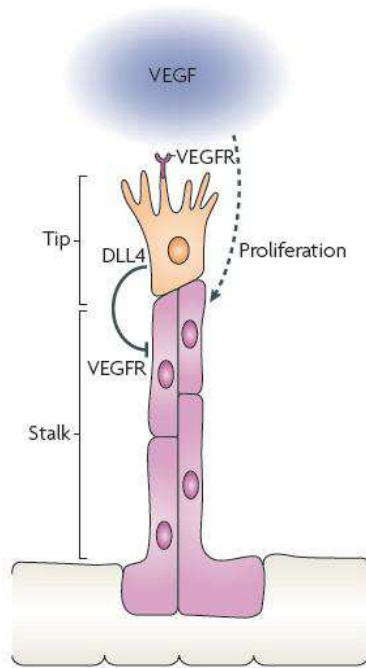


Figure 4. Induction des cellules « tip » et cellules « stalk ». Au cours de l'angiogenèse, la voie de signalisation du VEGF détermine la formation de bourgeons angiogènes et contrôle l'identité de la cellule « tip » (orange) et des cellules « stalk » (rose) via la signalisation Delta-Notch. Figure adaptée d'après (Affolter *et al.* 2009).

1.4.4 La formation du lumen

Après l'induction des cellules « tip » et l'élongation des cellules « stalk », le vaisseau a besoin de générer un lumen et d'initier un flux sanguin. La formation du lumen peut se faire par coalescence de vacuoles intracellulaires (*cell hollowing*) (Kamei *et al.* 2006) ou par fusion de membranes de deux cellules endothéliales adjacentes (*cord hollowing*) (Milkiewicz *et al.* 2006) (Potente *et al.* 2011). Signalons que différentes intégrines peuvent jouer un rôle important dans la formation du lumen, d'une part, par leur capacité d'interaction avec la matrice extracellulaire et d'autre part, par les voies de signalisation qu'elles sont capables d'induire tels que SRC, FAK (*Focal Adhesion Kinase*), MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*), Rho GTPases... (Liu *et al.* 2004; Avraamides *et al.* 2008; Iruela-Arispe *et al.* 2009).

1.4.5 La maturation des vaisseaux sanguins

Les vaisseaux néosynthétisés sont maturés et stabilisés afin de former un réseau vasculaire fonctionnel. Une fois ce réseau établi, les cellules endothéliales redeviennent quiescentes et établissent des jonctions adhérentes composées de VE-cadhérines et de N-cadhérines ainsi que des jonctions serrées composées de Claudines et Occludines. Ces cellules endothéliales sont alors recouvertes de cellules murales qui sont de deux types, les péricytes (PC) et les cellules musculaires lisses (SMC). Les PC établissent un contact direct avec les cellules endothéliales dans les capillaires et les vaisseaux immatures, tandis que les SMC recouvrent les artères et les veines et sont séparées des cellules endothéliales par une matrice.

Le recrutement des cellules murales est contrôlé par le *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF) et son récepteur-1 (PDGFR-1). Les cellules endothéliales sécrètent le PDGF qui se lie à son récepteur présent à la surface des cellules murales, stimulant ainsi leurs migration et prolifération (Gaengel *et al.* 2009). Les cellules murales, quant à elles, expriment l'angiopoïétine 1 (ANG1) qui active son récepteur endothéliale Tie2 et stabilise donc les vaisseaux (Augustin *et al.* 2009; Huang *et al.* 2010). La sphingosine-1-phosphate (S1P) via sa voie de signalisation lié à son récepteur (S1PR), joue également un rôle prépondérant dans les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules murales (Lucke *et al.* 2010). Notch3 est également requis pour la maturation et la différenciation des SMCs artérielles (Gridley 2010). La voie de transduction TGF- β (*Transforming Growth Factor β*) via ALK1 et ALK5 est également impliquée dans la maturation. Elle inhibe la prolifération et la migration endothéliales, induit la différenciation des SMCs et stimule la production de matrice extracellulaire (Dickson *et al.* 1995; Pardali *et al.* 2010). Après ce recouvrement par les cellules murales, une membrane basale est produite par les cellules endothéliales avec l'aide des cellules environnantes qui fournissent un support structural et maintiennent la quiescence des cellules endothéliales. Une fois la formation du vaisseau terminée, le flux sanguin amène au nouveau vaisseau formé l'oxygène qui entraîne une diminution du niveau de VEGF. Le processus d'angiogenèse est ainsi terminé (Chung *et al.* 2010).

1.5 La régulation de l'angiogenèse

Alors que l'angiogenèse est extrêmement active durant l'embryogenèse, l'endothélium vasculaire se trouve à l'état de quiescence durant la vie adulte. Néanmoins, il existe quelques circonstances dans lesquelles l'angiogenèse est réactivée, telles que la réparation tissulaire, la vascularisation de l'endomètre, et celle du placenta lors de la gestation, l'adaptation à l'exercice musculaire, les maladies rhumatoïdes et ophtalmiques, le psoriasis, les maladies ischémiques ainsi que le développement tumoral (Carmeliet 2000; Carmeliet 2005). Par conséquent, ce processus est extrêmement bien régulé par une balance entre des facteurs pro-angiogènes et des facteurs anti-angiogènes (Bergers *et al.* 2003). En présence d'un excès de facteurs anti-angiogènes, les cellules endothéliales sont maintenues en quiescence. Lors du « *switch angiogène* », excès de facteur pro-angiogène, l'angiogenèse est activée (**Figure 5**) (Hanahan *et al.* 1996).

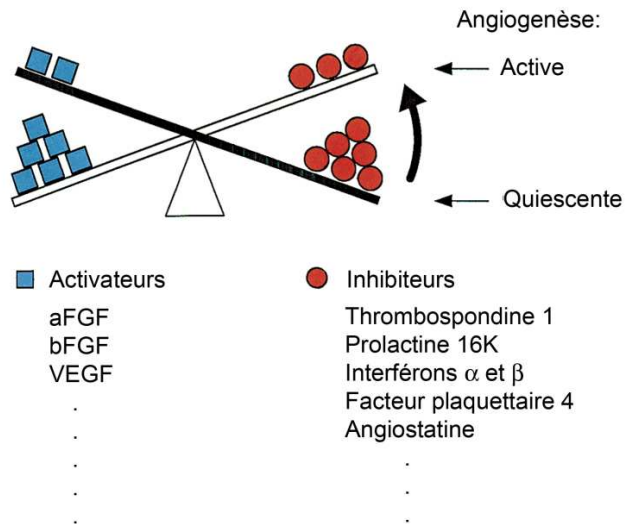


Figure 5: La balance du « switch angiogène ». L'angiogenèse normalement quiescente peut être déclenchée par un changement d'équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs de l'angiogenèse. Figure adaptée de (Hanahan *et al.* 1996).

De nombreuses molécules sont impliquées dans l'activation de l'angiogenèse telles que le VEGF, bFGF, HGF (*Hepatocyte Growth Factor*), l'EGF (*Epidermal Growth Factor*), le NO, le PDGF, l'uPA (*urokinase Plasminogen Activator*), les MMPs, le TGF- β , HIF-1, Ets-1,.... (Milkiewicz *et al.* 2006). Le rôle du VEGF sera développé au point 3.

La plupart des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse sont des fragments issus de molécules de la matrice extracellulaire. Ces fragments sont libérés après une protéolyse de la matrice extracellulaire et de la membrane basale par divers enzymes tels que les MMPs, les cathepsines et les élastases. Le premier inhibiteur de l'angiogenèse découvert est la thrombospondine-1 (TSP-1), une protéine de liaison à l'héparine (Good *et al.* 1990). TSP-1 est capable d'inhiber la prolifération des cellules endothéliales et de déstabiliser les contacts entre les cellules (Taraboletti *et al.* 1990; Iruela-Arispe *et al.* 1991; Nyberg *et al.* 2005; Ribatti 2009). L'endostatine, quant à elle, est un fragment, C-terminal de 20-22 kDa, issu du collagène de type XVIII, capable de se lier aux intégrines $\beta 1$ et à l'héparine présents à la surface des cellules endothéliales. Celle-ci inhibe directement l'angiogenèse en interférant avec les voies de signalisation du FGF2 et du VEGF. Par conséquent, elle induit l'apoptose et inhibe la prolifération ainsi que la migration des cellules endothéliales. L'endostatine exerce aussi une action indirecte sur l'angiogenèse en inhibant l'activité de la MMP2 et MMP9 ainsi qu'en stabilisant les interactions cellules-cellules et cellules-matrices (Nyberg *et al.* 2005; Ribatti 2009). Il existe également des inhibiteurs de l'angiogenèse non issus de la matrice extracellulaire. L'angiostatine est un fragment de 38 kDa issu du plasminogène capable d'inhiber principalement la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Le fragment de haut poids moléculaire issu du Kininogène (HKa) présente une activité anti-

angiogène via son domaine 5 (D5). Il est capable d'inhiber l'adhésion, la prolifération et d'induire l'apoptose des cellules endothéliales. Le D5 est capable de se lier au domaine somatomédine B de la vitronectine mais également directement au domaine DII/DIII de l'uPAR (*urokinase Plasminogen Activator Receptor*) (Colman *et al.* 2010). Un autre inhibiteur ne provenant pas de la matrice extracellulaire est la prolactine 16K. Les différents effets anti-angiogènes de ce fragment N-terminal issu de la prolactine entière seront repris en détail dans le point 2.3. (Nyberg *et al.* 2005; Ribatti 2009).

1.6 L'angiogenèse tumorale

La croissance tumorale et la dissémination des métastases sont dépendantes de l'angiogenèse. En effet, les vaisseaux sanguins permettent l'élimination des déchets métaboliques mais également l'apport des nutriments, d'oxygène ainsi que de facteurs de croissance nécessaires à la croissance tumorale (Folkman 1971). Cette dernière est caractérisée par deux phases. Tout d'abord, il y a la phase avasculaire ou dormante et, ensuite, vient la phase vascularisée ou invasive. Lors de la phase avasculaire, les cellules tumorales prolifèrent jusqu'à ce que la tumeur atteigne une taille de 1-2 mm de diamètre. Cette croissance ne requiert pas de vaisseaux sanguins et les cellules sont alimentées en oxygène et nutriments par simple diffusion. Sous l'accumulation d'altérations génétiques, la prolifération tumorale s'accroît et la tumeur grandit jusqu'à obtenir une taille critique à la simple diffusion de l'oxygène. A ce stade, les cellules intra-tumorales se retrouvent en hypoxie, ce qui induit l'expression de divers facteurs pro-angiogènes tels que le VEGF. Par conséquent, l'environnement tumoral est enrichi en facteurs pro-angiogènes, ce qui entraîne le «switch angiogène». La phase invasive qui est dépendante de l'angiogenèse, est, alors déclenchée, ce qui engendre une croissance tumorale exponentielle. Cette phase vascularisée permet également la dissémination des métastases (Bergers *et al.* 2003).

Les vaisseaux tumoraux peuvent être formés par bourgeonnement, intussusception ou par recrutement des précurseurs endothéliaux provenant de la moelle osseuse. Les cellules tumorales peuvent également participer à l'élaboration de la vascularisation en cooptant les vaisseaux existants ou en mimant les cellules endothéliales pour former des «vaisseaux» (*vascular mimicry*) (Carmeliet *et al.* 2000; Carmeliet *et al.* 2011). Les vaisseaux tumoraux sont structurellement et fonctionnellement anormaux en comparaison à la vascularisation physiologique (**Figure 6**).

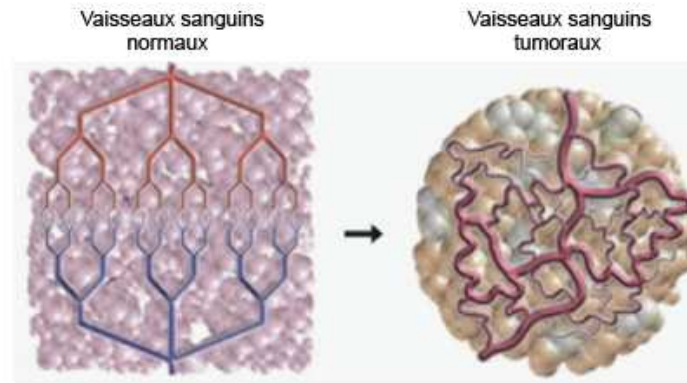


Figure 6: Représentation des vaisseaux sanguins normaux et tumoraux. Les vaisseaux tumoraux sont structurellement et fonctionnellement anormaux. Adapté d'après (Goel *et al.* 2011)

En effet, ils sont hautement désorganisés, tortueux, dilatés, avec une densité de branchement excessive. Au niveau cellulaire, les cellules endothéliales des vaisseaux tumoraux sont également irrégulières présentant une morphologie désorganisée. Par conséquent, ces cellules endothéliales sont pauvrement connectées entre elles; en témoignent la haute perméabilité des vaisseaux tumoraux. De plus, les péricytes et les SMCs possèdent également des caractéristiques structurales anormales (Carmeliet *et al.* 2000; Goel *et al.* 2011; Potente *et al.* 2011). Ajoutons que le flux sanguin est également chaotique et irrégulier, favorisant ainsi des régions acides et hypoxiques au sein de la tumeur. Ces conditions engendrent la production de stimulateurs angiogènes et la sélection des cellules cancéreuses plus malignes et métastatiques (Carmeliet *et al.* 2000).

1.7 La thérapie anti-angiogène

Au vu de l'implication de l'angiogénèse dans la croissance et la progression tumorale, l'inhibition de la vascularisation semble être une stratégie thérapeutique très prometteuse (Folkman 1971). De plus, en comparaison aux cellules tumorales génétiquement instables, les cellules endothéliales recrutées par les tumeurs sont plus stables et, par conséquent, moins susceptibles de développer des résistances aux traitements (Tugues *et al.* 2011). Par ailleurs, les agents anti-angiogènes utilisés ne ciblent que les cellules endothéliales en prolifération, minimisant ainsi leur toxicité, puisque l'angiogénèse chez l'adulte est quasi totalement quiescente. Ainsi, en inhibant la vascularisation tumorale, la thérapie anti-angiogène induit également l'apoptose des cellules tumorales. Par conséquent, un même agent anti-angiogène peut traiter différents types de cancers (Abdollahi *et al.* 2010). Notons qu'il existe 2 classes d'inhibiteurs de l'angiogénèse à savoir les inhibiteurs directs et indirects. Les inhibiteurs directs tels que l'endostatine ciblent directement les cellules endothéliales, les empêchant

ainsi de répondre aux stimuli angiogènes. Les inhibiteurs indirects, eux, empêchent la communication entre les cellules endothéliales et les cellules tumorales. Ces inhibiteurs peuvent interférer avec l'expression des facteurs pro-angiogènes (VEGF, bFGF, ...) au sein des cellules tumorales. Ils peuvent également agir en neutralisant les facteurs angiogènes, les empêchant ainsi d'atteindre les cellules endothéliales. Une dernière façon d'agir est d'empêcher l'activation des récepteurs présents à la surface des cellules endothéliales (Abdollahi *et al.* 2003; Abdollahi *et al.* 2010).

Le VEGF étant un facteur clé dans la vascularisation tumorale, il est une cible idéale dans le cadre de la thérapie anti cancéreuse. C'est pourquoi le Bévacicumab, un anticorps monoclonal humanisé neutralisant le VEGF soluble, a été développé (Ferrara *et al.* 2004). Etant donné les résultats très encourageants obtenus sur la croissance tumorale en modèle souris, la thérapie anti-angiogène devient une réalité. Ainsi, en 1997, le Bevacizumab rentre en phase clinique (Ferrara *et al.* 2004). Ensuite, une seconde génération d'inhibiteurs du VEGF a également vu le jour. Ce sont des petites molécules inhibant l'activité tyrosine kinase des récepteurs du VEGF tels que le sunitinib ou le sorafenib (Loges *et al.* 2009). Une étude a montré que ce type de thérapie augmente la vie de nombreux patients atteints du cancer. Ce succès a d'ailleurs révolutionné la vision de l'oncologie clinique. Néanmoins, ce type de traitement augmente bien la survie totale des patients mais en réalité seulement que de quelques mois (Kerbel 2008). De plus, bien qu'elles inhibent la croissance de la tumeur primaire, les drogues ciblant la voie de transduction du VEGF favorisent l'invasion tumorale et la formation de métastases (Ebos *et al.* 2009).

Ces données fournissent l'évidence que les tumeurs sont capables de développer des mécanismes de résistance à l'encontre de la thérapie antiangiogène. Lors de la thérapie anti-VEGF, les tumeurs sont notamment capables d'utiliser d'autres facteurs pro-angiogènes (bFGF,...) pour induire leur vascularisation (Casanovas *et al.* 2005).

Afin de contrer ce mécanisme de résistance, il serait important de cibler plusieurs voies de signalisation angiogènes simultanément. L'hypoxie au sein de la tumeur causée par la régression des vaisseaux suite au traitement anti-angiogène, n'induit pas seulement l'expression d'activateurs angiogènes mais également le recrutement de progéniteurs vasculaires provenant de la moelle osseuse. Les progéniteurs endothéliaux et péricyaires se différencient ainsi pour former de nouveaux vaisseaux sanguins. En réponse à la thérapie anti-VEGF, les cellules endothéliales peuvent également induire un recrutement accru des péricytes afin de se protéger contre l'apoptose. Une des stratégies visant à contrer ce

phénomène était de développer une double thérapie anti-angiogène simultanément, composée d'un anti-VEGF et d'un inhibiteur de la voie de signalisation du PDGF. Ce double traitement rend l'endothélium tumoral plus sensible à la thérapie anti-VEGF mais malheureusement avec beaucoup d'effets indésirables. La réduction sévère ou le manque total de couverture péricytaire peut détruire l'intégrité vasculaire, favorisant la dissémination des métastases. De plus, il existe des tumeurs qui, suite à un traitement anti-angiogène, n'utilisent plus l'angiogenèse pour croître et envahir les tissus sains. C'est le cas des cellules de glioblastomes qui sont capables de co-opter elles-mêmes les vaisseaux sanguins existants (Bergers *et al.* 2008).

2. La famille Prolactine/Hormone de Croissance/Lactogène Placentaire (PRL/GH/PL)

2.1 Généralités

La PRL est une hormone polypeptidique qui a été découverte il y a plus de 70 ans (Freeman *et al.* 2000). Sur base de ces propriétés génétiques, structurelles et fonctionnelles, la PRL appartient à la famille d'hormones protéiques PRL/GH/PL. La comparaison de séquences de ces hormones chez les tétrapodes montre que le gène codant pour la PRL, GH et PL a évolué à partir d'un gène ancestral par duplication. De plus, la divergence entre la PRL et la GH se serait déroulée il y a 400 millions d'années (Bole-Feysot *et al.* 1998).

2.2 La Prolactine (PRL)

2.2.1 La structure de la PRL

La PRL, une protéine d'environ 23 kDa, est présente chez tous les vertébrés. A l'exception de la PRL issue du poisson, toutes les PRL identifiées à présent possèdent de 197 à 199 acides aminés et contiennent 6 cystéines formant 3 ponts disulfure intramoléculaires. La PRL humaine (hPRL) mature est une protéine composée de 199 acides aminés et a un poids moléculaire de 23 kDa. Elle est synthétisée sous forme de molécules précurseurs et possède un peptide signal de 28 acides aminés.

Des études ont montré que la PRL a une structure secondaire composée de 4 hélices α majeures, de la Leu 15 à l'Arg 43 (hélice 1), Lys 78 à l'Arg 103 (hélice 2), Ala 111 à la Val 137 (hélice 3) et de la Glu 161 à Ile 193 (hélice 4).

Sa structure tertiaire est composée des 4 hélices α qui sont groupées en deux paires anti-parallèles hélice1/hélice4 et hélice2/hélice3 (**Figure 7**) (Teillum *et al.* 2005)

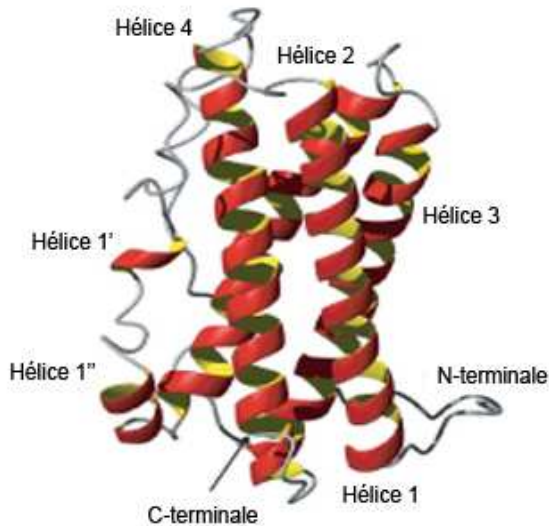


Figure 7 : Représentation de la structure tridimensionnelle de la hPRL. La hPRL est composée de 4 hélices α . L'hélice 1 (Leu15 - Arg43), l'hélice 2 (Lys78 - Arg103), l'hélice 3 (Ala111 - Val137) et l'hélice 4 (Glu161 - Ile193). Figure adaptée de (Teilum *et al.* 2005)

De nombreux variants de la PRL ont été caractérisés chez les mammifères. Ces variants peuvent être le résultat d'épissages alternatifs du transcrit primaire, ou de modifications post-traductionnelles tels qu'une glycosylation, une phosphorylation, une dimérisation, une polymérisation ou un clivage protéolytique (Freeman *et al.* 2000).

2.2.2 La régulation de la synthèse et de la sécrétion de la PRL

La majeure partie de la PRL est synthétisée et sécrétée par les cellules lactotrophes de l'hypophyse, mais elle est également produite par de nombreuses autres cellules (cellules épithéliales mammaires, lymphocytes, fibroblastes, cellules endothéliales) et tissus (cerveau, rate, thymus, tumeurs, prostate...) (Bole-Feysot *et al.* 1998; Corbacho *et al.* 2002).

La PRL se retrouve dans de nombreux fluides biologiques tels que le sérum, le lait, le liquide amniotique, le liquide céphalo-rachidien, les larmes, la transpiration,... La majorité de la PRL circulante est d'origine hypophysaire et agit selon la voie endocrine classique. Elle est sécrétée par une glande, transportée par le système circulatoire et agit sur les cellules cibles via un récepteur présent à la surface de ces cellules. La PRL, qui est produite par plusieurs types cellulaires, peut également agir sur les cellules adjacentes (paracrine) ou directement sur la cellule la produisant (autocrine) (Bole-Feysot *et al.* 1998; Freeman *et al.* 2000).

La sécrétion de la PRL est un mécanisme hautement régulé positivement ou négativement par de nombreux facteurs. La régulation majeure de la production de la PRL se fait par la dopamine à travers ses récepteurs D2 présents dans les lactotrophes (Goffin *et al.* 2002).

La PRL est également régulée au niveau transcriptionnel par deux promoteurs distincts. Le promoteur proximal, rapporté comme étant le promoteur hypophysaire, est nécessaire et

suffisant à la transcription. Le second est rapporté comme étant le promoteur extra-hypophysaire.

2.2.3 Les fonctions biologiques de la PRL

La PRL présente plus de 300 fonctions biologiques. Elle joue un rôle dans la reproduction, l'homéostasie, l'angiogenèse, la réponse immunitaire,... Bien qu'il existe de nombreux variants de la PRL issus des modifications post-traductionnelles, ceux-ci ne semblent pas impliqués dans ses diverses fonctions. En effet, ces modifications post-traductionnelles semblent plutôt néfastes à l'activité de la PRL. Par exemple, la glycosylation et la phosphorylation diminuent son activité. Les produits issus du clivage protéolytique n'ont même plus la capacité de se lier au récepteur de la prolactine essentielle à son activité (Sinha 1995; Goffin *et al.* 2002).

L'effet le plus connu de la PRL est celui sur la glande mammaire. En effet, elle participe à la croissance et au développement de la glande mammaire, à la synthèse du lait ainsi qu'à la maintenance de la sécrétion lactée (Freeman *et al.* 2000). Durant la lactogenèse, la PRL stimule la synthèse protéique, la prise de glucose, la synthèse du lactose et celle des lipides (Freeman *et al.* 2000).

La PRL intervient également dans la fertilité ainsi que dans le développement et la fonction du corps jaune, dans la fonction du pancréas en augmentant la sécrétion de l'insuline, dans l'induction de réponses comportementales d'adaptation au stress et présente des effets analgésiques. La PRL semble favoriser l'immunité en induisant la production de certains anticorps ou du récepteur à l'IL-2 par exemple (Bole-Feysot *et al.* 1998).

De plus, la PRL peut stimuler l'angiogenèse, mais son effet est dépendant du modèle utilisé et des conditions locales de l'endothélium vasculaire. En effet, il a été montré que la PRL n'a pas d'effet sur le développement précoce des vaisseaux sanguins dans les CAM (*Chick Chorioallantoic Membrane assay*). Néanmoins, la PRL stimule la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans des CAM durant la phase tardive. La PRL agit via l'activation de son récepteur dont l'expression n'est pas présente dans toutes les cellules endothéliales. Dans ce cas, la PRL induirait l'angiogenèse de façon indirecte en stimulant la production de facteurs angiogènes produit par les cellules non-endothéliales (Freeman *et al.* 2000; Corbacho *et al.* 2002).

2.3 La Prolactine 16K

2.3.1 Clivage de la PRL

Comme dit précédemment, la PRL peut subir de nombreuses modifications post-traductionnelles. Une de ces modifications est le clivage protéolytique qui génère des fragments biologiquement actifs. Ainsi, une forme clivée de la PRL a été découverte en 1980 par Mitra *et al.* dans des extraits hypophysaires de rats (Mitra 1980). Plus tard, Sinha *et al.* ont identifié la PRL clivée dans des extraits hypophysaires de souris (Sinha 1995) mais également dans des extraits d'hypophyse et du sérum humains (Sinha 1995).

La présence de PRL clivée a également été observée dans divers tissus tels que la glande mammaire, le cerveau, la partie antérieure de l'hypophyse, la prostate, le foie, les reins et la rate (Compton *et al.* 1984; Clapp 1987; Baldocchi *et al.* 1992).

Par spectrométrie de masse, il a été montré que la cathepsine D clive la PRL de rat entre les acides aminés Tyr145-Leu146 et Trp148-Ser149. L'excision du tripeptide Leu-Val-Trp, suivie d'une étape de réduction, mène à la production d'un fragment N-terminal de 16 364 Da (la PRL 16K) et d'un fragment C-terminal de 5808 Da (**Figure 8**) (Baldocchi *et al.* 1993).

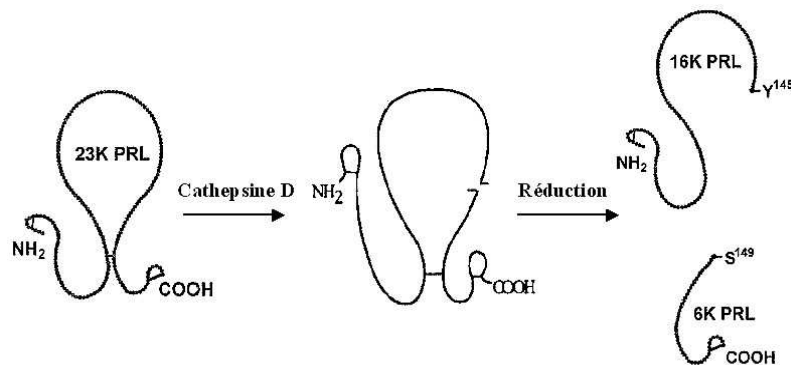


Figure 8 : Production de la PRL 16K. Le clivage de la PRL de rat par la cathepsine D, suivie d'une étape de réduction des ponts disulfures, libère deux fragments de 16 kDa N-terminal et de 6 kDa C-terminal, Figure adaptée de (Sinha 1995).

La PRL humaine (hPRL) est également clivée par la cathepsine D en condition acide générant ainsi plusieurs fragments correspondant aux acides aminés 1-132 (15 kDa), 1-147 (16,5 kDa) et 1-150 (17 kDa). Un alignement de séquence des fragments issus de la hPRL et rPRL a montré que le fragment de 16,5 kDa humain et celui de 16 kDa de rat sont homologues (Piwnica *et al.* 2004).

La libération physiologique de cathepsine D active générant le fragment 16K de la PRL a été décrite dans des cellules épithéliales mammaires (Lkhider *et al.* 2004).

Une étude de Piwnica *et al.*, a identifié un nouveau mécanisme de clivage extracellulaire de la PRL par la cathepsine D dans des conditions de pH physiologique. Ce clivage serait dépendant d'une acidification locale par des pompes à proton qui permet ainsi l'activité de la cathepsine D (Piwnica *et al.* 2006). Par ailleurs, l'équipe de Clapp a montré que les MMPs sécrétées de chondrocytes sont également capables de générer un fragment de 17 kDa issu de la PRL entière (Macotella *et al.* 2006).

2.3.2 Effets anti-angiogènes de la PRL 16K

Le fragment N-terminal de 16 kDa issu de la PRL possède une activité anti-angiogène. En 1991, Ferrara a montré pour la première fois que la rPRL 16K inhibe la prolifération des *Bovine Brain Capillary Endothelial Cell* (BBCE) induite par le bFGF. Cette capacité est absente chez la PRL entière, ce qui suggère ainsi que l'effet de la PRL 16K ne requiert pas le récepteur de la PRL. (Ferrara *et al.* 1991).

Afin de mieux caractériser les effets anti-angiogènes de la PRL 16K, la protéine recombinante a été produite. La PRL 16K recombinante est capable d'inhiber la croissance des BBCE stimulées au bFGF et VEGF (Clapp *et al.* 1993). De plus, Struman *et al.* ont montré que l'effet anti-angiogène du fragment N-terminal de 16 kDa n'est pas restreint à celui de la PRL. En effet, les fragments issus de la GH et de la PL possèdent également la capacité d'inhiber l'angiogenèse dans un modèle de CAM tandis que les hormones entières sont angiogènes (Struman *et al.* 1999).

2.3.3 Mode d'action de la PRL 16K

Un des processus impliqué dans l'action anti-angiogène de la hPRL 16K est l'inhibition de la **vasodilatation**, une étape importante dans l'angiogenèse. La hPRL 16K empêche l'activation de l'oxyde nitrique synthétase endothéliale (eNOS), ce qui diminue la production du NO (Gonzalez *et al.* 2004). De plus, l'expression de l'oxyde nitrique synthétase inductible (iNOS) peut également être inhibée par la hPRL 16K dans les cellules endothéliales. Elle agit en inhibant l'activation de la **MAPK P38** et **STAT1**, ce qui empêche l'expression **d'IRF-1** (*interferon regulatory factor-1*), un activateur de la transcription de l'iNOS (Lee *et al.* 2005).

La hPRL 16K inhibe la **prolifération** des cellules endothéliales en empêchant l'activation des **MAPK**. En effet, l'activation et la phosphorylation des MAPK P42 et P44 induites par le bFGF et le VEGF est inhibée par la hPRL 16K (D'Angelo *et al.* 1995). Cet effet est dû à l'inhibition de l'activation de Ras et par conséquent de Raf-1 (D'Angelo *et al.* 1999). De plus, dans notre laboratoire, il a été montré que la hPRL 16K peut induire l'arrêt du cycle cellulaire en phase G0-G1 et G2-M en réduisant l'expression de la cycline D1 et cycline B1 et en induisant l'expression de deux inhibiteurs du cycle cellulaire, p27 (Kip1) et p21 (cip1) (Tabruyn *et al.* 2005).

L'induction de l'**apoptose** des cellules endothéliales est un autre mécanisme utilisé par la PRL 16K pour inhiber l'angiogenèse. En 2000, il a été montré que la hPRL 16K est capable d'induire la fragmentation de l'ADN (acide désoxyribonucléique) et d'activer les caspases 1 et 3 spécifiquement dans les cellules endothéliales. En effet, la hPRL 16K n'induit pas l'apoptose des cellules épithéliales ni celle des cellules stromales (Martini *et al.* 2000). De plus, l'activation de **NF-κB** (nuclear factor κB) est requise pour l'induction de l'apoptose par la hPRL 16K. Il est nécessaire à l'activation de la caspase 8 et 9 et par conséquent à l'activation de la caspase effectrice, la caspase 3 (Tabruyn *et al.* 2003).

La **migration** des cellules endothéliales, étape cruciale dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins, est également inhibée par la hPRL 16K. Elle agit en interférant avec la voie de signalisation **Ras-Tiam1-Rac1-Pak1** (Lee *et al.* 2007). Une autre étude a montré que la hPRL 16K induit l'expression de la protéine PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor 1*). Dans de nombreuses études, il a été montré qu'en excès PAI-1 inhibe la migration des cellules endothéliales. C'est pourquoi, PAI-1 a été suggéré comme étant un composant important dans les effets anti-angiogènes de la hPRL 16K (Lee *et al.* 1998).

En réduisant l'expression de Dll1 (*Delta like ligand 1*), Dll4, Notch 3 ou Notch 4, la hPRL 16K perturbe la voie de signalisation Delta/Notch. Ceci réduit ainsi le recrutement des péricytes et inhibe, par conséquent, la **maturation** des vaisseaux sanguins (Nguyen *et al.* 2011).

Afin de mieux comprendre le mécanisme d'action de la hPRL 16K, Tabruyn et al. ont réalisé une étude transcriptomique par microarray. A l'issue de celle-ci, de nouveaux gènes cibles de la hPRL 16K ont été identifiés (Sprouty, Caspase-3, ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*), VCAM-1 (*Vascular Cell adhesion molecule 1*),...). Cette analyse à grande échelle a confirmé le rôle majeur de **NF-κB** dans les effets anti-angiogènes de la hPRL 16K. De plus, sur base des nouveaux gènes cibles identifiés, il a été suggéré que la hPRL 16K

joue également un rôle dans **l'inflammation** et dans **l'adhésion cellulaire**. En effet, en induisant l'expression de diverses molécules d'adhésion, la hPRL 16K est capable d'augmenter le recrutement des leucocytes au niveau des cellules endothéliales. Les différents effets de la PRL 16K sont repris dans la **figure 9**.

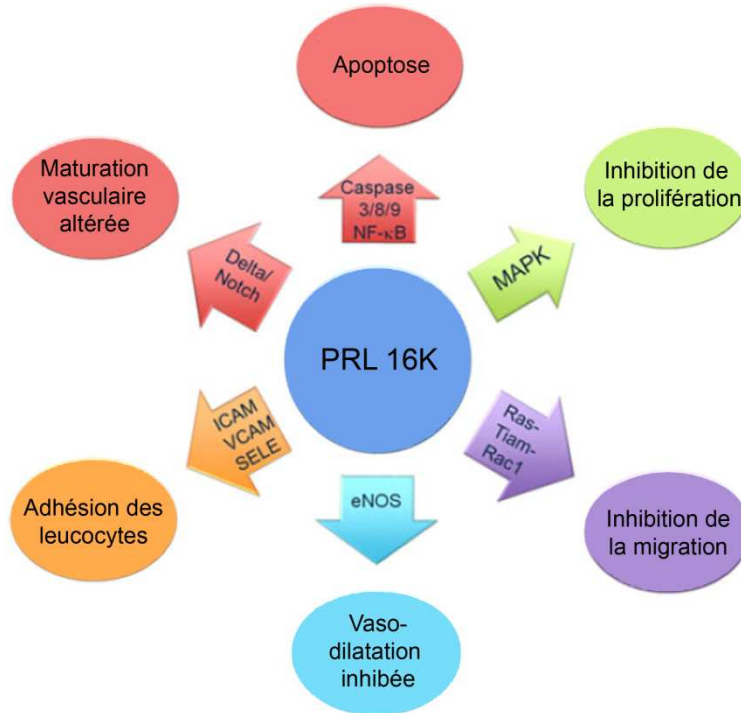


Figure 9: Résumé des différentes actions anti-angiogènes de la PRL 16K. La PRL 16K inhibe la prolifération des cellules endothéliales en empêchant l'activation des MAPK. L'inhibition de la migration des cellules endothéliales par la PRL 16K requiert la voie de signalisation Ras-Tiam-Rac-Pak, bien que l'induction de l'apoptose est dépendante de l'activation des caspases dépendantes de NF-κB. Le blocage de l'eNOS par la PRL 16K inhibe la vasodilatation. La PRL 16K, via l'induction de l'expression d'ICAM-1, VCAM-1 et de la sélectine E (SELE), augmente les interactions cellules endothéliales-leucocytes. Les tumeurs traitées avec la PRL 16K montrent moins de vaisseaux matures avec une couverture péricytaire réduite, la PRL 16K interfère avec la voie de signalisation Delta/notch. Figure adaptée de (Hilfiker-Kleiner *et al.* 2012).

Un des éléments manquants à la compréhension totale du mécanisme d'action de la hPRL 16K est l'identité de son récepteur. En effet, il a été montré que la hPRL 16K n'agit pas via le récepteur de la PRL entière ni via celui du bFGF (Ferrara *et al.* 1991), mais qu'elle possède un site de liaison spécifique, saturable et de haute affinité à la surface des cellules endothéliales. Des analyses de Scatchard ont montré que la constante de dissociation (Kd) est de $9,9 \times 10^{-9} \text{M}$ et que la capacité de liaison (Bmax) est de 4,8 pmol/mg de protéines membranaires. D'autres études ont également montré que la PRL entière ainsi que la GH ou la PL ne sont pas capables de lier ce site de liaison (Clapp *et al.* 1992). L'identité de ce site sera présentée dans la partie résultat de ce travail.

Dans le but de mieux comprendre le mode d'action de la hPRL 16K, notre laboratoire a identifié une séquence de 14 acides aminés dans les différents fragments de 16 kDa de la famille PRL/GH, responsable de leur activité antiangiogène. Cette séquence présente les caractéristiques d'un peptide oblique. Les peptides obliques issus de ces fragments sont capables d'induire l'apoptose des cellules endothéliales, d'inhiber la prolifération et la formation de capillaires. De plus, l'activité caspase des cellules endothéliales, traitées avec une hPRL 16K ayant un peptide oblique muté, est significativement réduite. Cette donnée suggère que cette structure amphipatique est en partie responsable de l'activité anti-angiogène de la hPRL 16K. Le peptide oblique est localisé dans la région N-terminale de la deuxième hélice près du site de clivage de la cathepsine D. Ceci pourrait expliquer les actions différentes de la hPRL et de la hPRL 16K sur l'angiogenèse, car ce peptide oblique serait plus exposé dans les fragments que dans l'hormone entière (Nguyen *et al.* 2006).

2.3.4 Effets *in vivo* de la hPRL 16K

Le potentiel thérapeutique de la hPRL 16K a été analysé dans différents modèles tumoraux. En 2001, Bentzien et ses collaborateurs ont développé des clones stables de cellules tumorales de colon humain HCT 116 surexprimant la hPRL 16K. La hPRL 16K produite par ces cellules implantées dans des souris RAG^{-/-} entraîne une diminution de la croissance tumorale via une réduction de la vascularisation de ces tumeurs (Bentzien *et al.* 2001). Kim *et al.*, quant à eux, ont développé un vecteur adénoviral permettant l'expression de la hPRL 16K dans deux types de cellules cancéreuses prostatiques, PC-3 et DU145. La hPRL 16K inhibe la croissance de ces tumeurs dans un modèle murin de xénogreffe (Kim *et al.* 2003). La croissance de mélanome murin B16F10 est également inhibée par la hPRL 16K non seulement via une inhibition de l'angiogenèse mais également par une augmentation de la réponse immunitaire. En effet, l'infiltration leucocytaire au sein des tumeurs augmente en présence de la hPRL 16K (Tabruyn *et al.* 2007). Une autre étude réalisée dans notre laboratoire a démontré que la hPRL 16K est capable d'inhiber la croissance de la tumeur primaire mais également l'établissement des métastases dans un modèle murin de mélanome B16F10 (Nguyen *et al.* 2007; Kinet *et al.* 2009). Dans ce même modèle murin, il a été montré que la réduction de croissance tumorale par la hPRL 16K est associée à une diminution de la taille et de la perfusion des vaisseaux tumoraux ainsi que du recouvrement péricytaire (Nguyen *et al.* 2011). Récemment, nous avons démontré que la hPRL 16K, en plus d'être un agent anti-angiogène, inhibe la lymphangiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Kinet *et al.* 2011). De

plus, en 2010, il a été montré que la hPRL 16K est capable d'inhiber la vascularisation des tumeurs MDA-MB-231 et MCF-7 (Faupel-Badger *et al.* 2010). Ces résultats suggèrent que la hPRL 16K a un haut potentiel thérapeutique dans le traitement des cancers.

Le potentiel thérapeutique de la hPRL 16K a également été observé dans un modèle pathologique mais non tumoral. L'administration intra-vitréenne d'un vecteur adénoviral codant pour la hPRL 16K inhibe la néovascularisation de la rétine dans un modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène (Pan *et al.* 2004).

2.3.5 Effets de la PRL 16K associés à des pathologies

Bien que la hPRL 16K présente un intérêt thérapeutique très intéressant dans le traitement des cancers, elle se présente également comme étant un facteur pathophysiologique. En effet, elle a été montrée comme un acteur responsable de la régression vasculaire dans des rétines de patients atteints de rétinopathie prématurée (Aranda *et al.* 2005). De plus, une étude récente propose la hPRL 16K comme étant le facteur majeur induisant et menant à la PPCM (*PostPartum CardioMyopathy*), une insuffisance cardiaque associée à la grossesse. La génération excessive de hPRL 16K dans le cœur des patientes inhibe le réseau de capillaires cardiaques et réduit le métabolisme des cardiomyocytes (Hilfiker-Kleiner *et al.* 2007). Au niveau moléculaire, il a été montré que la hPRL 16K induit la PPCM via sa capacité à induire l'expression dans les cellules endothéliales d'un microARN anti-angiogène, mir 146 (Halkein *et al.* 2013).

Une étude a également mis en avant que le niveau de la hPRL 16K augmente tant dans le sérum que dans l'urine et le liquide amniotique des femmes atteintes de pré-éclampsie, une affection touchant certaines femmes chez lesquelles la dérégulation de l'endothélium vasculaire maternelle engendre de l'hypertension et de la protéinurie. De ce fait, la hPRL 16K a été proposée par Gonzalez *et al.* comme étant le facteur responsable de cette dérégulation endothéliale (Gonzalez *et al.* 2007).

3. Le système VEGF-A/VEGFR-2

Le système VEGF-VEGFR occupe une place importante dans la régulation de la vasculogenèse, de l'angiogenèse et de la lymphangiogenèse chez les vertébrés. Les VEGFs forment une famille de cytokines régulant l'angiogenèse autant dans un contexte physiologique que pathologique. Le VEGF a un rôle prépondérant dans l'angiogenèse embryonnaire puisqu'il est impliqué dans ces différentes étapes comme l'augmentation de la perméabilité, la migration et la prolifération des cellules endothéliales, la spécification des cellules « tip » et « stalk », ainsi que la formation du lumen des nouveaux vaisseaux. Le VEGF joue également un rôle dans l'angiogenèse tumorale. Sécrété par les tumeurs, il agit sur les cellules endothéliales via des récepteurs présents à leur surface, favorisant ainsi la croissance tumorale et la dissémination des métastases.

Le génome des mammifères code 5 membres de la famille des VEGFs, le VEGF-A, PlGF (*Placental Growth Factor*), VEGF-B, VEGF-C et VEGF-D. Le VEGF-E et le VEGF-F, des protéines qui leur sont apparentées ont été identifiées respectivement chez les parapoxvirus et dans le venin de serpent (Tugues *et al.* 2011). Les membres de la famille VEGF exercent leurs fonctions biologiques via l'interaction avec des récepteurs présents à la surface membranaire des cellules endothéliales. Trois récepteurs ont été identifiés à ce jour : VEGFR-1 (FLT1), VEGFR-2 (Flk1/KDR) et VEGFR-3 (FLT4). Le VEGF-B et le PlGF se lient tout les deux au VEGFR-1.

3.1 Le VEGF-A

Le VEGF-A a été décrit pour la première fois par Senger *et al.* comme étant un facteur de perméabilité sécrété par les tumeurs (Senger *et al.* 1983). Le VEGF-A est un facteur clé dans la vasculogenèse et l'angiogenèse. Son importance a été prouvée par des études génétiques chez la souris. En effet, l'inactivation du gène codant le VEGF-A chez la souris provoque l'arrêt du développement embryonnaire suite à un défaut vasculaire aux jours 9,5-10 (E9,5-10). De façon surprenante, l'inactivation d'un seul allèle codant le VEGF-A engendre également l'arrêt du développement embryonnaire E11-12 associé à un réseau vasculaire défectueux (Carmeliet *et al.* 1996; Ferrara *et al.* 1996).

Le gène codant le VEGF-A est localisé sur le bras court du chromosome 6, comprend 14kb et est composé de 8 exons. Son épissage alternatif produit plusieurs isoformes de la protéine mature comprenant de 121 à 206 acides aminés (**Figure 10**).

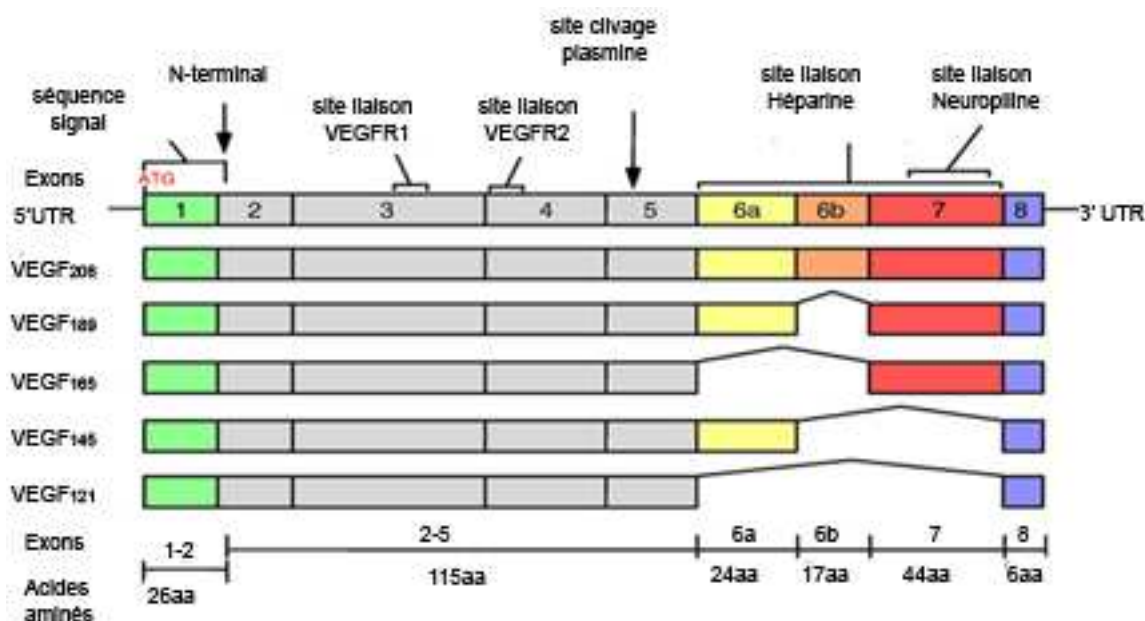


Figure 10 : Structure en exons des différents isoformes du VEGF-A résultant de l'épissage alternatif. Le gène codant pour le VEGF-A comprend 8 exons qui codent pour des motifs structuraux différents. L'épissage alternatif de l'ARNm mène à la formation de plusieurs isoformes différents qui ont un nombre d'acides aminés (aa) différent. Chez l'humain, le VEGF165 est la forme prédominante. Figure adaptée de (Holmes *et al.* 2007).

Le VEGF-A₁₆₅ représente l'isoforme dominant responsable de l'angiogenèse pathologique (Djordjevic *et al.* 2012). Les isoformes diffèrent dans leur affinité de liaison aux VEGFRs mais également dans leur capacité à se lier à l'héparan sulfate et à la matrice extracellulaire (Tozer *et al.* 2008). L'importance de la liaison du VEGF à la matrice extracellulaire a longtemps été négligée. Cependant, Bergers et al. ont montré que l'interaction du VEGF avec les protéines de la matrice extracellulaire est importante pour le « switch angiogène », facilitant la formation de tumeurs malignes (Bergers *et al.* 2000). De plus, il a été montré que lorsque le VEGF-A est lié à la matrice extracellulaire, il favorise une interaction entre le VEGFR-2 et les intégrines $\beta 1$. Cette interaction provoque une phosphorylation prolongée de la tyrosine 1214, ce qui entraîne une activation accrue de la voie P38/MAPK (Chen *et al.* 2010).

Le VEGF-A est une cytokine homodimérique qui est stabilisée par un lien covalent, ainsi que par des ponts disulfures intra et interpeptidiques. Chez l'humain, le VEGF-A₁₆₅ est la forme la plus abondante et agit sous forme d'homodimère de 46 kDa. Exprimé par toute une série de cellules incluant les cellules musculaires lisses, les macrophages, les cellules tumorales, il agit comme médiateur de l'angiogenèse de manière paracrine sur les cellules endothéliales. En 2006, Maharaj et al. ont montré que le VEGF-A peut également être

exprimé par les cellules endothéliales et agit de façon autocrine, ce qui favorise la survie des cellules endothéliales même à l'âge adulte (Maharaj *et al.* 2006; Lee *et al.* 2007).

Un régulateur important de l'expression du VEGF-A est l'hypoxie, le gène *VEGF-A* comprenant un élément de réponse à l'hypoxie (HRE) dans ses régions 5' et 3' UTR. Son expression peut également être induite par de nombreux autres facteurs tels que le PDGF, EGF (*Epidermal Growth Factor*), TGF- β , TNF- α (*Tumor Necrosis Factor α*), par l'activation de la cyclooxygénase 2 (Cox-2) et par les ROS (*Reactive Oxygen species*) (Cross *et al.* 2003; Koch *et al.* 2011).

3.2 Le VEGFR-2

Le VEGFR-2 (*fetal liver kinase-1*, Flk-1 pour sa forme murine ou *kinase insert domain-containing receptor*, KDR, pour son homologue humain) tout comme le VEGFR-1 (*fms-like tyrosine kinase*, Flt-1) et le VEGFR-3 (*fms-like-tyrosine kinase 4*, Flt-4) sont des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTKs), appartenant à la superfamille du récepteur au PDGF.

Dans les cellules, le gène *vegfr-2* code un polypeptide de 150 kDa qui, mûré par plusieurs glycosylations, génère une protéine de 200-230 kDa exprimé à la surface cellulaire.

Au niveau structurel, le VEGFR-2 contient un domaine extracellulaire composé de 7 domaines immunoglobulines, une partie transmembranaire et un domaine à activité tyrosine kinase interrompu par un insert de 70 acides aminés (**figure 11**).

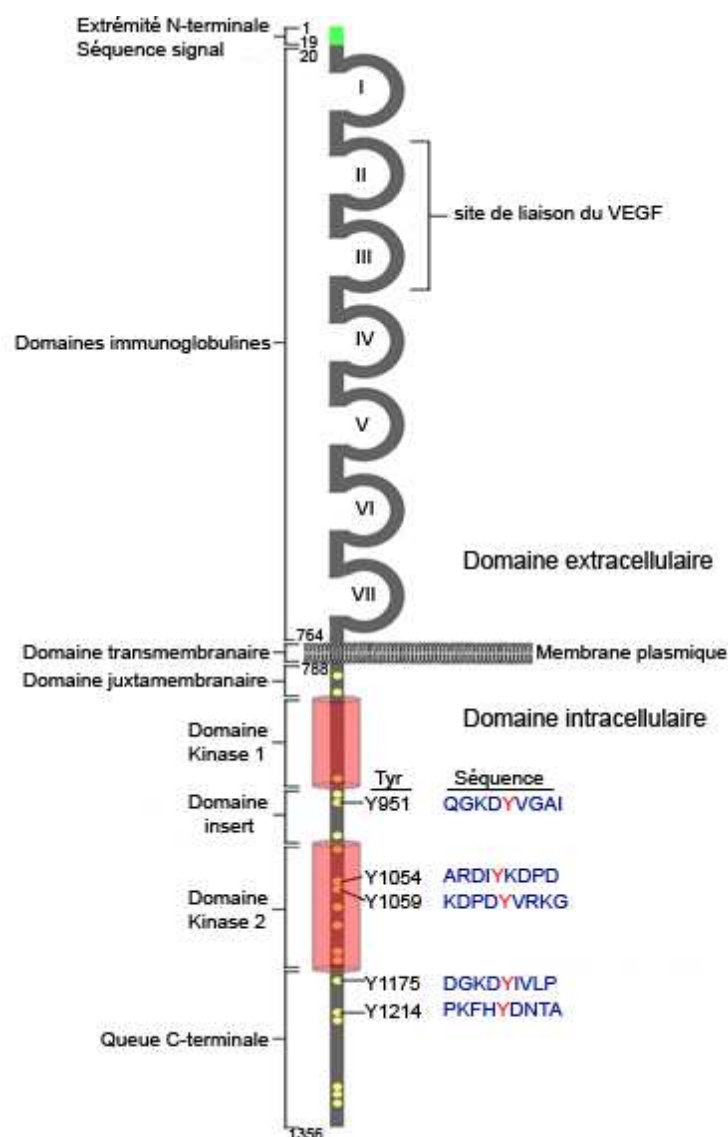


Figure 11 : Structure du VEGFR-2 (KDR) humain. Le VEGFR-2 est un récepteur tyrosine kinase transmembranaire de type III composé de 1356 acides aminés. Le domaine extracellulaire est composé de 7 domaines immunoglobulines (I-VII). Les domaines immunoglobulines 2 et 3 sont les sites de liaison du VEGF-A. Le domaine intracellulaire contient deux domaines tyrosine kinase, séparés par un domaine insert de 70 acides aminés. Dans le domaine intracellulaire, 5 résidus tyrosines ont été identifiés comme étant des sites majeurs de phosphorylation (Y951, Y1054, Y1059, Y1175 et Y1214). La phosphorylation des ces sites crée un site de liaison pour les domaines SH2 de nombreuses molécules de signalisation. Figure adaptée d'après (Holmes *et al.* 2007).

Le VEGF-A se lie aux domaines immunoglobulines 2 et 3 du VEGFR-2 avec une affinité 10 fois plus faible que l'interaction VEGF-A-VEGFR-1. La liaison du ligand induit la dimérisation et l'autophosphorylation du récepteur. Le VEGFR-2 contient 5 tyrosines qui sont autophosphorylées. De plus, l'extrémité C-terminale du VEGFR-2 contient d'autres sites de phosphorylation composés de sérines. Le rôle de ces sérines n'est pas encore bien élucidé, bien que des expériences de mutations des sérines 1188 et 1191, dans l'extrémité C-terminale du VEGFR-2 murin, montrent qu'elles sont impliquées dans l'atténuation du signal induite par le ligand (Singh *et al.* 2005; Holmes *et al.* 2007).

Durant l'embryogenèse murine, l'expression du VEGFR-2 est détectée dès le 7^{ème} jour du développement embryonnaire, au niveau des progéniteurs des îlots sanguins mésodermiques. Plus tard, il est exprimé dans les précurseurs endothéliaux ainsi que dans les cellules endothéliales différenciées. Les souris Flk1^{-/-} (correspondant au VEGFR-2 humain)

meurent au 9^{ème} jour de l'embryogenèse suite à un développement vasculaire inabouti, un phénotype similaire à celui des souris VEGF-A^{-/-} (Shalaby *et al.* 1995; Tugues *et al.* 2011). Ces données indiquent que le VEGFR-2 joue un rôle essentiel dans la vasculogenèse et l'angiogenèse durant l'embryogenèse.

Durant la vie adulte, le VEGFR-2 est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, les progéniteurs endothéliaux, les cellules hématopoïétiques,... Son expression est fortement induite dans les cellules présentant une angiogenèse active comme dans l'utérus mais également dans des processus pathologiques associés à la néovascularisation de cancers (Holmes *et al.* 2007; Tugues *et al.* 2011; Koch *et al.* 2012).

3.2.1 Activités du VEGFR-2

De nombreuses études ont montré que le VEGFR-2 est le principal médiateur des effets physiologiques et pathologiques du VEGF-A dans les cellules endothéliales.

La liaison du VEGF-A au VEGFR-2 induit la dimérisation du récepteur, stabilisé par des interactions faibles entre les différents domaines immunoglobulines, permettant la trans ou autophosphorylation des résidus tyrosines. Les sites majeurs de phosphorylation sont les résidus Y951, localisés dans le domaine insert, Y1054 et Y1059, présents dans les domaines kinases, et Y1175 et Y1214 situés dans la queue C-terminale. Matsumoto *et al.*, ont montré que les trois résidus tyrosines 1305, 1309 et 1319 sont également phosphorylés mais à un moindre niveau par le VEGF-A. Néanmoins, le rôle de ces trois phosphorylations n'est pas encore élucidé (Matsumoto *et al.* 2005).

Par double hybride en levure, Wu *et al.*, ont montré que la protéine VRAP (*VEGFR-2 Receptor Associated Protein*) interagit avec le résidu Y951 phosphorylé, localisé dans le domaine insert du VEGFR-2 (Wu *et al.* 2000). Activé uniquement dans certaines cellules endothéliales suite à une stimulation au VEGF-A, le résidu Y951 phosphorylé, via la protéine VRAP, régule la réorganisation de l'actine et, par conséquent, la migration des cellules endothéliales. Par contre, ce site ne possède aucune activité mitogène (Matsumoto *et al.* 2005).

La phosphorylation de la tyrosine 1175 est particulièrement importante pour la fonction du VEGFR-2. En effet, elle est le site de liaison de nombreuses protéines (PLC γ , ShB, Sck, Grb2,...) impliquées dans diverses voies de signalisation. Le rôle prépondérant de ce résidu a été montré par une étude menée *in vivo* sur des souris dans lesquelles la tyrosine 1173 (équivalent de la tyrosine 1175 humaine) est substituée par une phénylalanine. Les

souris homozygotes *Flk1*^{Y1173F} meurent entre les jours embryonnaires 8,5 et 9,5 et présentent un phénotype semblable à celui des souris *Flk-1*^{-/-}, soit un réseau vasculaire déficient (Sakurai *et al.* 2005). De plus, une étude réalisée *in vitro* a montré que la substitution de la tyrosine 1173 par une phénylalanine empêche la migration des cellules endothéliales suite à une stimulation au VEGF-A (Holmqvist *et al.* 2004).

La phosphorylation de la tyrosine 1212 est un site d'interaction avec la protéine adaptatrice Nck, qui en activant la protéine PAK-2 (*P21-activated protein kinase-2*) induit la migration des cellules endothéliales (Lamalice *et al.* 2006). Toutefois, l'importance de ce site dans l'activation du VEGFR-2 est controversée. En effet, une étude réalisée sur des récepteurs portant des mutations au niveau de ce site semble indiquer qu'il est essentiel à l'activation du VEGFR-2 et à l'angiogenèse induite par le VEGF-A (Meyer *et al.* 2002). Cependant, une étude *in vivo* réalisée sur des souris dans lesquelles la tyrosine 1214 (analogue de la tyrosine 1212 humaine) est substituée par une phénylalanine montre que ce site n'est pas essentiel aux effets du VEGF. En effet, les souris *Flk-1*^{Y1214F} sont viables et fertiles (Sakurai *et al.* 2005). Enfin, les sites Y1054 et Y1059 phosphorylés sont des régulateurs positifs de l'activité kinase du récepteur (Dougher *et al.* 1999).

Cette diversité de phosphorylation permet le recrutement de différents médiateurs de signalisation, ce qui permet au VEGFR-2 d'induire diverses fonctions angiogènes telles que la perméabilité, la prolifération, la migration et la survie (**Figure 12**).

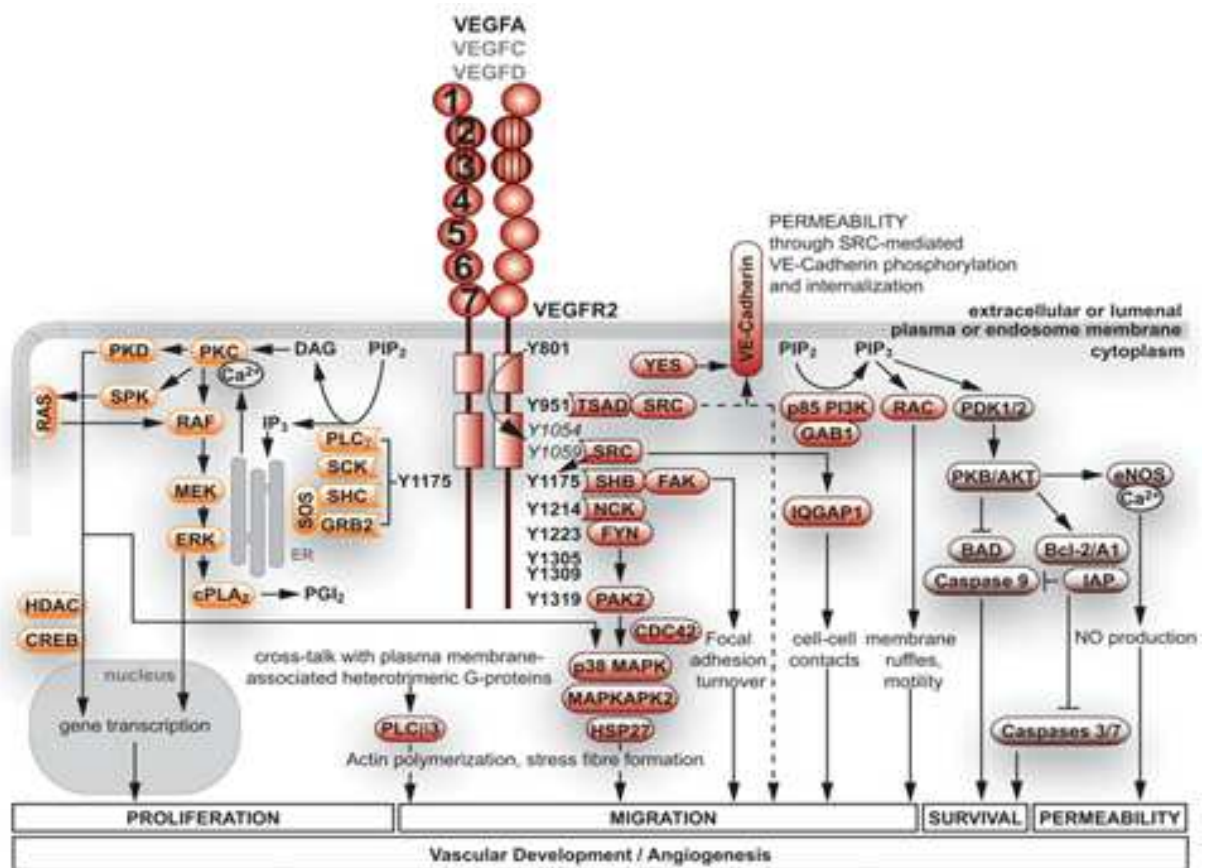


Figure 12 : Voies de transduction induites par le VEGFR-2. Représentation schématique du VEGFR-2 dimérisé et activé. Suite à la liaison du VEGF-A aux domaines immunoglobulines 2 et 3 du VEGFR-2, des molécules adaptatrices se lient aux différents sites phosphorylés dans le domaine intracellulaire du VEGFR-2 et activent les médiateurs en aval. Les Y1054 et Y1059 sont cruciales à l'activité kinase du VEGFR-2. Le réseau complexe des voies de signalisation intracellulaires entraîne des réponses biologiques, à savoir la prolifération, la migration, la survie et la perméabilité. Tous ces effets sont requis à l'organisation tri-dimensionnelle des cellules endothéliales pour former et maintenir les tubes vasculaires. Cdc 42 : *cell division cycle 42* ; DAG : diacylglycérol ; IP3 : *inositol 1,4,5-triphosphate* ; PIP2 : *phosphatidylinositol 4,5-biphosphate* ; SOS : *Son of Sevenless*. Figure provenant de (Koch *et al.* 2011).

3.2.1.1 Perméabilité

A l'origine, le VEGF-A a été découvert comme étant un facteur de perméabilité vasculaire, un effet important aussi bien dans l'angiogenèse physiologique que pathologique. La perméabilité induite par le VEGF-A requiert l'oxyde nitrique synthase endothélial (eNOS) qui permet la formation de monoxyde d'azote (NO). L'activité de l'eNOS peut être stimulée par l'influx de calcium dépendant de la PLC- γ ou par AKT qui phosphoryle la sérine 1179 de l'eNOS (Dimmeler *et al.* 1999; Fulton *et al.* 1999).

La perméabilité induite par le VEGF-A est également dépendante de la protéine Src. Celui-ci régule les contacts entre les cellules endothéliales en induisant la phosphorylation des VE-

cadhérines (Wallez *et al.* 2007). Une autre étude récente montre que la perméabilité est également dépendante de FAK. Une fois activé, FAK déstabilise les jonctions cellulaires en induisant la dissociation du complexe VE-cadhérine/ β -caténine (Chen *et al.* 2012).

Pour induire la perméabilité vasculaire, le VEGFR-2 requiert également les neuropilines qui seront décrites dans le point 3.2.2.1.

L'augmentation de la perméabilité vasculaire provoque l'extravasation de protéines plasmatiques telles que la fibrine. Cela mène à la formation d'un gel de fibrine extracellulaire, formant un substrat pour la croissance endothéliale (Fulton *et al.* 1999).

3.2.1.2 La dégradation matricielle

L'implication directe du VEGFR-2 dans la dégradation de la matrice extracellulaire n'est pas réellement décrite. Néanmoins, en 2004, Prager a montré que le VEGF-A via son interaction avec le VEGFR-2 induit un changement conformationnel des intégrines β 1, présentes à la surface cellulaire, qui est dépendant de la voie des PI3 kinases. Cette modification de conformation engendre l'activation des pro-MMP2, associées aux intégrines, en MMP2. Les MMP2 activent alors le pro-uPA en uPA, lorsqu'il est lié à l'uPAR. Dans cet état, l'uPA est capable de dégrader la matrice extracellulaire, favorisant ainsi l'invasion cellulaire (Prager *et al.* 2004).

3.2.1.3 La migration

La migration des cellules endothéliales est induite par plusieurs voies de signalisation impliquant plusieurs sites de phosphorylation du VEGFR-2. La phosphorylation de la tyrosine 1175 joue un rôle majeur dans ce processus via le recrutement de la protéine adaptatrice Shb. La phosphorylation de Shb qui en découle est dépendante de Src. Une étude utilisant des siARN ciblant Shb a montré son implication dans l'activation de la PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) et FAK. PI3K est connue pour induire la migration des cellules endothéliales et FAK est un enzyme impliqué dans l'attachement et la migration cellulaires. La phosphorylation de la tyrosine 951 est également impliquée via le recrutement du complexe protéique VRAP/TSAD/Src. Etant donné que l'activation de ce site n'est pas ubiquiste dans toutes les cellules endothéliales, il est considéré comme secondaire face à l'importance de la tyrosine 1175. Enfin, la phosphorylation de la tyrosine 1214 via les protéines Cdc42 et P38 MAPK est impliquée dans la réorganisation de l'actine et dans la migration cellulaire (Koch *et al.* 2012).

3.2.1.4 La prolifération

Le VEGF-A est un mitogène pour les cellules endothéliales. Il stimule la prolifération via la voie classique des MAPK, soit Ras/Raf/Erk/Mapk. Le mécanisme exact d'activation de Ras via le VEGFR-2 n'est pas clair. Contrairement à de nombreux RTKs, VEGFR-2 ne stimule pas les ERK via Grb2-Sos-Ras, mais plutôt via la phosphorylation de la PLC γ /PKC (protéine Kinase C) dépendant de la tyrosine 1175 (Takahashi *et al.* 2001). La PLC γ phosphorylé hydrolyse le phosphatidylinositol (4,5)-biphosphate (PIP2) membranaire, ce qui génère l'accumulation de diacylglycérole (DAG) et d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3). La génération d'IP3 induit une augmentation de la concentration en ions calcium dans le cytoplasme et le DAG active la PKC. Les membres de la famille PKC sont impliqués dans la prolifération induite par le VEGF-A (Takahashi *et al.* 1999; Koch *et al.* 2012).

3.2.1.5 La survie

L'activation de la voie PI3K/AKT favorise la survie cellulaire en inhibant par phosphorylation l'activité apoptotique de deux protéines, BAD (*Bcl-2 associated death promoter*) et caspase 9. De plus, le VEGF-A via AKT est capable d'induire l'expression de protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-2, IAP (*Inhibitor Apoptosis Protein*) et survivine, qui inhibent l'activation des caspases 3 et 7. Pour protéger les cellules endothéliales de la mort cellulaire, le VEGFR-2 requiert également la co-opération des intégrines $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (Cardone *et al.* 1998; Gerber *et al.* 1998; Fujio *et al.* 1999). Ce point sera détaillé dans le point 3.2.2.3.

3.2.2 Les Co-Récepteurs du VEGFR-2

Durant de nombreuses années, les VEGFRs ont été considérés comme étant les seuls médiateurs des effets du VEGF. Mais, de plus en plus, de nouvelles molécules semblent réguler également les effets du VEGF, ce sont les co-récepteurs. Dans ce paragraphe, les co-récepteurs sont définis comme étant des protéines transmembranaires qui modulent les voies de signalisation du VEGFR-2.

3.2.2.1 Les Neuropilines (NRP)

Les neuropilines, NRP-1 et -2, ont été initialement identifiées pour leur rôle essentiel dans la guidance neuronale au cours du développement du système nerveux et vasculaire (Chen *et al.* 1997; He *et al.* 1997). Découvertes initialement chez le Xénope, elles sont

hautement conservées au sein des vertébrés. Chez l'humain, NRP-1 et -2 présentent une identité de séquence de 44%.

NRP-1 et -2 sont des protéines transmembranaires de 130 kDa, dépourvues d'activités catalytiques. Plus tard, il a été montré que les NRPs sont des co-récepteurs du système VEGFR. En effet, NRP-2 s'associe avec le VEGFR-3 de façon dépendante du VEGF-A, -C ou -D.

NRP-1, quant à elle, est capable de lier le VEGF-A lié à l'héparan sulfate ce qui lui permet d'interagir avec le VEGFR-2. Cette association physique permet à NRP-1 de moduler les voies de signalisation impliquées dans la survie et la migration cellulaires induites par VEGFR-2 (**Figure 13**) (Vander Kooi *et al.* 2007). D'autres études ont également montré que cette association est impliquée dans la perméabilité induite par le VEGFR-2 mais également dans le bourgeonnement et le branchement des vaisseaux sanguins (Wang *et al.* 2003; Becker *et al.* 2005; Favier *et al.* 2006; Kawamura *et al.* 2008).

Un des mécanismes proposés pour expliquer l'effet de NRP-1 est sa capacité à réguler le trafic intracellulaire de VEGFR-2. Ainsi, NRP-1 recrute les protéines synectine-myosine VI au complexe VEGF-A/VEGFR-2/Héparan Sulfate/NRP-1, ce qui entraîne l'internalisation de ce complexe (Cai *et al.* 1999) (**Figure 13**).

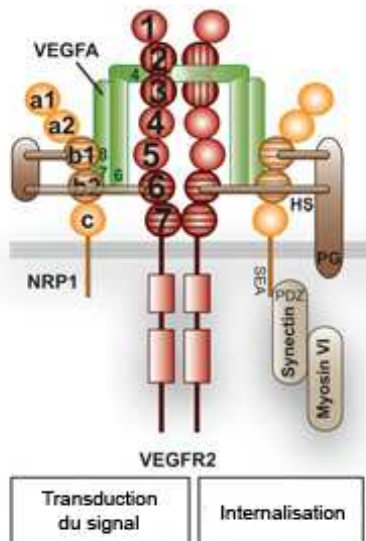


Figure 13 : Représentation schématique des interactions du VEGFR-2 avec ses co-récepteurs Héparan Sulfate (HS) et Neuropiline-1 (NRP-1). Le VEGF-A (vert) se lie au VEGFR-2 (rouge) via la région codée par son exon 4 et à NRP-1 (jaune) via la région codée par l'exon 8. Le domaine codé par l'exon 6 du VEGF-A interagit avec HS (brun) et les régions codées par les exons 1-5 sont impliquées dans la liaison au VEGFR-2. Le VEGF-A forme ainsi un complexe HS/VEGFR-2/NRP-1. Le protéoglycan (brun) peut être soluble ou ancré dans la membrane plasmique. Le motif intracellulaire SEA de NRP-1 se lie au domaine PDZ de la synectine, qui entraîne l'internalisation du complexe via la myosine VI. Figure adaptée de (Koch *et al.* 2011)

Une étude récente a également démontré que NRP-1 joue un rôle dans la perpétuation du signal induit par le VEGF-A en favorisant le recyclage membranaire de VEGFR-2.

En effet, en absence de NRP-1, le VEGFR-2 est dégradé dans les lysosomes mais en présence de NRP-1, VEGFR-2 est envoyé dans les vésicules de recyclage à la membrane plasmique (Ballmer-Hofer *et al.* 2011).

Durant le développement embryonnaire, NRP-1, préférentiellement exprimé par les artères, joue un rôle de régulateur dans la néovascularisation. En effet, sa surexpression ou sa délétion engendrent une létalité embryonnaire entre les jours 12,5 et 13,5, associée à un excès de vaisseaux formés ou à des anomalies vasculaires et de guidance neuronale, respectivement (Fujisawa *et al.* 1998; Herzog *et al.* 2001).

A l'état adulte, NRP-1 est exprimé d'une part par les cellules endothéliales mais également par les cellules des muscles lisses, les cellules immunitaires et les cellules épithéliales (Tugues *et al.* 2011; Djordjevic *et al.* 2012).

3.2.2.2 L'Héparan Sulfate (HS)

HS module les voies de signalisation du VEGFR-2 par son interaction non seulement avec le VEGF mais également avec les récepteurs et co-récepteurs tels que NRP-1. HS est actuellement vu comme étant un réservoir de facteurs de croissance qui contrôle la libération de ces facteurs pour ainsi former des gradients de concentration (Gerhardt *et al.* 2005). De plus, HS peut également stabiliser le signal induit. En effet, lorsque le VEGF-A est lié à VEGFR-2, il peut interagir avec les protéoglycans présents à la membrane des cellules adjacentes comme les péricytes, ce qui empêche probablement l'internalisation du récepteur et augmente par conséquent le temps de transduction du signal (Jakobsson *et al.* 2006) (Figure 14).

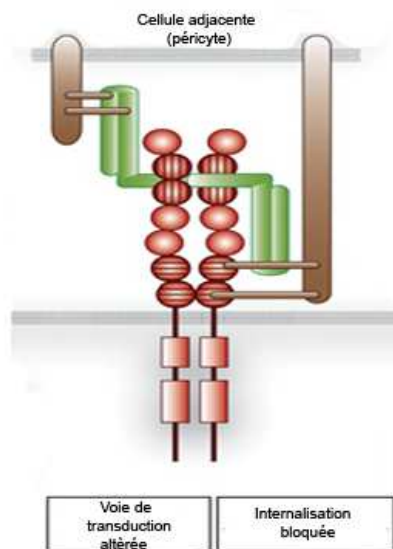


Figure 14 : Représentation schématique de l'interaction du complexe VEGF-A/VEGFR-2 et HS présent à la surface d'une cellule adjacente. Le complexe VEGF-A/VEGFR-2 peut interagir avec le HS présent sur les cellules adjacentes, menant à une voie de signalisation modifiée et probablement empêchant l'internalisation du complexe. Figure adaptée de (Koch *et al.* 2011).

3.2.2.3 Les intégrines

Les intégrines sont des glycoprotéines hétérodimériques et transmembranaires responsables des interactions cellules-cellules et cellules-matrice extracellulaire. La famille des intégrines comprend 24 récepteurs transmembranaires différents constitués par l'association non covalente de sous-unités α et β . Actuellement, 8 sous-unités β et 18 α sont répertoriées. Chaque sous-unité comprend un grand domaine extracellulaire, une région transmembranaire et un petit domaine cytosolique.

Les intégrines ont la particularité de pouvoir transmettre un signal bidirectionnel. En effet, la queue cytoplasmique de la sous-unité β peut interagir avec différentes protéines comme la taline, qui induisent un changement conformationnel du domaine extracellulaire et qui contrôlent ainsi l'interaction avec les ligands. C'est le « *inside-out signaling* ». D'autre part, la liaison d'un ligand extracellulaire aux intégrines peut activer des voies de signalisation intracellulaires. Ce type de transmission de signal est le « *outside-in signaling* » (Hynes 2002). Dans ce cas, le domaine cytosolique, exempt d'activité catalytique, agit comme support à la formation des complexes de signalisation multiprotéiques. La queue cytosolique de la sous-unité β , contenant deux sites de phosphorylation, interagit directement avec des protéines adaptatrices (taline, vinculine et paxiline), ce qui permet une interaction indirecte avec le cytosquelette. De plus, il y a également des protéines possédant une activité tyrosine kinase qui sont recrutées aux intégrines, tels que FAK, Src,... Au final, tous ces recrutements protéiques contribuent à l'activation des voies MAPK, AKT, Rho GTPases, et beaucoup d'autres. Par conséquent, les intégrines sont impliquées dans de nombreux effets biologiques tels que l'adhésion, la motilité, la prolifération et la survie cellulaires (**Figure 15**).

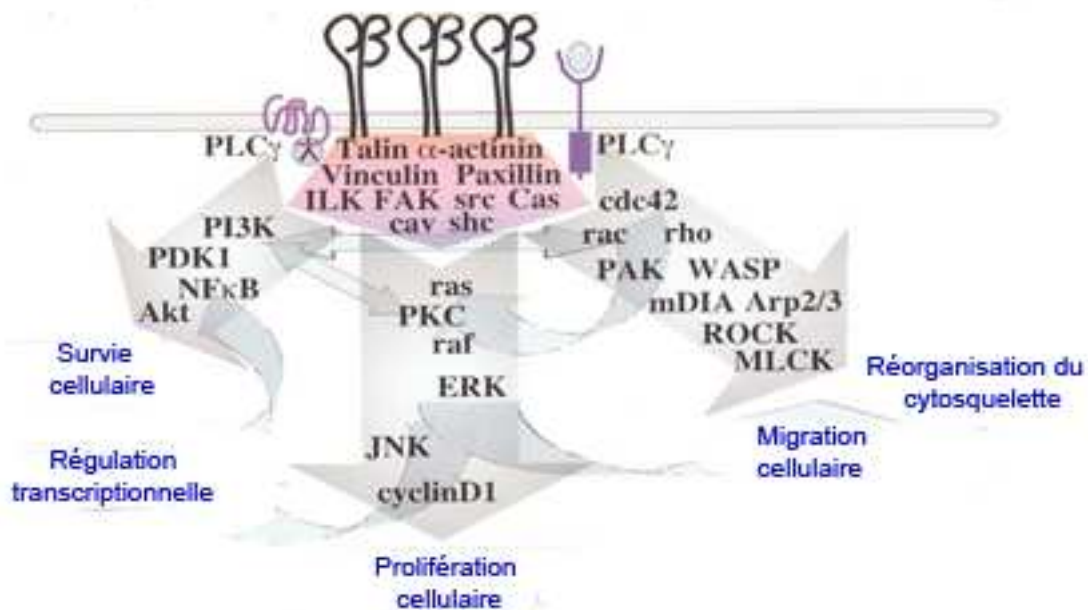


Figure 15 : Représentation de la voie de signalisation des intégrines. Les voies de signalisation, modifiant le comportement cellulaire, induites par les intégrines agissent souvent en association avec les récepteurs couplés à la protéine G ou les récepteurs à activité tyrosine kinase. Sous la membrane plasmique, la queue cytosolique des intégrines s'associe à différentes protéines (pourpre), entraînant ainsi l'activation de diverses voies de signalisation telles que PI3K, Ras, ERK, RAC. En activant ces différentes voies de transduction, les intégrines sont capables de réorganiser le cytosquelette et de réguler l'expression transcriptionnelle de certains gènes, ce qui entraîne la prolifération, la migration et la survie cellulaire. D'après (Hynes 2002).

Une autre particularité des intégrines est qu'elles ont la capacité de réguler d'autres voies de signalisation indépendamment de la leur. En effet, les intégrines peuvent également s'associer avec d'autres protéines membranaires telles que l'uPAR et les récepteurs RTKs (VEGFR, EGFR, PDGFR,...) (Garmy-Susini *et al.* 2008; Smith *et al.* 2010). L'association des intégrines avec l'uPAR sera vue plus en détail dans le point 4.

De nombreuses études montrent que les intégrines peuvent moduler les voies de transduction induites par le VEGFR-2. En effet, il a été montré que le VEGF-A est capable d'induire la formation d'un complexe entre le VEGFR-2 et l'intégrine $\alpha v \beta 3$. La sous-unité $\beta 3$ se lie au VEGFR-2 via son domaine extracellulaire et le complexe est stabilisé par la sous-unité αv (Borges *et al.* 2000; Liu *et al.* 2009). Cette association entraîne ainsi un changement conformationnel de la sous-unité $\beta 3$, ce qui induit sa phosphorylation sur ses sites Y747 et Y759 (Soldi *et al.* 1999; Byzova *et al.* 2000; Mahabeleshwar *et al.* 2006; Mahabeleshwar *et al.* 2007). Cette association entre le VEGFR-2 et l'intégrine $\alpha v \beta 3$, ainsi que les phosphorylations qui en découlent, sont cruciales aux effets angiogènes induits par le VEGFR-2 (West *et al.* 2012). En 2011, une autre étude a montré que les effets induits par le

VEGFR-2 requièrent également l'activation des intégrines $\alpha\text{v}\beta\text{3}$. Néanmoins, dans cette étude, l'activation des intégrines ne serait pas due à un changement conformationnel. En effet, selon Lakshmikanthan et al., le complexe VEGF/VEGFR-2 induit l'activation de la GTPase, RAP-1, qui une fois active, va phosphoryler la sous-unité β3 de l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ (Lakshmikanthan *et al.* 2011).

De façon surprenante, Robinson a montré que l'intégrine $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ peut également s'associer avec NRP-1 et ainsi, en séquestrant NRP-1, réguler négativement la voie de transduction induite par le VEGFR-2 (Robinson *et al.* 2009).

Le VEGF-A lié à la matrice extracellulaire peut également induire une association entre le VEGFR-2 et les intégrines β1 . Cette association facilite l'internalisation du VEGFR-2, permettant ainsi une phosphorylation prolongée de la tyrosine 1214 et par conséquent une activation prolongée de la MAPK P38 (Chen *et al.* 2010). Par ailleurs, en 2012, Alexander et al., ont montré que la capacité du VEGF-A à induire la migration des cellules endothéliales est dépendante de la redistribution des intégrines β1 (Alexander *et al.* 2012).

3.2.2.4 Les VE-cadhérines

La VE-cadhérine est un co-récepteur du VEGFR-2 un peu particulier. En effet, en 2003, Lampugnani a montré que le VEGFR-2 forme un complexe avec les VE-cadhérines. Mais contrairement à toutes les interactions décrites précédemment, celles-ci a un effet négatif sur l'activation du VEGFR-2 et entraîne l'atténuation de l'activation des MAPK. Cet effet avait été attribué à la phosphatase DEP-1, qui par liaison à la β -caténine et p120, est recruté au complexe VEGFR-2/VE-cadhérine (Grazia Lampugnani *et al.* 2003). En 2006, Lampugnani a décrit un autre aspect de ce phénomène. En effet, l'absence de VE-cadhérine induit une internalisation plus efficace et plus rapide du VEGFR-2. Étonnamment, cette internalisation ne termine pas le signal, mais le perpétue au sein des endosomes. C'est pourquoi, la délétion de la VE-cadhérine dans les cellules induit une croissance non contrôlée (Lampugnani *et al.* 2006).

3.2.2.5 Les autres co-récepteurs

De nombreuses études, visant à déterminer de nouveaux co-récepteurs, ont été entreprises durant ces dernières années. De fait, il a été montré à multiples reprises que la bi-thérapie, la thérapie anti-VEGF associé à un anti-co-récepteur, présente un effet synergique. En effet, l'étude de Pan a montré que la thérapie anti-NRP-1 en combinaison à un anti-VEGF

présente un effet additif sur la réduction de la croissance tumorale (Pan *et al.* 2007). Au vu de ces résultats encourageants, de nombreuses recherches visant à comprendre tout le complexe du VEGFR-2 ont vu le jour.

En 2010, Sawamiphak a montré que l'éphrine-B2 régule la guidance des cellules endothéliales « tip », en contrôlant l'internalisation du VEGFR-2. Dans ce cas, l'endocytose du VEGFR-2 permet l'activation des voies de transduction en aval (Sawamiphak *et al.* 2010). Le rôle de l'internalisation sera vu plus en détail dans le point 3.2.3.1.

Récemment, l'interaction entre le VEGFR-2 et la protéine CD146, une molécule d'adhésion cellulaire, a été identifiée à la surface des cellules endothéliales. Cette interaction est importante pour les processus d'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. Par ailleurs, ils ont également montré que la combinaison du bevacizumab avec un anti-CD146 présente un effet additif sur l'inhibition de la croissance de carcinomes pancréatiques et mélanome humain. Le mécanisme d'action de CD146 sur l'activation de VEGFR-2 doit encore être élucidé (Jiang *et al.* 2012).

3.2.3 L'internalisation du VEGFR-2

3.2.3.1 Rôle de l'internalisation du VEGFR-2

VEGFR-2 est un des nombreux RTKs qui est internalisé en réponse à une stimulation par un ligand. Suite à une stimulation au VEGF-A, le VEGFR-2 est internalisé de façon clathrine et dynamine dépendante (Damke *et al.* 1994; Lampugnani *et al.* 2006). Le rôle de cette internalisation dans la régulation de la voie de transduction est très controversé. En 2006, Ewan a montré que suite à une stimulation au VEGF-A, le VEGFR-2 est dans un premier temps internalisé dans les endosomes, ensuite dégradé dans les lysosomes. Ce processus entraîne la terminaison du signal induit par le VEGF-A (Ewan *et al.* 2006). De plus, récemment, il a été montré que le LDL (*Low Density Lipoprotein*) est capable d'atténuer l'angiogenèse induite par le VEGF-A en entraînant l'internalisation et la dégradation du VEGFR-2 (Jin *et al.* 2013). Ces deux études tendent à montrer que l'endocytose du VEGFR-2 est plutôt associé à l'atténuation du signal, en réduisant la disponibilité du récepteur à la surface cellulaire mais également en entraînant sa dégradation. Cependant, de nombreuses autres études montrent que l'internalisation du VEGFR-2 permet la perpétuation du signal. En effet, en 2006, l'équipe de Dejana a montré que présent dans les endosomes, VEGFR-2 est toujours phosphorylé et capable d'induire la phosphorylation des MAPK (Lampugnani *et al.* 2006). Récemment, une nouvelle étude a montré que l'internalisation du VEGFR-2 était

cruciale à l'activation des ERK suite à une stimulation au VEGF-A. Cette dernière a également montré qu'un inhibiteur de l'endocytose tel que la dynasore est capable de supprimer l'angiogenèse *in vivo* (Gourlaouen *et al.* 2013). De plus, Lanahan a montré que durant le développement, la morphogenèse artérielle induite par le VEGF-A requiert non seulement l'internalisation du VEGFR-2 mais également le trafic intracellulaire de ce dernier dépendant du complexe synectine-myosine VI. En effet, lorsque le trafic cellulaire est perturbé via la délétion de la synectine ou de la myosine VI, la phosphorylation du VEGFR-2 sur la tyrosine 1175 est altérée entraînant ainsi une réduction de l'activité des voies PLC γ /MAPK et PI3K/AKT. Cet effet est probablement dû à la présence de la phosphatase PTP1b (*Protein Tyrosine Phosphatase 1b*) localisée près de la membrane plasmique (Lanahan *et al.* 2010). L'étude de Ballmer-Hofer, quant à elle, montre qu'une fois que le VEGFR-2 est entré dans les vésicules de recyclage Rab11, il n'est plus phosphorylé sur sa tyrosine 1175. Rab 11 est une GTPase impliqué dans le recyclage des protéines internalisées via le reticulum endoplasmique et le golgi (Stenmark *et al.* 2001). Collectivement, ces deux études suggèrent que le VEGFR-2 signale à partir des endosomes précoces ou des endosomes de recyclage Rab4/Rab5 (Horowitz *et al.* 2012). Rab5, localisé dans les puits de clathrines et dans les endosomes précoces, est impliqué dans les premières étapes de l'internalisation et dans la fusion des endosomes précoces. Rab4, quant à elle, est impliquée dans le recyclage vers la membrane plasmique (Somsel Rodman *et al.* 2000).

3.2.3.2 Régulation de l'internalisation du VEGFR-2

La régulation de l'internalisation du VEGFR-2 n'est pas encore tout à fait élucidée. Néanmoins, la phosphorylation de celui-ci induite par le VEGF-A serait à la base de son internalisation. En effet, en plus de posséder plusieurs sites de phosphorylation sur les tyrosines, la queue C-terminale du récepteur comporte deux autres sites de phosphorylation, la sérine 1188 et la sérine 1191. Il a été montré que lorsque ces deux sites sont mutés, l'internalisation du récepteur ainsi que l'atténuation du signal sont altérés (Singh *et al.* 2005). Une seconde étude a également mis en avant que l'ubiquitinylation du VEGFR-2, de manière kinase dépendante (Y1054 et Y1059), entraîne l'internalisation du complexe récepteur-ligand ainsi que sa dégradation par les lysosomes (Ewan *et al.* 2006). En plus d'être régulée de façon intrinsèque, l'internalisation du VEGFR-2 est également contrôlée par de nombreuses autres protéines.

Lampugnani a montré que dans les cellules quiescentes, la VE-cadhérine associée au VEGFR-2 via la β -caténine le stabilise à la surface cellulaire en empêchant son internalisation. Une fois le VEGFR-2 activée, les VE-cadhérines s'associent à la β -arrestine et se dissocient du récepteur. La β -arrestine est une protéine qui facilite la formation des vésicules de clathrines, et donc induit l'internalisation du VEGFR-2 (Lampugnani *et al.* 2006; Horowitz *et al.* 2012) (**Figure 16**).

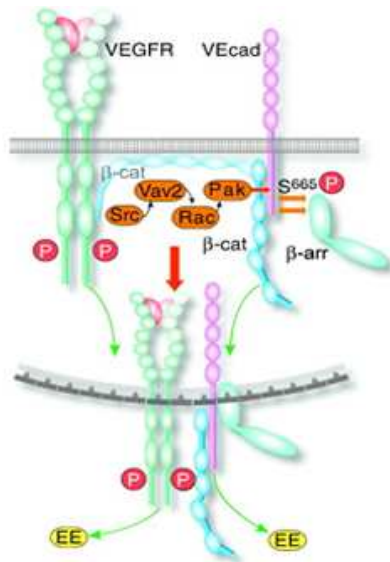


Figure 16 : Représentation schématique de l'internalisation du VEGFR-2 et de la VE-cadhérine. Le VEGFR-2 activé induit Src, ce qui active Vav2-Rac et Pak. Ensuite, la sérine 665 de la queue cytosolique de la VE-cadhérine est phosphorylée, entraînant le recrutement de la β -arrestine. Cette protéine facilite la formation des vésicules de clathrines. Durant ou après l'internalisation, la VE-cadhérine et le VEGFR-2 se dissocient et entament un trafic cytosolique séparément via les endosomes précoces (EE, *Early Endosome*)

De plus, une étude récente sur des rétines de souris a également montré que l'Ephrine B2 contrôle l'endocytose du VEGFR-2 et les voies de signalisation en aval, ce qui permet l'extension des filopodes des cellules en migration (Sawamiphak *et al.* 2010). Le mécanisme par lequel l'Ephrine B2 régule l'internalisation n'est pas encore tout à fait décrit. Bien que par spectrométrie de masse, il a été montré que suite à une stimulation au VEGF-A, le complexe VEGFR-2/Ephrine B2 interagit avec les protéines PAR-3 et Dab-2 (Disabled 2). De plus, dans les cellules endothéliales *Knockdown* pour PAR-3 ou Dab-2, l'internalisation du VEGFR-2 est empêchée ainsi que l'angiogenèse induite par celui-ci (Nakayama *et al.* 2013). Une autre étude menée par Chen a également suggéré que le recrutement des intégrines β 1 au VEGFR-2 facilite son internalisation ainsi que l'activation de la voie P38 MAPK (Chen *et al.* 2010).

4. Les acteurs du système plasminogène-plasmine

4.1 Le système plasminogène-plasmine

La conversion du plasminogène (plg) en plasmine est un processus qui entraîne la dégradation de la matrice extracellulaire, la migration cellulaire, l'invasion tumorale, la formation des métastases ainsi que la fibrinolyse.

La plasmine permet la dégradation matricielle soit en clivant directement les protéines de la matrice ou soit en activant d'autres protéases tels que les MMPs. Chez les mammifères, deux activateurs physiologiques du plasminogène ont été identifiés : celui de type tissulaire (tPA, *tissue Plasminogen Activator*) et celui de type urokinase (uPA, *urokinase Plasminogen Activator*). L'uPA est une protéase à sérine sécrétée sous la forme d'un zymogène (pro-uPA), qui doit interagir avec son récepteur, l'uPAR (*urokinase Plasminogen Activator Receptor*), afin d'être activée. Lié à son récepteur, l'uPA est activée et localisée à la surface cellulaire. Sous cette forme, l'uPA génère la plasmine par clivage protéolytique du plg, ce qui permet la dégradation matricielle et la libération de différents facteurs de croissance séquestrés dans la matrice tels que le TGF- β ou le VEGF-A. Cette protéolyse est notamment impliquée dans la migration et l'invasion cellulaires durant l'angiogenèse. Le second activateur du plasminogène, le tPA, quant à lui, est directement sécrété sous sa forme active et agit dans la circulation où il est requis pour la fibrinolyse (van Hinsbergh *et al.* 2006).

Au vu de son importance, l'activation du plg est hautement régulée. En effet, l'inhibition du système du plasminogène se fait soit au niveau de la plasmine, principalement par l' α 2-antiplasmine, soit au niveau des activateurs du plasminogène via PAI-1 (*Plasminogen Activator Inhibitor 1*) (**Figure 17**).

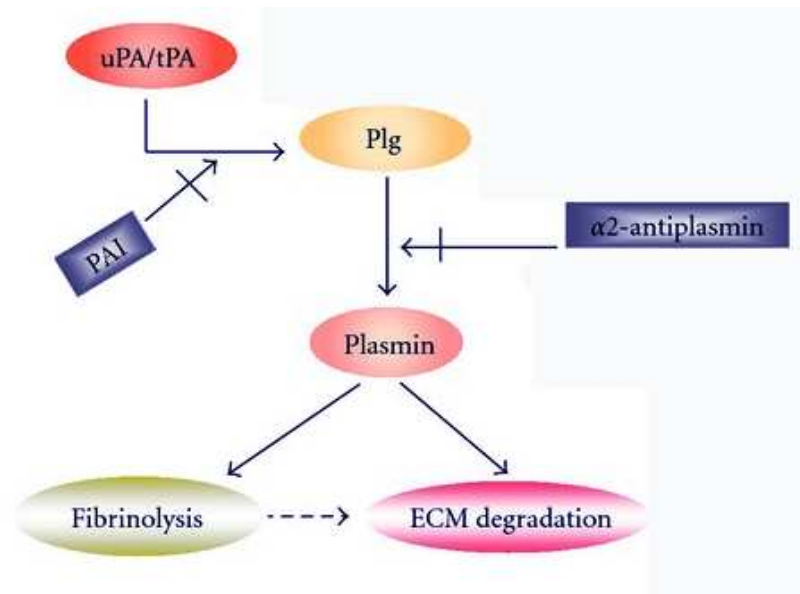


Figure 17: représentation simplifiée du système plasminogène (Plg)-plasmine. Chez les mammifères, il y a deux activateurs du plasminogène, uPA et tPA qui convertissent le Plg en plasmine. L'activation du plg est hautement régulée. En effet, l'inhibition du système du plasminogène se fait soit au niveau de la plasmine, principalement par l' α 2-antiplasmine, soit au niveau des activateurs du plasminogène via PAI-1. Adapté d'après (Dellas *et al.* 2005).

4.2 PAI-1

PAI-1, décrit pour la première fois en 1963, est un membre de la superfamille des Serpines (*Serine protease inhibitor*) (Brakman *et al.* 1963). Cette famille contient également l'anti-thrombine, l' α 2-antiplasmine, PAI-2 et PAI-3. Ces deux dernières protéines sont apparentées à PAI-1.

4.2.1 Généralités biochimiques de PAI-1

PAI-1 est une glycoprotéine de 379 acides aminés et est la serpine la plus étudiée. Sa structure primaire est totalement exempte de cystéines mais enrichie en méthionines. Cette protéine globulaire est composée de 3 feuillets β , 9 hélices α et d'une boucle appelé RCL (*Reactive Center Loop*), son site actif (Dupont *et al.* 2009).

Sa fonction majeure est d'inhiber les activateurs du plasminogène, tPA et uPA, en formant un complexe stœchiométrique 1:1. La protéase (uPA ou tPA) interagit avec le RCL. Un intermédiaire acyl-enzyme covalent est alors formé, dans lequel le site actif sérine de la protéase est attaché au groupe hydroxyl du résidu P1 par un lien ester. Le RCL est alors rapidement incorporé comme un nouveau brin β dans le feuillet β de la serpine. Cela entraîne la translocation de la protéase covalentiellement attachée de l'autre côté de la serpine et la distorsion de son site actif. Au final, la protéase se retrouve capturée dans un état

irréversiblement inactif. Cependant dans certains cas, la protéase, toujours active, peut cliver le RCL ce qui génère le PAI-1 clivé (Dupont *et al.* 2009; D'Amico *et al.* 2012).

En condition physiologique, PAI-1 existe sous 3 formes, active, latente et clivée (**Figure 18**). La forme clivée a été décrite précédemment. La conversion de la forme active en latente est due à l'insertion spontanée du RCL dans le feuillet β . La signification biologique de la forme latente reste toujours inconnue, bien qu'elle contribue probablement à la régulation de l'activité de PAI-1. En effet, le PAI-1 latent n'est plus capable d'interagir avec les protéases, ce qui le rend complètement inactif. Il est important de noter que le temps de demi-vie pour la transition de latence de PAI-1 *in vitro*, n'est que 1 ou 2 h dans les conditions physiologiques.

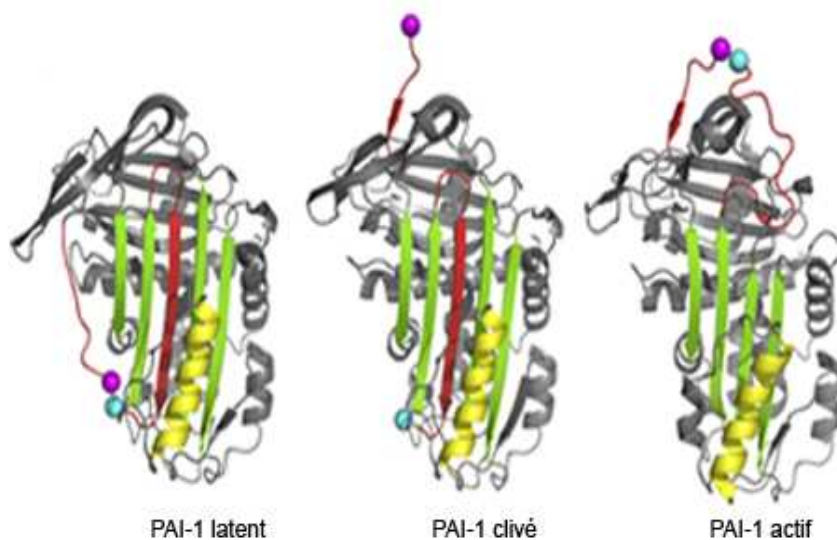


Figure 18 : Structure 3D de PAI-1 latent, clivé et actif. Le feuillet β A est représenté en vert, l'hélice α F est montrée en jaune et le RCL est représenté en rouge. Les résidus du site actif R346 et M347 (P1-P1') sont représentés en bleu et en violet, respectivement. Figure adaptée de (Novoa de Armas *et al.* 2007).

L'activité de PAI-1 peut également être régulée par sa capacité à interagir avec le domaine somatomédine B de la vitronectine, une protéine de la matrice extracellulaire. Il a d'ailleurs été suggéré que l'interaction de ces deux protéines permet de conserver PAI-1 sous son état actif et par conséquent d'empêcher la transition de latence (Wiman *et al.* 1988; Lindahl *et al.* 1989; Salonen *et al.* 1989; Dupont *et al.* 2009).

4.2.2 Régulation de l'expression de PAI-1

PAI-1 est exprimé et sécrété par de nombreux types cellulaires incluant les hépatocytes, les cellules des muscles lisses, les adipocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules épithéliales, les cellules tumorales, le placenta ainsi que les plaquettes. L'expression de PAI-1 est hautement régulée par une série de cytokines et facteurs

de croissance tels que le TGF- β , EGF, interleukine-1- β (IL-1 β) et les lipopolysaccharides (LPS) (Dellas *et al.* 2005; Samarakoon *et al.* 2008).

L'hypoxie peut également induire l'expression de PAI-1 de façon HIF-1 α dépendante et indépendante. En effet, des études réalisées sur le promoteur murin du gène *pai-1* ont montré la présence d'un site de liaison pour l'EGR (*Early growth response*), un site de liaison pour la protéine C/EBP α , ainsi que deux HRE. Ces 4 sites présents dans la région promotrice de PAI-1 sont essentiels à son expression en réponse à l'hypoxie (Liao *et al.* 2007).

Plusieurs autres éléments régulateurs cis et facteurs de transcription (activateurs, co-activateurs ou répresseurs) ont également été caractérisés. En effet, le promoteur de PAI-1 contient également un site de liaison pour la protéine activatrice-1 (AP-1), CTF/NP-1, et les Smads (Riccio *et al.* 1992; Yingling *et al.* 1997; Dennler *et al.* 1998)

4.2.3 Rôles de PAI-1

La majorité des fonctions de PAI-1 sont dues à sa capacité à interagir avec les activateurs du plasminogène uPA et tPA. Son activité inhibitrice sur tPA interfère avec la fibrinolyse. Le rôle de PAI-1 dans la fibrinolyse sera vu en détail dans le point 4.2.3.5.

Son interaction avec uPA lui permet de réguler la dégradation de la matrice extracellulaire mais également de le localiser à la surface cellulaire et donc de réguler la migration, l'adhésion et l'apoptose des cellules.

4.2.3.1 La migration cellulaire

La régulation de la migration cellulaire par PAI-1 est très controversée. En effet, *in vitro*, selon le type cellulaire (endothéliales, épithéliales, cancéreuses,...), les conditions de culture, ainsi que les protéines de la matrice extracellulaire présentes, PAI-1 agit soit en favorisant, soit en inhibant la migration.

En se liant au complexe uPA/uPAR, PAI-1 favorise la migration sur la vitronectine. En effet, présent dans ce complexe, il induit l'internalisation de ce dernier de façon LRP-1 dépendante. Le complexe PAI-1/uPA est alors dégradé dans les lysosomes. L'uPAR, quant à lui, est recyclé à la surface apicale de la cellule, au « *leading edge* », ce qui induit la migration en alternant des phases d'attachement et de détachement des cellules à la matrice extracellulaire (Chapman *et al.* 2001). De plus, via son interaction directe avec LRP-1, PAI-1 est capable d'induire la migration cellulaire via l'activation de la voie JAK/STAT (Degryse *et al.* 2004).

D'ailleurs, l'inhibition de l'interaction entre PAI-1 et LRP-1 par le TM5275 empêche la migration des macrophages (Ichimura *et al.* 2013).

Bien que de nombreuses études tendent à montrer PAI-1 comme un inducteur de la migration, d'autres travaux relatent que PAI-1 peut également l'inhiber. En effet, une étude réalisée sur des cellules épithéliales provenant de souris PAI-1^{-/-} a montré que PAI-1 inhibe la migration en empêchant l'attachement des cellules à la vitronectine (Lazar *et al.* 2004). Stefansson a également montré que PAI-1 inhibe la migration des cellules de muscles lisses en empêchant la liaison de la vitronectine aux intégrines $\alpha\beta 3$ par encombrement stérique (Stefansson *et al.* 1996).

L'effet de PAI-1 sur la migration n'est pas seulement dépendant du type cellulaire mais également de la nature de la matrice extracellulaire. PAI-1 inhibe la migration des cellules HBMEC (*Human Brain Microvascular Endothelial Cell*) semées sur de la vitronectine, mais il la stimule vers la fibronectine. Au vu de l'abondance de la fibronectine au sein des tumeurs, et de la présence de vitronectine en périphérie des vaisseaux sanguins, il a été suggéré que PAI-1 permet aux cellules endothéliales d'échapper à leur environnement riche en vitronectine pour ainsi pénétrer dans la zone avascularisée enrichie en fibronectine au sein des tumeurs (Isogai *et al.* 2001).

4.2.3.2 L'adhésion cellulaire

En interagissant avec le domaine somatomédine B, PAI-1 inhibe la liaison de l'uPAR à la vitronectine, et empêche donc l'adhésion cellulaire (Deng *et al.* 1996; Deng *et al.* 2001). De plus, la liaison de PAI-1 au domaine somatomédine B inhibe aussi l'adhésion cellulaire dépendante de l'intégrine $\alpha\beta 3$, vraisemblablement par encombrement stérique de son site de liaison (Stefansson *et al.* 1996). Etant donné la plus forte affinité de la vitronectine pour PAI-1 que pour l'uPAR, PAI-1 favorise également le détachement cellulaire (Deng *et al.* 1996). Czekay a démontré que PAI-1 peut également détacher les cellules de la vitronectine ou d'autres types de protéines de la matrice extracellulaire tels que le collagène de type I ou la fibronectine en inactivant spécifiquement les intégrines impliquées dans l'adhésion. Ce processus, qui requiert l'interaction entre l'uPAR et les intégrines, peut également conduire à l'internalisation de ce complexe via la protéine LRP-1 (Czekay *et al.* 2003; Stefansson *et al.* 2007; Czekay *et al.* 2009).

4.2.3.3 L'apoptose

Par sa capacité à induire le détachement, PAI-1 peut entraîner la mort cellulaire par anoïkose. De plus, une autre étude menée sur des cellules endothéliales provenant de souris PAI-1^{-/-} a montré que PAI-1 induit l'apoptose des cellules endothéliales en inhibant l'activation de la voie de signalisation AKT (Balsara *et al.* 2006). De façon surprenante, PAI-1 est également une protéine anti-apoptotique. En effet, il est capable de protéger les cellules endothéliales de l'apoptose dépendante de FASL, en inhibant la génération du fragment de 21,5 kDa issu du clivage protéolytique de FASL par la plasmine (Bajou *et al.* 2008).

4.2.3.4 L'angiogenèse et la croissance tumorale

Le rôle de PAI-1 dans l'angiogenèse est très complexe. Selon le contexte, sa concentration et le modèle utilisé, il se comporte soit comme un agent pro-angiogène soit anti-angiogène.

En concentration supraphysiologique, PAI-1 inhibe la néovascularisation dans un modèle de CAM via ses capacités à inhiber l'activité protéolytique de l'uPA mais également via sa liaison à la vitronectine (Stefansson *et al.* 2001). Par contre, en concentration physiologique (nanomolaire), il se définit comme un agent pro-angiogène. C'est son activité antiprotéolytique qui lui confère sa capacité à induire l'angiogenèse (Devy *et al.* 2002).

Par ailleurs, le rôle de PAI-1 sur l'angiogenèse et la croissance tumorale n'est pas mieux défini. Il est dépendant des conditions expérimentales, du stade de la progression tumorale et de l'origine des cellules. Il a été montré que des kératinocytes malins (PVDA) implantés dans des souris PAI-1^{-/-} sont incapables d'induire la vascularisation et par conséquent d'envahir les tissus hôtes (Bajou *et al.* 1998). PAI-1 contrôle la vascularisation tumorale *in vivo* via son interaction avec les protéases et non via sa liaison à la vitronectine (Bajou *et al.* 2001). De façon similaire, la croissance tumorale de fibrosarcome T241 et de neuroblastome est supprimée dans les souris déficientes en PAI-1 comparée aux souris *wild type* (Gutierrez *et al.* 2000; Bajou *et al.* 2008). Cependant, des données contradictoires ont aussi été documentées. En effet, la déficience de PAI-1 n'affecte pas la taille de la tumeur primaire ni le potentiel métastatique des cellules de mélanomes B16F10 (Eitzman *et al.* 1996). D'autres études ont également montré que la présence de PAI-1 actif inhibe la croissance tumorale de mélanome humain M21 et de carcinome pancréatique PC3 (McMahon *et al.* 2001; Chen *et al.* 2008).

4.2.3.5 La fibrinolyse

En interagissant avec l'activateur du plasminogène tissulaire (tPA), PAI-1 régule également les processus de fibrinolyse en limitant la production excessive de plasmine. Chez l'homme, l'absence de PAI-1 mène à une hyperfibrinolyse et à des saignements anormaux suite à des traumatismes ou des chirurgies (Minowa *et al.* 1999). Le rôle de PAI-1 dans les événements thrombotiques a été confirmé en utilisant des modèles de souris transgéniques. Les souris surexprimant PAI-1 souffrent de thromboses au sein des artères coronaires (Erickson *et al.* 1990). Par ailleurs, les souris déficientes en PAI-1 (PAI-1^{-/-}) présentent une dissolution plus rapide du caillot (Carmeliet *et al.* 1993). Dans le plasma, PAI-1 est complexé à la vitronectine, ce qui le maintient dans sa configuration active. Il a d'ailleurs été montré que les souris déficientes en vitronectine présentent un temps d'occlusion plus long par rapport aux souris *wild type* (Eitzman *et al.* 2000). Toutes ces données confirment que PAI-1, dans sa conformation active, inhibe la fibrinolyse et la thérapie antithrombotique en empêchant ou en retardant la dissolution des caillots de fibrine.

4.3 L'uPA

L'uPA est généré sous la forme d'un zymogène (pro-uPA) de 54 kDa qui comprend trois domaines indépendants: le domaine GFD (*Growth Factor Domain*), un domaine *Kringle* et un domaine sérine protéase. La liaison du pro-uPA à son récepteur mène à l'activation de l'uPA en clivant le propeptide entre les résidus Lys₁₅₈ et Ile₁₅₉. L'uPA actif, composé de deux chaînes (A et B) reliées entre elles par un pont disulfure, initie alors une cascade protéolytique entraînant la conversion du plasminogène en plasmine à la surface cellulaire. La plasmine générée dégrade alors la matrice extracellulaire, ce qui contribue à la migration, l'adhésion et l'invasion cellulaire (Takada 2012; Yue *et al.* 2012).

En plus de participer à la dégradation de la matrice, l'uPA lié à l'uPAR initie toute une série de voies de signalisation impliquées dans l'adhésion, la prolifération et la survie cellulaire (Binder *et al.* 2007; Blasi *et al.* 2010).

L'uPA est produit par les cellules endothéliales, les cellules des muscles lisses, les monocytes, les macrophages, les fibroblastes, les cellules épithéliales ainsi que les cellules tumorales (Fuhrman 2012).

4.4 uPAR

4.4.1 Structure de la protéine

L'uPAR est un polypeptide de 283 acides aminés hautement glycosylé et lié à la membrane plasmique par un lien glycosyl phosphatidylinositol (GPI). Il contient trois domaines de 90 acides aminés désignés DI-DII-DIII connectés entre eux par de courtes régions « linker ».

L'uPA se lie au domaine DI de l'uPAR via son domaine GFD, ce qui lui permet d'être inséré dans la structure concave de l'uPAR formé par ses trois domaines (**Figure 19**) (Huai *et al.* 2006; Blasi *et al.* 2010; Smith *et al.* 2010; Fuhrman 2012).

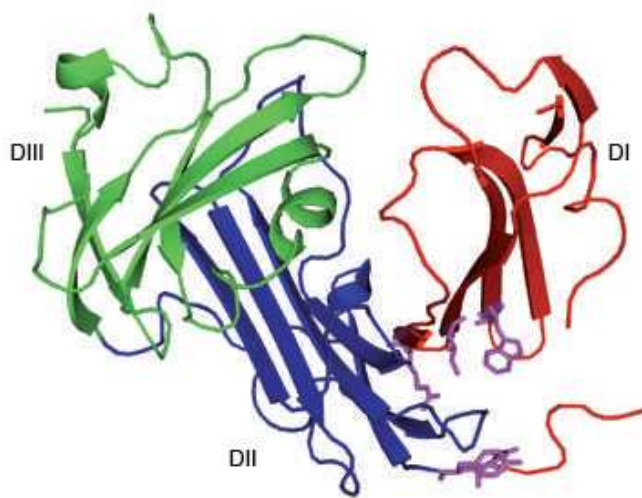


Figure 19 : Structure tri-dimensionnelle de l'uPAR. Le domaine DI est représenté en rouge, le domaine DII est en bleu et le domaine DIII en vert. Les sites de liaison du domaine somatomédine de la vitronectine sont représentés en violet. Le site de liaison de l'uPA est localisé dans la cavité centrale formé par les trois domaines. Figure adaptée de (Smith *et al.* 2010).

La liaison de l'uPA induit la dimérisation de l'uPAR, ce qui favorise son interaction avec le domaine somatomédine B de la vitronectine (Caiolfa *et al.* 2007).

Etant exempt de domaine transmembranaire et cytosolique, l'uPAR doit interagir avec des co-récepteurs (les intégrines, LPR-1, EGFR, ...) pour transduire une voie de signalisation. Ce sont les domaines DII et DIII de l'uPAR qui sont impliqués dans ces interactions. Les interactions entre l'uPAR et les co-récepteurs sont détaillées dans le point 4.4.3.

4.4.2 Régulation de l'expression

L'uPAR est exprimé par de nombreuses cellules. Dans les individus sains, il est modérément exprimé dans de nombreux tissus incluant les poumons, les reins, la rate, les vaisseaux, l'utérus, la vessie, le thymus, le cœur, le foie et les testicules. Une expression importante de l'uPAR est observée dans les tissus subissant un remodelage important tels que les cellules du trophoblaste, les kératinocytes et les cellules endothéliales. L'expression de

l'uPAR est augmentée dans des conditions pathologiques incluant les cancers, l'inflammation et les infections (Blasi *et al.* 2010).

L'uPAR est exprimé dans de nombreux cancers humains tels que les tumeurs solides, les leucémies et les lymphomes. L'expression élevée de l'uPAR dans les cancers est souvent associée à un mauvais diagnostic (Bene *et al.* 2004; Smith *et al.* 2010).

Au niveau moléculaire, dans les cellules tumorales, l'expression de l'uPAR peut être induite par les voies de signalisation des MAPK, Wnt. Dans les cellules endothéliales, l'inhibition de la phosphorylation des ERK par DEP-1 (*Density Enhanced Phosphatase-1*) réduit l'expression de l'uPAR (Brunner *et al.* 2011).

Le promoteur de l'uPAR contient également des HRE, des sites de liaison de NF- κ B, de SP1 (*Specificity Protein 1*), de Ets-1 et d'AP2 (*Activator protein 2*) (Wang *et al.* 2000; Ragno 2006; Rius *et al.* 2008; Smith *et al.* 2010).

Au niveau post transcriptionnel, l'expression d'uPAR est aussi régulée par des protéines qui se lient et stabilisent l'ARNm *uPAR* tels que HuR (*HU antigen*) et hnRNPC (*heterogeneous nuclear RiboNucleoProtein C*). La protéine P53, quant à elle, accélère la dégradation de son ARNm en se liant à sa région 3'UTR (Shetty *et al.* 2007; Smith *et al.* 2010).

4.4.3 L'interactome uPAR

Outre sa fonction protéolytique suite à la liaison de l'uPA, l'uPAR possède également diverses activités biologiques. Comme tout récepteur membranaire, il est impliqué dans diverses voies de signalisation entraînant la prolifération, l'adhésion, la survie et la migration cellulaire. Suite à la liaison à son ligand, l'uPAR peut subir des changements conformationnels favorisant son interaction avec des co-récepteurs. De plus, étant donné que l'uPA se lie dans la cavité centrale de l'uPAR, il ne gêne aucune interaction latérale essentielle aux voies de transduction induites par l'uPAR. En effet, étant exempt de domaine transmembranaire, l'uPAR doit interagir avec des protéines membranaires pour pouvoir transduire un signal.

Au vu de la diversité des co-récepteurs de l'uPAR (cavéoline, LRP-1, intégrines, EGFR, PDGFR, vitronectine,...), il est capable de transduire de nombreuses voies de signalisation tels que MAPK, FAK, PI3K, RAC, STAT, ... (**Figure 20**).

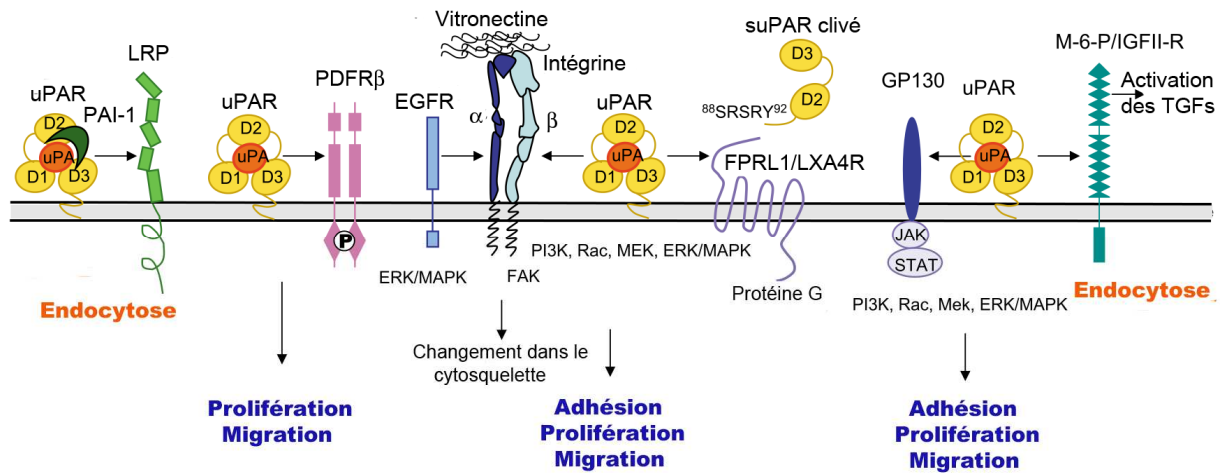


Figure 20: Schéma résumant les interactions de l'uPAR avec ses différents partenaires et menant à différentes voies de signalisation. D'après (Binder *et al.* 2007).

Dans ce travail, seules les interactions entre l'uPAR et les intégrines, LRP-1 et EGFR sont étudiées.

4.4.3.1 Les intégrines

Les intégrines sont des composants majeurs de l'interactome de l'uPAR. En effet, l'interaction entre l'uPAR et les intégrines a été montrée pour la première fois par co-immunoprécipitation en 1995 (Bohuslav *et al.* 1995). Ensuite, il a été montré par de nombreuses études que l'uPAR peut interagir physiquement avec les intégrines α_v , β_1 , β_2 ainsi qu'avec les hétérodimères $\alpha_5\beta_1$ et $\alpha_3\beta_1$ (Xue *et al.* 1997; Wei *et al.* 2001; Pluskota *et al.* 2003).

Le site de liaison des intégrines sur l'uPAR n'est pas encore réellement connu. Ses domaines DII et DIII semblent être impliqués dans l'interaction avec les intégrines. Une étude menée par le groupe de Chapman a montré que l'acide aspartique 262 et l'histidine 249 du domaine DIII de l'uPAR sont des sites importants pour l'interaction avec les intégrines $\alpha_3\beta_1$ et $\alpha_5\beta_1$, respectivement (Wei *et al.* 2007). Indépendamment à cette étude, le groupe d'Ossowski a identifié une région de 9 acides aminés (résidus 240-248) venant du domaine DIII, capable d'interagir avec l'intégrine $\alpha_5\beta_1$ purifiée (Chaurasia *et al.* 2006). De plus, la substitution de la sérine 245 par une alanine empêche l'interaction avec l'intégrine. Toutes les données fournies par ces études suggèrent que les résidus 240 à 250 du domaine DIII de l'uPAR constituent les sites de liaison des intégrines $\alpha_5\beta_1$. L'équipe de Blasi, quant à elle, a identifié une séquence de 13 acides aminés ($^{130}\text{IQEGEEGRPKDDR}^{142}$) dans le domaine DII

responsable de l'interaction avec les intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha v\beta 3$. Cependant, il n'exclut pas la présence éventuelle de sites de liaison dans le domaine DIII de l'uPAR (Degryse *et al.* 2005)

L'uPAR, quant à lui, peut interagir avec la chaîne α et β des intégrines. En effet, l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ s'associe avec l'uPAR via leurs résidus 242-246 situés dans la chaîne $\alpha 3$ (Wei *et al.* 2001). Une seconde étude a identifié un site de liaison dans la chaîne β aux résidus 224 à 232 de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Wei *et al.* 2005).

Les conséquences des interactions entre les intégrines et l'uPAR sont d'autant plus grandes qu'elle modifie non seulement les effets et les voies de signalisations des intégrines mais aussi de l'uPAR. En effet, deux études menées indépendamment montrent que l'association entre l'uPAR et les intégrines $\alpha 5\beta 1$ modifie la conformation des intégrines et par conséquent régule les fonctions et voies de signalisation de celles-ci (Liu *et al.* 2002; Wei *et al.* 2005). De plus, lorsque les cellules cancéreuses HT1080 et H1299 sont déficientes en uPAR, l'activation des ERK dépendante des intégrines $\alpha 5\beta 1$ est réduite (Tang *et al.* 2008). Cette association est également cruciale aux voies de signalisation et aux effets induits par l'uPAR. En effet, l'expression d'un mutant d'uPAR portant une double mutation H249A-D262A, incapable de se lier aux intégrines $\alpha 5\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$, dans les cellules cancéreuses de poumon, empêche l'activation des voies de transduction induites par l'uPA à savoir p-GSK3 β , p-AKT, p-STAT (Tang *et al.* 2008). De plus, cette interaction uPAR/intégrines peut provoquer des recrutements protéiques dans l'interactome de l'uPAR tels que l'EGFR, favorisant ainsi l'angiogenèse (LaRusch *et al.* 2010). Ce point est détaillé dans la rubrique 4.4.4.

4.4.3.2 LRP-1

LRP-1 (*Low-density lipoprotein Receptor-related Protein-1*) ou CD91 est une protéine membranaire appartenant à la superfamille des récepteurs LDL (*Low Density Lipoprotein*). LRP-1 natif est une protéine de 600 kDa qui est clivée durant sa biosynthèse en deux polypeptides associés non covalentiellement: un fragment C-terminal de 85 kDa et une chaîne N-terminale de 515 kDa. La partie extracellulaire est composée de 4 domaines (1 à 4) de liaison aux ligands. Les différents ligands, se lient préférentiellement aux domaines 2 et 4 de la partie extracellulaire de LRP-1. LRP-1 se lie à plus de 30 ligands différents incluant PAI-1, tPA, les facteurs de coagulation, la leptine, la lactoferrine. (Gaultier *et al.* 2006).

Son domaine cytosolique, quant à lui, se lie à des protéines adaptatrices impliquées soit dans la transduction du signal ou dans l'endocytose des récepteurs. Il contient deux motifs NPxY, un motif YxxL et deux motifs di-leucines qui seraient associés à l'endocytose rapide de LRP-1 (Deane *et al.* 2008). De plus, sa queue cytosolique peut également être phosphorylée sur les résidus sérine et/ou tyrosine, ce qui lui permet d'interagir avec des protéines adaptatrices associées aux voies de signalisations telles que disabled-1 (Dab-1), FE65, JNK, PSD95 (*Postsynaptic density protein 95*) (Spuch *et al.* 2012). En interagissant avec des protéines adaptatrices, LRP-1 peut activer la voie des MAPK et induire l'expression de gènes cibles directement impliqués dans la composition de la matrice extracellulaire (**figure 21**) (Gaultier *et al.* 2006).

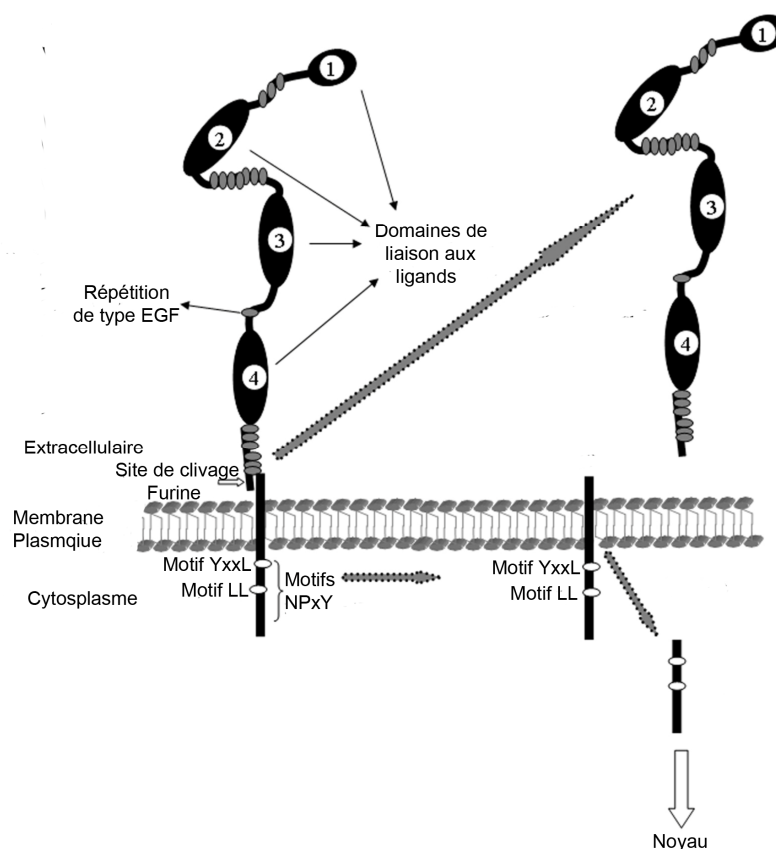


Figure 21: Représentation schématique de LRP-1. LRP-1 contient 5 domaines différents, le domaine de liaison aux ligands, les répétitions de type EGF, le domaine lié aux sucres, le domaine transmembranaire et le domaine intracellulaire. La queue cytosolique de LRP-1 contient la séquence NPXY qui interagit avec les protéines adaptatrices impliquées dans l'endocytose et le transport intracellulaire. LRP-1 peut être clivé par la furine en deux sous-unités : la sous-unité α N-terminale de 515 kDa qui contient les domaines de liaison aux ligands et la sous-unité β C-terminale qui contient les domaines transmembranaires et cytosolique. Modifié d'après (Gaultier *et al.* 2006).

Le domaine cytoplasmique de LRP-1 peut également être clivé par la furine et transloquer directement dans le noyau, ce qui lui confère également une activité

transcriptionnelle. Bien qu'il y ait très peu de gènes transcriptionnellement régulés par LRP-1 identifiés, les gènes associés au réseau d'actine ou aux complexes d'adhésion focale le sont probablement (Dedieu *et al.* 2008).

LRP-1 est une protéine hautement exprimée au niveau des neurones, des astrocytes activés. Il est également très exprimé dans différents types cellulaires du système nerveux central. Au niveau des cellules endothéliales, l'expression de LRP-1 est controversée. Il a été reporté précédemment que les cellules endothéliales n'exprimaient pas LRP-1. Maintenant, il est reporté que LRP-1 n'est pas exprimé de manière ubiquiste au sein des cellules endothéliales et que cela est dépendant de l'origine et du type cellulaire (Moestrup *et al.* 1992; Lupu *et al.* 1994; Degryse *et al.* 2004; Spuch *et al.* 2012).

4.4.3.2.1. Rôle de LRP-1 dans l'interactome de l'uPAR

LRP-1, en interagissant avec le domaine DIII de l'uPAR lié au complexe uPA/PAI-1, est un composant de l'interactome de l'uPAR (Czekay *et al.* 2001). LRP-1 est directement impliqué dans l'internalisation du complexe PAI-1/uPA/uPAR suivie du recyclage de l'uPAR à la membrane plasmique, favorisant ainsi la migration cellulaire (Conese *et al.* 1995; Nykjaer *et al.* 1997).

De plus, LRP-1 peut également induire l'internalisation du complexe PAI-1/uPA/uPAR/intégrines suivie du recyclage du complexe uPAR/intégrines à la surface cellulaire, favorisant ainsi le détachement et la migration cellulaire. En absence de LRP-1, l'inhibition de l'internalisation de l'uPAR induit l'augmentation de son association avec les intégrines ainsi que la stabilisation du complexe uPAR/intégrines, modifiant ainsi leur capacité à transduire les signaux. Par exemple, dans les cellules cancéreuses, l'activation des ERK dépendantes des intégrines est régulée par la stabilité du complexe uPA/uPAR/intégrine $\beta 1$ et est donc par conséquent modulée par LRP-1 (Degryse *et al.* 2001; Dedieu *et al.* 2008).

4.4.3.3 EGFR

ErbB1 ou EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), membre de la famille des récepteurs tyrosine kinase ErbB, est une glycoprotéine de 170 kDa composée d'un domaine extracellulaire, d'une région transmembranaire et d'un domaine intracellulaire possédant l'activité tyrosine kinase. Le domaine extracellulaire d'EGFR est le site de liaison de ces différents ligands dont les trois principaux l'EGF, l'amphiréguline et TGF- α (Citri *et al.* 2006).

En condition physiologique, l'EGFR est surtout impliqué dans le développement des cellules épithéliales. En effet, les souris déficientes en EGFR sont létales. Elles présentent des problèmes dans le cerveau suite à une anomalie dans la prolifération, la migration et la différenciation des cellules épithéliales (Citri *et al.* 2006).

En condition pathologique, EGFR est impliqué dans de nombreux types de cancers humains, où il contrôle la prolifération et la survie des cellules métastatiques. D'ailleurs, les membres de la famille ErbB sont considérés comme étant de bonnes cibles dans la thérapie anti-cancéreuse (Yarden 2001). Au niveau clinique, deux types d'inhibiteurs de l'EGFR, un anticorps monoclonal antagoniste et des petites molécules qui inhibent son activité tyrosine kinase (ZD1839 et PKI166), se révèlent efficaces. En effet, ces inhibiteurs empêchent non seulement la croissance tumorale mais ont également des propriétés anti-angiogènes (Bruns *et al.* 2000; Thomas *et al.* 2004).

4.4.3.3.1. Voie de signalisation de l'EGFR

La liaison du ligand au domaine extracellulaire induit non seulement l'homodimérisation de l'EGFR mais également l'hétérodimérisation avec un autre membre de la famille ErbB tels que ErbB2 (Her2), ErbB3 (Her3) ou ErbB4 (Her4) (Riese *et al.* 1998). Etant donné qu'ErbB2 ne sait pas interagir avec les ligands et qu'ErbB3 n'a pas d'activité tyrosine kinase, seule la formation d'hétérodimères avec d'autres membres ErbB leur confère la capacité de transduire un signal à l'intérieur de la cellule (Citri *et al.* 2006).

La dimérisation du récepteur entraîne un changement conformationnel, l'activation des kinases du récepteur, ainsi que l'autophosphorylation de ses résidus tyrosines situés dans la région COOH terminale. Ces diverses phosphorylations induisent le recrutement de différentes protéines adaptatrices telles que la protéine Grb2 (*Growth-factor Receptor Bound 2*) et la protéine Shc (*Src-Homology-2-Containing*), qui sont responsables du recrutement de Ras et de l'activation des MAPK. Une autre voie directement activée par EGFR est la voie STAT. Bien qu'aucun site d'interaction pour PI3K n'ait été trouvé sur EGFR, la voie AKT peut être activée de façon indirecte soit via Ras-PI3K-AKT, soit via l'interaction entre la protéine « *docking* » Gab1 et l'EGFR. Par contre, comme ErbB3 possède un site d'interaction avec PI3K, la formation de l'hétérodimère EGFR/ErbB3 peut directement activer la voie AKT. Via ces différentes voies de transduction, EGFR est surtout impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire (Schlessinger 2002; Citri *et al.* 2006; Katz *et al.* 2007; Yoshida *et al.* 2010).

Suite à la liaison du ligand, le complexe ligand-EGFR est rapidement internalisé, ce qui perpétue l'activation des voies AKT et ERK. Ensuite, l'EGFR peut être recyclé à la membrane plasmique ou être dégradé (**figure 22**).

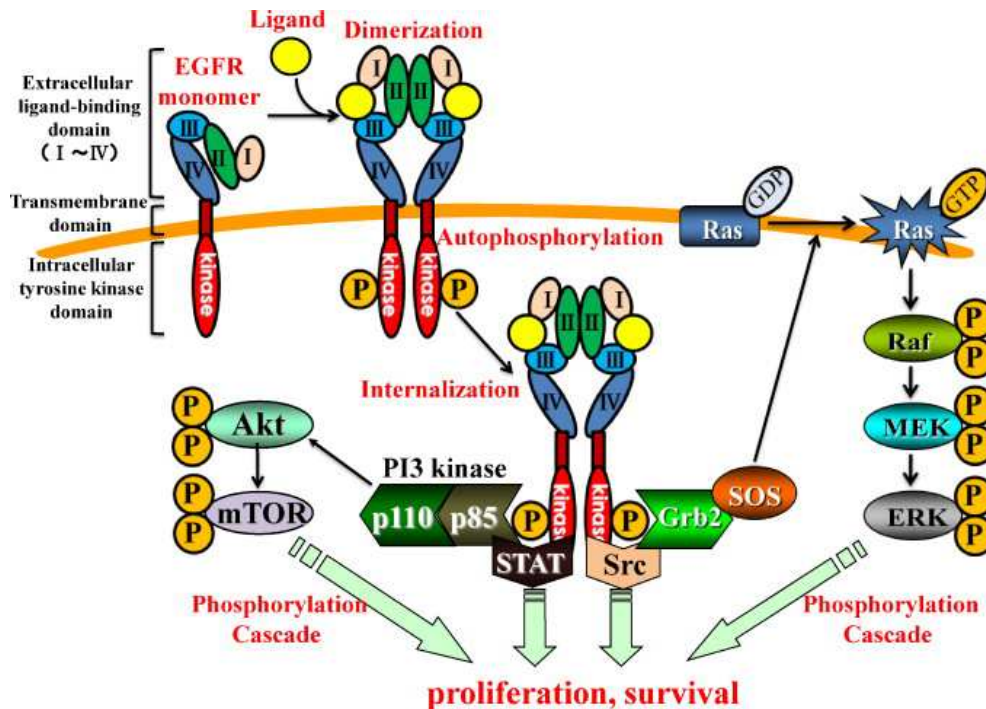


Figure 22: Représentation schématique de la voie de signalisation de l'EGFR. La liaison du ligand induit des changements conformationnels et la dimérisation de l'EGFR suivie de l'activation de son activité kinase, de l'autophosphorylation des résidus tyrosines situés dans son domaine intracellulaire. L'internalisation suivie de l'EGFR entraîne son interaction avec le domaine SH2 de nombreuses protéines de signalisation telles que Grb2 et PI3K. L'association de Grb2 avec Sos induit l'activation de la voie de signalisation Ras/Raf/MEK/ERK, ce qui induit la prolifération cellulaire. La voie de signalisation PI3K/AKT, quant à elle, est associée à la survie cellulaire. D'après (Yoshida *et al.* 2010).

4.4.3.3.2 EGFR et l'angiogénèse

L'impact de l'EGFR dans l'angiogénèse devient de mieux en mieux admis. En effet, il a été montré que le ZD1839, un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR, est capable d'inhiber la croissance de tumeurs humaines mais également d'inhiber l'angiogénèse (Hirata *et al.* 2002). Cependant, le mécanisme par lequel EGFR régule l'angiogénèse n'est pas encore réellement clair. En effet, n'étant pas exprimé dans les cellules endothéliales, l'EGFR induit l'angiogénèse de façon indirecte, en induisant dans les cellules cancéreuses l'expression et la sécrétion de facteurs angiogènes tels que le VEGF ou l'angiopoïétine (Maity *et al.* 2000; Kim *et al.* 2003). Par contre, l'étude réalisée par Sini montre que les HUVEC et les HDMVECs (*Human Dermal MicroVascular Endothelial Cell*) expriment toutes deux ErbB1 et ErbB2 mais pas ErbB3 ni ErbB4 (Sini *et al.* 2005). De plus, le ZD1839 est capable d'inhiber la migration et la formation de tubes des HUVEC *in vitro* ainsi que la néovascularisation *in vivo*

dans un modèle de cornée (Hirata *et al.* 2002). Ces données montrent que l'EGFR peut également induire l'angiogenèse en agissant directement dans la cellule endothéliale.

4.4.3.3. EGFR dans l'interactome de l'uPAR

Au vu de la surexpression de l'EGFR et de l'uPAR dans les cellules tumorales, la présence de l'EGFR dans l'interactome de l'uPAR a surtout été rapportée au niveau de ces cellules. L'effet de cette interaction est bénéfique pour les deux protéines. En effet, dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB 231, l'activité mitogène de l'EGF via l'activation de l'EGFR est bloquée lorsque les cellules sont transfectées avec un siARN ciblant l'uPAR ou traitées avec un anticorps bloquant la liaison de l'uPA à l'uPAR (Jo *et al.* 2007). De plus, dans les cellules du cancer de la prostate (DU145), l'EGFR présent dans le complexe uPAR/intégrine $\alpha 5\beta 1$ /EGFR est phosphorylé sur sa tyrosine 1173, ce qui le rend capable d'activer la voie AKT et celle des MAPK (Liu *et al.* 2009).

Cette association permet également la transmission du signal induit par l'uPAR. En effet, dans les cellules de carcinomes humains HEP3, l'inhibition de l'activité kinase de l'EGFR bloque l'activation des ERK induites par l'uPAR (Liu *et al.* 2002).

De même, au niveau des cellules endothéliales, la formation du complexe uPAR/intégrine $\beta 1$ /EGFR induit l'angiogenèse *in vitro* via l'activation des voies AKT et ERK (LaRusch *et al.* 2010).

4.4.4 Rôle de l'uPAR dans l'angiogenèse

L'uPAR est un acteur essentiel dans l'angiogenèse. En effet, selon Balsara les cellules endothéliales issues de souris déficientes en uPAR n'ont qu'une angiogenèse faiblement activée suite à un traitement par des facteurs angiogènes tels que le VEGF. Par des tests *in vitro* et *in vivo*, ils ont montré que la migration, l'adhésion, la tubulogenèse ainsi que la prolifération de ces cellules sont altérées par rapport aux cellules endothéliales provenant de souris sauvages (Balsara *et al.* 2011). De plus, l'invasion cellulaire induite par le VEGF requiert à la fois les intégrines $\beta 1$ ainsi que le complexe uPA/uPAR. Le VEGF induit un changement conformationnel, dépendant de la voie PI3K, des intégrines $\beta 1$ à la surface des cellules endothéliales. Cette modification de conformation induit l'activation des pro-MMP2 en MMP2. Les MMP2 activent alors le pro-uPA en uPA, lorsqu'il est lié à l'uPAR, ce qui induit la dégradation de la matrice extracellulaire et par conséquent l'invasion cellulaire (Prager *et al.* 2004). En 2004, Prager a également montré que le VEGF, via le VEGFR-2,

induit l'internalisation de l'uPAR et des intégrines $\alpha 5\beta 1$, suite à la formation du complexe PAI-1/uPA/uPAR et à son interaction avec LRP-1. Cette internalisation suivie du recyclage de l'uPAR et des intégrines à la surface apicale des cellules favorise la migration des cellules endothéliales (Prager *et al.* 2004; Alexander *et al.* 2012). Les effets du VEGF sur uPAR sont repris dans la **figure 23**.

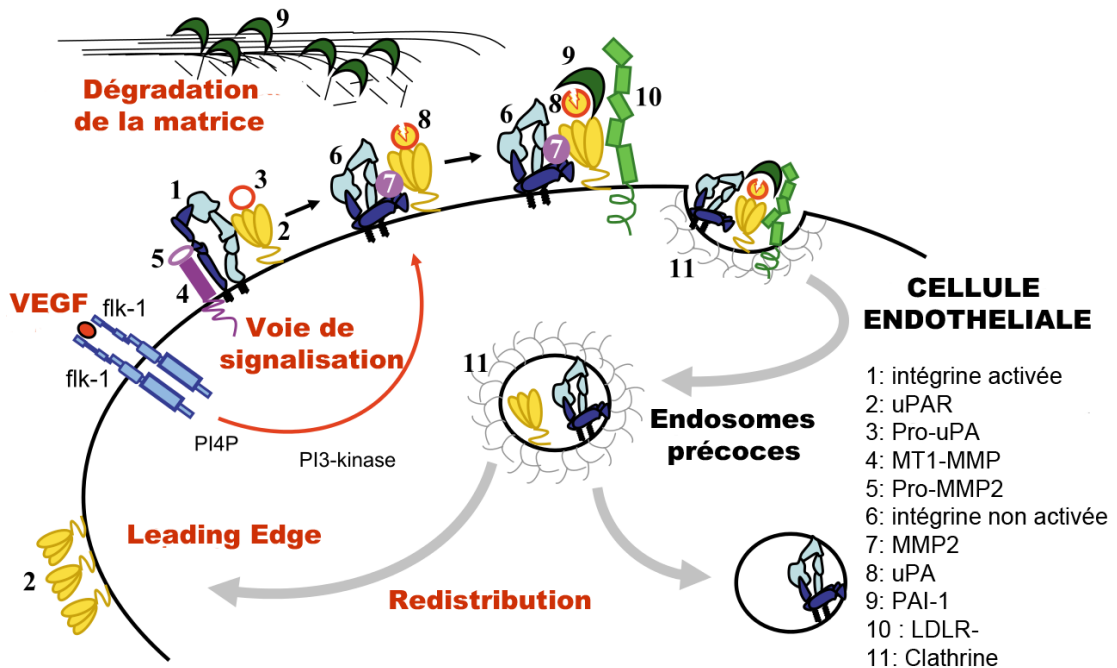


Figure 23: Evénements déclenchés dans la cellule endothéliale suite à la stimulation au VEGF. Le VEGF lié à son récepteur induit l'activation du pro-uPA en uPA lié à l'uPAR. uPA actif interagit avec PAI-1. Ce complexe est internalisé par un mécanisme faisant intervenir LRP-1. uPAR est ensuite redistribué au point d'adhésion focale, le *leading edge*. D'après (Binder *et al.* 2007).

Récemment, cette équipe a également montré que l'implication de l'uPAR dans la migration des cellules endothéliales n'est pas seulement restreinte au VEGF mais également à l'EGF, FGF2, HGF (Poettler *et al.* 2012).

L'uPAR, en agissant via de nombreuses voies de signalisation tels que MAPK, PI3K, FAK, NF- κ B et JAK/STAT est capable de favoriser la migration ainsi que la survie cellulaire. En effet, dans les cellules endothéliales adhérentes, l'uPA en se liant à son récepteur est capable d'activer la voie NF- κ B et d'induire l'expression de XIAP (*X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein*). Cette activation est non seulement dépendante de l'uPAR mais également de LRP-1 (Prager *et al.* 2009).

But du travail

L'angiogenèse est un des processus clés dans la croissance tumorale et dans la dissémination des métastases. Elle est déclenchée par l'expression de facteurs angiogènes produits par les cellules tumorales ou cellules stromales, dont le plus connu et le mieux caractérisé est le VEGF. C'est pourquoi une des stratégies pour combattre le cancer est de développer des composants qui ciblent ces facteurs pro-angiogènes, tels que le traitement anti-VEGF. Malheureusement, cette thérapie est confrontée à quelques limitations telles qu'une faible réponse, l'induction de mécanisme de résistances (production d'autres facteurs de croissance, augmentation de la maturation des vaisseaux sanguins,...) ainsi qu'une toxicité (Ebos *et al.* 2009).

Dans notre laboratoire, nous travaillons sur un inhibiteur de l'angiogenèse, la prolactine 16K (PRL 16K), le fragment N-terminal de 16 kDa issu de la prolactine. Les résultats obtenus précédemment font de la PRL 16K un agent antiangiogène très prometteur agissant suivant des mécanismes différents de la thérapie anti-VEGF. En effet, nous avons montré *in vivo* que la PRL 16K est capable d'inhiber l'angiogenèse dans plusieurs modèles (Struman *et al.* 1999; Nguyen *et al.* 2007; Sabatel *et al.* 2010). Au niveau *in vitro*, nous savons déjà que la PRL 16K est capable d'inhiber les effets du bFGF (*basic Fibroblast Growth Factor*) (Tabruyn *et al.* 2005) et du VEGF. Récemment, dans notre laboratoire, il a été montré que la PRL 16K inhibe également la maturation des vaisseaux sanguins en perturbant le recouvrement péricytaire et ce en inhibant la voie de signalisation Delta Notch (Nguyen *et al.* 2011). Tous ces résultats montrent que ce facteur anti-angiogène semble agir suivant des mécanismes différents à celui des thérapies anti-VEGF. A la différence des thérapies actuelles qui ne ciblent qu'une voie angiogène (celle du VEGF), la PRL 16K est capable de cibler aussi d'autres voies d'activation comme celle du bFGF. Bien qu'en 1992, un site de liaison saturable, spécifique et de haute affinité pour la PRL 16K ait été décrit, celui-ci demeure inconnu. Le but majeur de ce travail est, donc d'identifier le récepteur de la PRL 16K, afin de comprendre le mécanisme d'action de cette dernière.

De plus, la combinaison du double hybride en levure, des expériences de proximité (PLA) et de co-immunoprécipitation indiquent que la PRL 16K agit en interagissant avec le complexe PAI-1/uPA/uPAR. Les résultats obtenus dans cette première partie du travail montrent un rôle essentiel de l'uPAR dans l'inhibition de l'angiogenèse par la PRL 16K.

Nous nous sommes alors demandé si l'uPAR est également requis dans la situation opposée à savoir une induction de l'angiogenèse. Comme inducteur, nous avons choisi d'étudier le VEGF.

Matériel et Méthodes

1. Souris

La génération de souris C57BL/6J possédant une délétion du gène PAI-1 (PAI-1^{-/-}) a été décrite par (Carmeliet *et al.* 1993) et celle possédant une délétion du gène uPAR (uPAR^{-/-}) a été décrite précédemment par (Bugge *et al.* 1995)

Toutes les procédures animales sont approuvées par l'institut de la protection des animaux et sont réalisées en accord avec les directives de la commission d'éthique animale de l'Université de Liège.

2. Cellules

Les cellules endothéliales humaines de la veine ombilical (HUVEC) sont isolées comme précédemment décrit (Jaffe *et al.* 1973). Brièvement, la veine ombilicale est lavée au PBS puis remplie d'une solution de trypsine (0,05% trypsine, 0,2% EDTA, PBS, pH 7,6), clampée et ensuite incubée 30 minutes à 37°C. La veine ombilicale est alors lavée au PBS et l'éluat est centrifugé afin de récupérer les cellules. Les HUVEC sont semées dans des boîtes de culture « coatées » à la gélatine (0,2%) et cultivées dans un milieu composé de 75% de milieu SFM (*Serum Free Medium*, Invitrogen) et 25% EGM-2 (EGM-2 BulletKit medium, Lonza) supplémenté de 5% de sérum suprême (BioWhittaker). Les HUVEC sont utilisées pour les expériences entre les passages 6 et 11. Les cellules ABAE (*Adult Bovine Aortic Endothelial*) sont isolées comme précédemment décrit (Gospodarowicz *et al.* 1986). Les cellules sont cultivées dans un milieu composé de 75% de SFM et 25% de milieu DMEM (Gibco) supplémenté de 10% de sérum suprême (BioWhittaker) et 100 unités/ml de pénicilline-streptomycine (Gibco). Chaque jour, 1ng/ml de bFGF recombinant (Promega) sont ajoutés. Les cellules ABAE sont utilisées entre les passages 8 et 13. Les cellules de mélanome murin (B16F10) sont cultivées dans du milieu DMEM contenant une haute concentration de glucose (Gibco) supplémenté de 10% de sérum (BioWhittaker), 4 mM de glutamine (Gibco) et 100 unités/ml de Pénicilline/Streptomycine (Gibco).

3. Réactifs

La PRL 16K recombinante est produite et purifiée comme décrit précédemment (Struman *et al.* 1999). Brièvement, le codon Cys 58 (TGC) est muté en un codon Ser (TCC) et la séquence nucléotidique codant les acides aminés 139-144 (Pro-Glu-Thr-Lys-Glu-Asn: CCT-GAA-ACC-AAA-GAA-AAT) dans la hPRL sauvage est remplacée par la séquence nucléotidique codant le site de clivage spécifique pour la protéase IgA (Pro-Arg-Pro-Pro-Thr-Pro: CCT-AGA-CCC-CCA-ACA-CCT). Le clivage a lieu entre les Pro 142 et Thr 143. Pour générer la hPRL 16K, le clivage de la hPRL est réalisé par la protéase IgA (0,05 %, 25 °C, durant une nuit, Boehringer Mannheim). La pureté de la hPRL 16K est supérieure à 95 %. Les endotoxines sont mesurées par le test *Limulus amoebocyte lysate assay* (Sigma).

Le PAI-1 recombinant contenant une étiquette histidine (PAI-1 His-tag) est produit comme décrit précédemment (D'Amico *et al.* 2012). Brièvement, le gène *pai-1* est inséré dans le plasmide pCold IV (Takara Bio) entre les sites de restriction NdeI et BamHI. La production de PAI-1 His-tag est réalisée à 15°C en utilisant les cellules E. coli Star B121 (DE3) (Invitrogen). Après la lyse des cellules, le PAI-1 His-tag est purifié en utilisant une colonne HP HiTrap Ni²⁺ (GE Healthcare). Nous récupérons approximativement 50 mg de protéines recombinantes purifiées à partir d'1L de milieu de culture. Le RAP (*Receptor Associated Protein*) provient de chez Calbiochem et est utilisé à une concentration de 5 µM à 200 µM selon les essais. La dynasore (Sigma) est utilisée à une concentration de 20 µM. Le VEGF-A (Reliatech) est utilisé à une concentration de 50 ng/ml.

4. Transfections des siARN dans les cellules ABAE et HUVEC

Les siARN sont transfectés selon la méthode au phosphate calcique. Les cellules ABAE ou HUVEC sont semées dans des plaques 6 puits (250000 cellules/puits) dans du milieu SFM (Gibco) supplémenté avec 5 ng/ml de bFGF. Le lendemain, 1h avant la transfection, le milieu est remplacé par du milieu complet (75% SFM, 25% EGM-2). Les complexes siARN-CaCl₂ sont formés par mélange des siARN (siARN PAI-1 bovin 20 nM, siARN PAI-1 humain 20 nM, siARN uPAR humain 10 et 50nM et siARN EGFR humain 50 nM) (IDT DNA technologies) avec 10 µl de CaCl₂ 2,5 µM. Ensuite, 100 µl de HSBP (280 mM NaCl, 1,9 mM Na₂HPO₄; 12 mM glucose, 10 mM KCl; 50 mM Hepes, pH 7.05) sont

ajoutés et le mélange est incubé 1 minute 30 secondes à température ambiante. Le mélange est ensuite ajouté goutte à goutte dans le puits et les cellules sont finalement incubées pendant 16 h à 37 °C. Les cellules sont alors trypsinisées et semées dans les supports adéquats aux différents tests.

5. Analyse quantitative de l'expression des gènes par qRT PCR

Les ARN totaux sont extraits grâce au kit miRNeasy (Qiagen). La synthèse d'ADNc est réalisée à partir de 1 µg d'ARN grâce au kit *iScript DNA Synthesis Kit* (Biorad). Les ADNc produits sont alors utilisés pour la réaction de PCR quantitative réalisée en utilisant la méthode du SYBR green (Bioline). Le cycle thermique est réalisé sur le système de détection Applied Biosystem 7900 HT (Applied Biosystems). Pour toutes les réactions, deux contrôles négatifs sont réalisés, le premier sans ADNc et le second soumis à une transcription reverse sans enzyme afin de vérifier l'absence d'amplification génomique. La quantité relative du niveau des ARNm est quantifiée par la méthode $2^{-\Delta Ct}$ et est normalisée par rapport aux gènes ubiquistes, cyclophiline A (PPIA) et β -2-microglobuline (β 2m). Les amorces sont dessinées à l'aide du programme *Primer Express* (Applied Biosystems) et sélectionnées de sorte qu'elles recouvrent des jonctions exon-exon afin d'éviter une détection de l'ADN génomique.

6. Essais angiogènes *in vitro*

6.1 Analyse de la Prolifération cellulaire

Les cellules sont semées dans des plaques 96 puits (8000 cellules/puits pour les HUVEC et 10 000 cellules/puits pour les ABAE) dans du milieu SFM supplémenté avec 5 ng/ml bFGF. Après 48h, les cellules sont traitées avec les différents facteurs à tester dans 100 µl de SFM. Les différents facteurs sont le bFGF (10 ng/ml), la hPRL 16K (50 nM), le VEGF-A (20 ng/ml). Après 24 h, la prolifération est analysée par mesure de l'incorporation de BrdU à l'aide du kit *Cell Proliferation ELISA, BrdU (Colorimetric)* (Roche) selon le protocole du fabricant. Pour les expériences avec les anticorps bloquants et les inhibiteurs, les cellules sont d'abord pré-incubées avec ceux-ci 1h avant l'induction de la prolifération. Ce test est basé sur la détection de BrdU incorporé dans l'ADN génomique des cellules en division.

6.2 Analyse de la migration cellulaire

Les cellules sont semées dans des plaques 48 puits (80 000 cellules/puits pour les HUVEC et 60 000 cellules/puits pour les ABAE) dans du milieu SFM supplémenté avec 5 ng/ml bFGF. Après 48 h, à l'aide d'un tips, un trait interrompant la monocouche de cellules confluentes est réalisé (temps 0). Les cellules sont ensuite lavées au PBS et traitées avec du VEGF-A (50 ng/ml) avec ou sans hPRL 16K (50 nM pour les HUVEC et 10 nM pour les ABAE) pendant 8 h. La distance entre les deux cotés du trait est mesurée à l'aide d'un oculaire gradué couplé au microscope Olympus CKX41 (Olympus). Dans le cas des expériences utilisant les inhibiteurs de l'internalisation, les cellules étaient pré-incubées 1h avec RAP (200 nM) (Calbiochem) ou la dynasore (20 μ M) (Sigma) avant le traitement au VEGF-A.

6.3 Analyse de la perméabilité

La perméabilité endothéliale est analysée *in vitro* par diffusion de la fluorescéine iosthiocyanate (FITC)-dextran (Sigma) à travers la monocouche endothéliale. 3×10^4 cellules sont semées dans du SFM supplémenté de 5 ng/ml de bFGF sur des inserts (ThinCerts-TC Inserts, pore size 0,40 μ m, Greiner Bio-One, Frieckenhausen, Allemagne) coatés avec de la fibronectine (7 μ g/ml) et incubé 72 h. Le milieu du compartiment supérieur est remplacé par du SFM contenant du FITC-dextran et supplémenté avec du VEGF-A (50 ng/ml) (RELIA Tech GmbH). La quantité de FITC-dextran qui diffuse à travers la monocouche endothéliale dans le compartiment inférieur est mesurée. Dans le cas des expériences utilisant des inhibiteurs d'internalisation, les cellules sont pré-incubées 1h avec RAP (200 nM) (Calbiochem) ou la dynasore (20 μ M) (Sigma) avant le traitement au VEGF-A. Pour les expériences avec les cellules transfectées par les siARN, les HUVEC sont transfectées avec les siARN uPAR ou siARN contrôle (50 nM) en utilisant la méthode du phosphate calcique. Après 16h de transfection, les HUVEC sont semées sur les inserts et incubées 72h.

7. Immunofluorescence

Les HUVEC sont semées dans des boîtes de 35 mm de diamètre (CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frieckenhausen, Allemagne) dans du SFM supplémenté de 5ng/ml de bFGF à raison de 250 000 cellules. Après 48h, elles sont prétraitées avec 5 μ g/ml d'anticorps anti-uPAR humain (MAB807, R&D Systems), anti uPAR humain (399R, American

Diagnostica) ou un anticorps contrôle (SantaCruz) durant 1 h. Ensuite, les cellules sont traitées avec la PRL 16K (50 nM) durant 1 h. Les cellules sont alors rincées au PBS, fixées à la paraformaldéhyde 1% durant 30 minutes sur glace. Les cellules sont alors bloquées avec du PBS 5% BSA durant 30 minutes. L'anticorps anti-prolactine (Dako) est ajouté à une concentration de 1/100 durant 1h à 4°C. Après deux lavages au PBS, l'anticorps secondaire couplé au FITC est additionné pour 1 h à 4°C. Les échantillons sont alors analysés au microscope à fluorescence (*NIKON eclipse 90i*, Tokyo, Japon).

8. Proximity ligation assay, PLA

La technologie duolink a été élaborée par la firme suédoise Olink Bioscience (Uppsala, Suède) et permet de mettre en évidence l'interaction entre deux protéines *in situ*, distantes de moins de 40 nm. Les deux protéines d'intérêt sont reconnues par deux anticorps primaires. Ces anticorps sont reconnus par des anticorps secondaires qui ont la particularité d'être conjugué à un oligonucléotide, dénommé sonde PLA, plus et moins. Si les deux protéines sont proches, les sondes PLA s'apparient entre elles et peuvent être amplifiées par *Rolling circles*. La détection est réalisée grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes capables de s'hybrider au produit d'amplification (**figure 24**).

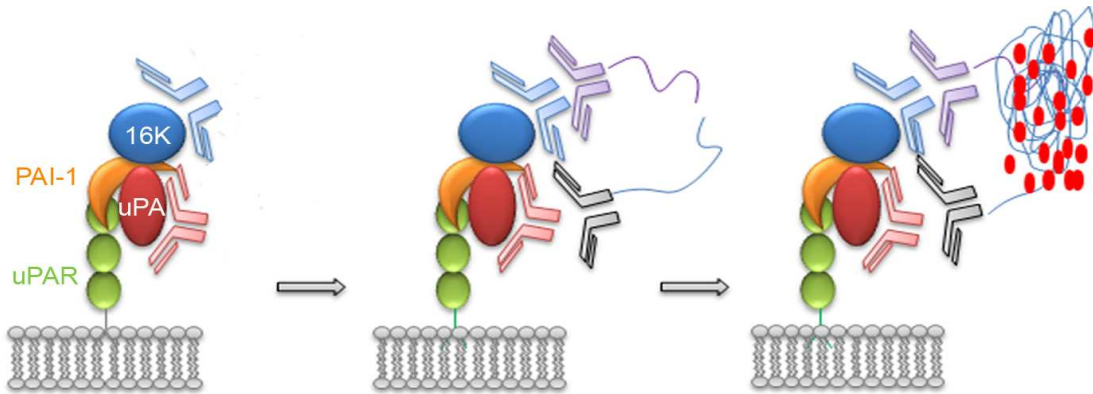


Figure 24: Principe du Proximity Ligation Assay (PLA) pour l'uPA et la PRL 16K. Les anticorps primaires d'espèces différentes pour uPA et PRL 16K sont utilisés. Ensuite, les anticorps secondaires liés à des sondes d'ADN sont ajoutés. Si les deux protéines sont suffisamment proches, les sondes d'ADN liées aux anticorps secondaires seront amplifiées par *Rolling Circles*. L'ADN simple brin issu de cette amplification sera ensuite marqué à l'aide de sondes Cy3.

Les HUVEC sont semées dans des boîtes de 35 mm de diamètre (CELLSTAR, Greiner Bio-One, Frieckenhausen, Allemagne) dans du SFM supplémenté de 5ng/ml de bFGF à raison de 250 000 cellules. Après 48h, elles sont traitées soit avec de la hPRL 16K (50 nM durant 15 minutes avec ou sans pré-incubation avec 2 nM de PAI-1 His-tag) ou avec

50 ng/ml de VEGF₁₆₅ pendant 15 minutes. Elles sont ensuite rincées au PBS et fixées à la paraformaldéhyde 1% durant 30 minutes sur glace. Le test de « *proximity ligation* » est alors réalisé en utilisant le kit « *Duloink I Fluorescence* » selon le protocole du fabricant. Les échantillons sont alors analysés au microscope à fluorescence (*NIKON eclipse 90i, Tokyo, Japon*).

9. La cytométrie de flux

Les HUVEC sont semées dans des boîtes de 28 cm², à raison de 600 000 cellules dans du SFM contenant 5 ng/ml bFGF. Après 48h, les cellules subissent un traitement au VEGF₁₆₅ (50ng/ml) pendant 15 minutes. Les cellules sont alors lavées au PBS et grattées dans du PBS-5% BSA. Après un blocage dans du PBS-5% BSA, l'anticorps primaire approprié est ajouté à une concentration de 1/100 durant 1 h à 4°C. Après deux lavages au PBS, l'anticorps secondaire couplé au FITC est additionné pour 1 h à 4°C. Les cellules sont alors analysées par cytométrie de flux (*EPIC XL, Beckman Coulter, Brea, CA, USA*). Les anticorps primaires utilisés pour la cytométrie de flux sont anti-EGFR (*Santa Cruz*), anti-intégrine β 1 (*MAB1999, Millipore*), anti-intégrine β 3 (*Millipore*) anti-LRP-1 (438190, *Calbiochem*), anti-uPAR humain (*MAB807, R&D Systems*), anti-VEGFR-2 (2479, *Cell Signaling*).

10. Biotinylation des protéines de surface

Pour les expériences de biotinylation, les HUVEC sont traitées avec 2 mg/ml de biotine clivable (*EZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotin, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA*) dans du PBS durant 30 minutes sur glace. Ensuite, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS, puis traitées au VEGF₁₆₅ (100 ng/ml) dans du milieu SFM durant 15 minutes à 37°C. Les cellules sont alors incubées 2 fois, 20 minutes, avec une solution de glutathion (GSH, *Sigma-Aldrich*) (45mM GSH, 75 mM NaCl, 75 mM NaOH and 1% BSA).

Pour l'immunoprécipitation, les HUVEC sont lavées deux fois dans du PBS et lysées sur glace avec une solution de lyse (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 0.5% triton-x100, 10% glycerol, supplémenté d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Roche*)). Les protéines biotinylées sont immunoprécipitées avec des billes de sépharose coâtées à la streptavidine pendant 2 h à 4°C. Les billes sont alors lavées 3 fois avec la solution de lyse. Les protéines biotinylées sont analysées par SDS-PAGE suivie d'un Western blotting sur une membrane de PVDF.

11. Co-immunoprécipitation

Les HUVEC sont semées dans des flasques de 75 cm² dans du SFM contenant 5 ng/ml de bFGF, à raison de 1,5×10⁶ cellules. Après 48 h, les HUVEC sont incubées avec 50 ng/ml de VEGF₁₆₅ ou avec de la hPRL 16K (50 nM) pendant 10 minutes à 37°C. Après ce traitement, les cellules sont incubées avec un agent de cross-link (2mM) (DTSSP, thermoscientific) pour 2h à 4°C. Les cellules sont alors lysées avec 500 µl de solution de lyse (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100 supplémenté avec un cocktail d'inhibiteur de protéases (Roche)). Les extraits protéiques sont alors incubés toute la nuit à 4°C avec les anticorps dirigés contre les protéines d'intérêt sous rotation. 50 µl de protéine A Agarose sont alors ajoutés au mixte et incubés 1 h à 4°C sous rotation. Après centrifugation, les billes sont récupérées et lavées trois fois avec la solution de lyse. Les protéines immunoprécipitées sont alors resuspendues dans 30 µl de tampon de chargement (Tris HCl 30 mM ; SDS 5% ; glycérol 5% ; bleu de bromophénol 0,002% ; β-mercaptoéthanol 2,5% ; pH 6,8) et chauffées à 100°C pour 5 minutes. Les protéines sont alors analysées par Western blotting.

Pour les immunoprécipitations sur les tumeurs B16F10, l'agent de *cross-link* utilisé est le DSP (*Thermoscientific*) à une concentration de 2 mM durant 2h à 4°C.

Concernant les immunoprécipitations PAI-1/PRL 16K sur les protéines recombinantes, les protéines PAI-1 (5 ng) et PRL 16K (300 ng) sont incubées toute la nuit à 4°C pour qu'elles interagissent. Le complexe est alors cross-linké avec du DSP (*Thermoscientific*) à une concentration de 2 mM durant 2h à 4°C. Ensuite, le protocole suivi est identique aux autres Co-IP réalisées dans ce travail.

12. Préparation des extraits protéiques et Western Blotting

Les cellules sont lavées deux fois avec du PBS froid et grattées dans du tampon de lyse (25 mM HEPES (pH 7.9), 150 mM NaCl, 0.5% Triton, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride) sur glace. Les débris cellulaires insolubles sont éliminés par centrifugation à 10000 g pendant 15 min. Les aliquots de surnageants contenant les protéines sont stockés à -80 °C. La concentration protéique est déterminée par la méthode Bradford à l'aide du Kit « BCA Assay » (Thermo Fisher Scientific). Les lysats cellulaires solubles sont séparés par SDS-PAGE (6%, 10%, 12 % ou 15% selon la taille de la protéine d'intérêt) et

transférés sur une membrane polyfluorure de vinylidène (Milipore Corp.). Les blots sont bloqués pendant 1 h dans une solution saline tampon contenant du Tris (TBS), 8 % de lait et 0,1 % de Tween 20 à température ambiante et incubés toute la nuit à 4 °C avec les anticorps primaires: anti-AKT (4691, *Cell Signaling*), anti-phospho-AKT (Ser 473) (4060, *Cell Signaling*), anti-phospho-AKT (Thr 308) (4056, *Cell Signaling*) anti-phospho ERK1/2 (9101, *Cell signaling*), anti-intégrine β 1 (9699, *Cell signaling*), anti MAPK (06-182, *Millipore*), anti-PAI-1 (clone 33H1F7), anti-Prolactine (Dako) anti-uPAR humain (MAB807, *R&D Systems*), anti uPAR humain (399R, *American Diagnostica*), anti-phospho VEGFR-2 (*Cell Signaling*), anti VEGFR-2 (2479, *Cell Signaling*) et anti-beta-tubulin (ab6046, *Abcam*). Après 3 lavages avec du TBS contenant 0,1 % de Tween 20, les complexes antigène-anticorps sont détectés avec un anticorps secondaire couplé à la peroxydase et un système d'amplification fluoro-chemiluminescent (ECL; Pierce Biotechnology).

13. Test de l'activité de NF- κ B

L'activité p65 de liaison à l'ADN de NF- κ B est quantifiée par ELISA (EZ Transcription Factor kit NF- κ B p65 (Pierce)) sur des extraits protéiques totaux selon les instructions du fabricant. La liaison de NF- κ B à l'oligonucléotide cible est détectée par incubation d'un anticorps primaire spécifique pour la forme activée de p65, visualisée par un anti-IgG conjugué à la peroxydase et une solution de développement et quantifiée par la chémiluminescence à l'aide d'un luminomètre. La spécificité est établie par incubation avec un oligonucléotide consensus sauvage (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') qui rivalise avec le substrat pour la liaison. Tous les échantillons sont analysés en duplicats.

14. Croissance tumorale en modèle murin

Les souris homozygote PAI-1^{-/-} (Carmeliet *et al.* 1993) et les souris *wild type* correspondantes ont été utilisées dans cette étude. Brièvement, les cellules B16F10 confluentes sont trypsinisées, lavées et resuspendues dans du PBS. La suspension de cellules B16F10 (10⁵ cellules dans 50 μ l de PBS) est injectée en sous cutanée dans le flanc droit de chaque souris (7 par groupe). Les adénovirus exprimant la PRL 16K ou les adénovirus contrôle sont injectés dans la veine de la queue deux jours avant l'injection sous cutanée des cellules tumorales. Pour maintenir l'expression de la PRL 16K, une seconde injection est administrée huit jours après la première. La quantité de virus utilisée pour chaque injection est

de 10^9 pfu. La croissance tumorale des B16F10 est évaluée par mesure de la longueur et de la largeur de chaque tumeur chaque jour. Le volume tumoral est alors calculé sur base de la formule : longueur X largeur X 0,5. Entre 18 et 20 jours après l'injection des cellules tumorales, les souris sont euthanasiées et les tumeurs sont récupérées. Le protocole de cette expérimentation animale a été approuvé par le comité éthique de l'Université de Liège.

15. Modèle d'angiogenèse rétinienne murine

Pour analyser l'angiogenèse rétinienne, les souriceaux en P1 sont injectés de façon intra vitelline avec 85 nM de PRL 16K ou 50ng/ml de VEGF₁₆₅ et sacrifié en P5. Le P0 correspond au jour de la naissance. Les yeux sont récupérés et fixés 45 minutes dans la paraformaldéhyde 4%. Les rétines sont alors disséquées et post fixées durant 1h avec la paraformaldéhyde 4%. Ensuite, une immunofluorescence est réalisée en utilisant l'isolectine b4 pour marquer les vaisseaux sanguins. Brièvement, les rétines sont perméabilisées dans du PBS 0,1% de triton X100 toute la nuit à 4°C. L'isolectine b4 est alors additionnée à la rétine à une concentration de 1/50 durant 4h à 4°C. Les rétines sont alors lavées toute la nuit dans du PBS. L'anticorps secondaire (Alexa 488) est alors ajouté durant 4h à une concentration de 1/500. Les rétines sont alors montées sur lame et analysées par microscopie à fluorescence (Gerhardt *et al.* 2003).

16. Analyses statistiques

Toutes les expériences sont réalisées au moins 3 fois. Toutes les valeurs sont exprimées sous forme de moyennes relatives \pm déviation standard (SD) pour les expériences *in vitro* ou moyenne \pm moyenne de l'erreur standard (SEM) pour les expériences *in vivo*. La comparaison entre les différentes conditions est évaluée par le test t de Student.

17. Séquences des siARN et amorces utilisés

17.1 Séquence des siARN utilisés

Nom	Brin sens	Brin anti-sens
siARN PAI-1 bovin	CCGAUUUACUGAAGAA UUGCACAGA	UCUGUGCAAUUCUUCAGU AAAUCGGUC
siARN PAI-1 humain	UCAAUAGAUUUAGGAG CAGAAAUGC	GCAUUUCUGCUCCUAAAU CUAUUGAAC
siARN EGFR humain	CGAGGGCAAUACAG CUUGGUGCC	GGCACCAAAGCUGUAUUU GCCCUCGGG
siARN contrôle	siARN contrôle universel (IDT-DNA)	
siARN uPAR humain	GGUGAAGAAGGGCGUCCAA	UUGGACGCCCUUCUUCACC
siARN uPAR contrôle	AACCUGCGGGAAGAAGUGG	CCACUUCUCCCCGCAGGUU

17.2 Séquences des oligonucléotides utilisés pour la qRT PCR

Gene	Amorces sens	Amorces anti-sens
hsa PPIA	CCAACACAAATGGTCCCAGT	CCATGGCCTCCACAATATTCA
hsa β 2M	GAGTATGCCTGCCGTGT	AATCCAAATGCGGCATCT
hsa PAI-1	ACGTGGTTTTCTCACCTATG	CATGCCCTTGTCATCAATCTTG
mmu Dll4	CCTCTCGAACTTGGACTTGC	AGCTCCTGCTTAATGCCAAA
mmu/rno PPIA	ACCGTGTTCTTCGACATCACG	CTGGCACATGAATCCTGGAATA
mmu/rno β 2m	CATGGCTCGCTCGGTGACC	AATGTGAGGCGGGTGGAACTG

ibliographie

- Abdollahi, A. and Folkman, J. (2010). "Evading tumor evasion: current concepts and perspectives of anti-angiogenic cancer therapy." *Drug Resist Updat* **13**(1-2): 16-28.
- Abdollahi, A., Lipson, K. E., Sckell, A., Zieher, H., Klenke, F., Poerschke, D., Roth, A., Han, X., Krix, M., Bischof, M., Hahnfeldt, P., Grone, H. J., Debus, J., Hlatky, L. and Huber, P. E. (2003). "Combined therapy with direct and indirect angiogenesis inhibition results in enhanced antiangiogenic and antitumor effects." *Cancer Res* **63**(24): 8890-8898.
- Affolter, M. and Zeller, R. (2009). "From cells to organs: new insight into organ morphogenesis." *Curr Opin Genet Dev* **19**(5): 421-423.
- Alexander, R. A., Prager, G. W., Mihaly-Bison, J., Uhrin, P., Sunzenauer, S., Binder, B. R., Schutz, G. J., Freissmuth, M. and Breuss, J. M. (2012). "VEGF-induced endothelial cell migration requires urokinase receptor (uPAR)-dependent integrin redistribution." *Cardiovasc Res* **94**(1): 125-135.
- Aranda, J., Rivera, J. C., Jeziorski, M. C., Riesgo-Escovar, J., Nava, G., Lopez-Barrera, F., Quiroz-Mercado, H., Berger, P., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (2005). "Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(8): 2947-2953.
- Augustin, H. G., Koh, G. Y., Thurston, G. and Alitalo, K. (2009). "Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiopoietin-Tie system." *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**(3): 165-177.
- Avraamides, C. J., Garmy-Susini, B. and Varnier, J. A. (2008). "Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis." *Nat Rev Cancer* **8**(8): 604-617.
- Bajou, K., Masson, V., Gerard, R. D., Schmitt, P. M., Albert, V., Praus, M., Lund, L. R., Frandsen, T. L., Brunner, N., Dano, K., Fusenig, N. E., Weidle, U., Carmeliet, G., Loskutoff, D., Collen, D., Carmeliet, P., Foidart, J. M. and Noel, A. (2001). "The plasminogen activator inhibitor PAI-1 controls in vivo tumor vascularization by interaction with proteases, not vitronectin. Implications for antiangiogenic strategies." *J Cell Biol* **152**(4): 777-784.
- Bajou, K., Noel, A., Gerard, R. D., Masson, V., Brunner, N., Holst-Hansen, C., Skobe, M., Fusenig, N. E., Carmeliet, P., Collen, D. and Foidart, J. M. (1998). "Absence of host plasminogen activator inhibitor 1 prevents cancer invasion and vascularization." *Nat Med* **4**(8): 923-928.
- Bajou, K., Peng, H., Laug, W. E., Maillard, C., Noel, A., Foidart, J. M., Martial, J. A. and DeClerck, Y. A. (2008). "Plasminogen activator inhibitor-1 protects endothelial cells from FasL-mediated apoptosis." *Cancer Cell* **14**(4): 324-334.
- Baldocchi, R. A., Tan, L., King, D. S. and Nicoll, C. S. (1993). "Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D." *Endocrinology* **133**(2): 935-938.
- Baldocchi, R. A., Tan, L. and Nicoll, C. S. (1992). "Processing of rat prolactin by rat tissue explants and serum in vitro." *Endocrinology* **130**(3): 1653-1659.
- Ballmer-Hofer, K., Andersson, A. E., Ratcliffe, L. E. and Berger, P. (2011). "Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output." *Blood* **118**(3): 816-826.
- Balsara, R. D., Castellino, F. J. and Ploplis, V. A. (2006). "A novel function of plasminogen activator inhibitor-1 in modulation of the AKT pathway in wild-type and plasminogen activator inhibitor-1-deficient endothelial cells." *J Biol Chem* **281**(32): 22527-22536.
- Balsara, R. D., Merryman, R., Virjee, F., Northway, C., Castellino, F. J. and Ploplis, V. A. (2011). "A deficiency of uPAR alters endothelial angiogenic function and cell morphology." *Vasc Cell* **3**(1): 10.

- Becker, P. M., Waltenberger, J., Yachechko, R., Mirzapoiazova, T., Sham, J. S., Lee, C. G., Elias, J. A. and Verin, A. D. (2005). "Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability." *Circ Res* **96**(12): 1257-1265.
- Bene, M. C., Castoldi, G., Knapp, W., Rigolin, G. M., Escribano, L., Lemez, P., Ludwig, W. D., Matutes, E., Orfao, A., Lanza, F. and van't Veer, M. (2004). "CD87 (urokinase-type plasminogen activator receptor), function and pathology in hematological disorders: a review." *Leukemia* **18**(3): 394-400.
- Bentzien, F., Struman, I., Martini, J. F., Martial, J. and Weiner, R. (2001). "Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice." *Cancer Res* **61**(19): 7356-7362.
- Bergers, G. and Benjamin, L. E. (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." *Nat Rev Cancer* **3**(6): 401-410.
- Bergers, G., Brekken, R., McMahon, G., Vu, T. H., Itoh, T., Tamaki, K., Tanzawa, K., Thorpe, P., Itohara, S., Werb, Z. and Hanahan, D. (2000). "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis." *Nat Cell Biol* **2**(10): 737-744.
- Bergers, G. and Hanahan, D. (2008). "Modes of resistance to anti-angiogenic therapy." *Nat Rev Cancer* **8**(8): 592-603.
- Binder, B. R., Mihaly, J. and Prager, G. W. (2007). "uPAR-uPA-PAI-1 interactions and signaling: a vascular biologist's view." *Thromb Haemost* **97**(3): 336-342.
- Blasi, F. and Sidenius, N. (2010). "The urokinase receptor: focused cell surface proteolysis, cell adhesion and signaling." *FEBS Lett* **584**(9): 1923-1930.
- Bohuslav, J., Horejsi, V., Hansmann, C., Stockl, J., Weidle, U. H., Majdic, O., Bartke, I., Knapp, W. and Stockinger, H. (1995). "Urokinase plasminogen activator receptor, beta 2-integrins, and Src-kinases within a single receptor complex of human monocytes." *J Exp Med* **181**(4): 1381-1390.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. and Kelly, P. A. (1998). "Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice." *Endocr Rev* **19**(3): 225-268.
- Borges, E., Jan, Y. and Ruoslahti, E. (2000). "Platelet-derived growth factor receptor beta and vascular endothelial growth factor receptor 2 bind to the beta 3 integrin through its extracellular domain." *J Biol Chem* **275**(51): 39867-39873.
- Brakman, P. and Astrup, T. (1963). "Selective Inhibition in Human Pregnancy Blood of Urokinase Induced Fibrinolysis." *Scand J Clin Lab Invest* **15**: 603-609.
- Brunner, P. M., Heier, P. C., Mihaly-Bison, J., Priglinger, U., Binder, B. R. and Prager, G. W. (2011). "Density enhanced phosphatase-1 down-regulates urokinase receptor surface expression in confluent endothelial cells." *Blood* **117**(15): 4154-4161.
- Bruns, C. J., Solorzano, C. C., Harbison, M. T., Ozawa, S., Tsan, R., Fan, D., Abbruzzese, J., Traxler, P., Buchdunger, E., Radinsky, R. and Fidler, I. J. (2000). "Blockade of the epidermal growth factor receptor signaling by a novel tyrosine kinase inhibitor leads to apoptosis of endothelial cells and therapy of human pancreatic carcinoma." *Cancer Res* **60**(11): 2926-2935.
- Bugge, T. H., Suh, T. T., Flick, M. J., Daugherty, C. C., Romer, J., Solberg, H., Ellis, V., Dano, K. and Degen, J. L. (1995). "The receptor for urokinase-type plasminogen activator is not essential for mouse development or fertility." *J Biol Chem* **270**(28): 16886-16894.
- Byzova, T. V., Goldman, C. K., Pampori, N., Thomas, K. A., Bett, A., Shattil, S. J. and Plow, E. F. (2000). "A mechanism for modulation of cellular responses to VEGF: activation of the integrins." *Mol Cell* **6**(4): 851-860.
- Cai, H. and Reed, R. R. (1999). "Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1." *J Neurosci* **19**(15): 6519-6527.

- Caiolfa, V. R., Zamai, M., Malengo, G., Andolfo, A., Madsen, C. D., Sutin, J., Digman, M. A., Gratton, E., Blasi, F. and Sidenius, N. (2007). "Monomer dimer dynamics and distribution of GPI-anchored uPAR are determined by cell surface protein assemblies." *J Cell Biol* **179**(5): 1067-1082.
- Cardone, M. H., Roy, N., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S., Franke, T. F., Stanbridge, E., Frisch, S. and Reed, J. C. (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." *Science* **282**(5392): 1318-1321.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." *Nat Med* **6**(4): 389-395.
- Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." *Nature* **438**(7070): 932-936.
- Carmeliet, P., De Smet, F., Loges, S. and Mazzone, M. (2009). "Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way." *Nat Rev Clin Oncol* **6**(6): 315-326.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. and Nagy, A. (1996). "Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele." *Nature* **380**(6573): 435-439.
- Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." *Nature* **407**(6801): 249-257.
- Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2011). "Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis." *Nature* **473**(7347): 298-307.
- Carmeliet, P., Kieckens, L., Schoonjans, L., Ream, B., van Nuffelen, A., Prendergast, G., Cole, M., Bronson, R., Collen, D. and Mulligan, R. C. (1993). "Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. I. Generation by homologous recombination and characterization." *J Clin Invest* **92**(6): 2746-2755.
- Carmeliet, P., Stassen, J. M., Schoonjans, L., Ream, B., van den Oord, J. J., De Mol, M., Mulligan, R. C. and Collen, D. (1993). "Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis." *J Clin Invest* **92**(6): 2756-2760.
- Casanovas, O., Hicklin, D. J., Bergers, G. and Hanahan, D. (2005). "Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors." *Cancer Cell* **8**(4): 299-309.
- Chapman, H. A. and Wei, Y. (2001). "Protease crosstalk with integrins: the urokinase receptor paradigm." *Thromb Haemost* **86**(1): 124-129.
- Chaurasia, P., Aguirre-Ghiso, J. A., Liang, O. D., Gardsvoll, H., Ploug, M. and Ossowski, L. (2006). "A region in urokinase plasminogen receptor domain III controlling a functional association with alpha5beta1 integrin and tumor growth." *J Biol Chem* **281**(21): 14852-14863.
- Chen, H., Chedotal, A., He, Z., Goodman, C. S. and Tessier-Lavigne, M. (1997). "Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III." *Neuron* **19**(3): 547-559.
- Chen, S. C., Henry, D. O., Reczek, P. R. and Wong, M. K. (2008). "Plasminogen activator inhibitor-1 inhibits prostate tumor growth through endothelial apoptosis." *Mol Cancer Ther* **7**(5): 1227-1236.
- Chen, T. T., Luque, A., Lee, S., Anderson, S. M., Segura, T. and Iruela-Arispe, M. L. (2010). "Anchorage of VEGF to the extracellular matrix conveys differential signaling responses to endothelial cells." *J Cell Biol* **188**(4): 595-609.
- Chen, X. L., Nam, J. O., Jean, C., Lawson, C., Walsh, C. T., Goka, E., Lim, S. T., Tomar, A., Tancioni, I., Uryu, S., Guan, J. L., Acevedo, L. M., Weis, S. M., Cheresch, D. A. and Schlaepfer, D. D. (2012). "VEGF-induced vascular permeability is mediated by FAK." *Dev Cell* **22**(1): 146-157.
- Chung, A. S., Lee, J. and Ferrara, N. (2010). "Targeting the tumour vasculature: insights from physiological angiogenesis." *Nat Rev Cancer* **10**(7): 505-514.
- Citri, A. and Yarden, Y. (2006). "EGF-ERBB signalling: towards the systems level." *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**(7): 505-516.

- Clapp, C. (1987). "Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms." *Endocrinology* **121**(6): 2055-2064.
- Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delure, F. and Weiner, R. I. (1993). "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis." *Endocrinology* **133**(3): 1292-1299.
- Clapp, C. and Weiner, R. I. (1992). "A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells." *Endocrinology* **130**(3): 1380-1386.
- Colman, R. W., Wu, Y. and Liu, Y. (2010). "Mechanisms by which cleaved kininogen inhibits endothelial cell differentiation and signalling." *Thromb Haemost* **104**(5): 875-885.
- Compton, M. M. and Witorsch, R. J. (1984). "Proteolytic degradation and modification of rat prolactin by subcellular fractions of the rat ventral prostate gland." *Endocrinology* **115**(2): 476-484.
- Conese, M. and Blasi, F. (1995). "Urokinase/urokinase receptor system: internalization/degradation of urokinase-serpin complexes: mechanism and regulation." *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**(3): 143-155.
- Corbacho, A. M., Martinez De La Escalera, G. and Clapp, C. (2002). "Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis." *J Endocrinol* **173**(2): 219-238.
- Coussens, L. M., Raymond, W. W., Bergers, G., Laig-Webster, M., Behrendtsen, O., Werb, Z., Caughey, G. H. and Hanahan, D. (1999). "Inflammatory mast cells up-regulate angiogenesis during squamous epithelial carcinogenesis." *Genes Dev* **13**(11): 1382-1397.
- Cross, M. J., Dixelius, J., Matsumoto, T. and Claesson-Welsh, L. (2003). "VEGF-receptor signal transduction." *Trends Biochem Sci* **28**(9): 488-494.
- Czekay, R. P., Aertgeerts, K., Curriden, S. A. and Loskutoff, D. J. (2003). "Plasminogen activator inhibitor-1 detaches cells from extracellular matrices by inactivating integrins." *J Cell Biol* **160**(5): 781-791.
- Czekay, R. P., Kuemmel, T. A., Orlando, R. A. and Farquhar, M. G. (2001). "Direct binding of occupied urokinase receptor (uPAR) to LDL receptor-related protein is required for endocytosis of uPAR and regulation of cell surface urokinase activity." *Mol Biol Cell* **12**(5): 1467-1479.
- Czekay, R. P. and Loskutoff, D. J. (2009). "Plasminogen activator inhibitors regulate cell adhesion through a uPAR-dependent mechanism." *J Cell Physiol* **220**(3): 655-663.
- D'Amico, S., Martial, J. A. and Struman, I. (2012). "A peptide mimicking the C-terminal part of the reactive center loop induces the transition to the latent form of plasminogen activator inhibitor type-1." *FEBS Lett* **586**(6): 686-692.
- D'Angelo, G., Martini, J. F., Iiri, T., Fantl, W. J., Martial, J. and Weiner, R. I. (1999). "16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells." *Mol Endocrinol* **13**(5): 692-704.
- D'Angelo, G., Struman, I., Martial, J. and Weiner, R. I. (1995). "Activation of mitogen-activated protein kinases by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in capillary endothelial cells is inhibited by the antiangiogenic factor 16-kDa N-terminal fragment of prolactin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(14): 6374-6378.
- Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E. and Schmid, S. L. (1994). "Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation." *J Cell Biol* **127**(4): 915-934.
- De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P. J. and Carmeliet, P. (2009). "Mechanisms of vessel branching: filopodia on endothelial tip cells lead the way." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(5): 639-649.
- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M. B., Holtzman, D. M. and Zlokovic, B. V. (2008). "apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain." *J Clin Invest* **118**(12): 4002-4013.
- Dedieu, S. and Langlois, B. (2008). "LRP-1: a new modulator of cytoskeleton dynamics and adhesive complex turnover in cancer cells." *Cell Adh Migr* **2**(2): 77-80.

- Degryse, B., Neels, J. G., Czekay, R. P., Aertgeerts, K., Kamikubo, Y. and Loskutoff, D. J. (2004). "The low density lipoprotein receptor-related protein is a motogenic receptor for plasminogen activator inhibitor-1." *J Biol Chem* **279**(21): 22595-22604.
- Degryse, B., Orlando, S., Resnati, M., Rabbani, S. A. and Blasi, F. (2001). "Urokinase/urokinase receptor and vitronectin/alpha(v)beta(3) integrin induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization through different signaling pathways." *Oncogene* **20**(16): 2032-2043.
- Degryse, B., Resnati, M., Czekay, R. P., Loskutoff, D. J. and Blasi, F. (2005). "Domain 2 of the urokinase receptor contains an integrin-interacting epitope with intrinsic signaling activity: generation of a new integrin inhibitor." *J Biol Chem* **280**(26): 24792-24803.
- Dellas, C. and Loskutoff, D. J. (2005). "Historical analysis of PAI-1 from its discovery to its potential role in cell motility and disease." *Thromb Haemost* **93**(4): 631-640.
- Deng, G., Curriden, S. A., Hu, G., Czekay, R. P. and Loskutoff, D. J. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 regulates cell adhesion by binding to the somatomedin B domain of vitronectin." *J Cell Physiol* **189**(1): 23-33.
- Deng, G., Curriden, S. A., Wang, S., Rosenberg, S. and Loskutoff, D. J. (1996). "Is plasminogen activator inhibitor-1 the molecular switch that governs urokinase receptor-mediated cell adhesion and release?" *J Cell Biol* **134**(6): 1563-1571.
- Dennler, S., Itoh, S., Vivien, D., ten Dijke, P., Huet, S. and Gauthier, J. M. (1998). "Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene." *EMBO J* **17**(11): 3091-3100.
- Devy, L., Blacher, S., Grignet-Debrus, C., Bajou, K., Masson, V., Gerard, R. D., Gils, A., Carmeliet, G., Carmeliet, P., Declerck, P. J., Noel, A. and Foidart, J. M. (2002). "The pro- or antiangiogenic effect of plasminogen activator inhibitor 1 is dose dependent." *FASEB J* **16**(2): 147-154.
- Dickson, M. C., Martin, J. S., Cousins, F. M., Kulkarni, A. B., Karlsson, S. and Akhurst, R. J. (1995). "Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice." *Development* **121**(6): 1845-1854.
- Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R. and Zeiher, A. M. (1999). "Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation." *Nature* **399**(6736): 601-605.
- Djordjevic, S. and Driscoll, P. C. (2012). "Targeting VEGF signalling via the neuropilin co-receptor." *Drug Discov Today*.
- Dougher, M. and Terman, B. I. (1999). "Autophosphorylation of KDR in the kinase domain is required for maximal VEGF-stimulated kinase activity and receptor internalization." *Oncogene* **18**(8): 1619-1627.
- Dupont, D. M., Madsen, J. B., Kristensen, T., Bodker, J. S., Blouse, G. E., Wind, T. and Andreasen, P. A. (2009). "Biochemical properties of plasminogen activator inhibitor-1." *Front Biosci* **14**: 1337-1361.
- Ebos, J. M., Lee, C. R., Cruz-Munoz, W., Bjarnason, G. A., Christensen, J. G. and Kerbel, R. S. (2009). "Accelerated metastasis after short-term treatment with a potent inhibitor of tumor angiogenesis." *Cancer Cell* **15**(3): 232-239.
- Eilken, H. M. and Adams, R. H. (2010). "Dynamics of endothelial cell behavior in sprouting angiogenesis." *Curr Opin Cell Biol* **22**(5): 617-625.
- Eitzman, D. T., Krauss, J. C., Shen, T., Cui, J. and Ginsburg (1996). "Lack of plasminogen activator inhibitor-1 effect in a transgenic mouse model of metastatic melanoma." *Blood* **87**(11): 4718-4722.
- Eitzman, D. T., Westrick, R. J., Nabel, E. G. and Ginsburg, D. (2000). "Plasminogen activator inhibitor-1 and vitronectin promote vascular thrombosis in mice." *Blood* **95**(2): 577-580.
- Erickson, L. A., Fici, G. J., Lund, J. E., Boyle, T. P., Polites, H. G. and Marotti, K. R. (1990). "Development of venous occlusions in mice transgenic for the plasminogen activator inhibitor-1 gene." *Nature* **346**(6279): 74-76.

- Ewan, L. C., Jopling, H. M., Jia, H., Mittar, S., Bagherzadeh, A., Howell, G. J., Walker, J. H., Zachary, I. C. and Ponnambalam, S. (2006). "Intrinsic tyrosine kinase activity is required for vascular endothelial growth factor receptor 2 ubiquitination, sorting and degradation in endothelial cells." *Traffic* **7**(9): 1270-1282.
- Faupel-Badger, J. M., Ginsburg, E., Fleming, J. M., Susser, L., Doucet, T. and Vonderhaar, B. K. (2010). "16 kDa prolactin reduces angiogenesis, but not growth of human breast cancer tumors in vivo." *Horm Cancer* **1**(2): 71-79.
- Favier, B., Alam, A., Barron, P., Bonnin, J., Laboudie, P., Fons, P., Mandron, M., Herault, J. P., Neufeld, G., Savi, P., Herbert, J. M. and Bono, F. (2006). "Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration." *Blood* **108**(4): 1243-1250.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K. S., Powell-Braxton, L., Hillan, K. J. and Moore, M. W. (1996). "Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene." *Nature* **380**(6573): 439-442.
- Ferrara, N., Clapp, C. and Weiner, R. (1991). "The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells." *Endocrinology* **129**(2): 896-900.
- Ferrara, N., Hillan, K. J., Gerber, H. P. and Novotny, W. (2004). "Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer." *Nat Rev Drug Discov* **3**(5): 391-400.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." *N Engl J Med* **285**(21): 1182-1186.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A. and Nagy, G. (2000). "Prolactin: structure, function, and regulation of secretion." *Physiol Rev* **80**(4): 1523-1631.
- Fuhrman, B. (2012). "The urokinase system in the pathogenesis of atherosclerosis." *Atherosclerosis* **222**(1): 8-14.
- Fujio, Y. and Walsh, K. (1999). "Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner." *J Biol Chem* **274**(23): 16349-16354.
- Fujisawa, H. and Kitsukawa, T. (1998). "Receptors for collapsin/semaphorins." *Curr Opin Neurobiol* **8**(5): 587-592.
- Fulton, D., Gratton, J. P., McCabe, T. J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T. F., Papapetropoulos, A. and Sessa, W. C. (1999). "Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt." *Nature* **399**(6736): 597-601.
- Gaengel, K., Genove, G., Armulik, A. and Betsholtz, C. (2009). "Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **29**(5): 630-638.
- Garmy-Susini, B. and Varner, J. A. (2008). "Roles of integrins in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis." *Lymphat Res Biol* **6**(3-4): 155-163.
- Gaultier, A., Salicioni, A. M., Arandjelovic, S. and Gonias, S. L. (2006). "Regulation of the composition of the extracellular matrix by low density lipoprotein receptor-related protein-1: activities based on regulation of mRNA expression." *J Biol Chem* **281**(11): 7332-7340.
- Gerber, H. P., Dixit, V. and Ferrara, N. (1998). "Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells." *J Biol Chem* **273**(21): 13313-13316.
- Gerhardt, H. and Betsholtz, C. (2005). "How do endothelial cells orientate?" *EXS*(94): 3-15.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D. and Betsholtz, C. (2003). "VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia." *J Cell Biol* **161**(6): 1163-1177.
- Goel, S., Duda, D. G., Xu, L., Munn, L. L., Boucher, Y., Fukumura, D. and Jain, R. K. (2011). "Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases." *Physiol Rev* **91**(3): 1071-1121.

- Goffin, V., Binart, N., Touraine, P. and Kelly, P. A. (2002). "Prolactin: the new biology of an old hormone." Annu Rev Physiol **64**: 47-67.
- Gonzalez, C., Corbacho, A. M., Eiserich, J. P., Garcia, C., Lopez-Barrera, F., Morales-Tlalpan, V., Barajas-Espinosa, A., Diaz-Munoz, M., Rubio, R., Lin, S. H., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (2004). "16K-prolactin inhibits activation of endothelial nitric oxide synthase, intracellular calcium mobilization, and endothelium-dependent vasorelaxation." Endocrinology **145**(12): 5714-5722.
- Gonzalez, C., Parra, A., Ramirez-Peredo, J., Garcia, C., Rivera, J. C., Macotela, Y., Aranda, J., Lemini, M., Arias, J., Ibarguengoitia, F., de la Escalera, G. M. and Clapp, C. (2007). "Elevated vasoinhibins may contribute to endothelial cell dysfunction and low birth weight in preeclampsia." Lab Invest **87**(10): 1009-1017.
- Good, D. J., Polverini, P. J., Rastinejad, F., Le Beau, M. M., Lemons, R. S., Frazier, W. A. and Bouck, N. P. (1990). "A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(17): 6624-6628.
- Gospodarowicz, D., Massoglia, S., Cheng, J. and Fujii, D. K. (1986). "Effect of fibroblast growth factor and lipoproteins on the proliferation of endothelial cells derived from bovine adrenal cortex, brain cortex, and corpus luteum capillaries." J Cell Physiol **127**(1): 121-136.
- Gourlaouen, M., Welti, J. C., Vasudev, N. S. and Reynolds, A. R. (2013). "Essential Role for Endocytosis in the Growth Factor-stimulated Activation of ERK1/2 in Endothelial Cells." J Biol Chem **288**(11): 7467-7480.
- Grazia Lampugnani, M., Zanetti, A., Corada, M., Takahashi, T., Balconi, G., Breviario, F., Orsenigo, F., Cattelino, A., Kemler, R., Daniel, T. O. and Dejana, E. (2003). "Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148." J Cell Biol **161**(4): 793-804.
- Gridley, T. (2010). "Notch signaling in the vasculature." Curr Top Dev Biol **92**: 277-309.
- Gutierrez, L. S., Schulman, A., Brito-Robinson, T., Noria, F., Ploplis, V. A. and Castellino, F. J. (2000). "Tumor development is retarded in mice lacking the gene for urokinase-type plasminogen activator or its inhibitor, plasminogen activator inhibitor-1." Cancer Res **60**(20): 5839-5847.
- Halkein, J., Tabruyn, S. P., Ricke-Hoch, M., Haghikia, A., Nguyen, N. Q., Scherr, M., Castermans, K., Malvaux, L., Lambert, V., Thiry, M., Sliwa, K., Noel, A., Martial, J. A., Hilfiker-Kleiner, D. and Struman, I. (2013). "MicroRNA-146a is a therapeutic target and biomarker for peripartum cardiomyopathy." J Clin Invest **123**(5): 2143-2154.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-364.
- He, Z. and Tessier-Lavigne, M. (1997). "Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III." Cell **90**(4): 739-751.
- Hellstrom, M., Phng, L. K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A. K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M. L., Kalen, M., Gerhardt, H. and Betsholtz, C. (2007). "Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis." Nature **445**(7129): 776-780.
- Herzog, Y., Kalcheim, C., Kahane, N., Reshef, R. and Neufeld, G. (2001). "Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins." Mech Dev **109**(1): 115-119.
- Hilfiker-Kleiner, D., Meyer, G. P., Schieffer, E., Goldmann, B., Podewski, E., Struman, I., Fischer, P. and Drexler, H. (2007). "Recovery from postpartum cardiomyopathy in 2 patients by blocking prolactin release with bromocriptine." J Am Coll Cardiol **50**(24): 2354-2355.
- Hilfiker-Kleiner, D., Struman, I., Hoch, M., Podewski, E. and Sliwa, K. (2012). "16-kDa prolactin and bromocriptine in postpartum cardiomyopathy." Curr Heart Fail Rep **9**(3): 174-182.

- Hirata, A., Ogawa, S., Kometani, T., Kuwano, T., Naito, S., Kuwano, M. and Ono, M. (2002). "ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase." *Cancer Res* **62**(9): 2554-2560.
- Holmes, K., Roberts, O. L., Thomas, A. M. and Cross, M. J. (2007). "Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition." *Cell Signal* **19**(10): 2003-2012.
- Holmqvist, K., Cross, M. J., Rolny, C., Hagerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L. and Welsh, M. (2004). "The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration." *J Biol Chem* **279**(21): 22267-22275.
- Horowitz, A. and Seerapu, H. R. (2012). "Regulation of VEGF signaling by membrane traffic." *Cell Signal* **24**(9): 1810-1820.
- Huai, Q., Mazar, A. P., Kuo, A., Parry, G. C., Shaw, D. E., Callahan, J., Li, Y., Yuan, C., Bian, C., Chen, L., Furie, B., Furie, B. C., Cines, D. B. and Huang, M. (2006). "Structure of human urokinase plasminogen activator in complex with its receptor." *Science* **311**(5761): 656-659.
- Huang, H., Bhat, A., Woodnutt, G. and Lappe, R. (2010). "Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy." *Nat Rev Cancer* **10**(8): 575-585.
- Hynes, R. O. (2002). "Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines." *Cell* **110**(6): 673-687.
- Ichimura, A., Matsumoto, S., Suzuki, S., Dan, T., Yamaki, S., Sato, Y., Kiyomoto, H., Ishii, N., Okada, K., Matsuo, O., Hou, F. F., Vaughan, D. E., van Ypersele de Strihou, C. and Miyata, T. (2013). "A Small Molecule Inhibitor to Plasminogen Activator Inhibitor 1 Inhibits Macrophage Migration." *Arterioscler Thromb Vasc Biol*.
- Iruela-Arispe, M. L., Bornstein, P. and Sage, H. (1991). "Thrombospondin exerts an antiangiogenic effect on cord formation by endothelial cells in vitro." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(11): 5026-5030.
- Iruela-Arispe, M. L. and Davis, G. E. (2009). "Cellular and molecular mechanisms of vascular lumen formation." *Dev Cell* **16**(2): 222-231.
- Isogai, C., Laug, W. E., Shimada, H., Declerck, P. J., Stins, M. F., Durden, D. L., Erdreich-Epstein, A. and DeClerck, Y. A. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 promotes angiogenesis by stimulating endothelial cell migration toward fibronectin." *Cancer Res* **61**(14): 5587-5594.
- Jaffe, E. A., Nachman, R. L., Becker, C. G. and Minick, C. R. (1973). "Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria." *J Clin Invest* **52**(11): 2745-2756.
- Jakobsson, L., Kreuger, J., Holmborn, K., Lundin, L., Eriksson, I., Kjellen, L. and Claesson-Welsh, L. (2006). "Heparan sulfate in trans potentiates VEGFR-mediated angiogenesis." *Dev Cell* **10**(5): 625-634.
- Jiang, T., Zhuang, J., Duan, H., Luo, Y., Zeng, Q., Fan, K., Yan, H., Lu, D., Ye, Z., Hao, J., Feng, J., Yang, D. and Yan, X. (2012). "CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis." *Blood* **120**(11): 2330-2339.
- Jin, F., Hagemann, N., Brockmeier, U., Schafer, S. T., Zechariah, A. and Hermann, D. M. (2013). "LDL attenuates VEGF-induced angiogenesis via mechanisms involving VEGFR2 internalization and degradation following endosome-trans-Golgi network trafficking." *Angiogenesis*.
- Jo, M., Thomas, K. S., Takimoto, S., Gaultier, A., Hsieh, E. H., Lester, R. D. and Gonias, S. L. (2007). "Urokinase receptor primes cells to proliferate in response to epidermal growth factor." *Oncogene* **26**(18): 2585-2594.
- Kamei, M., Saunders, W. B., Bayless, K. J., Dye, L., Davis, G. E. and Weinstein, B. M. (2006). "Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo." *Nature* **442**(7101): 453-456.
- Katz, M., Amit, I. and Yarden, Y. (2007). "Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases." *Biochim Biophys Acta* **1773**(8): 1161-1176.

- Kawamura, H., Li, X., Goishi, K., van Meeteren, L. A., Jakobsson, L., Cebe-Suarez, S., Shimizu, A., Edholm, D., Ballmer-Hofer, K., Kjellen, L., Klagsbrun, M. and Claesson-Welsh, L. (2008). "Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization." *Blood* **112**(9): 3638-3649.
- Kerbel, R. S. (2008). "Tumor angiogenesis." *N Engl J Med* **358**(19): 2039-2049.
- Kim, H. S., Shin, H. S., Kwak, H. J., Cho, C. H., Lee, C. O. and Koh, G. Y. (2003). "Betacellulin induces angiogenesis through activation of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase in endothelial cell." *FASEB J* **17**(2): 318-320.
- Kim, J., Luo, W., Chen, D. T., Earley, K., Tunstead, J., Yu-Lee, L. Y. and Lin, S. H. (2003). "Antitumor activity of the 16-kDa prolactin fragment in prostate cancer." *Cancer Res* **63**(2): 386-393.
- Kinet, V., Castermans, K., Herkenne, S., Maillard, C., Blacher, S., Lion, M., Noel, A., Martial, J. A. and Struman, I. (2011). "The angiostatic protein 16K human prolactin significantly prevents tumor-induced lymphangiogenesis by affecting lymphatic endothelial cells." *Endocrinology* **152**(11): 4062-4071.
- Kinet, V., Nguyen, N. Q., Sabatel, C., Blacher, S., Noel, A., Martial, J. A. and Struman, I. (2009). "Antiangiogenic liposomal gene therapy with 16K human prolactin efficiently reduces tumor growth." *Cancer Lett* **284**(2): 222-228.
- Koch, S. and Claesson-Welsh, L. (2012). "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(7): a006502.
- Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L. and Claesson-Welsh, L. (2011). "Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors." *Biochem J* **437**(2): 169-183.
- Lakshmikanthan, S., Sobczak, M., Chun, C., Henschel, A., Dargatz, J., Ramchandran, R. and Chrzanowska-Wodnicka, M. (2011). "Rap1 promotes VEGFR2 activation and angiogenesis by a mechanism involving integrin alphavbeta(3)." *Blood* **118**(7): 2015-2026.
- Lamallice, L., Houle, F. and Huot, J. (2006). "Phosphorylation of Tyr1214 within VEGFR-2 triggers the recruitment of Nck and activation of Fyn leading to SAPK2/p38 activation and endothelial cell migration in response to VEGF." *J Biol Chem* **281**(45): 34009-34020.
- Lampugnani, M. G., Orsenigo, F., Gagliani, M. C., Tacchetti, C. and Dejana, E. (2006). "Vascular endothelial cadherin controls VEGFR-2 internalization and signaling from intracellular compartments." *J Cell Biol* **174**(4): 593-604.
- Lanahan, A. A., Hermans, K., Claes, F., Kerley-Hamilton, J. S., Zhuang, Z. W., Giordano, F. J., Carmeliet, P. and Simons, M. (2010). "VEGF receptor 2 endocytic trafficking regulates arterial morphogenesis." *Dev Cell* **18**(5): 713-724.
- LaRusch, G. A., Mahdi, F., Shariat-Madar, Z., Adams, G., Sitrin, R. G., Zhang, W. M., McCrae, K. R. and Schmaier, A. H. (2010). "Factor XII stimulates ERK1/2 and Akt through uPAR, integrins, and the EGFR to initiate angiogenesis." *Blood* **115**(24): 5111-5120.
- Lazar, M. H., Christensen, P. J., Du, M., Yu, B., Subbotina, N. M., Hanson, K. E., Hansen, J. M., White, E. S., Simon, R. H. and Sisson, T. H. (2004). "Plasminogen activator inhibitor-1 impairs alveolar epithelial repair by binding to vitronectin." *Am J Respir Cell Mol Biol* **31**(6): 672-678.
- Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J. and Weiner, R. I. (1998). "Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression." *Endocrinology* **139**(9): 3696-3703.
- Lee, S., Chen, T. T., Barber, C. L., Jordan, M. C., Murdock, J., Desai, S., Ferrara, N., Nagy, A., Roos, K. P. and Iruela-Arispe, M. L. (2007). "Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis." *Cell* **130**(4): 691-703.
- Lee, S. H., Kunz, J., Lin, S. H. and Yu-Lee, L. Y. (2007). "16-kDa prolactin inhibits endothelial cell migration by down-regulating the Ras-Tiam1-Rac1-Pak1 signaling pathway." *Cancer Res* **67**(22): 11045-11053.
- Lee, S. H., Nishino, M., Mazumdar, T., Garcia, G. E., Galfione, M., Lee, F. L., Lee, C. L., Liang, A., Kim, J., Feng, L., Eissa, N. T., Lin, S. H. and Yu-Lee, L. Y. (2005). "16-kDa prolactin down-regulates

- inducible nitric oxide synthase expression through inhibition of the signal transducer and activator of transcription 1/IFN regulatory factor-1 pathway." *Cancer Res* **65**(17): 7984-7992.
- Liao, H., Hyman, M. C., Lawrence, D. A. and Pinsky, D. J. (2007). "Molecular regulation of the PAI-1 gene by hypoxia: contributions of Egr-1, HIF-1alpha, and C/EBPalpha." *FASEB J* **21**(3): 935-949.
- Lindahl, T. L., Sigurdardottir, O. and Wiman, B. (1989). "Stability of plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1)." *Thromb Haemost* **62**(2): 748-751.
- Liu, D., Aguirre Ghiso, J., Estrada, Y. and Ossowski, L. (2002). "EGFR is a transducer of the urokinase receptor initiated signal that is required for in vivo growth of a human carcinoma." *Cancer Cell* **1**(5): 445-457.
- Liu, Y., Pixley, R., Fusaro, M., Godoy, G., Kim, E., Bromberg, M. E. and Colman, R. W. (2009). "Cleaved high-molecular-weight kinogen and its domain 5 inhibit migration and invasion of human prostate cancer cells through the epidermal growth factor receptor pathway." *Oncogene* **28**(30): 2756-2765.
- Liu, Y. and Senger, D. R. (2004). "Matrix-specific activation of Src and Rho initiates capillary morphogenesis of endothelial cells." *FASEB J* **18**(3): 457-468.
- Liu, Z., Kobayashi, K., van Dinther, M., van Heiningen, S. H., Valdimarsdottir, G., van Laar, T., Scharpfenecker, M., Lowik, C. W., Goumans, M. J., Ten Dijke, P. and Pardali, E. (2009). "VEGF and inhibitors of TGFbeta type-I receptor kinase synergistically promote blood-vessel formation by inducing alpha5-integrin expression." *J Cell Sci* **122**(Pt 18): 3294-3302.
- Lkhider, M., Castino, R., Bouguyon, E., Isidoro, C. and Ollivier-Bousquet, M. (2004). "Cathepsin D released by lactating rat mammary epithelial cells is involved in prolactin cleavage under physiological conditions." *J Cell Sci* **117**(Pt 21): 5155-5164.
- Loges, S., Mazzone, M., Hohensinner, P. and Carmeliet, P. (2009). "Silencing or fueling metastasis with VEGF inhibitors: antiangiogenesis revisited." *Cancer Cell* **15**(3): 167-170.
- Lucke, S. and Levkau, B. (2010). "Endothelial functions of sphingosine-1-phosphate." *Cell Physiol Biochem* **26**(1): 87-96.
- Lupu, F., Heim, D., Bachmann, F. and Kruithof, E. K. (1994). "Expression of LDL receptor-related protein/alpha 2-macroglobulin receptor in human normal and atherosclerotic arteries." *Arterioscler Thromb* **14**(9): 1438-1444.
- Macotela, Y., Aguilar, M. B., Guzman-Morales, J., Rivera, J. C., Zermeno, C., Lopez-Barrera, F., Nava, G., Lavalle, C., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (2006). "Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin." *J Cell Sci* **119**(Pt 9): 1790-1800.
- Mahabeleshwar, G. H., Feng, W., Phillips, D. R. and Byzova, T. V. (2006). "Integrin signaling is critical for pathological angiogenesis." *J Exp Med* **203**(11): 2495-2507.
- Mahabeleshwar, G. H., Feng, W., Reddy, K., Plow, E. F. and Byzova, T. V. (2007). "Mechanisms of integrin-vascular endothelial growth factor receptor cross-activation in angiogenesis." *Circ Res* **101**(6): 570-580.
- Maharaj, A. S., Saint-Geniez, M., Maldonado, A. E. and D'Amore, P. A. (2006). "Vascular endothelial growth factor localization in the adult." *Am J Pathol* **168**(2): 639-648.
- Maity, A., Pore, N., Lee, J., Solomon, D. and O'Rourke, D. M. (2000). "Epidermal growth factor receptor transcriptionally up-regulates vascular endothelial growth factor expression in human glioblastoma cells via a pathway involving phosphatidylinositol 3'-kinase and distinct from that induced by hypoxia." *Cancer Res* **60**(20): 5879-5886.
- Martini, J. F., Piot, C., Humeau, L. M., Struman, I., Martial, J. A. and Weiner, R. I. (2000). "The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation." *Mol Endocrinol* **14**(10): 1536-1549.
- Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., Wang, L., Wikner, C., Qi, J. H., Wernstedt, C., Wu, J., Bruheim, S., Mugishima, H., Mukhopadhyay, D., Spurkland, A.

- and Claesson-Welsh, L. (2005). "VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSAd in tumor angiogenesis." *EMBO J* **24**(13): 2342-2353.
- McMahon, G. A., Petitclerc, E., Stefansson, S., Smith, E., Wong, M. K., Westrick, R. J., Ginsburg, D., Brooks, P. C. and Lawrence, D. A. (2001). "Plasminogen activator inhibitor-1 regulates tumor growth and angiogenesis." *J Biol Chem* **276**(36): 33964-33968.
- Meyer, R. D., Dayanir, V., Majnoun, F. and Rahimi, N. (2002). "The presence of a single tyrosine residue at the carboxyl domain of vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 regulates its autophosphorylation and activation of signaling molecules." *J Biol Chem* **277**(30): 27081-27087.
- Milkiewicz, M., Ispanovic, E., Doyle, J. L. and Haas, T. L. (2006). "Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation." *Int J Biochem Cell Biol* **38**(3): 333-357.
- Minowa, H., Takahashi, Y., Tanaka, T., Naganuma, K., Ida, S., Maki, I. and Yoshioka, A. (1999). "Four cases of bleeding diathesis in children due to congenital plasminogen activator inhibitor-1 deficiency." *Haemostasis* **29**(5): 286-291.
- Mittra, I. (1980). "A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: part I. Biosynthesis, characterization and regulatory control." *Biochem Biophys Res Commun* **95**(4): 1750-1759.
- Moestrup, S. K., Gliemann, J. and Pallesen, G. (1992). "Distribution of the alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein in human tissues." *Cell Tissue Res* **269**(3): 375-382.
- Nakayama, M., Nakayama, A., van Lessen, M., Yamamoto, H., Hoffmann, S., Drexler, H. C., Itoh, N., Hirose, T., Breier, G., Vestweber, D., Cooper, J. A., Ohno, S., Kaibuchi, K. and Adams, R. H. (2013). "Spatial regulation of VEGF receptor endocytosis in angiogenesis." *Nat Cell Biol* **15**(3): 249-260.
- Nguyen, N. Q., Castermans, K., Berndt, S., Herkenne, S., Tabruyn, S. P., Blacher, S., Lion, M., Noel, A., Martial, J. A. and Struman, I. (2011). "The antiangiogenic 16K prolactin impairs functional tumor neovascularization by inhibiting vessel maturation." *PLoS One* **6**(11): e27318.
- Nguyen, N. Q., Cornet, A., Blacher, S., Tabruyn, S. P., Foidart, J. M., Noel, A., Martial, J. A. and Struman, I. (2007). "Inhibition of tumor growth and metastasis establishment by adenovirus-mediated gene transfer delivery of the antiangiogenic factor 16K hPRL." *Mol Ther* **15**(12): 2094-2100.
- Nguyen, N. Q., Tabruyn, S. P., Lins, L., Lion, M., Cornet, A. M., Lair, F., Rentier-Delrue, F., Brasseur, R., Martial, J. A. and Struman, I. (2006). "Prolactin/growth hormone-derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(39): 14319-14324.
- Novoa de Armas, H., Dewilde, M., Verbeke, K., De Maeyer, M. and Declerck, P. J. (2007). "Study of recombinant antibody fragments and PAI-1 complexes combining protein-protein docking and results from site-directed mutagenesis." *Structure* **15**(9): 1105-1116.
- Nyberg, P., Xie, L. and Kalluri, R. (2005). "Endogenous inhibitors of angiogenesis." *Cancer Res* **65**(10): 3967-3979.
- Nykjaer, A., Conese, M., Christensen, E. I., Olson, D., Cremona, O., Gliemann, J. and Blasi, F. (1997). "Recycling of the urokinase receptor upon internalization of the uPA:serpin complexes." *EMBO J* **16**(10): 2610-2620.
- Pan, H., Nguyen, N. Q., Yoshida, H., Bentzien, F., Shaw, L. C., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Weiner, R., Struman, I. and Grant, M. B. (2004). "Molecular targeting of antiangiogenic factor 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(7): 2413-2419.
- Pan, Q., Chanthery, Y., Liang, W. C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., Tong, R. K., Kowalski, J., Yee, S. F., Pacheco, G., Ross, S., Cheng, Z., Le Couter, J., Plowman, G., Peale, F., Koch, A. W., Wu, Y., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M. and Watts, R. J. (2007). "Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth." *Cancer Cell* **11**(1): 53-67.

- Pardali, E., Goumans, M. J. and ten Dijke, P. (2010). "Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease." *Trends Cell Biol* **20**(9): 556-567.
- Phng, L. K. and Gerhardt, H. (2009). "Angiogenesis: a team effort coordinated by notch." *Dev Cell* **16**(2): 196-208.
- Piwnica, D., Fernandez, I., Binart, N., Touraine, P., Kelly, P. A. and Goffin, V. (2006). "A new mechanism for prolactin processing into 16K PRL by secreted cathepsin D." *Mol Endocrinol* **20**(12): 3263-3278.
- Piwnica, D., Touraine, P., Struman, I., Tabruyn, S., Bolbach, G., Clapp, C., Martial, J. A., Kelly, P. A. and Goffin, V. (2004). "Cathepsin D processes human prolactin into multiple 16K-like N-terminal fragments: study of their antiangiogenic properties and physiological relevance." *Mol Endocrinol* **18**(10): 2522-2542.
- Pluskota, E., Soloviev, D. A. and Plow, E. F. (2003). "Convergence of the adhesive and fibrinolytic systems: recognition of urokinase by integrin alpha Mbeta 2 as well as by the urokinase receptor regulates cell adhesion and migration." *Blood* **101**(4): 1582-1590.
- Poettler, M., Unseld, M., Mihaly-Bison, J., Uhrin, P., Koban, F., Binder, B. R., Zielinski, C. C. and Prager, G. W. (2012). "The urokinase receptor (CD87) represents a central mediator of growth factor-induced endothelial cell migration." *Thromb Haemost* **108**(2): 357-366.
- Potente, M., Gerhardt, H. and Carmeliet, P. (2011). "Basic and therapeutic aspects of angiogenesis." *Cell* **146**(6): 873-887.
- Prager, G. W., Breuss, J. M., Steurer, S., Mihaly, J. and Binder, B. R. (2004). "Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces rapid prourokinase (pro-uPA) activation on the surface of endothelial cells." *Blood* **103**(3): 955-962.
- Prager, G. W., Breuss, J. M., Steurer, S., Olcaydu, D., Mihaly, J., Brunner, P. M., Stockinger, H. and Binder, B. R. (2004). "Vascular endothelial growth factor receptor-2-induced initial endothelial cell migration depends on the presence of the urokinase receptor." *Circ Res* **94**(12): 1562-1570.
- Prager, G. W., Mihaly, J., Brunner, P. M., Koshelnick, Y., Hoyer-Hansen, G. and Binder, B. R. (2009). "Urokinase mediates endothelial cell survival via induction of the X-linked inhibitor of apoptosis protein." *Blood* **113**(6): 1383-1390.
- Ragno, P. (2006). "The urokinase receptor: a ligand or a receptor? Story of a sociable molecule." *Cell Mol Life Sci* **63**(9): 1028-1037.
- Ribatti, D. (2009). "Endogenous inhibitors of angiogenesis: a historical review." *Leuk Res* **33**(5): 638-644.
- Riccio, A., Pedone, P. V., Lund, L. R., Olesen, T., Olsen, H. S. and Andreasen, P. A. (1992). "Transforming growth factor beta 1-responsive element: closely associated binding sites for USF and CCAAT-binding transcription factor-nuclear factor I in the type 1 plasminogen activator inhibitor gene." *Mol Cell Biol* **12**(4): 1846-1855.
- Riese, D. J., 2nd and Stern, D. F. (1998). "Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network." *Bioessays* **20**(1): 41-48.
- Risau, W. (1997). "Mechanisms of angiogenesis." *Nature* **386**(6626): 671-674.
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S., Haddad, G. G. and Karin, M. (2008). "NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha." *Nature* **453**(7196): 807-811.
- Robinson, S. D., Reynolds, L. E., Kostourou, V., Reynolds, A. R., da Silva, R. G., Tavora, B., Baker, M., Marshall, J. F. and Hodivala-Dilke, K. M. (2009). "Alphav beta3 integrin limits the contribution of neuropilin-1 to vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis." *J Biol Chem* **284**(49): 33966-33981.
- Sabatel, C., Cornet, A. M., Tabruyn, S. P., Malvaux, L., Castermans, K., Martial, J. A. and Struman, I. (2010). "Sprouty1, a new target of the angiostatic agent 16K prolactin, negatively regulates angiogenesis." *Mol Cancer* **9**: 231.

- Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N. and Shibuya, M. (2005). "Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(4): 1076-1081.
- Salonen, E. M., Vaheri, A., Pollanen, J., Stephens, R., Andreasen, P., Mayer, M., Dano, K., Gailit, J. and Ruoslahti, E. (1989). "Interaction of plasminogen activator inhibitor (PAI-1) with vitronectin." J Biol Chem **264**(11): 6339-6343.
- Samarakoon, R., Higgins, S. P., Higgins, C. E. and Higgins, P. J. (2008). "TGF-beta1-induced plasminogen activator inhibitor-1 expression in vascular smooth muscle cells requires pp60(c-src)/EGFR(Y845) and Rho/ROCK signaling." J Mol Cell Cardiol **44**(3): 527-538.
- Sawamiphak, S., Seidel, S., Essmann, C. L., Wilkinson, G. A., Pitulescu, M. E., Acker, T. and Acker-Palmer, A. (2010). "Ephrin-B2 regulates VEGFR2 function in developmental and tumour angiogenesis." Nature **465**(7297): 487-491.
- Schlessinger, J. (2002). "Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor." Cell **110**(6): 669-672.
- Semenza, G. L. (2001). "HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing." Curr Opin Cell Biol **13**(2): 167-171.
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V. S. and Dvorak, H. F. (1983). "Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid." Science **219**(4587): 983-985.
- Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenstein, M., Wu, X. F., Breitman, M. L. and Schuh, A. C. (1995). "Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice." Nature **376**(6535): 62-66.
- Shetty, S., Velusamy, T., Idell, S., Shetty, P., Mazar, A. P., Bhandary, Y. P. and Shetty, R. S. (2007). "Regulation of urokinase receptor expression by p53: novel role in stabilization of uPAR mRNA." Mol Cell Biol **27**(16): 5607-5618.
- Singh, A. J., Meyer, R. D., Band, H. and Rahimi, N. (2005). "The carboxyl terminus of VEGFR-2 is required for PKC-mediated down-regulation." Mol Biol Cell **16**(4): 2106-2118.
- Sinha, Y. N. (1995). "Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance." Endocr Rev **16**(3): 354-369.
- Sini, P., Wyder, L., Schnell, C., O'Reilly, T., Littlewood, A., Brandt, R., Hynes, N. E. and Wood, J. (2005). "The antitumor and antiangiogenic activity of vascular endothelial growth factor receptor inhibition is potentiated by ErbB1 blockade." Clin Cancer Res **11**(12): 4521-4532.
- Smith, H. W. and Marshall, C. J. (2010). "Regulation of cell signalling by uPAR." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(1): 23-36.
- Soldi, R., Mitola, S., Strasly, M., Defilippi, P., Tarone, G. and Bussolino, F. (1999). "Role of alphavbeta3 integrin in the activation of vascular endothelial growth factor receptor-2." EMBO J **18**(4): 882-892.
- Somsel Rodman, J. and Wandinger-Ness, A. (2000). "Rab GTPases coordinate endocytosis." J Cell Sci **113 Pt 2**: 183-192.
- Spuch, C., Ortolano, S. and Navarro, C. (2012). "LRP-1 and LRP-2 receptors function in the membrane neuron. Trafficking mechanisms and proteolytic processing in Alzheimer's disease." Front Physiol **3**: 269.
- Stefansson, S. and Lawrence, D. A. (1996). "The serpin PAI-1 inhibits cell migration by blocking integrin alpha V beta 3 binding to vitronectin." Nature **383**(6599): 441-443.
- Stefansson, S., Petittler, E., Wong, M. K., McMahon, G. A., Brooks, P. C. and Lawrence, D. A. (2001). "Inhibition of angiogenesis in vivo by plasminogen activator inhibitor-1." J Biol Chem **276**(11): 8135-8141.
- Stefansson, S., Su, E. J., Ishigami, S., Cale, J. M., Gao, Y., Gorlatova, N. and Lawrence, D. A. (2007). "The contributions of integrin affinity and integrin-cytoskeletal engagement in endothelial and smooth muscle cell adhesion to vitronectin." J Biol Chem **282**(21): 15679-15689.

- Stenmark, H. and Olkkonen, V. M. (2001). "The Rab GTPase family." *Genome Biol* **2**(5): REVIEWS3007.
- Struman, I., Bentzien, F., Lee, H., Mainfroid, V., D'Angelo, G., Goffin, V., Weiner, R. I. and Martial, J. A. (1999). "Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(4): 1246-1251.
- Tabruyn, S. P., Nguyen, N. Q., Cornet, A. M., Martial, J. A. and Struman, I. (2005). "The antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G0-G1 and the G2-M phases." *Mol Endocrinol* **19**(7): 1932-1942.
- Tabruyn, S. P., Sabatel, C., Nguyen, N. Q., Verhaeghe, C., Castermans, K., Malvaux, L., Griffioen, A. W., Martial, J. A. and Struman, I. (2007). "The angiostatic 16K human prolactin overcomes endothelial cell anergy and promotes leukocyte infiltration via nuclear factor-kappaB activation." *Mol Endocrinol* **21**(6): 1422-1429.
- Tabruyn, S. P., Sorlet, C. M., Rentier-Delrue, F., Bours, V., Weiner, R. I., Martial, J. A. and Struman, I. (2003). "The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB." *Mol Endocrinol* **17**(9): 1815-1823.
- Takada, Y. (2012). "Potential role of krigle-integrin interaction in plasmin and uPA actions (a hypothesis)." *J Biomed Biotechnol* **2012**: 136302.
- Takahashi, T., Ueno, H. and Shibuya, M. (1999). "VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells." *Oncogene* **18**(13): 2221-2230.
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K. and Shibuya, M. (2001). "A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells." *EMBO J* **20**(11): 2768-2778.
- Tang, C. H., Hill, M. L., Brumwell, A. N., Chapman, H. A. and Wei, Y. (2008). "Signaling through urokinase and urokinase receptor in lung cancer cells requires interactions with beta1 integrins." *J Cell Sci* **121**(Pt 22): 3747-3756.
- Tang, C. H. and Wei, Y. (2008). "The urokinase receptor and integrins in cancer progression." *Cell Mol Life Sci* **65**(12): 1916-1932.
- Taraboletti, G., Roberts, D., Liotta, L. A. and Giavazzi, R. (1990). "Platelet thrombospondin modulates endothelial cell adhesion, motility, and growth: a potential angiogenesis regulatory factor." *J Cell Biol* **111**(2): 765-772.
- Teilum, K., Hoch, J. C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J. A. and Kragelund, B. B. (2005). "Solution structure of human prolactin." *J Mol Biol* **351**(4): 810-823.
- Thomas, S. M. and Grandis, J. R. (2004). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of EGFR inhibitors under clinical investigation." *Cancer Treat Rev* **30**(3): 255-268.
- Tkachuk, V. A., Plekhanova, O. S. and Parfyonova, Y. V. (2009). "Regulation of arterial remodeling and angiogenesis by urokinase-type plasminogen activator." *Can J Physiol Pharmacol* **87**(4): 231-251.
- Tozer, G. M., Akerman, S., Cross, N. A., Barber, P. R., Bjorndahl, M. A., Greco, O., Harris, S., Hill, S. A., Honess, D. J., Ireson, C. R., Pettyjohn, K. L., Prise, V. E., Reyes-Aldasoro, C. C., Ruhrberg, C., Shima, D. T. and Kanthou, C. (2008). "Blood vessel maturation and response to vascular-disrupting therapy in single vascular endothelial growth factor-A isoform-producing tumors." *Cancer Res* **68**(7): 2301-2311.
- Tugues, S., Koch, S., Gualandi, L., Li, X. and Claesson-Welsh, L. (2011). "Vascular endothelial growth factors and receptors: anti-angiogenic therapy in the treatment of cancer." *Mol Aspects Med* **32**(2): 88-111.
- van Hinsbergh, V. W., Engelse, M. A. and Quax, P. H. (2006). "Pericellular proteases in angiogenesis and vasculogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**(4): 716-728.

- Vander Kooi, C. W., Jusino, M. A., Perman, B., Neau, D. B., Bellamy, H. D. and Leahy, D. J. (2007). "Structural basis for ligand and heparin binding to neuropilin B domains." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(15): 6152-6157.
- Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I. and Huber, P. (2007). "Src kinase phosphorylates vascular endothelial-cadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site." Oncogene **26**(7): 1067-1077.
- Wang, L., Zeng, H., Wang, P., Soker, S. and Mukhopadhyay, D. (2003). "Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration." J Biol Chem **278**(49): 48848-48860.
- Wang, Y., Dang, J., Wang, H., Allgayer, H., Murrell, G. A. and Boyd, D. (2000). "Identification of a novel nuclear factor-kappaB sequence involved in expression of urokinase-type plasminogen activator receptor." Eur J Biochem **267**(11): 3248-3254.
- Wei, Y., Czekay, R. P., Robillard, L., Kugler, M. C., Zhang, F., Kim, K. K., Xiong, J. P., Humphries, M. J. and Chapman, H. A. (2005). "Regulation of alpha5beta1 integrin conformation and function by urokinase receptor binding." J Cell Biol **168**(3): 501-511.
- Wei, Y., Eble, J. A., Wang, Z., Kreidberg, J. A. and Chapman, H. A. (2001). "Urokinase receptors promote beta1 integrin function through interactions with integrin alpha3beta1." Mol Biol Cell **12**(10): 2975-2986.
- Wei, Y., Tang, C. H., Kim, Y., Robillard, L., Zhang, F., Kugler, M. C. and Chapman, H. A. (2007). "Urokinase receptors are required for alpha 5 beta 1 integrin-mediated signaling in tumor cells." J Biol Chem **282**(6): 3929-3939.
- West, X. Z., Meller, N., Malinin, N. L., Deshmukh, L., Meller, J., Mahabeleshwar, G. H., Weber, M. E., Kerr, B. A., Vinogradova, O. and Byzova, T. V. (2012). "Integrin beta3 crosstalk with VEGFR accommodating tyrosine phosphorylation as a regulatory switch." PLoS One **7**(2): e31071.
- Wiman, B., Almquist, A., Sigurdardottir, O. and Lindahl, T. (1988). "Plasminogen activator inhibitor 1 (PAI) is bound to vitronectin in plasma." FEBS Lett **242**(1): 125-128.
- Wu, L. W., Mayo, L. D., Dunbar, J. D., Kessler, K. M., Ozes, O. N., Warren, R. S. and Donner, D. B. (2000). "VRAP is an adaptor protein that binds KDR, a receptor for vascular endothelial cell growth factor." J Biol Chem **275**(9): 6059-6062.
- Xue, W., Mizukami, I., Todd, R. F., 3rd and Petty, H. R. (1997). "Urokinase-type plasminogen activator receptors associate with beta1 and beta3 integrins of fibrosarcoma cells: dependence on extracellular matrix components." Cancer Res **57**(9): 1682-1689.
- Yarden, Y. (2001). "The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities." Eur J Cancer **37 Suppl 4**: S3-8.
- Yingling, J. M., Datto, M. B., Wong, C., Frederick, J. P., Liberati, N. T. and Wang, X. F. (1997). "Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor beta-inducible DNA binding protein." Mol Cell Biol **17**(12): 7019-7028.
- Yoshida, T., Zhang, G. and Haura, E. B. (2010). "Targeting epidermal growth factor receptor: central signaling kinase in lung cancer." Biochem Pharmacol **80**(5): 613-623.
- Yue, J., Zhang, K. and Chen, J. (2012). "Role of integrins in regulating proteases to mediate extracellular matrix remodeling." Cancer Microenviron **5**(3): 275-283.

Liste des publications

The antiangiogenic 16K prolactin impairs functional tumor neovascularization by inhibiting vessel maturation. Nguyen NQ, Castermans K, Berndt S, **Herkenne S**, Tabruyn SP, Blacher S, Lion M, Noel A, Martial JA, Struman I. PLoS One. 2011;6(11):e27318.

The angiostatic protein 16K human prolactin significantly prevents tumor-induced lymphangiogenesis by affecting lymphatic endothelial cells. Kinet V, Castermans K, **Herkenne S**, Maillard C, Blacher S, Lion M, Noël A, Martial JA, Struman I. Endocrinology. 2011 Nov;152(11):4062-71.

