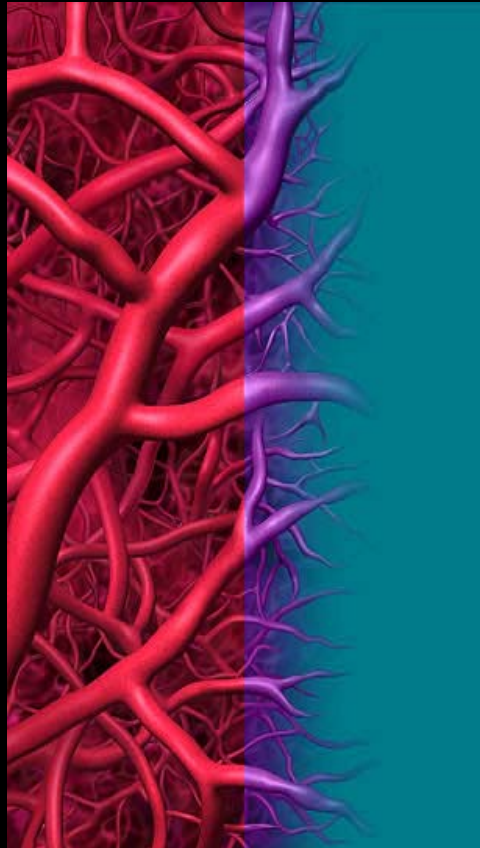




**UNIVERSITE DE LIEGE**  
**Faculté des Sciences**



Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génie Génétique  
Professeur J.A. Martial



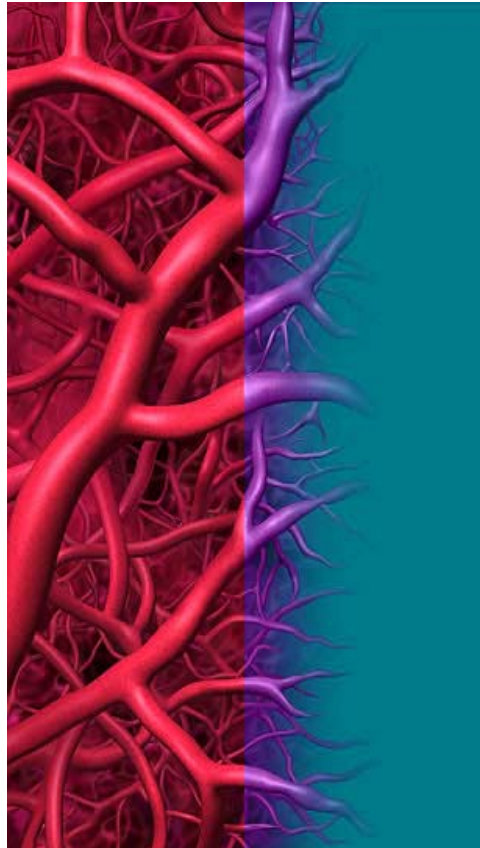
**Etude de l'effet antiangiogène de la prolactine 16K  
sur la progression tumorale et métastatique  
et identification de nouveaux peptides  
antiangiogènes**

Thèse présentée par Ngoc-Quynh-Nhu Nguyen  
en vue de l'obtention du titre de Docteur en Sciences

Année 2006



Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génie Génétique  
Professeur J.A. Martial



**Etude de l'effet antiangiogène de la prolactine 16K  
sur la progression tumorale et métastatique  
et identification de nouveaux peptides  
antiangiogènes**

Thèse présentée par Ngoc-Quynh-Nhu Nguyen  
en vue de l'obtention du titre de Docteur en Sciences

Année 2006



*Au terme de ce travail, je voudrais remercier tous ceux qui m'ont soutenue et aidée à réaliser cette thèse.*

*Je tiens tout d'abord à remercier le Professeur Joseph A. Martial pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire, me permettant ainsi de découvrir le monde passionnant de la recherche scientifique. Merci pour l'intérêt prononcé que vous avez porté à mes travaux.*

*Je voudrais également remercier le Docteur Françoise Rentier-Delrue qui m'a guidée tout au long de mon mémoire de licence ainsi qu'au début de ma thèse. Mes premiers pas dans le laboratoire à ses côtés ont conforté mon goût pour la recherche.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement le Docteur Ingrid Struman pour m'avoir guidée, épaulée puis laissée prendre mon envol... Ton enthousiasme, ton optimisme sans faille et bien sûr tes conseils furent une aide bien précieuse dans les moments de doutes. Je soulignerai également ton esprit aventureux qui m'a menée aussi bien à des descentes en kayak qu'à des projets prometteurs. Enfin, je garderai en mémoire notre escapade à New-York et me poserai toujours la question de savoir ce qu'est 'a N-Y experience' ???!...*

*I would like to thank Pr. Richard Weiner for hosting me in his laboratory and inviting me in the best sushi restaurant in San Francisco. Thanks to Dr. Hiroshi Yoshida for his help during my stay, in particular for the adenovirus purifications.*

*Many thanks also to Dr. Maria Grant and her team for the productive collaboration.*

*Mes vifs remerciements sont également adressés à ceux qui ont collaboré à la réalisation de cette thèse. Je pense particulièrement au Docteur Silvia Blacher, au Professeur Agnès Noël ainsi qu'à son équipe (merci à Isabelle Dasoul pour ses conseils en immunohistologie), au Docteur Laurence Lins et au Professeur Robert Brasseur. Un grand merci à Luc Duwez pour ses conseils animaliers ainsi que pour sa dextérité lors des injections intraveineuses.*

*Je remercie chaleureusement Michelle Lion qui est à mes côtés depuis mon mémoire de licence. J'aimerais la remercier non seulement pour ses conseils techniques, son aide mais aussi et surtout pour son soutien quotidien. Merci d'avoir partager mes joies et mes doutes.*

*Je remercie également le Docteur Sébastien Tabruyn qui par son regard critique, ses conseils, ses encouragements et parfois bousculades m'ont permis d'évoluer et de m'affirmer au sein du groupe 16K. Bonne chance de l'autre côté de l'Atlantique!*

*Je remercie tout particulièrement le Docteur Anne Cornet pour m'avoir communiqué son incroyable curiosité scientifique. Partager le bureau avec toi ces deux dernières années fut un vrai bonheur! Je me souviendrai de nos conversations scientifiques et surtout extrascientifiques (que je ne saurais rapporter ici). Enfin, ton soutien et tes conseils me furent bien précieux tout au long de ces deux années mais encore plus lors de cette dernière ligne droite...*

*Un grand merci à John Vilour qui a guidé mes premiers pas dans la recherche ainsi qu'à Catherine Sorlet pour sa gentillesse, ses conseils et ses nombreux encouragements.*

*Je tiens également à remercier les jeunots de l'équipe 16K :*

*-Florence Lair qui a eu le courage (et peut être pas le choix) de « passer » entre mes mains. Merci pour ta contribution à l'élaboration de ce travail et bonne chance pour la suite de ton doctorat !*

*-Virginie Kinet dont la motivation et la persévérance m'ont marquée pendant son mémoire de licence. Merci pour tes encouragements et pour la relecture de la thèse.*

*-Céline Sabatel pour son soutien discret mais combien important et pour la relecture de la thèse.*

*Je croise les doigts pour Ludo qui j'en suis sûre rejoindra bien vite le groupe 16K. Ce fut un plaisir de partager avec toi le bureau ces derniers mois.*

*Je remercie Fabien qui avec une infinie patience a résolu mes petits et grands problèmes informatiques. Je le remercie également pour les délicieux légumes de son jardin qui m'ont procuré les vitamines nécessaires pour achever cette thèse.*

*Je voudrais remercier l'ensemble du laboratoire. Je ne citerai personne de peur d'oublier quelqu'un. Merci à vous tous, qui par un conseil ou un encouragement m'ont permis de mener à terme cette thèse. Je n'oublierai pas l'ambiance chaleureuse du laboratoire ainsi que les verres, les barbecues, les sorties kayak, les soupers de Noël et autres festivités... (merci qui ? merci au G.O. François).*

*Enfin, à François (star du petit écran), Nicolas, Vincianne, Anka, Vincent, Virginie et Céline. : que la force soit avec vous pour la suite de votre doctorat ! Bonne route à toi Mauricio, ton humour pince sans rire me manque.*

*A mes amies Sabrina et Anastasia, j'adresse mes plus vifs remerciements pour leur soutien que même la distance d'un océan n'a pu altéré. Bonne continuation à toutes les deux dans le pays de l'oncle Sam.*

*Je ne saurais manquer de remercier Vava et Marie-Pierre, mes deux amies d'enfance, qui ont toujours su me prêter une oreille attentive.*

*Merci à mes beaux-parents Mariette et Joseph ainsi qu'à Bastien et Isabelle qui depuis le début m'ont encouragée de façon continue.*

*Je remercie chaleureusement mes parents sans qui je ne serais pas arriver là où je suis aujourd'hui. Merci à vous de m'avoir encouragée à aller toujours plus loin. Je remercie mon frère Ky ainsi que ma sœur Marie pour leur inconditionnel soutien. Merci pour l'intérêt que vous avez porté à mon « projet » même si face à celui-ci vous sembliez circonspect.*

*Enfin, je remercie Stéphane qui, avec une infinie patience, m'a soutenue lors de ces années de doctorat. Par ton écoute et tes conseils, tu m'as donné la force de mener à bien cette thèse. Merci pour tout ce que tu m'apportes et tout simplement pour être présent dans ma vie.*

# Table des matières

## Liste des principales abréviations

## **INTRODUCTION GÉNÉRALE** **1**

---

<b>I. L'ANGIOGENESE</b>	<b>1</b>
1. LE DEVELOPPEMENT DES VAISSEAUX SANGUINS	1
1.1 Généralités	1
1.2 De la vasculogenèse à l'angiogenèse	2
2. LE MECANISME MOLECULAIRE DE L'ANGIOGENESE	4
2.1 La vasodilatation et la perméabilité vasculaire	4
2.2 La dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire	4
2.3 La migration et la prolifération des cellules endothéliales	5
2.4 La formation du lumen et la maturation des vaisseaux	5
3. LA REGULATION DE L'ANGIOGENESE	6
3.1 Les activateurs de l'angiogenèse	7
3.1.1 Les enzymes protéolytiques	7
La plasmine	8
Les métalloprotéinases matricielles	8
3.1.2 Les facteurs angiogènes	9
Le VEGF et ses récepteurs (VEGFR)	10
Les angiopoïétines et leurs récepteurs Tie	12
Le FGF	13
Le PDGF	13
Le TGF- $\beta$	14
3.1.3 Les intégrines: molécules d'adhésion	14
3.1.4 L'hypoxie	15
3.2 Les inhibiteurs de l'angiogenèse	15
3.2.1 La thrombospondine-1 (TSP-1)	16
3.2.2 L'angiostatine	16
3.2.3 L'endostatine	17
3.2.4 Les fragments 16K de la famille prolactine/hormone de croissance/lactogène placentaire	18
4. L'ANGIOGENESE PATHOLOGIQUE	18
4.1 Généralités	18
4.2 L'angiogenèse tumorale	19
4.2.1 Le "switch" angiogène	19
4.2.2 La formation des vaisseaux tumoraux	21
4.2.3 La description des vaisseaux tumoraux	22
5. LA THERAPIE ANTI-/ ANGIOGENE	23
5.1 La thérapie angiogène	23
5.2 La thérapie antiangiogène	23
5.3 L'angiogenèse tumorale comme cible thérapeutique	24
6. LES PERSPECTIVES THERAPEUTIQUES	25

<b>II. LA FAMILLE PROLACTINE/HORMONE DE CROISSANCE /LACTOGENE PLACENTAIRE (PRL/GH /PL)</b>	<b>28</b>
1. GENERALITES	28
2. LA PRL	29
2.1 La structure de la PRL	29
2.2 La régulation de la synthèse et de la sécrétion de la PRL	30
2.3 Les fonctions biologiques de la PRL	30
2.4 La PRL extrahypophysaire	31
2.5 La structure du récepteur de la PRL (PRLR)	31
3. LA GH	32
3.1 La structure de la GH	32
3.2 La régulation de la synthèse et de la sécrétion de la GH	32
3.3 Les fonctions biologiques de la GH	33
3.4 La structure du récepteur de la GH (GHR)	33
4. LA TRANSDUCTION DU SIGNAL DE LA PRL ET DE LA GH	34
5. LE GH-V ET LE PL	35
5.1 Généralités	35
5.2 Les fonctions biologiques	36
6. LA FAMILLE PRL/GH ET L' ANGIOGENESE	36
<b>III. LA PROLACTINE 16K</b>	<b>38</b>
1. GENERALITES	38
2. LES ACTIVITES ANTIANGIOGENES DE LA PRL 16K	39
3. LES AUTRES FRAGMENTS DE LA FAMILLE PRL/GH	42

---

## **BUT DU TRAVAIL** **43**

---

## **ARTICLE N°1** **45**

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>45</b>
1. LE DEVELOPPEMENT DU SYSTEME VASCULAIRE DE L'ŒIL	45
2. L' ANGIOGENESE ET LES PATHOLOGIES OCULAIRES	46
2.1 La dégénérescence maculaire liée à l'âge	46
2.2 Les rétinopathies prolifératives	47
2.2.1 La rétinopathie du prématuré	48
2.2.2 La rétinopathie diabétique proliférative	48
3. L' APPROCHE ADENOVIRALE	49
<b>II. PRESENTATION DES RESULTATS</b>	<b>51</b>
1. CONSTRUCTION DU VECTEUR ADENOVIRAL 16K-AD	51
2. LES CELLULES ABAE INFECTEES PAR 16K-AD SECRETENT DE LA HPRL 16K BIOLOGIQUEMENT ACTIVE	51
3. LA HPRL 16K REDUIT LA NEOVASCULARISATION DANS UN MODELE MURIN DE RETINOPATHIE INDUITE PAR L' OXYGENE	52
4. LA HPRL 16K INDUIT L' APOPTOSE DES CELLULES ENDOTHELIALES HUMAINES DE LA RETINE (HREC)	52
<b>III. DISCUSSION</b>	<b>53</b>
<b>IV. CONTRIBUTIONS A CE TRAVAIL</b>	<b>55</b>



<b>ARTICLE 1</b>	<b>55</b>
------------------	-----------

---

<b>ARTICLE N°2</b>	<b>56</b>
--------------------	-----------

---

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>56</b>
1. L' ANGIOGENESE/LA LYMPHANGIOGENESE ET LA FORMATION DES METASTASES	56
<b>II. PRESENTATION DES RESULTATS</b>	<b>60</b>
1. LE VECTEUR ADENOVIRAL 16K-AD PERMET L'EXPRESSION DE LA HPRL16K	60
2. LA HPRL 16K ET LE VECTEUR ADENOVIRAL 16K-AD N' AFFECTENT PAS LA VIABILITE DES B16-F10	60
3. LA HPRL 16K REDUIT LA CROISSANCE TUMORALE EN AFFECTANT LA MORPHOLOGIE DES VAISSEAUX TUMORAUX	61
4. LA HPRL 16K INHIBE LA FORMATION DES METASTASES	61
<b>III. DISCUSSION</b>	<b>63</b>
<b>IV. PERSPECTIVES</b>	<b>67</b>
<b>V. CONTRIBUTIONS A CE TRAVAIL</b>	<b>68</b>
<b>ARTICLE 2</b>	<b>68</b>

---

<b>ARTICLE N°3</b>	<b>69</b>
--------------------	-----------

---

<b>I. INTRODUCTION</b>	<b>69</b>
1. LES PEPTIDES OBLIQUES	70
1.1 Généralités	70
1.2 Classifications	72
1.3 Stratégie de détection des peptides obliques	73
<b>II. PRESENTATION DES RESULTATS</b>	<b>74</b>
1. IDENTIFICATION DE SEQUENCE PEPTIDE OBLIQUE DANS LES FRAGMENTS 16K DE LA FAMILLE PRL/GH HUMAINE	74
2. INDUCTION DE LA FUSION DES LIPOSOMES PAR LE PEPTIDE OBLIQUE DE LA HPRL 16K	74
3. PRODUCTION DE PROTEINES RECOMBINANTES	75
4. LES PEPTIDES OBLIQUES DE LA HPRL 16K ET DE LA HGH 16K INHIBENT LA PROLIFERATION DES CELLULES ENDOTHELIALES ET INDUISENT LEUR APOPTOSE	75
5. LES PEPTIDES OBLIQUES DE LA HPRL 16K ET DE LA HGH 16K INHIBENT LA FORMATION DES CAPILLAIRES <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i>	76
6. LA HPRL 16K MUTEE DE FAÇON A ABOLIR LE GRADIENT D'HYDROPHOBICITE DE SON PEPTIDE OBLIQUE MONTRE UNE ACTIVITE REDUITE	76
7. LES PEPTIDES OBLIQUES DE LA GP32 DU VIRUS SIV ET DU PEPTIDE A $\beta$ INHIBENT L' ANGIOGENESE	76
<b>III. DISCUSSION</b>	<b>78</b>
<b>IV. PERSPECTIVES</b>	<b>83</b>
<b>V. CONTRIBUTIONS A CE TRAVAIL</b>	<b>84</b>
<b>ARTICLE 3</b>	<b>84</b>

---

<b>CONCLUSION GÉNÉRALE</b>	<b>85</b>
----------------------------	-----------

---

<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>86</b>
----------------------	-----------

---



## Liste des principales abréviations

(h)GH 16K	Fragment N-terminal de 16 kDa de la (h)GH
(h)GH	Hormone de croissance (humaine)
(h)GH-V 16K	Fragment N-terminal de 16 kDa du (h)GH-V
(h)GH-V	Variante placentaire de l'hormone de croissance (humaine)
(h)PL 16K	Fragment N-terminal de 16 kDa du (h)PL
(h)PL	Lactogène placentaire (humain)
(h)PRL 16K	Fragment N-terminal de 16 kDa de la (h)PRL
(h)PRL	Prolactine (humaine)
AA	acide aminé
aFGF	<i>acidic Fibroblast Growth Factor</i>
ABAE	<i>Adult Bovine Aortic Endothelial</i>
Ang	<i>Angiopoietin</i>
BACE	<i>Bovine Adrenal Cortex Endothelial</i>
BBCE	<i>Bovine Brain Capillary Endothelial</i>
bFGF	<i>basic Fibroblast Growth Factor</i>
BLV	<i>Bovine Leukemia Virus</i>
CAM	<i>Chorioallantoic Membrane</i>
CEPT	<i>Cholesteryl Ester Transport Protein</i>
DMLA	Dégénérescence Maculaire Liée à l'âge
EGD1	<i>Endothelial Differentiation Sphingolipid G-protein-coupled receptor-1</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ERK	<i>Extracellular-Regulated Kinase</i>
eNOS	<i>endothelial Nitric Oxide Synthase</i>
IGF-1	<i>Insulin like Growth factor-1</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
kDa	kiloDalton
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MBP	<i>Maltose-Binding Protein</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
PAI-1	<i>Plasminogen Activator Inhibitor of type 1</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth factor</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3 kinase</i>
RDP	Rétinopathie Diabétique Proliférative
RP	Rétinopathie du Prématuré
SIV	<i>Simian Immunodeficiency Virus</i>
Stat	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor-<math>\beta</math></i>
tPA	<i>tissue-type Plasminogen Activator</i>
uPA	<i>urokinase-type Plasminogen Activator</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
R	Récepteur



# Introduction générale

---



# Introduction générale

## I. L'angiogenèse

### 1. Le développement des vaisseaux sanguins

#### *1.1 Généralités*

Au cours du développement embryonnaire, les vaisseaux sanguins peuvent se former selon plusieurs processus:

- par **vasculogenèse**, processus par lequel des précurseurs hémangioblastiques se différencient pour former un plexus vasculaire primitif;
- par **angiogenèse**, définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants (Carmeliet, 2005) (Fig. 1).

Lors de l'embryogenèse, le processus de néovascularisation dépend de l'origine de l'organe. Ainsi, la vasculogenèse est un mécanisme prépondérant dans les ébauches d'organes constitués de mésoderme et d'endoderme (poumon, pancréas, rate). En revanche, dans les organes composés de mésoderme et d'ectoderme (cerveau, rein), la vascularisation s'établit par angiogenèse (Ortega *et al.*, 1997).

Au cours de la vie adulte, la néovascularisation est principalement effectuée par angiogenèse. Cependant, des cellules précurseurs de cellules endothéliales (angioblastes) identifiées dans la moelle osseuse et dans le sang périphérique chez l'adulte peuvent également participer à la néovascularisation (Ferrara *et al.*, 2005).

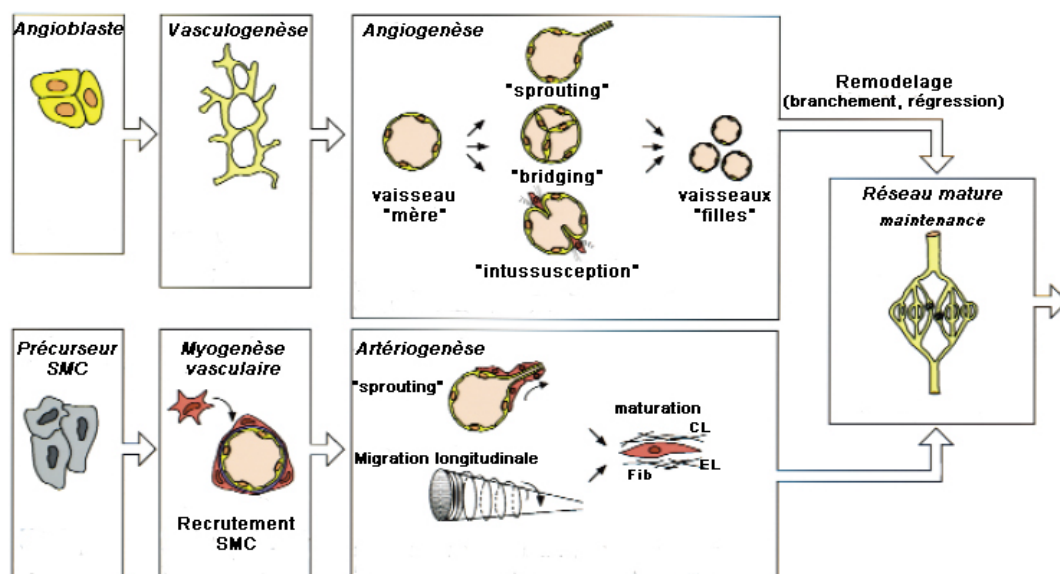
En plus de son rôle dans le développement embryonnaire, l'angiogenèse contribue encore à la croissance des organes après la naissance. Cependant, durant la vie adulte, la

plupart des vaisseaux sanguins restent quiescents (seulement 0.01% de cellules endothéliales sont en division) et l'angiogenèse se déroule alors seulement durant le cycle ovarien, dans le placenta pendant la gestation ou encore lors de processus de réparation tissulaire ou post-ischémique (Hanahan *et al.*, 1996; Carmeliet, 2005).

### 1.2 De la vasculogénèse à l'angiogénèse

Lors de la **vasculogénèse**, les hémangioblastes (progéniteurs communs des cellules endothéliales et hématopoïétiques) apparaissent dans les îlots sanguins de l'aire extraembryonnaire et sur la paroi ventrale de l'aorte mésodermique. Les cellules en périphérie des îlots sanguins donneront naissance aux angioblastes, tandis que celles au centre constitueront les progéniteurs hématopoïétiques. Les angioblastes s'assemblent en un plexus vasculaire primitif qui sera affiné en un réseau fonctionnel par angiogénèse et artériogénèse (Carmeliet, 2004).

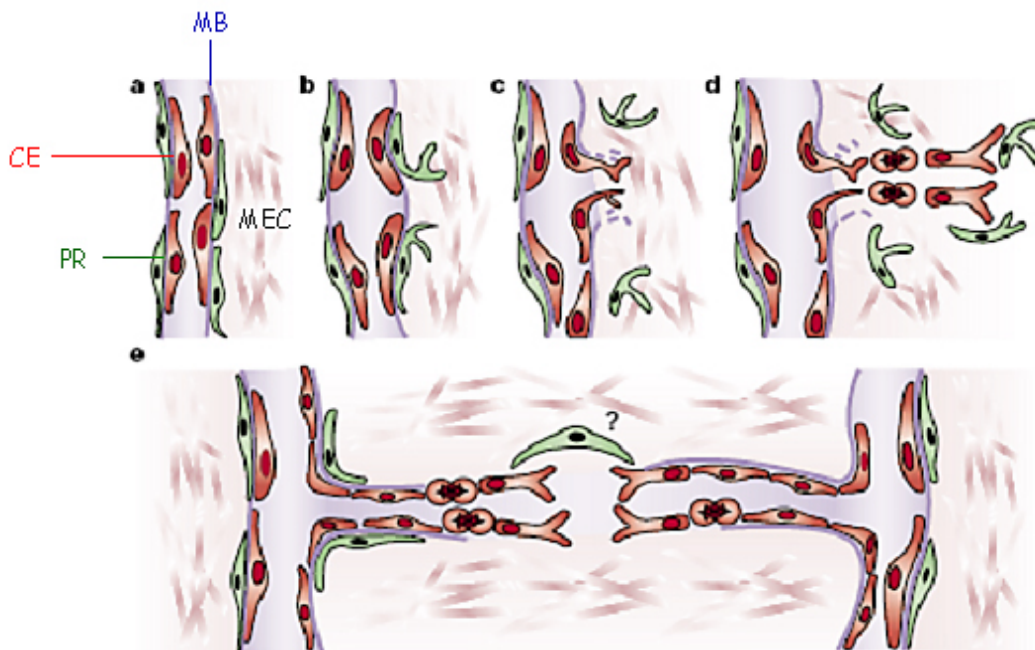
L'**angiogénèse** peut se dérouler selon trois mécanismes: par bourgeonnement ("**sprouting**"), par élargissement et séparation des vaisseaux déjà formés ("**intussusception**") ou encore par septation où les cellules poussent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés ("**bridging**") (Carmeliet, 2000) (Fig. 1).



**Fig. 1. Vasculogénèse et angiogénèse.** Dans l'embryon, les cellules précurseurs endothéliales (angioblastes) s'assemblent en un réseau primitif (vasculogénèse), qui se développe et se remodèle (angiogénèse). Les cellules musculaires lisses (SMC) couvrent les cellules endothéliales pendant la myogénèse vasculaire et stabilisent les vaisseaux durant l'artériogénèse. CL, collagène; EL, élastine; Fib, fibrilline (d'après Carmeliet, 2000).



Le mécanisme le plus étudié est l'angiogenèse **bourgeonnante** qui est caractérisée par différentes étapes (Fig. 2). L'initiation de l'angiogenèse, suite à un stimulus angiogène local tel que l'hypoxie, débute par une **vasodilatation** et une **augmentation** de la **perméabilité** des vaisseaux via la dissolution des jonctions d'adhésion. La **dégradation** de la **membrane basale** et de la **matrice extracellulaire** environnante permet alors la **migration** et la **prolifération** des cellules endothéliales qui s'assemblent en tubes, formant ainsi des vaisseaux primitifs. Lors de la **maturation**, certains de ces vaisseaux deviennent des capillaires après différenciation et apposition de cellules mésenchymateuses spécialisées, les péricytes; d'autres se transforment en vaisseaux de plus grands calibres (artères et veines) après la mise en place d'une paroi constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses (Pepper, 2000).



**Fig. 2. Etapes principales de l'angiogenèse par bourgeonnement.** a. Vaisseau sanguin. CE, cellule endothéliale; PR, péricyte; MB, membrane basale; MEC, matrice extracellulaire. b. Tout d'abord, les péricytes se détachent et les vaisseaux se dilatent avant que la membrane basale et la matrice extracellulaire soient dégradées. c. Les cellules endothéliales peuvent alors migrer dans l'espace péri-vasculaire vers les stimuli angiogènes. d. Les cellules endothéliales prolifèrent et migrent. e. Les cellules endothéliales adhèrent les unes aux autres et forment un lumen. S'ensuit la formation de la membrane basale et l'attachement des péricytes. Finalement les bourgeons capillaires fusionnent avec d'autres bourgeons pour former de nouveaux systèmes circulatoires (d'après Bergers, 2003).

## **2. Le mécanisme moléculaire de l'angiogenèse**

### ***2.1 La vasodilatation et la perméabilité vasculaire***

Lors de la néovascularisation par bourgeonnement, les vaisseaux existants se dilatent sous l'action du monoxyde d'azote (NO) et deviennent perméables grâce au VEGF (*vascular endothelial growth factor*). Cette augmentation de la perméabilité est due à la formation de fenestrations et d'organelles vésiculo-vacuolaires, à la redistribution des molécules d'adhésion intercellulaire telles que PECAM-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) et VE-cadhérine (*vascular endothelial-cadherin*) et à la modification des propriétés des membranes cellulaires lors de l'activation des Src kinases. L'augmentation de la perméabilité vasculaire permet alors l'extravasation des protéines plasmatiques, induite par le VEGF, qui serviront de matrice provisoire lors de la migration des cellules endothéliales (Eliceiri *et al.*, 1999; Carmeliet, 2000; Conway *et al.*, 2001; Jain, 2003).

L'hyperperméabilité de la paroi vasculaire est induite par le VEGF dont la transcription est en partie régulée positivement par le NO et est contrôlée par l'angiopoïétine-1 (Ang-1) (Silvestre *et al.*, 2002).

### ***2.2 La dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire***

La membrane basale et la matrice extracellulaire sont dégradées suite à l'activation de protéases telles que l'activateur du plasminogène de type urokinase (uPA), les chymases ou héparanases, les métalloprotéinases MMP-2, -3 et -9 (*matrix metalloproteinase*) et à la suppression d'inhibiteurs de protéases (TIMP-2, *tissue inhibitor MMP-2*). Ces dégradations permettent ainsi la migration des cellules endothéliales dans la matrice interstitielle environnante. La dégradation de la matrice extracellulaire permet également d'activer ou de libérer des facteurs de croissance comme le FGF (*fibroblast growth factor*) ou le VEGF séquestrés dans cette matrice (Carmeliet, 2000; Silvestre *et al.*, 2002; Jain, 2003). L'angiopoïétine-2 (Ang-2) intervient aussi dans la déstabilisation des vaisseaux matures en détachant les cellules musculaires lisses et en relâchant la matrice, ce qui permet aux cellules

endothéliales de migrer, les contacts cellulaires endothéliaux étant rompus (Carmeliet, 2000; Conway *et al.*, 2001).

### ***2.3 La migration et la prolifération des cellules endothéliales***

Les barrières physiques étant dissoutes, les cellules endothéliales peuvent migrer et proliférer vers les stimuli angiogènes. Les cellules endothéliales forment de fins prolongements cytoplasmiques et les cellules migrantes s'allongent et s'alignent les unes avec les autres pour former un bourgeon capillaire. La division des cellules endothéliales augmente davantage la longueur du bourgeon (Pepper, 1997). L'activation de PI3K/Akt promeut la survie et la prolifération des cellules endothéliales via la modulation de nombreux régulateurs du cycle cellulaire, incluant cycline D1, p27 et Bcl-X2. De même, les voies de signalisation des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) (ERK1/2 (*extracellular-regulated kinase*), p38 et JNK (*c-jun N-terminal kinase*)) médient l'effet des facteurs de croissance et la prolifération des cellules endothéliales (Milkiewicz *et al.*, 2006).

Lors de la migration, les cellules endothéliales expriment à leur surface des intégrines qui facilitent leur adhésion à la matrice extracellulaire. Ainsi, l'expression des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_v\beta_5$  augmente dans les cellules endothéliales en prolifération grâce à la stimulation du bFGF (*basic FGF*) et du VEGF (Milkiewicz *et al.*, 2006).

### ***2.4 La formation du lumen et la maturation des vaisseaux***

Après avoir migré et proliféré, les cellules endothéliales s'assemblent en tubes et forment un lumen. Ce lumen peut s'établir par canalisation intracellulaire, qui se déroule via la fusion des vésicules cytoplasmiques, ou par un processus alternatif de canalisation intercellulaire, dans lequel un lumen est créé par apposition d'une membrane provenant de deux cellules différentes (Milkiewicz *et al.*, 2006). Au niveau moléculaire, on distingue plusieurs facteurs impliqués dans la formation du lumen: les intégrines  $\alpha_5\beta_1$  et  $\alpha_v\beta_3$ , les VEGF (les isoformes VEGF<sub>121</sub> et VEGF<sub>165</sub> et leurs récepteurs augmentent la formation du lumen tandis que VEGF<sub>189</sub> diminue son diamètre), le récepteur EGD1 (*endothelial*

*differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor-1*) et Ang-1 qui, en combinaison avec le VEGF, augmente le diamètre du lumen (Conway *et al.*, 2001).

Les vaisseaux nouvellement formés sont ensuite stabilisés, lors du processus de maturation, par recrutement des cellules mésenchymateuses qui se différencient en cellules péri-endothéliales (péricytes, cellules musculaires lisses) et par génération de la matrice extracellulaire. Plusieurs molécules sont impliquées dans la régulation de ce processus: le facteur PDGF-B (*platelet-derived growth factor-B*) et son récepteur PDGFR- $\beta$ ; la S1P1 (*sphingosine-1-phosphate-1*) et EDG1; Ang-1 et son récepteur à tyrosine kinase Tie-2 (*tyrosine kinase with immunoglobulin-2 and EGF-like domain*); le facteur TGF- $\beta$  (*transforming growth factor- $\beta$* ) (Jain, 2003). Le facteur de croissance PlGF (*placental growth factor*) peut aussi assister le processus de stabilisation. PlGF présente une haute affinité pour le récepteur à tyrosine kinase VEGFR-1. L'activation de ce récepteur sur les péricytes ou les cellules musculaires lisses stimule le recouvrement et la stabilisation des capillaires (Milkiewicz *et al.*, 2006).

Une fois assemblées en nouveaux vaisseaux, les cellules endothéliales deviennent quiescentes et survivent pendant des années. Les vaisseaux matures sont moins enclin à la déstabilisation et à la régression. VEGF,  $\alpha_v\beta_3$  et Ang-1 promeuvent la survie des cellules endothéliales tandis que Ang-2 l'inhibe, au moins en absence de stimuli angiogènes. Ces facteurs de survie contrôlent plusieurs molécules impliquées dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose des cellules endothéliales: ils inhibent p53, p21, p16, p27 et *Bax* et activent variablement PI3-kinase/Akt, p42/44 MAPK, Bcl-2 A1 et les voies de survie (Carmeliet, 2000).

### **3. La régulation de l'angiogenèse**

Chez les mammifères adultes, en conditions physiologiques normales, le réseau vasculaire est quiescent. L'angiogenèse est un processus finement contrôlé par une balance d'activateurs et d'inhibiteurs produits par des cellules normales (Table 1). Un changement dans l'équilibre de ces régulateurs peut induire une angiogenèse excessive ou insuffisante.

Régulateurs positifs	Régulateurs négatifs
aFGF et bFGF Ang 1 Angiogénine EGF Héparine HGF Hypoxie IL-8 PDGF-B Prostaglandines TGF- $\alpha$ et TGF- $\beta$ TNF- $\alpha$ VEGF	Angiostatine Endostatine Inhibiteurs des MMP et des PA Interférons Fragments 16K de la PRL, GH, GH-V et PL PF4 PRP TGF- $\beta$ Thrombospondine Troponine 1

**Table 1. Liste non exhaustive des régulateurs positifs et négatifs de l'angiogenèse.**

Ang: *angiopoietin*; EGF: *epidermal growth factor*; FGF: *fibroblast growth factor*; GH-V: *growth hormone variant*; HGF: *hepatocyte growth factor*; IL: *interleukin*; MMP: *matrixmetalloproteinase*; PA: *plasminogen activator*; PDGF: *platelet-derived growth factor*; PF: *platelet factor*; PL: *placenta lactogen*; PRL: *prolactin*; PRP: *proliferin related peptide*; TGF: *transforming growth factor*; TNF: *tumor necrosis factor*; VEGF: *vascular endothelial growth factor*.

### 3.1 Les activateurs de l'angiogenèse

Le processus d'angiogenèse est régulé à plusieurs niveaux et par différents facteurs. Ainsi, la dégradation de la membrane basale nécessaire à l'invasion et la migration des cellules endothéliales requiert l'activité des enzymes protéolytiques. Les facteurs angiogènes stimulent la migration et la prolifération des cellules endothéliales ; les molécules d'adhésion, quant à elles, régulent les interactions des cellules entre elles ou avec la matrice (Liekens *et al.*, 2001).

#### 3.1.1 Les enzymes protéolytiques

La protéolyse extracellulaire joue un rôle essentiel dans le processus d'angiogenèse à différents niveaux. Elle permet la dégradation de la membrane basale sous-endothéliale,

l'invasion de la matrice extracellulaire et la formation d'une lumière au sein d'un capillaire néoformé. Elle est également impliquée dans l'activation de facteurs angiogènes, soit en activant les formes latentes (TGF- $\beta$ ), soit en relarguant les facteurs liés à la matrice (bFGF). Enfin, en plus de son rôle positif dans l'angiogenèse, la protéolyse extracellulaire peut aussi intervenir dans la régulation négative de celle-ci en permettant la formation de fragments protéiques possédant des activités antiangiogènes (l'endostatine provient du clivage du collagène XVIII) (Pepper, 2000) (voir plus loin le paragraphe 3.2.3).

### **La plasmine**

La plasmine dégrade plusieurs composés de la matrice extracellulaire incluant la fibrine, la fibronectine, la laminine et le cœur protéique des protéoglycans. La plasmine active plusieurs MMP telles que MMP-1, MMP-3 et MMP-9. Elle est régulée négativement par l' $\alpha$ -antiplasmine. L'activation de la proenzyme plasminogène en plasmine se fait par l'intermédiaire des activateurs du plasminogène. Ces activateurs sont des protéases à sérine dont on connaît deux types : les uPA (*urokinase plasminogen activator*) et les tPA (*tissue plasminogen activator*). L'activité fibrinolytique est principalement régulée par l'uPA dans le sang et par le tPA dans les tissus. L'uPA est sécrété sous forme de proenzyme et est activé protéolytiquement par la plasmine, le facteur XIIa ou la cathepsine B. Il transduit son signal via le récepteur membranaire uPAR. En se liant à son récepteur membranaire, l'uPA va focaliser la production de la plasmine à la surface cellulaire. L'activité de l'uPA est régulée négativement par PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor of type 1*) (Pepper, 2000; Liekens *et al.*, 2001).

Des études ont montré que uPA, uPAR et PAI-1 jouent un rôle non seulement dans la dégradation matricielle mais aussi dans l'adhérence cellulaire en intervenant avec la vitronectine et l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  (Pepper, 2000).

### **Les métalloprotéinases matricielles**

Les MMP représentent une famille d'enzymes comprenant les collagénases, les gélatinases et les stromélyosines. Elles sont capables de dégrader la plupart des composants de la matrice. Cette famille d'enzymes possède une structure similaire et leur activité est dépendante d'un atome de zinc. Les MMP possèdent toutes un prédomaine correspondant au

peptide signal de sécrétion et un prodomaine qui est enlevé lorsque l'enzyme est activée par clivage. Elles possèdent également un domaine catalytique contenant un ion zinc, et à côté, un domaine contenant un site de liaison pour les TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinase*). Les MMP sont solubles à l'exception du groupe MT-MMP (*membrane type MMP*) qui contient un domaine transmembranaire à l'extrémité C-terminale et qui est localisé à la surface des cellules. Les MMP sont sécrétées sous la forme de zymogène dont l'activation se produit dans le compartiment extracellulaire ou dans le cas de la MMP-2 au contact de la membrane plasmique. Les MT-MMP sont activées à l'intérieur de la cellule. L'activité de ces enzymes est régulée par les TIMP (Liekens *et al.*, 2001; Silvestre *et al.*, 2002).

Les MMP sont cruciales pour l'angiogenèse. Elles dégradent la matrice extracellulaire en faisant de la place pour les cellules endothéliales en migration. Elles contribuent aussi à l'angiogenèse en détachant les péricytes des vaisseaux angiogènes et en libérant des facteurs de croissance liés à la matrice extracellulaire. De plus, elles génèrent des fragments promigratoires de la matrice extracellulaire et clivent la VE-cadhérine afin de briser les adhésions cellule-cellule. La MMP-2, aussi appelée collagénase de type IV ainsi que la MMP-9 (ou gélatinase B) sont critiques pour le « switch » angiogène (Rundhaug, 2005). Parmi les MT-MMP, il a été montré que la MT1-MMP joue un rôle dans l'angiogenèse physiologique et tumorale. La MT1-MMP participe au remodelage de la matrice extracellulaire de façon directe en dégradant certains de ses composants et de façon indirecte en activant la pro-MMP-2 (Sounni *et al.*, 2003).

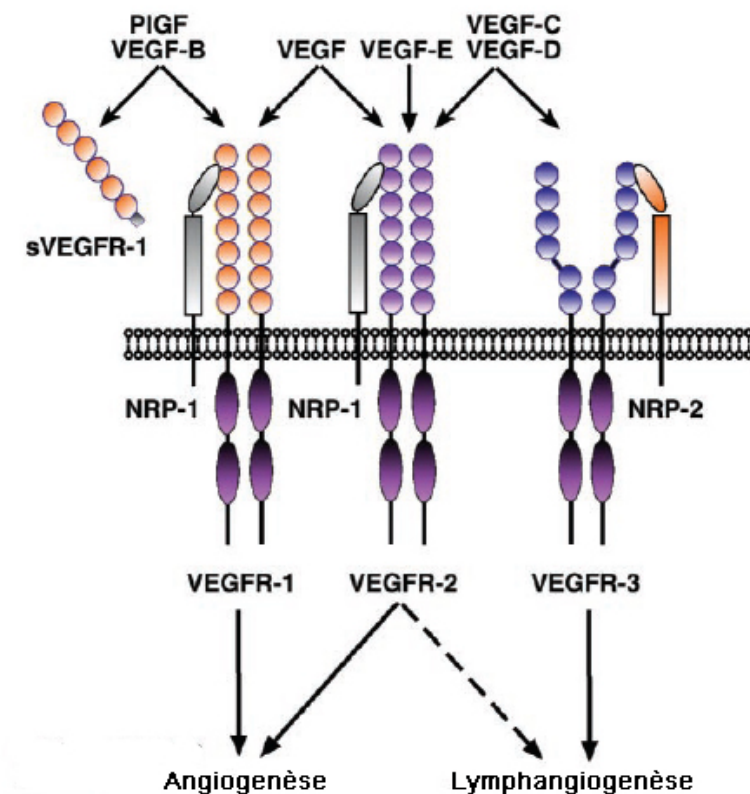
Les MMP peuvent aussi contribuer négativement au processus d'angiogenèse en générant des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse par clivage protéolytique de certaines chaînes de collagène et du plasminogène. Ainsi, MMP-2, MMP-7, MMP-9 et MMP-12 peuvent hydrolyser le plasminogène pour former l'angiostatine, un puissant inhibiteur de l'angiogenèse. De même, un autre facteur antiangiogène, l'endostatine peut être libéré par MMP-3, MMP-9, MMP-12, MMP-13 et MMP-20 (Rundhaug, 2005).

### 3.1.2 Les facteurs angiogènes

Parmi les activateurs de l'angiogenèse, le VEGF et les angiopoïétines sont connus pour agir sélectivement sur les cellules endothéliales (Yancopoulos *et al.*, 2000).

### Le VEGF et ses récepteurs (VEGFR)

La famille du gène VEGF comprend 6 membres: VEGF-A (ou VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et PlGF. Le VEGF, qui a d'abord été étudié pour sa capacité à induire la perméabilité et l'épanchement vasculaire, est principalement impliqué dans l'angiogenèse tandis que les VEGF-C et -D sont principalement impliqués dans la lymphangiogenèse (Byrne *et al.*, 2005) (Fig. 3).



**Fig. 3. Famille des VEGF et de leurs récepteurs.** La stimulation du VEGFR-1 et du VEGFR-2 par différents membres de la famille VEGF induit l'angiogenèse, tandis que celle du VEGFR-3 la lymphangiogenèse. Le VEGFR-2 a été occasionnellement détecté chez les cellules endothéliales lymphatiques. La neuropiline 1 (NRP-1) et la neuropiline 2 (NRP-2) sont des co-récepteurs. Une forme soluble de VEGFR-1 (sVEGFR-1) peut être également produite dans certains cas (d'après Jussila, 2002).

Chez l'homme, le gène du VEGF (ou VEGF-A) est constitué de 8 exons dont l'épissage alternatif donne des variants qui se distinguent entre autres par leur capacité à lier l'héparine et l'héparine sulfate. Les isoformes les plus communs sont constitués de 121, 145, 165, 189, et 206 acides aminés (Byrne *et al.*, 2005). Tous les isoformes montrent des activités biologiques



identiques, mais les VEGF<sub>121</sub> et VEGF<sub>165</sub> sont sécrétés dans l'environnement extracellulaire tandis que les VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub> restent associés à la cellule ou à la matrice via leur affinité pour l'héparine sulfate. L'isoforme prédominant est le VEGF<sub>165</sub> qui est également le plus puissant en terme de stimulation de l'angiogenèse (Papetti *et al.*, 2002).

Le VEGF est une glycoprotéine dimérique liée par un pont disulfure hautement conservé, avec une masse moléculaire de 34-45 kDa, qui perd son activité biologique en présence d'agents réducteurs (Papetti *et al.*, 2002).

Le VEGF induit son activité angiogène en augmentant la perméabilité vasculaire, ce qui permet l'extravasation des protéines du plasma et la formation d'une matrice extracellulaire favorable à la migration des cellules endothéliales et stromales. Le VEGF stimule les cellules endothéliales à produire des activateurs du plasminogène (uPA et tPA), l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1) et du collagène interstitiel. Il induit ainsi un système équilibré de protéolyse qui peut remodeler des composés de la matrice extracellulaire nécessaires à l'angiogenèse. Le VEGF stimule la prolifération des cellules endothéliales et leur migration via de nombreuses voies incluant l'activation des protéines kinases (MAPK), ERK, p38 et JNK et les membres de la famille RhoGTPase (Papetti *et al.*, 2002). Il agit comme facteur de survie des cellules endothéliales via l'activation de la voie de la kinase phosphatidyl-inositol 3 (PI3K)/Akt et via son association avec l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et l'activation de kinases d'adhésion focale (Milkiewicz *et al.*, 2006).

La transcription de l'ARNm du VEGF est induite par différents facteurs de croissance et cytokines (PDGF, EGF, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  et Il-1 $\beta$ ), par l'activation de la cyclooxygénase-2 (COX-2), par l'hypoxie, aussi bien que par des forces mécaniques de stress (Liekens *et al.*, 2001) (Milkiewicz *et al.*, 2006).

Le VEGF-B est structurellement similaire au VEGF et au PlGF. Des niveaux élevés des VEGF-B et -C ont été associés à la formation de métastases dans les nodules lymphatiques du cancer colorectal mais son rôle dans la progression tumorale n'a pas été complètement éclairci (Byrne *et al.*, 2005).

Le VEGF-C a été isolé du milieu conditionné de cellules cancéreuses prostatiques humaines PC3. Les VEGF-C et -D promeuvent la mitogenèse et la survie des cellules endothéliales lymphatiques (Byrne *et al.*, 2005).

Le VEGF-E est l'homologue viral du VEGF codé par le virus Orf (Byrne *et al.*, 2005).

Les activités des VEGF sont transmises par trois récepteurs à tyrosine kinase, VEGFR-1 ou Flt-1 (*fms-like tyrosine kinase 1*), VEGFR-2 ou KDR (*kinase insert domain-containing receptor*) ou Flk-1 (*fetal liver kinase 1*) et VEGFR-3 ou Flt-3. Le VEGFR-2 est le médiateur majeur des effets du VEGF (stimulation mitogène, angiogène, perméabilité). Le VEGFR-1 a une double activité. Sous certaines conditions, il agirait comme un récepteur antagoniste qui séquestre le VEGF et prévient son interaction avec le VEGFR-2. Cependant, le VEGFR-1 joue un rôle dans l'hématopoïèse, le recrutement des monocytes et autres dérivés de la moelle osseuse qui peuvent se diriger automatiquement vers le réseau sanguin vasculaire et promouvoir l'angiogenèse. De plus, le VEGFR-1 est impliqué dans l'induction des MMP et la libération paracrine des facteurs de croissance des cellules endothéliales (Ferrara *et al.*, 2005).

Le VEGFR-3 lie les VEGF-C et -D. Il est exprimé chez les cellules endothéliales de l'embryon mais durant le développement, son expression à la surface des vaisseaux sanguins diminue pour se restreindre à l'endothélium lymphatique chez l'adulte (Byrne *et al.*, 2005).

Le récepteur Neuropiline-1 (NRP-1) identifié originellement sur les cellules neuronales, est aussi exprimé par les cellules endothéliales où il agit comme co-récepteur pour le VEGF. Le récepteur NRP-1, ne possédant pas de domaine à tyrosine kinase intracellulaire, peut s'associer aux récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 pour transduire son signal (Byrne *et al.*, 2005).

### **Les angiopoïétines et leurs récepteurs Tie**

Les récepteurs Tie-1 et Tie-2 ainsi que leurs ligands Ang-1 et Ang-2 sont aussi des éléments critiques dans la formation et la stabilisation des vaisseaux. Les principales sources de Ang-1 et Ang-2 sont respectivement les cellules murales et endothéliales (Jain, 2003). Ang1 est une protéine glycosylée de 70 kDa qui se lie au récepteur à tyrosine kinase Tie-2 présent à la surface de cellules endothéliales. Par sa liaison à Tie-2, Ang-1 active sa phosphorylation ce qui a pour effet de renforcer les vaisseaux en affectant les molécules de jonction et en favorisant les interactions entre les cellules endothéliales et murales. Elle agit aussi en induisant au niveau des cellules endothéliales des facteurs responsables du

recrutement des cellules mésenchymateuses (cellules accessoires, péricytes) (Pepper, 2000; Carmeliet, 2003).

L'Ang-2, un deuxième ligand de Tie-2, se lie avec une affinité semblable à celle de l'Ang-1, mais inhibe la phosphorylation de Tie-2 induite par Ang-1. Ang-2 serait donc un facteur proangiogène qui, par sa fonction d'antagoniste à la fonction stabilisatrice de Ang-1, rendrait l'endothélium vasculaire plus susceptible de répondre à des facteurs angiogènes comme le VEGF (Pepper, 2000). En absence de VEGF, Ang-2 déstabilise les vaisseaux, entraînant finalement la régression des vaisseaux (Jain, 2003).

### **Le FGF**

La famille FGF est constituée de protéines de 18 à 30 kDa ayant une haute affinité pour l'héparine (Liekens *et al.*, 2001). Cette famille comprend 23 membres dont 2 membres, aFGF (*acidic* FGF) et bFGF (*basic* FGF), qui ont des propriétés angiogènes particulièrement étudiées. aFGF et bFGF stimulent l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. Ils activent au niveau des cellules endothéliales la voie des MAP kinases et celle de la p38 kinase. bFGF est impliqué dans l'angiogenèse tumorale et peut participer à la lymphangiogenèse en activant VEGF-C. aFGF et bFGF se lient à des récepteurs à activité tyrosine kinase dont 4 ont été décrits (FGFR-1, FGFR-2, FGFR-3 et FGFR-4). La spécificité et l'affinité des récepteurs dépendent de l'épissage alternatif des exons. L'autophosphorylation de FGFR-1 et FGFR-2, exprimés par les cellules endothéliales, est stimulée par aFGF et bFGF (Bikfalvi, 2003).

### **Le PDGF**

La famille PDGF est constituée de 4 membres (PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D) qui lient, avec une affinité différente, les récepteurs à tyrosine kinase PDGFR- $\alpha$  et PDGFR- $\beta$  exprimés sur les cellules endothéliales et sur les cellules musculaires lisses. Ces récepteurs jouent un rôle essentiel dans la stabilisation des vaisseaux sanguins naissants en permettant leur recouvrement par des cellules musculaires lisses. En sécrétant le PDGF-BB, les cellules endothéliales stimulent la croissance et la différenciation des progéniteurs mésenchymateux PDGFR- $\beta^+$  et les recrutent autour des vaisseaux naissants. PDGF-CC promeut le développement vasculaire dans l'embryon, et chez l'adulte lors de la cicatrisation

et dans l'angiogenèse des tissus avasculaires, tandis que PDGF-D stimule l'angiogenèse tumorale (Carmeliet, 2004).

## **Le TGF- $\beta$**

Le TGF- $\beta$  est une cytokine multifonctionnelle sécrétée sous forme inactive. Elle est activée par protéolyse. La dimérisation du TGF- $\beta$  actif entraîne l'hétérodimérisation des récepteurs de type I et II, ce qui conduit à la phosphorylation de TGF- $\beta$ -R1 (Bikfalvi, 2003).

Le TGF- $\beta$  est exprimé dans de nombreux types cellulaires, incluant les cellules endothéliales et murales. Selon le contexte et sa concentration, le TGF- $\beta$  est pro- ou antiangiogène (Jain, 2003). A faible concentration, le TGF- $\beta$  contribue à l'activation de l'angiogenèse en surrégulant des facteurs angiogènes (VEGF) et des protéases (uPA). A forte dose, il inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales en stimulant la reconstruction de la membrane basale et la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules murales (provoquée par la surrégulation de PDGF-B). Il stimule également la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules musculaires lisses via la surrégulation de SM22 $\alpha$  (*smooth muscle 22 $\alpha$* ) et SMC $\alpha$  actine (Carmeliet, 2004).

### 3.1.3 Les intégrines: molécules d'adhésion

Les intégrines constituent un groupe de récepteurs d'adhésion cellulaire formés par les sous-unités  $\alpha$  et  $\beta$  associées de façon non-covalente. Les cellules endothéliales expriment plusieurs intégrines distinctes qui permettent leur attachement aux protéines de la matrice extracellulaire.

L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  est d'une importance particulière pour l'angiogenèse. Cette intégrine sert de récepteur aux protéines extracellulaires contenant une séquence RGD (Arg-Gly-Asp), incluant la fibronectine, la vitronectine, la laminine, le facteur von Willebrand, le fibrinogène et le collagène dénaturé. *In vivo*,  $\alpha_v\beta_3$  est peu exprimée par les cellules au repos, mais son expression est fort augmentée au niveau des cellules endothéliales activées lors de l'angiogenèse (Liekens *et al.*, 2001).

Le rôle de  $\alpha_v\beta_3$  dans l'angiogenèse n'est pas limité à la liaison de composés de la matrice extracellulaire.  $\alpha_v\beta_3$  lie la MMP-2 et localise la forme active de cette enzyme sur les vaisseaux sanguins angiogènes. Ainsi, elle peut réguler la dégradation locale de la matrice extracellulaire et aider à la migration des cellules endothéliales en les adhérant à la matrice en remodelage. La liaison de  $\alpha_v\beta_3$  induit aussi l'activation des MAPK et inhibe l'apoptose des cellules endothéliales (Papetti *et al.*, 2002).

#### 3.1.4 L'hypoxie

L'hypoxie stimule la formation de nouveaux capillaires et le recrutement des cellules précurseurs endothéliales. Elle fournit sa réponse par l'activation des facteurs de transcription HIF (*hypoxia inducible factor*) (ex. HIF-1 $\alpha$ , HIF-2 $\alpha$ , HIF-3 $\alpha$ ). Ces facteurs surrégulent de nombreux gènes affectant la croissance des cellules endothéliales, le recrutement des cellules musculaires lisses, la vasorégulation, l'attraction des leucocytes, etc., ... (VEGF, Ang-2, HGF, PlGF, Tie-2, Flt-1, PDGF-B, NOS (*nitric oxide synthase*), IL-6, IL-8, MMP-2, MMP-13, PAI-1, uPAR, etc.) (Carmeliet, 2004). L'activité transcriptionnelle de HIF-1 $\alpha$  se déroule via sa dimérisation avec HIF-1 $\beta$  qui est constitutivement exprimé. Le dimère peut alors se lier aux régions HRE (*hypoxia response elements*). En conditions normoxiques, la demi-vie de la protéine HIF-1 $\alpha$  est de courte durée (< 5 min). Elle est ubiquitinée puis dégradée par le protéosome. Par contre, en conditions d'hypoxie, la dégradation de HIF-1 $\alpha$  est réduite (Milkiewicz *et al.*, 2006).

### **3.2 Les inhibiteurs de l'angiogenèse**

Parmi les molécules inhibitrices identifiées de l'angiogenèse, certaines sont des molécules endogènes de régulation comme la thrombospondine, ou des fragments cryptiques de molécules endogènes qui, elles-mêmes, ne présentent pas d'activité antiangiogène.

Actuellement, les fragments cryptiques représentent la moitié des inhibiteurs connus de l'angiogenèse: c'est le cas de l'angiostatine, de l'endostatine, de la tumstatine ou du PF-4 (*platelet factor-4*). Les fragments 16K de la famille prolactine/hormone de croissance/lactogène placentaire font également partie de ces inhibiteurs cryptiques. La plupart de ces fragments ne sont pas directement produits par les cellules hôtes. Les tissus et

les cellules tumorales produisent des enzymes qui convertissent une protéine circulante ou de la matrice extracellulaire en un inhibiteur de l'angiogénèse suggérant que les processus protéolytiques jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'angiogénèse (Cao, 2001).

### 3.2.1 La thrombospondine-1 (TSP-1)

La TSP-1 est le premier inhibiteur endogène identifié. Elle est considérée comme le principal inhibiteur de l'angiogénèse produit constitutivement par les cellules normales. Sa production est activée par le suppresseur de tumeurs p53 (Cao, 2001). La TSP-1 est régulée par Id1 qui est un répresseur de la transcription. Par la liaison et l'activation de CD36 à la surface des cellules endothéliales, la TSP-1 inhibe l'angiogénèse tumorale en agissant directement sur la prolifération, la migration et la survie de ces cellules. Elle inhibe aussi l'angiogénèse tumorale en agissant indirectement sur la libération du VEGF de la matrice, processus qui implique l'activation de MMP-9 (Bikfalvi, 2003).

### 3.2.2 L'angiostatine

L'angiostatine fait partie des nombreux fragments protéolytiques, produits à partir de la dégradation de la matrice extracellulaire, qui peuvent réguler de manière négative l'angiogénèse. L'angiostatine est un fragment interne de 38 kDa du plasminogène. Il était originellement purifié à partir du sérum et d'urine de souris portant des tumeurs LLC (*Lewis lung carcinoma*). Chez ces souris, le médiateur permettant la conversion du plasminogène en angiostatine est une métalloélastase sécrétée par des macrophages infiltrés dans la tumeur. Les cellules tumorales peuvent aussi sécréter des protéases (MMP, système uPA/plasmine) qui coupent le plasminogène en angiostatine (Liekens *et al.*, 2001). L'angiostatine est un puissant inhibiteur de l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo*. Elle réduit la croissance tumorale et la dissémination des métastases (O'Reilly *et al.*, 1994).

L'angiostatine, comme beaucoup d'autres facteurs antiangiogènes, n'a pas encore de récepteur spécifique identifié. Cependant, plusieurs sites de liaison ont été identifiés mais leurs rôles dans l'angiogénèse ne sont toutefois pas encore bien définis. Ainsi, cet inhibiteur de l'angiogénèse induirait ses effets via de multiples sites de liaisons et plusieurs récepteurs dont notamment:

- la  $F_1F_0$  ATP synthase, pour la survie des cellules endothéliales en conditions de stress dû au pH inhérent au microenvironnement tumoral ;
- l'angiostatine, pour la migration, l'invasion des cellules endothéliales et la morphogénèse vasculaire ;
- les intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , pour l'attachement des cellules endothéliales, leur survie et leur migration ;
- c-met et son récepteur à tyrosine kinase, pour la prolifération et la survie cellulaire ;
- l'annexine, le protéoglycan NG2 et l'ABSP (*angiostatin binding sequence protein*), dont les rôles ne sont pas encore bien compris dans l'angiogénèse (Wahl *et al.*, 2005).

### 3.2.3 L'endostatine

L'endostatine est une protéine de 20 kDa générée par protéolyse du domaine C-terminal du collagène XVIII, une molécule matricielle présente dans la membrane basale des parois des vaisseaux. Des protéases telles que les MMP, les élastases ou la Cathepsine L peuvent générer l'endostatine par protéolyse du collagène XVIII (Felbor *et al.*, 2000; Ferreras *et al.*, 2000). L'activité antiangiogène de l'endostatine est un processus complexe résultant de l'inhibition de l'adhésion, de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales et de l'induction de l'apoptose de ces cellules (O'Reilly *et al.*, 1997) (Dhanabal *et al.*, 1999). Des études *in vivo* ont montré que l'endostatine inhibe la croissance des tumeurs primaires et prévient la néovascularisation et la croissance des métastases (O'Reilly *et al.*, 1997).

Comme l'angiostatine, le mécanisme moléculaire de l'endostatine n'est pas complètement élucidé (Dixelius *et al.*, 2003):

- elle lie des récepteurs de surface cellulaire et le complexe récepteur ligand est internalisé dans le cytoplasme ;
- elle lie un récepteur non identifié, de haute affinité, sur cellules endothéliales et lie avec une faible affinité des glypicans présents sur les cellules tubulaires rénales ;
- des études cristallographiques ont montré que l'endostatine expose à sa surface un domaine globulaire compact, avec des petits groupes riches en arginine, qui peut lier un protéoglycan sulfate d'héparine/héparine ;
- elle interagit avec les intégrines  $\alpha_v\beta_1$ ,  $\alpha_v\beta_3$  et  $\alpha_5\beta_1$  et induit le « clustering » de l'intégrine  $\alpha_5\beta$  et la co-localisation avec la calvéoline-1 ;

- elle lie le site actif de la MMP-2, diminuant ainsi l'activité de la métalloprotéinase ;
- elle interagit avec la  $\beta$ -caténine pour inhiber la migration des cellules endothéliales.

### 3.2.4 Les fragments 16K de la famille prolactine/hormone de croissance/lactogène placentaire

Struman et ses collaborateurs ont démontré que le fragment N-terminal de 16 kDa des membres de la famille prolactine d'origine humaine, incluant la prolactine (hPRL), l'hormone de croissance (hGH), le variant de l'hormone de croissance (hGH-V) et le lactogène placentaire (hPL), exerce aussi une activité antiangiogène tandis que les molécules entières stimulent la formation des vaisseaux (Struman et al., 1999). Ces fragments N-terminaux seront détaillés au point III.

## **4. L'angiogenèse pathologique**

### ***4.1 Généralités***

Un changement dans l'équilibre entre activateurs et régulateurs de l'angiogenèse peut induire une angiogenèse excessive ou insuffisante menant à de nombreuses pathologies. Les pathologies associées à une angiogenèse insuffisante ou à une régression des vaisseaux incluent la maladie d'Alzheimer, le diabète, l'athérosclérose, la maladie de Crohn, l'ostéoporose. Par contre, l'obésité, le psoriasis, la croissance tumorale et la dissémination des métastases sont liés à une angiogenèse anormale ou excessive (Carmeliet, 2005) (Table 2).

<b>Pathologies associées à une angiogenèse excessive</b>	<b>Pathologies associées à une angiogenèse insuffisante</b>
Arthrite rhumatoïde	Athérosclérose
Croissance tumorale/métastases	Diabète
Endométriose	Oedème lymphatique
Obésité	Fibrose pulmonaire, emphysème
Psoriasis	Ischémie myocardiaque et périphérique
Rétinopathies prolifératives	Maladie de Crohn
Sarcome de Kaposi	Ostéoporose

**Table 2. Liste non exhaustive de pathologies associées à une angiogenèse excessive ou insuffisante.** (d'après Carmeliet, 2005).

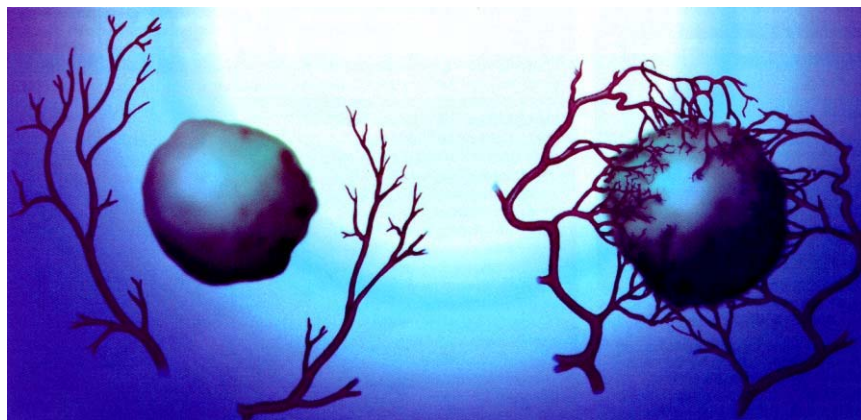


## 4.2 L'angiogenèse tumorale

### 4.2.1 Le "switch" angiogène

La croissance des tumeurs solides est contrôlée à la fois par des mécanismes strictement intratumoraux et par des interactions entre la tumeur et le tissu environnant (Bikfalvi, 2003). En 1971, Folkman a émis l'hypothèse que la croissance des tumeurs et des métastases était dépendante de l'angiogenèse (Folkman, 1971). En effet, les nouveaux vaisseaux sanguins approvisionnent la tumeur en oxygène et en nutriments permettant ainsi son expansion au-delà d'1 à 2 mm<sup>3</sup>. Ils éliminent les déchets métaboliques et fournissent également des cytokines et des facteurs de croissance qui stimulent directement la croissance des cellules cancéreuses.

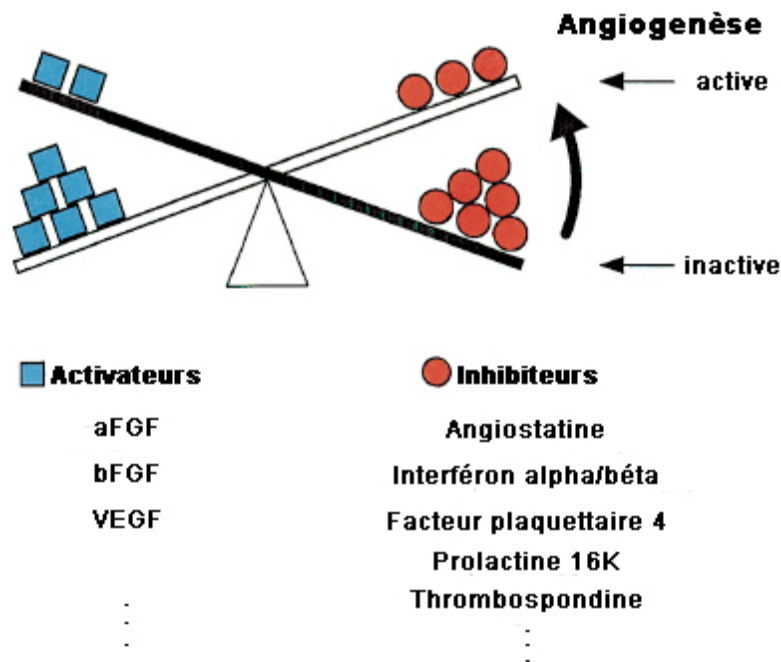
La progression tumorale est caractérisée par une phase prévasculaire et une phase vasculaire (Fig. 4).



**Fig. 4. Les phases prévasculaire et vasculaire de la tumorigenèse.** La progression tumorale débute par une phase prévasculaire latente (image de gauche) et à partir du moment où la tumeur acquiert une certaine taille, on observe une transition vers une phase vasculaire agressive (image de droite) (d'après Pepper, 1997).

Le passage de la phase prévasculaire à la phase vasculaire a été dénommé « switch » angiogène (Fig. 5). Le « switch » angiogène peut être déclenché par de nombreux signaux tels que le stress métabolique ( $pO_2$  faible, pH faible ou hypoglycémie) ou mécanique (pression générée par des cellules en prolifération), une réponse immunitaire/inflammatoire (cellules immunitaires/inflammatoires qui ont infiltré le tissu) ou encore des mutations génétiques (activation d'oncogènes et délétion de gènes suppresseurs de tumeurs qui contrôlent la

production de régulateurs de l'angiogenèse). La phase prévasculaire est caractérisée par une augmentation de la croissance tumorale suivie par un plateau durant lequel le taux de cellules en prolifération est balancé par le taux de cellules en apoptose. Durant la phase vasculaire, qui est caractérisée par une croissance exponentielle, une invasion tissulaire et une dissémination des cellules tumorales, l'augmentation rapide de la croissance tumorale est due en grande partie à une diminution du taux de cellules en apoptose (Pepper, 1997; Carmeliet *et al.*, 2000; Bergers *et al.*, 2003).



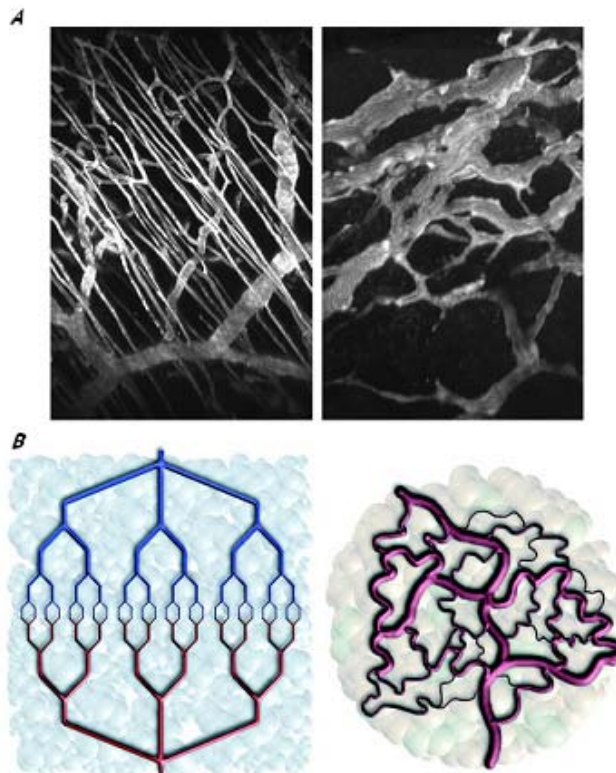
**Fig 5. Modèle du « switch angiogène ».** L'induction de l'angiogenèse (ou «switch» angiogène) décrit la transition des cellules endothéliales de la phase de quiescence à la phase d'activation angiogène. Dans les tissus normaux, les inhibiteurs de l'angiogenèse prédominent et les vaisseaux sont quiescents. Expérimentalement, cette balance peut-être renversée soit en réduisant les inhibiteurs soit en augmentant les inducteurs (d'après Hanahan, 1996).

#### 4.2.2 La formation des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux sanguins tumoraux peuvent se former par angiogenèse mais aussi par vasculogenèse, processus par lequel les cellules précurseurs endothéliales de la moelle osseuse sont mobilisées, transportées via la voie sanguine et incorporées dans les vaisseaux sanguins en croissance. Les facteurs angiogènes (VEGF, PlGF et Ang-1) stimulent également ce processus. Le pourcentage d'incorporation des cellules précurseurs endothéliales est variable (de <0,1% jusqu'à 50%), probablement dépendant du type de tumeur et du modèle angiogène utilisé (Bergers *et al.*, 2003; Carmeliet, 2004). Les tumeurs peuvent aussi, dans un premier temps, coopter des vaisseaux existants qui régressent ensuite, entraînant ainsi une nécrose massive. La tumeur est alors vascularisée par angiogenèse tumorale (Holash *et al.*, 1999; Bergers *et al.*, 2003). Il existe un autre phénomène par lequel certaines tumeurs très agressives, tels certains mélanomes, développent une microcirculation indépendante de l'angiogenèse: le "vasculogenic mimicry" où des cellules tumorales génèrent des canaux composés de matrice extracellulaire et de cellules tumorales dont le phénotype est de type endothélial (Maniotis *et al.*, 1999).

#### 4.2.3 La description des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux tumoraux diffèrent des vaisseaux normaux à plusieurs niveaux. Morphologiquement, les vaisseaux tumoraux sont hétérogènes, de forme irrégulière, dilatés, tortueux avec des branchements excessifs et des terminaisons aveugles. Le flux sanguin tumoral y est chaotique et variable formant des régions hypoxiques et acides au sein des tumeurs. Les vaisseaux sont également anormaux au niveau ultrastructural : ces vaisseaux comportent de nombreuses « ouvertures » (« fenestrae » endothéliales, vésicules et trous transcellulaires), de larges jonctions inter-endothéliales et une membrane basale discontinue ou absente. De plus, les cellules endothéliales anormales, se chevauchent les unes sur les autres et occupent une partie du lumen. Toutes ces anomalies rendent les vaisseaux tumoraux très perméables (Tozer *et al.*, 2005) (Fig. 6). Les tumeurs sont aussi très hétérogènes; toutes les régions ne sont pas vascularisées de façon égale, certains vaisseaux tumoraux sont plus matures que d'autres, et la balance de molécules pro- et antiangiogènes diffère selon la région et selon le stade de la tumeur (Jain, 2005).



**Fig. 6. Architecture du réseau vasculaire normal bien organisé (image de gauche) et réseau vasculaire tumoral anormal et chaotique (image de droite). A. Vue par micrographie. B. Représentation schématique (d'après Jain, 2002).**

En plus d'être une composante essentielle de la croissance tumorale, l'angiogenèse joue également un rôle important dans la dissémination des métastases (voir plus loin le paragraphe I.1 de l'article n°2).

## **5. La thérapie anti-/ angiogène**

Des avancées cliniques importantes ont été réalisées récemment grâce à une meilleure compréhension de la régulation de l'angiogenèse. Pendant les dix dernières années, des efforts intenses ont été entrepris afin de développer des stratégies thérapeutiques pour promouvoir la revascularisation de tissus ischémiques ou pour inhiber l'angiogenèse dans les maladies cancéreuses, oculaires ou de la peau (Carmeliet, 2005).

### ***5.1 La thérapie angiogène***

Plusieurs stratégies pour induire l'angiogenèse sont déjà en essais cliniques. La plupart de ces études délivrent un seul facteur angiogène faisant principalement partie de la famille du VEGF ou du FGF. Les résultats cliniques (phase II), provenant de patients atteints de maladie artérielle périphérique ou de maladie cardiovasculaire ischémique et traités avec du VEGF administré via un vecteur adénoviral ou via un plasmide, n'ont malheureusement pas répondu aux attentes. Toutefois, des essais effectués avec un vecteur adénoviral encodant le FGF-4, administré intracoronairement, chez des patients atteints d'ischémie cardiaque se sont révélés prometteurs puisqu'une diminution significative de la zone atteinte lors de l'infarctus a été observée (Springer, 2006).

Parmi les thérapies alternatives, la délivrance de cellules précurseurs endothéliales en essais cliniques de phase II a montré des résultats positifs dans le cas de maladie du myocarde (Springer, 2006).

### ***5.2 La thérapie antiangiogène***

Bien que les recherches effectuées sur l'angiogenèse soient fortement liées au cancer, de nombreuses maladies non néoplasiques sont dépendantes de l'angiogenèse. Ces maladies

incluent la dégénérescence maculaire, l'endométriose, le psoriasis, l'arthrite, etc... La dégénérescence maculaire liée à l'âge est notamment traitée par un aptamère du VEGF, le Macugène, qui a été approuvé par la FDA en décembre 2004. Cette molécule bloque le VEGF quand elle est injectée dans l'humeur vitrée et prévient la progression de la maladie (Folkman, 2006).

Les inhibiteurs de l'angiogenèse peuvent être classés en deux catégories. D'une part, les inhibiteurs directs qui inhibent la prolifération des cellules endothéliales, leur migration et différenciation. La plupart des essais cliniques antiangiogènes sont réalisés avec des inhibiteurs directs. D'autre part, les inhibiteurs indirects qui interfèrent avec des ligands angiogènes, leurs récepteurs ou leur voie de signalisation (Cao, 2004).

### ***5.3 L'angiogenèse tumorale comme cible thérapeutique***

La stratégie thérapeutique antiangiogène dans le traitement des cancers offre de nombreux avantages par rapport aux thérapies ciblant directement les cellules tumorales. Les vaisseaux sanguins tumoraux sont une cible attractive pour la thérapie car chez l'adulte sain, les cellules endothéliales étant en majorité quiescentes, un traitement antiangiogène ciblerait principalement les cellules endothéliales en prolifération de la tumeur ce qui limiterait la toxicité. De plus, un seul vaisseau peut supporter la survie de beaucoup de cellules tumorales et procurer également une route principale pour la dissémination des métastases. Le traitement antiangiogène possède un champ d'application vaste car la plupart des tumeurs solides sont dépendantes de l'angiogenèse pour leur survie. Contrairement aux cellules tumorales qui sont sujettes aux mutations spontanées, les cellules endothéliales sont génétiquement stables, réduisant les risques de résistance au traitement antiangiogène. Enfin, elles sont facilement accessibles car elles sont en contact direct avec la circulation sanguine (Feron, 2004).

Actuellement, de nombreux inhibiteurs de l'angiogenèse sont en essais cliniques et une vue d'ensemble de ces essais est repris sur le site internet [www.cancer.gov/clinicaltrials/developments/anti-angio-table](http://www.cancer.gov/clinicaltrials/developments/anti-angio-table). Parmi les cibles angiogènes dans le traitement antitumoral, la famille du VEGF prédomine car la plupart des tumeurs, si pas toutes, expriment des niveaux élevés de VEGF (Cao, 2004).

La validation clinique de la thérapie antiangiogène antitumorale a été démontrée à travers le monde. Ainsi, en février 2004, la FDA (*US Food and Drug Administration*) a approuvé aux Etats-Unis l'utilisation du Bevacizumab (ou Avastine), un anticorps anti-VEGF humain, pour le traitement du cancer colorectal métastatique en combinaison avec une chimiothérapie basée sur le 5-fluorouracil. L'Avastine est aussi étudiée dans de nombreux essais cliniques chez des patients atteints d'autres types de cancer et est administrée en combinaison avec le Tarceva, une molécule qui cible la voie de signalisation du récepteur du facteur de croissance épidermique humain (EGFR). En plus du cancer colorectal, la thérapie antiangiogène augmenterait la survie des patients atteints du cancer du poumon et du sein. Depuis l'Avastine, d'autres inhibiteurs antiangiogènes ont été approuvés par la FDA aux Etats-Unis et dans 28 autres pays (Table 3) (Folkman, 2006).

Date	Drogue	Lieu	Maladie
Décembre 2003	Thalidomide	Australie	Myélome multiple
Février 2004	Avastine	Etats-Unis	Cancer colorectal
Novembre 2004	Tarceva	Etats-Unis	Cancer du poumon
Décembre 2004	Avastine	Suisse	Cancer colorectal
Décembre 2004	Macugène	Etats-Unis	Dégénérescence maculaire
Janvier 2005	Avastine	Union Européenne	Cancer colorectal
Septembre 2005	Endostatine	Chine	Cancer du poumon

**Table 3. Inhibiteurs de l'angiogenèse approuvés pour l'utilisation clinique aux Etats-Unis et dans 28 autres pays** (d'après Folkman, 2006).

## **6. Les perspectives thérapeutiques**

La thérapie antiangiogène à elle seule ne permettant pas d'éradiquer complètement les tumeurs mais plutôt de contrôler leur croissance, elle est le complément idéal aux thérapeutiques cytotoxiques (chimiothérapie ou radiothérapie). Ainsi, de multiples études précliniques ont montré que la coadministration d'agents antiangiogènes avec des agents cytotoxiques conventionnels ou une radiothérapie augmentait considérablement l'effet antitumoral global. Comme décrit précédemment, cela fut confirmé cliniquement avec l'Avastine en combinaison avec une chimiothérapie basée sur le 5-fluorouracil (Ferrara *et al.*, 2005). Par ailleurs, Browder et ses collaborateurs ont montré qu'une chimiothérapie délivrée à faible dose et à intervalle de temps régulier et rapproché (appelée chimiothérapie

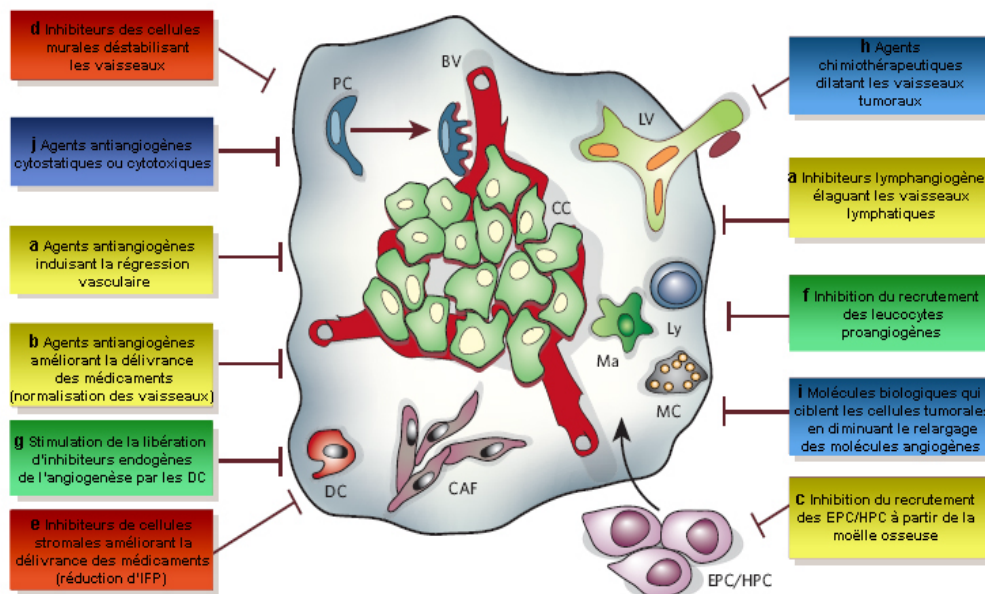
métronomique) endommage préférentiellement les cellules endothéliales dans les vaisseaux tumoraux (Browder *et al.*, 2000). L'efficacité de la chimiothérapie métronomique peut-être augmentée quand elle est administrée en combinaison avec des drogues antiangiogènes telles que des anticorps dirigés contre le VEGF ou le VEGFR-2 (Kerbel *et al.*, 2004). Des essais cliniques testant ces combinaisons sont en cours.

L'acquisition d'une résistance aux traitements antiangiogènes est un événement de moindre fréquence mais existant. Ainsi, certaines tumeurs humaines deviennent résistantes aux antagonistes d'un seul facteur antiangiogène car durant le développement tumoral, les cellules tumorales produisent d'autres facteurs angiogènes. Par exemple, au début de la maladie, 50% des cancers du sein produisent seulement du VEGF mais durant la progression tumorale ils produisent d'autres facteurs comme le bFGF, le TGF- $\beta$ , le PlGF,... (Cao, 2004). Une thérapie antiangiogène qui combine différents inhibiteurs ciblant différentes voies angiogènes semble donc être une approche indispensable pour espérer une efficacité optimale. Ces approches incluent l'Avastine et le Tarceva ou l'Avastine combinée avec une chimiothérapie antiangiogène. Récemment, une autre classe d'inhibiteurs de l'angiogenèse comprenant le Sugen11248, permet d'inhiber plusieurs facteurs angiogènes. Celui-ci peut interagir avec trois facteurs angiogènes (VEGF, bFGF et TGF- $\alpha$ ) et les essais sont en phase clinique (Folkman, 2006). L'action potentielle des médicaments antiangiogènes pourrait également s'exercer comme thérapie préventive chez des patients ayant des risques élevés de développer un cancer ou une récurrence pour un cancer. Une étude expérimentale portant sur le cancer du sein induit spontanément chez le rat, a révélé que l'endostatine pouvait prévenir la formation du cancer du sein et prolonger la survie des animaux traités. Un essai clinique mené dans le but de prévenir une récurrence est en cours chez des patients en rémission d'un cancer rectal. Dans cet essai, la thalidomide est administrée après une complète résection chirurgicale de la tumeur (Kerbel *et al.*, 2002).

Par ailleurs, certaines petites drogues administrées oralement peuvent induire une élévation du niveau d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse dans le sérum, mimant ainsi l'administration en continu de l'inhibiteur. Par exemple, le celecoxib peut augmenter le niveau d'endostatine dans le sérum ou la doxycycline et le rosiglitazone peuvent augmenter l'expression de TSP-1 (Folkman, 2004). Ces résultats suggèrent la possibilité d'un nouveau champ d'action par certains produits pharmaceutiques.



A côté des agents antiangiogènes qui affectent directement les cellules endothéliales, il existe des stratégies qui ont pour but d'interférer avec certaines cellules non endothéliales (cellules stromales et murales, cellules hématopoïétiques et cellules tumorales) impliquées dans l'angiogenèse tumorale (Fig. 7). Ainsi, le ciblage des vaisseaux tumoraux établis représente une thérapie alternative, probablement complémentaire à la thérapie antiangiogène. Des agents antivasculaires (toxine, cytokine, etc.) sont délivrés spécifiquement aux vaisseaux tumoraux grâce à des molécules (anticorps, peptides, aptamères) qui lient des marqueurs vasculaires spécifiquement exprimés sur les vaisseaux sanguins tumoraux. Ces agents antivasculaires induisent une hémorragie ou la formation de thrombus au sein de la tumeur entraînant une réduction de la perfusion de la tumeur et ensuite une nécrose (Neri *et al.*, 2005; Tozer *et al.*, 2005). Le combrestatine A-43-O-phosphate (CA-4-P) et les médicaments liés au 5,6-diméthylxhanténone-4-acide acétique (DMXAA) utilisés en combinaison avec des thérapies conventionnelles sont actuellement en phase clinique (Tozer *et al.*, 2005).



**Fig. 7. Stratégies ciblant les cellules endothéliales et non endothéliales dans le but d'inhiber l'angiogenèse tumorale.** Les boîtes jaunes montrent des agents (tels que des inhibiteurs du VEGF, la chimiothérapie métronomique et autres composés) qui ciblent les cellules (précurseurs) endothéliales (EPC); ils inhibent la (lymph)angiogenèse (a), induisent la régression (a) et la normalisation (b) des vaisseaux, et bloquent le recrutement des EPC (c). Les boîtes rouges montrent des agents (ex : inhibiteurs du PDGF) qui ciblent les cellules stromales et murales et déstabilisent les vaisseaux (d), réduisent le relargage de facteurs proangiogènes ou de cytokines, et diminuent la pression du fluide interstitiel (IFP), ce qui améliore la délivrance des médicaments (e). Les boîtes vertes indiquent des agents (inhibiteurs du VEGFR-1, antagonistes des chemokines, etc.) qui ciblent les cellules hématopoïétiques et réduisent l'infiltration de précurseurs proangiogènes dérivés de la moelle osseuse et de leucocytes matures (c, f) et stimulent la libération d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse dans les cellules dendritiques (g). Les boîtes bleues montrent des agents ciblant les cellules cancéreuses (chimiothérapie, radiation, molécules biologiques ciblant les cellules tumorales) ce qui améliore la délivrance des médicaments par dilatation des vaisseaux tumoraux (h) et diminution de la libération de facteurs (lymph)angiogènes (i); certains agents antiangiogènes sont aussi cytotoxiques pour les cellules tumorales (j). BV, vaisseau sanguin; CAF, fibroblaste activé par un carcinome; DC, cellule dendritique; LV, vaisseau lymphatique; Ly, lymphocyte; Ma, macrophage; PC, péricycte; MC, mastocyte (d'après Carmeliet, 2005).

## **II. La famille Prolactine/Hormone de Croissance /Lactogène Placentaire (PRL/GH /PL)**

### **1. Généralités**

La PRL, la GH et le PL font partie d'une famille d'hormone peptidique partageant d'importantes homologues structurales et fonctionnelles. La comparaison de séquence de ces hormones chez les tétrapodes montre que les gènes codant la PRL, GH et PL ont évolué à partir d'un gène ancestral par duplication et que la divergence entre la PRL et la GH s'est déroulée il y a 400 millions d'années (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Le variant de la GH (GH-V) et le lactogène placentaire (PL) sont deux membres de la famille PRL/GH uniquement exprimés par le placenta. Le PL, uniquement présent chez les mammifères, serait apparu il y a 80-100 millions d'années (Kawauchi *et al.*, 1990). L'évolution génétique du gène PL diffère selon les espèces : le gène PL des primates aurait évolué à partir du gène GH tandis que celui des non-primates aurait évolué à partir du gène PRL (Walker *et al.*, 1991).

Chez l'homme, la GH (hGH), le GH-V (hGH-V) et le PL (hPL) présentent des pourcentages élevés d'identité (hGH/hGH-V :95% ; hGH/hPL : 85%) alors que les pourcentages d'identité de ces hormones avec la hPRL sont nettement plus faibles (environ 20%) (Cunningham *et al.*, 1989).

Plus récemment, de nouvelles protéines identifiées comme la proliférine (PLF), la protéine apparentée à la proliférine (PRP) ou encore la somatolactine ont été ajoutées dans la famille PRL/GH sur base de leurs similarités de séquence (Goffin *et al.*, 2005).

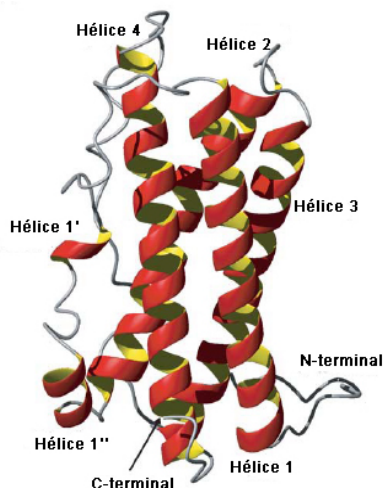
## 2. La PRL

### 2.1 La structure de la PRL

La PRL est une hormone peptidique de ~23 kDa qui est synthétisée et sécrétée principalement par les cellules lactotrophes de l'hypophyse antérieure. La PRL est présente chez tous les vertébrés. A l'exception des poissons, toutes les PRL identifiées jusqu'à présent possèdent 197 à 199 AA et contiennent 6 cystéines formant 3 ponts disulfures intramoléculaires (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Chez l'homme, la hPRL mature est composée de 199 AA et possède un poids moléculaire de 23 kDa. Elle est synthétisée sous forme de molécules précurseurs avec un peptide signal de 28 AA. Son gène est localisé sur le chromosome 6 (Goffin *et al.*, 2002).

De nombreux variants issus de modifications post-traductionnelles existent. Ils résultent d'un clivage protéolytique, d'une glycosylation ou d'une phosphorylation (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Chez l'homme, le site de glycosylation est situé sur l'asparagine 31 (Lewis *et al.*, 1985). On détecte seulement la forme glycosylée dans le sérum (Hashim *et al.*, 1990). Dans l'hypophyse, la forme monomérique oxydée et non glycosylée constitue la forme majoritaire (Sinha, 1992).

La structure tertiaire de la PRL humaine a été résolue par RMN en solution à haute résolution. Elle adopte une topologie d'un tonneau à 4 hélices  $\alpha$  « up-up-down-down », les hélices 1 et 2 sont parallèles entre elles et antiparallèles aux hélices 3 et 4 (Teilum *et al.*, 2005) (Fig. 8).



**Fig. 8. Représentation de la structure 3D de la hPRL.** La structure de la hPRL est composée d'un faisceau de 4 hélices  $\alpha$ . L'hélice 1 est composée des résidus 15 à 43, l'hélice 2 des résidus 78 à 103, l'hélice 3 des résidus 111 à 137 et l'hélice 4 des résidus 161 à 193 (d'après Teilum, 2005).

## ***2.2 La régulation de la synthèse et de la sécrétion de la PRL***

L'hypophyse étant sous le contrôle des hormones hypothalamiques, de très nombreux facteurs d'origine hypothalamique interviennent dans le contrôle de la biosynthèse et de la sécrétion de la PRL. Parmi les inhibiteurs provenant de l'hypothalamus, le plus important est la dopamine dont le récepteur est présent sur les cellules lactotrophes. Parmi les stimulateurs se retrouvent la TRH (*thyroid releasing hormone*), le VIP (*vasointestinal peptide*) ou l'angiotensine II. D'autres facteurs non hypothalamiques interviennent aussi dans la régulation de la synthèse de la PRL. Les oestrogènes stimulent la synthèse et la sécrétion de la PRL tandis que les hormones thyroïdiennes inhibent la sécrétion de la PRL essentiellement par action directe sur la libération de la dopamine (Freeman *et al.*, 2000).

## ***2.3 Les fonctions biologiques de la PRL***

La PRL présente plus de 300 fonctions biologiques regroupées en 6 processus comprenant la balance en eau et en électrolytes, la croissance et le développement, le métabolisme, le comportement, la reproduction et l'immunorégulation (Bole-Feysot *et al.*, 1998).

Chez l'homme, le rôle de la PRL dans le développement de la glande mammaire et la lactogénèse est le mieux connu. Elle est indispensable à toutes les périodes du développement de la glande mammaire (croissance de la glande, induction et entretien de la glande lactée) ainsi qu'au développement lobuloalvéolaire au terme de la première grossesse. Elle participe au maintien de la sécrétion lactée. Au niveau des cellules mammaires, la PRL stimule la biosynthèse des protéines, des lipides et des glucides du lait (Freeman *et al.*, 2000).

L'hyperprolactinémie et l'hypoprolactinémie font partie des pathologies liées à des taux sériques trop élevés ou trop faibles de la PRL. L'hyperprolactinémie, une des maladies endocrines les plus fréquentes, spécialement chez la femme, cause la galactorrhée, l'aménorrhée et la stérilité. L'hypoprolactinémie est une maladie plus rare qui mène à l'absence de sécrétion de lait (Goffin *et al.*, 2005).

## **2.4 La PRL extrahypophysaire**

La majorité de la PRL circulante est d'origine hypophysaire et agit via une voie endocrine classique, c'est à dire qu'elle est sécrétée par une glande, transportée par le système circulatoire et agit sur des cellules cibles grâce à des récepteurs spécifiques localisés sur leur membrane plasmique. Cependant, il existe une PRL extrahypophysaire, produite localement par d'autres cellules (lymphocytes circulantes, cellules épithéliales mammaires, cellules tumorales, etc.) et tissus (cerveau, thymus, rate, etc.). Cette PRL peut agir de façon plus directe, c'est à dire comme facteurs de croissance, neurotransmetteurs, de manière paracrine ou autocrine (Bole-Feysot *et al.*, 1998).

La régulation transcriptionnelle du gène de la PRL est réalisée par deux promoteurs distincts: le promoteur proximal ou hypophysaire et le promoteur extrahypophysaire (Goffin *et al.*, 2002).

## **2.5 La structure du récepteur de la PRL (PRLR)**

Le PRLR fait partie d'une superfamille de récepteurs à cytokines de classe 1 (Bole-Feysot *et al.*, 1998). Ce récepteur membranaire présente plusieurs isoformes (types court, long ou intermédiaire) variant par la longueur de la partie cytoplasmique mais dont le domaine extracellulaire (liant le ligand) est identique. Ce récepteur est exprimé de manière ubiquiste. Suivant le type cellulaire, le niveau d'expression est de 200-3000 récepteurs/cellule. Le PRLR lie la PRL, le PL et les GH des primates. La liaison de ces ligands constitue la première étape d'activation (Goffin *et al.*, 2002). Il existe une forme soluble, le PRLBP (*PRL binding protein*) générée par protéolyse cellulaire du domaine extracellulaire du PRLR. Cette forme peut lier 30% de la PRL sérique mais ne peut transduire des signaux (Chilton *et al.*, 2005).

### **3. La GH**

#### ***3.1 La structure de la GH***

La GH est une hormone peptidique de 20 ou 22 kDa (forme majoritaire) qui est sécrétée par les cellules somatotropes de l'hypophyse antérieure (Chilton *et al.*, 2005). Chez l'homme, son gène hGH-N (normal) est localisé sur le chromosome 1. Le gène hGH-V est exprimé dans le placenta (Walker *et al.*, 1991). La structure tridimensionnelle de la hGH est similaire à celle de la hPRL et est composée d'un faisceau de 4 hélices  $\alpha$  antiparallèles connectées de façon unique en un motif « up-up-down-down » (de Vos *et al.*, 1992).

#### ***3.2 La régulation de la synthèse et de la sécrétion de la GH***

La sécrétion de la GH par la cellule somatotrope est fonction du taux d'AMP cyclique intracellulaire. Celui-ci est dépendant de deux peptides hypothalamiques : la somatocrinine ou GH-RH (*GH-releasing hormone*) est stimulatrice tandis que la somatostatine ou SRIH (*somatropin release inhibiting hormone*) est inhibitrice. La GH régule sa propre sécrétion en stimulant ou en inhibant la sécrétion de la GH-RH et celle de la SRIH. La ghréline, un peptide produit par l'estomac, le petit intestin et l'hypothalamus, stimule la sécrétion de la GH par action directe sur l'hypophyse mais aussi en activant le système hypothalamique. La GH stimule aussi la sécrétion d'IGF-1 (*insulin-like growth factor of type 1*) qui effectue un rétrocontrôle négatif, soit directement au niveau des cellules somatotropes, ou indirectement en stimulant la sécrétion de la SIRH. Les hormones thyroïdiennes et les glucocorticoïdes sont des stimulateurs de la synthèse de la GH. La sécrétion de la GH s'effectue de manière pulsatile, avec les pics les plus élevés durant la nuit. La GH circule et agit sous forme de monomère. Un excès en GH cause l'acromégalie tandis qu'une déficience en GH diminue la croissance postnatale (Okada *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2004; Chilton *et al.*, 2005).

### **3.3 Les fonctions biologiques de la GH**

Les principales actions de la GH sont relayées par l'IGF-1. La GH induit la synthèse hépatique d'IGF-1 qui exerce ses effets à distance, telle une hormone, mais aussi localement sur un mode paracrine ou autocrine. L'IGF-1 circule dans le plasma sous forme liée à des protéines IGFBP (*IGF binding protein*). Les effets tissulaires de l'hGH portent principalement sur la croissance. Elle stimule la croissance des os longs. Sur le muscle, la GH produit une hypertrophie et une hyperplasie tissulaire. Au niveau métabolique, la GH stimule la lipolyse, conduisant à l'augmentation des concentrations sériques en acides gras libres et à une diminution générale de la masse grasseuse. Elle induit la synthèse des protéines et des acides nucléiques dans le muscle squelettique et augmente la glycémie en stimulant la néoglucogenèse et la glycogénolyse hépatique (Okada *et al.*, 2001).

### **3.4 La structure du récepteur de la GH (GHR)**

Les effets somatogéniques et métaboliques de la GH sont médiés par le GHR et la GHBP (*GH-binding protein*). Le GHR est membre de la superfamille de récepteurs à cytokines de classe 1. Il est caractérisé par un seul passage transmembranaire hydrophobe qui relie le domaine extracellulaire, liant l'hormone au domaine de signalisation intracellulaire. L'épissage alternatif du GHR produit deux récepteurs membranaires courts dont le domaine cytoplasmique est tronqué. Ils sont tous les deux incapables de transduire un signal (Chilton *et al.*, 2005).

La GHBP est produite soit par clivage protéolytique (chez l'homme et le lapin) du domaine extracellulaire du GHR ou par épissage alternatif du gène GHR (chez les rongeurs). La GHBP est détectée dans la circulation, dans des emplacements intracellulaires, et est associée avec des membranes cellulaires. Elle lie la GH et prolonge sa demi-vie dans la circulation. La GHBP intracellulaire serait associée au transport de la GH, tandis que la GHBP associée à la membrane entre en compétition avec des récepteurs tissulaires pour la liaison avec la GH (Chilton *et al.*, 2005).

#### **4. La transduction du signal de la PRL et de la GH**

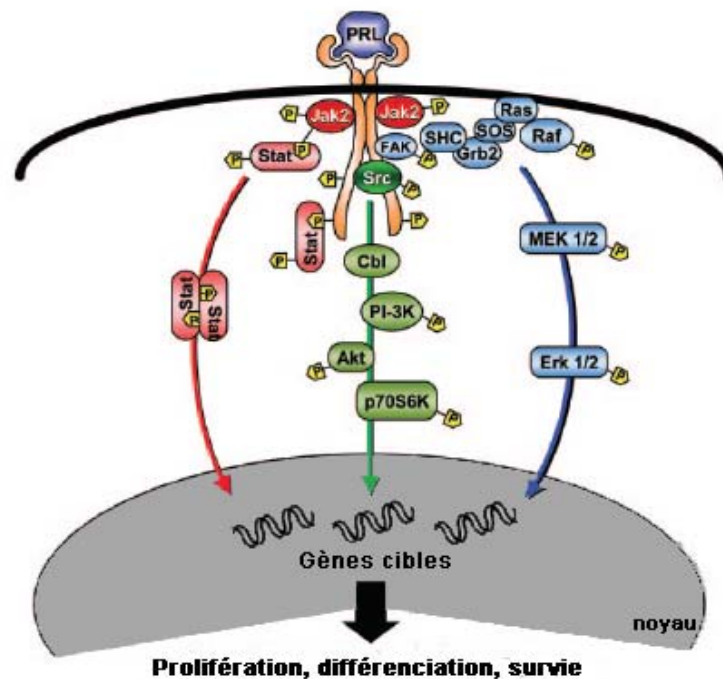
La hPRL, comme la hGH, comporte deux sites de liaison à son récepteur. Le premier site de liaison comprend des résidus localisés sur l'hélice 1, l'hélice 4 et la seconde moitié de la boucle 1. Le second site de liaison est localisé dans le canal hydrophobe formé entre les hélices 1 et 3 (Goffin *et al.*, 1995; Teilum *et al.*, 2005).

Les mécanismes d'activation du PRLR et du GHR sont similaires et se déroulent en deux étapes. La transduction du signal de la PRL ou de la GH débute par la liaison de l'hormone à son récepteur via son premier site de liaison de grande surface et de grande affinité. Le complexe intermédiaire formé est inactif. La même hormone recrute un second récepteur via son deuxième site de liaison de plus faible surface et affinité, formant ainsi un complexe trimérique actif (Bole-Feysot *et al.*, 1998).

Il existe des différences entre la PRL et la GH concernant leurs interactions avec leurs récepteurs. Le GHR existerait sous forme de complexe prédimérisé, tandis qu'il n'existe pas de preuves que le PRLR soit dimérisé avant sa liaison à l'hormone (Goffin *et al.*, 2005).

La dimérisation du récepteur induit la phosphorylation de la tyrosine de la kinase JAK2 (*janus kinase*) et son activation qui est suivie par la phosphorylation du récepteur. La voie JAK2/Stat5 (*Stat pour signal transducer and activator of transduction*) est la voie majeure de signalisation qui implique la phosphorylation des protéines Stat1, Stat3 et principalement Stat5a/b. Les Stat5a/b phosphorylées dimérisent et migrent vers le noyau où elles lient l'ADN d'une façon spécifique pour activer la transcription génique. D'autres voies sont aussi impliquées dans la signalisation des récepteurs à cytokines comme la voie des MAP kinases qui transduit son signal via la cascade protéique Shc/SOS/Grb2/Ras/Raf/MAPK ou la voie PI3K/Akt (Bole-Feysot *et al.*, 1998) (Fig. 9).





**Fig. 9. Les principales cascades de signalisation déclenchées par le PRLR dans les cellules cibles.** L'activation du PRLR induite par un ligand déclenche plusieurs cascades de signalisation. La voie principale implique la kinase à tyrosine Jak2, qui à son tour active trois membres de la famille Stat, Stat1, Stat3, et principalement Stat5. La voie des MAPK est une autre voie importante activée par le PRLR. Cette voie implique les intermédiaires Shc/SOS/Grb2/Ras/Raf en amont de la MAPK kinase et des kinases Erk-1/-2. Des connections entre les voies Jak-Stat et MAPK ont été suggérées. L'activation d'autres voies de signalisation a été reportée, parmi celles-ci, les kinases Src sont connues pour jouer un rôle important dans la prolifération et notamment dans celle des cellules du cancer du sein (d'après Goffin, 2005).

## 5. Le GH-V et le PL

### *5.1 Généralités*

Le variant placentaire de la GH (GH-V) ainsi que le lactogène placentaire (PL) sont produits par le syncytiotrophoblaste villositaire du placenta. Leurs gènes chez l'homme sont localisés sur le chromosome 17 (Walker *et al.*, 1991). Le hGH-V diffère de l'hGH par 13 acides aminés. Pendant la grossesse, à partir de 12-20 semaines, l'expression de l'hGH hypophysaire chez la mère est remplacée graduellement par le hGH-V. La sécrétion du hGH-V se fait de manière continue dans la circulation maternelle et est inhibée par le glucose (Lacroix *et al.*, 2002). Le hPL est sécrété dans les circulations maternelle et fœtale après la 6<sup>ème</sup> semaine de grossesse (Handwerger *et al.*, 2000).

## 5.2 Les fonctions biologiques

Relativement peu d'études ont été réalisées pour analyser les aspects physiologiques de ces deux hormones placentaires. Le hGH-V et le hPL stimulent chez la mère la production d'IGF et modulent le métabolisme intermédiaire, augmentant de cette manière la quantité de glucose et d'acides aminés disponibles pour le fœtus. Dans le fœtus, le hPL agit via des récepteurs lactogéniques et probablement un récepteur PL unique afin de moduler le développement embryonnaire, de réguler le métabolisme intermédiaire et de stimuler la production d'IGF, d'insuline, d'hormones adrénocorticales et de surfactant pulmonaire (Handwerger *et al.*, 2000).

L'hGH exprimée par l'hypophyse fœtal a peu ou pas d'actions physiologiques dans le fœtus jusque tard dans la grossesse. Cette situation est la résultante d'un manque de récepteurs GH fonctionnels sur les tissus fœtaux (Handwerger *et al.*, 2000). Le hGH-V n'aurait pas un effet direct sur la croissance du fœtus comme cette hormone n'est pas détectée dans la circulation fœtale (Alsat *et al.*, 1998). Toutefois, le niveau du hGH-V dans le sérum maternel est associé à la croissance du fœtus. En outre, le hGH-V pourrait influencer le développement du placenta via un mécanisme autocrine ou paracrine comme suggéré par la présence de récepteurs spécifiques de la GH dans ce tissu (Fuglsang *et al.*, 2006).

## **6. La famille PRL/GH et l'angiogénèse**

Le fragment N-terminal de 16 kDa de la prolactine (PRL 16K) présente de nombreux effets antiangiogènes (qui seront détaillés au point III.2). En plus de l'action antiangiogène de la hPRL 16K, Struman et ses collaborateurs ont montré que les fragments 16K des trois autres membres de la famille, à savoir la hGH, le hGH-V et le PL, ont également des effets antiangiogènes (cette partie sera détaillée au point III.2) tandis que les protéines entières sont angiogènes. Ainsi, *in vitro*, les quatre protéines de la famille PRL/GH stimulent l'activation et la phosphorylation des MAPK et favorisent la croissance capillaire *in vivo* dans le test de la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet (test de CAM, *chorioallantoic membrane*) (Struman *et al.*, 1999). Par ailleurs, il a été préalablement montré qu'*in vitro*, la hGH stimule la prolifération de l'endothélium microvasculaire rétinale humaine (Rymaszewski *et al.*, 1991) et la vascularisation de la CAM (Gould *et al.*, 1995).

Chez la souris, la proliférine (PLF) et la protéine apparentée à la proliférine (PRP), toutes deux apparentées aux GH et PRL, jouent un rôle essentiel dans l'angiogenèse placentaire (Jackson *et al.*, 1994). La PLF présente une activité angiogène alors que la PRP est au contraire antiangiogène. L'expression par le placenta de la PLF pendant la première moitié de la gestation serait responsable de l'initiation de la vascularisation placentaire tandis que l'expression de la PRP lors de la seconde moitié de la grossesse induirait l'arrêt de la vascularisation.

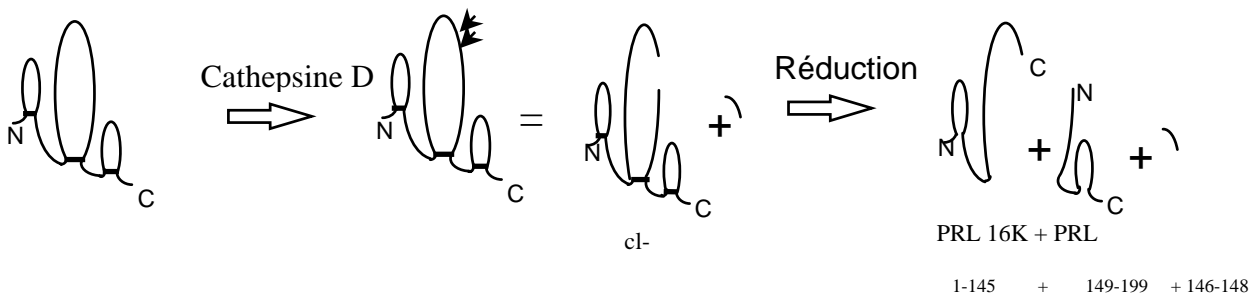
Plus récemment, il a été montré qu'une prolactine mimant la hPRL phosphorylée, à savoir la S179D PRL, avait des effets antiangiogènes. Cette PRL bloque notamment la signalisation du bFGF et inhibe la migration des cellules endothéliales (Ueda *et al.*, 2006).

### III. La Prolactine 16K

#### 1. Généralités

Une forme clivée de la prolactine (PRL-c) a été identifiée dans l'hypophyse du rat (Mitra, 1980) et de la souris (Sinha *et al.*, 1984) et dans l'hypophyse et le plasma humains (Sinha *et al.*, 1985). Cette PRL-c est constituée d'un fragment N-terminal de 16 kDa et d'un fragment C-terminal de 8 kDa reliés par un pont disulfure. La réduction de ce pont disulfure libère les deux fragments.

Chez le rat, la PRL 16K est obtenue par clivage de la PRL native par une protéase acide, la cathepsine D (Baldocchi *et al.*, 1993). Ce clivage engendre la formation de trois fragments (16K, 8K, tripeptide) après réduction des ponts disulfures (Fig. 10). A la différence de la PRL de rat, la cathepsine D clive la PRL humaine en trois fragments proches de 16 kDa : les fragments N-terminaux 15K, 16,5K et 17K présentant tous les trois des activités antiangiogènes (Piwnica *et al.*, 2004). Récemment, il a été montré que des MMP produites et sécrétées par les chondrocytes génèrent de la hPRL 16K biologiquement active à partir de la hPRL (Macotella *et al.*, 2006). La présence de la PRL 16K physiologique a rarement été démontrée et est sujet à controverse. Ainsi, chez l'homme, seule une faible proportion de PRL 16K a été observée en conditions non réductrices dans le sang et le liquide amniotique (Warner *et al.*, 1993). Plus récemment, deux études ont montré que la PRL 16K serait un inhibiteur naturel de l'angiogenèse oculaire (Duenas *et al.*, 2004; Aranda *et al.*, 2005).



**Fig. 10. Formation de la PRL 16K.** Clivage de la PRL de rat par la Cathepsine D et libération d'un fragment N-terminal 16K, d'un fragment C-terminal 8K et d'un tripeptide, après réduction des ponts disulfures.

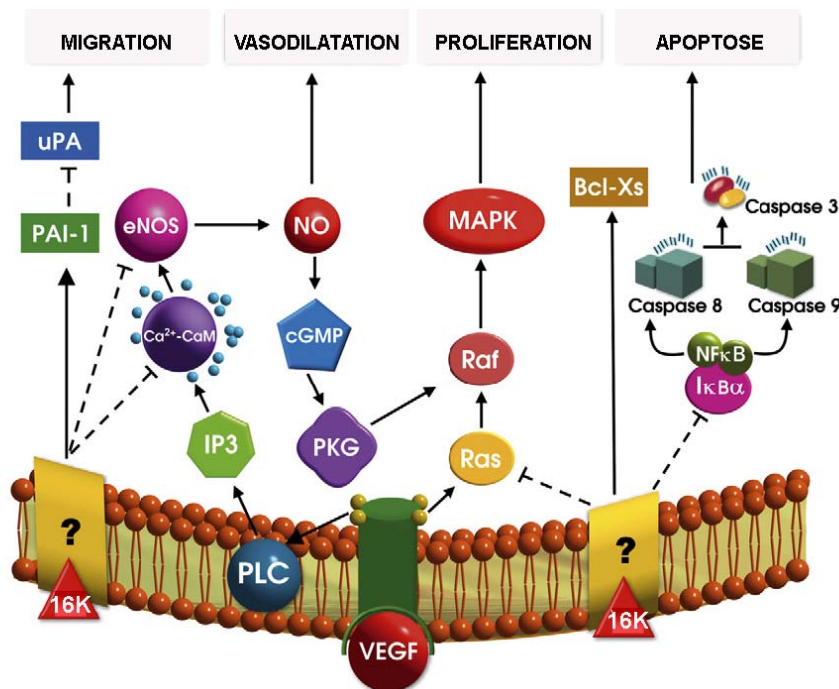
## **2. Les activités antiangiogènes de la PRL 16K**

En 1991, l'équipe du professeur R.I. Weiner (laboratoire d'Endocrinologie de la Reproduction, UCSF, CA, USA) montre que la PRL 16K de rat inhibe la prolifération des cellules endothéliales issues de capillaires de cerveau bovin (BBCE, *bovine brain capillary endothelial*). Ceci indiquerait que la PRL 16K de rat posséderait des propriétés antiangiogènes (Ferrara *et al.*, 1991).

Dans le but d'approfondir l'étude des propriétés antiangiogènes de la PRL 16K, notre laboratoire, en collaboration avec l'équipe du professeur R. I. Weiner, s'est investi dans la production de la hPRL 16K recombinante chez *Escherichia coli* (*E. coli*). *In vitro*, la hPRL 16K inhibe l'action proliférative du bFGF et du VEGF sur les cellules endothéliales primaires de type BBCE et HUVE (*human umbilical vein*) en culture (Clapp *et al.*, 1993). Elle stimule également la production de l'inhibiteur de l'activateur du plasminogène (PAI-1) (Lee *et al.*, 1998).

Jusqu'à présent, nous avons pu démontrer par des études réalisées *in vitro*, que les mécanismes d'action de la hPRL 16K se situent à plusieurs niveaux (Fig. 11). D'une part, elle inhibe la prolifération des cellules endothéliales en bloquant la voie principale de la signalisation des récepteurs de la famille des "tyrosine kinases", dont font partie les récepteurs du bFGF et du VEGF. La hPRL 16K agit plus particulièrement en inhibant l'activation de la protéine Ras, un des agents de la cascade de transduction qui aboutit à l'activation des MAPK (D'Angelo *et al.*, 1995; D'Angelo *et al.*, 1999). Tabruyn et ses collaborateurs ont également démontré que la hPRL 16K provoque l'arrêt du cycle cellulaire des cellules endothéliales au niveau des phases G0-G1 et G2-M (Tabruyn *et al.*, 2005). D'autre part, la hPRL 16K induit l'apoptose des cellules endothéliales (Martini *et al.*, 2000) et ce, via l'activation du facteur transcriptionnel NF- $\kappa$ B dans les cellules BACE (*bovine adrenal cortex endothelial*) (Tabruyn *et al.*, 2003). Plus récemment, des expériences de microarrays ont permis de mettre en évidence de nouvelles cibles transcriptionnelles de la hPRL 16K (caspase-3, ATF-3, Réprimo, Sprouty-1,...) impliquées dans l'effet antiangiogène de la hPRL 16K. Ces expériences ont également confirmé le rôle central de NF- $\kappa$ B dans l'activité de la hPRL 16K et suggéré que deux nouvelles fonctions biologiques puissent être affectées par la hPRL 16K : l'adhésion et l'inflammation. La hPRL 16K induit des molécules intervenant dans l'adhésion cellulaire telles que ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) ou VCAM-1 (*vascular cell adhesion*

*molecule-1*) ou dans le processus inflammatoire telles que les chémokines CXCL-1, -2, -6, -8 ou CCL-, -5, -8, -20, -26 ((Tabruyn *et al.*, 2006) article soumis). Il a également été montré que la hPRL 16K inhibe la production du NO et d'iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) dans les cellules endothéliales via l'inhibition d'une cascade de signalisation impliquant la voie p38 MAPK/Stat1/IRF-1 (Lee *et al.*, 2005). En outre, elle peut aussi inhiber la production du NO en inhibant l'activation d'eNOS (*endothelial nitric oxide synthase*), prévenant ainsi la dilatation des vaisseaux (Gonzalez *et al.*, 2004). Les activités antiangiogènes de la PRL 16K sont relayées via un site de liaison spécifique, saturable et de haute affinité, différent du récepteur de la PRL (Clapp *et al.*, 1992).



**Fig. 11. Voies de signalisation connues pour être activées par la hPRL 16K dans les cellules endothéliales.** La hPRL 16K (16K) induit une signalisation via un récepteur dont l'identité et la localisation demeurent inconnues. Elle peut inhiber la migration via une augmentation de l'expression de PAI-1 ou stimuler l'apoptose des cellules endothéliales en activant Bcl-Xs et/ou NFκB. En outre, les signaux induits par la hPRL 16K peuvent bloquer la stimulation par le VEGF d'eNOS ou de la voie Ras-MAPK. Il en résulte respectivement une inhibition de la vasodilatation ou de la prolifération des cellules endothéliales.

Les flèches indiquent les stimulations et les lignes hachurées les inhibitions. IP3, *inositol triphosphate*; PLC, *phospholipase C* (d'après Clapp, 2006).

*In vivo*, nous avons montré que la hPRL 16K empêche la formation des capillaires de la CAM d'embryons de poulet (Clapp *et al.*, 1993; Struman *et al.*, 1999). La hPRL 16K induit également une diminution significative de la masse de tumeurs humaines formées sur des CAM d'embryons de poulet, en augmentant le nombre de cellules en apoptose (Vilour, 1999). En 2001, Bentzien et ses collaborateurs ont développé des clones stables de cellules tumorales de colon humain HCT116 surexprimant la hPRL 16K. Ils ont montré que la hPRL 16K, produite par des cellules implantées en sous-cutané dans des souris immunodéficientes, conduit à une diminution de la croissance tumorale via une diminution de la vascularisation au sein de la tumeur (Bentzien *et al.*, 2001). Plus récemment, Kim et ses collaborateurs ont développé un vecteur adénoviral qui permet l'expression de la hPRL 16K. Les auteurs ont montré que l'infection des cellules tumorales prostatiques par ce vecteur adénoviral diminue fortement leur capacité à induire une tumeur chez la souris. La hPRL 16K supprime également la croissance de tumeur prostatique préétablie chez la souris (Kim *et al.*, 2003). Les résultats obtenus sur la progression tumorale font de la hPRL 16K un agent antiangiogène de choix dans la recherche d'une thérapie antitumorale empêchant la formation de vaisseaux tumoraux nécessaires au développement de la tumeur.

En plus des propriétés antiangiogènes de la hPRL 16K, Struman et ses collaborateurs ont montré que les fragments N-terminaux de 16 kDa de l'hGH, du hGH-V et du hPL ont également des effets antiangiogènes. *In vitro*, ces fragments N-terminaux inhibent la prolifération des cellules endothéliales BBCE, la phosphorylation et l'activation des MAPK et stimulent l'expression de PAI-1. *In vivo*, ils préviennent la néovascularisation de la CAM de l'embryon de poulet (Struman *et al.*, 1999).

Le fragment N-terminal de 16 kDa de la hGH peut être obtenu *in vitro* par coupure de la protéine entière avec la thrombine ou la plasmine (Aston *et al.*, 1981). *In vivo*, deux formes clivées de la hGH ont été identifiées. La première forme correspond au clivage de la GH entre les acides aminés 43 et 44, et conduit à deux fragments de 17 kDa et 5 kDa. Ces deux fragments, produits dans l'hypophyse et circulant dans le sang, pourraient jouer un rôle dans le métabolisme du glucose (Lewis *et al.*, 1994). La deuxième forme est clivée dans la grande boucle disulfure au niveau de l'acide aminé 134. Cette forme, isolée d'extraits de glande hypophysaire, est composée des fragments 1-134 et 136-191 reliés par un pont disulfure (Singh *et al.*, 1973). Des études ont montré que le fragment N-terminal conserve certaines propriétés lactogéniques ou somatogéniques alors que le fragment C-terminal en est dépourvu

(Aston *et al.*, 1983). A notre connaissance, aucune donnée sur le clivage du hGH-V n'a été publiée mais le clivage du hGH-V devrait être semblable à celui de la hGH. *In vitro*, le hPL peut être clivée par la plasmine pour donner deux fragments de 1-134 et 141-191 reliés par un pont disulfure (Russel *et al.*, 1979). *In vivo*, un fragment de 16 kDa reconnu spécifiquement par des anticorps anti-hPL a été identifié dans le sérum humain (Neri *et al.*, 1982).

### **3. Les autres fragments de la famille PRL/GH**

Des fragments de 14 kDa de la PRL possédant des propriétés antiangiogènes ont été détectés en conditions non réductrices dans le sang et la neurohypophyse de rat (Clapp *et al.*, 1994; Torner *et al.*, 1995). Notons enfin, qu'une forme C-terminale de 16 kDa de la PRL peut être obtenue par coupure de la PRL avec la thrombine. Cette forme ne présente pas d'activité antiangiogène (Khurana *et al.*, 1999).



**But du travail**

---



## But du Travail

Jusqu'à présent, l'évaluation de la hPRL 16K dans des modèles de thérapie anticancéreuse a été fortement limitée par la difficulté de produire de grandes quantités de protéines recombinantes actives; c'est pourquoi, afin de surmonter ce problème nous avons décidé de développer une nouvelle stratégie qui nous permettrait de produire la hPRL 16K directement *in situ* en utilisant un vecteur adénoviral pour le transfert de gène. Une première analyse permettant d'étudier les effets de la hPRL 16K produite par l'approche adénovirale a été réalisée *in vivo*. Par cette étude nous avons pu déterminer si la hPRL 16K produite était capable d'inhiber la néovascularisation rétinienne dans un modèle murin de rétinopathie (cette étude a été réalisée en collaboration avec la Docteur Maria Grant, Département d'Ophtalmologie et de Thérapie, Université de Floride, Floride, Etats-Unis). Ces résultats sont décrits dans le premier article.

Dans le cas des cancers, seulement deux études ont montré que les effets antiangiogènes de la hPRL 16K sont corrélés à un effet antitumoral. Actuellement, et à notre connaissance, aucune étude n'a mis en évidence l'effet de la hPRL 16K sur la dissémination des métastases. Le développement des métastases étant un des aspects les plus importants du cancer, il était donc important de déterminer si la hPRL 16K peut inhiber la dissémination des métastases. Cette étude a été réalisée en collaboration avec le laboratoire des Professeurs Agnès Noël et Jean-Michel Foidart (Laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement) et les résultats sont repris dans un second article.

Parallèlement à ces travaux, nous nous sommes attachés à identifier une région responsable de l'activité de la hPRL 16K. Partant du fait que les fragments 16K des trois autres membres de la famille humaine PRL/GH sont aussi de puissants facteurs antiangiogènes, malgré que la similarité de leur séquence soit faible (environ 35% de similarité entre les séquences de la PRL et de la GH), nous avons recherché une caractéristique structurale commune partagée par ces différents fragments. En collaboration avec l'équipe du Professeur Brasseur (Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux), nous avons identifié un domaine

susceptible d'adopter une structure en peptide oblique dans les séquences protéiques des fragments de 16 kDa de la famille PRL/GH. L'effet antiangiogène des peptides obliques de la hPRL 16K et de la hGH 16K a été analysé dans des expériences menées *in vitro* et *in vivo*. Afin de déterminer si tous les peptides obliques présentent des effets antiangiogènes, nous avons étudié l'effet antiangiogène des peptides obliques provenant du peptide  $\beta$ -amyloïde et du peptide de fusion du virus SIV. Ces travaux ont fait l'objet d'un dépôt de brevet et sont présentés dans le troisième article.

Article n°1

---



## Article n°1

« *Molecular Targeting of Antiangiogenic Factor 16K hPRL Inhibits Oxygen-Induced Retinopathy in Mice* »

Pan H, **Nguyen NQN**, Yoshida H, Bentzien F, Shaw LC, Rentier-Delrue F, Martial JA, Weiner R, Struman I, Grant MB. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45 :2413-2419.2004.

### I. Introduction

#### **1. Le développement du système vasculaire de l'œil**

Le développement de l'œil, comme les autres organes, dépend de la formation d'un système vasculaire complexe qui procure les nutriments et l'O<sub>2</sub> nécessaires aux tissus oculaires au moment de leur différenciation active. Ce processus angiogène intense est suivi d'une éradication d'une partie des vaisseaux par un processus appelé « pruning », dans le but d'adapter le flux sanguin aux besoins et aux caractéristiques des tissus différenciés. Chez la plupart des mammifères, la rétine mature est vascularisée par deux systèmes circulatoires indépendants : la choroïde et les vaisseaux rétinien. Durant le développement initial de l'œil, l'oxygénation de la rétine est assurée par les vaisseaux choroïdiens et le système hyaloïde. Le système vasculaire hyaloïdien est un système circulatoire intraoculaire dense, mais transitoire, qui subit une régression progressive et presque complète pendant la dernière étape du développement oculaire comprenant la formation du cristallin, du vitré et de la rétine mature. La vascularisation de la rétine proprement dite se déroule seulement durant la seconde partie de la gestation et est restreinte à la partie interne de la rétine tandis que la partie externe est complètement avascularisée pour assurer la fonction visuelle (Saint-Geniez *et al.*, 2004).

La régulation de la vascularisation de la rétine mature implique une balance entre stimulateurs et inhibiteurs de l'angiogenèse. Les facteurs angiogènes impliqués dans

l'angiogenèse rétinienne comprennent le VEGF qui est considéré comme le médiateur majeur, le bFGF, l'IGF-1, les angiopoïétines, le TNF et des interleukines. Le PEDF (*pigment epithelium-derived factor*), le TGF- $\beta$ , l'angiostatine, l'endostatine, la TSP-1 et les TIMP font partie des inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse identifiés dans l'oeil (Das *et al.*, 2003). Le PEDF est l'inhibiteur naturel majeur dans l'humeur vitrée et la cornée de l'œil (Dawson *et al.*, 1999). Récemment, le récepteur VEGFR-3 a été décrit pour jouer un rôle important dans le maintien de l'absence de vaisseaux dans la cornée (Cursiefen *et al.*, 2006).

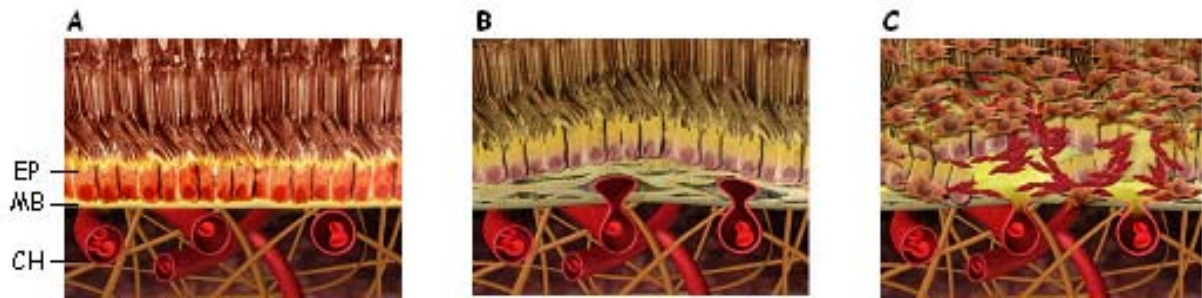
## **2. L'angiogenèse et les pathologies oculaires**

La rétinopathie diabétique proliférative (RDP), la rétinopathie du prématuré (RP) et la forme humide de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) sont des pathologies associées à une prolifération excessive de vaisseaux sanguins anormaux de la rétine pour la RDP et la RP, et pareil processus est observé au niveau de la choroïde pour la DMLA. La RDP et la DMLA sont les causes majeures de la cécité dans les pays occidentaux (Das *et al.*, 2003).

### ***2.1 La dégénérescence maculaire liée à l'âge***

La dégénérescence maculaire liée à l'âge représente la première cause de cécité chez les individus âgés de 65 ans et plus, dans les pays industrialisés. La DMLA est classée en deux formes majeures, la forme exsudative ou humide et la forme non exsudative ou sèche. La DMLA de forme humide est caractérisée par l'excroissance pathologique de nouveaux vaisseaux à partir de la choroïde. La néovascularisation choroïdienne s'étend à travers la membrane de Bruch dans l'espace sous-rétinien. L'accumulation de fluide ou de sang dans la partie postérieure de la rétine en association avec la néovascularisation choroïdienne entraîne le détachement de l'épithélium pigmentaire rétinien ou de la rétine, résultant en la perte de la vision centrale (Saint-Geniez *et al.*, 2004) (Fig. 12).





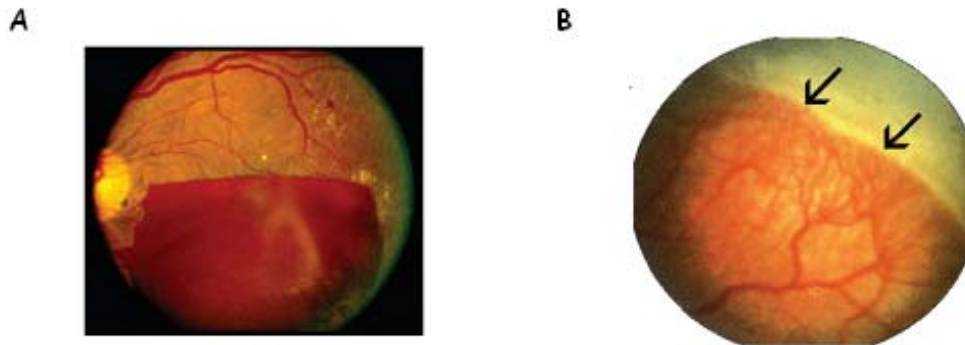
**Fig. 12. Etapes de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (forme humide).** **A.** Anatomie normale du complexe formé par la choroïde et l'épithélium pigmentaire de la rétine. **B.** Epaissement de la membrane de Bruch pouvant engendrer une hypoxie locale et induire la production de facteurs angiogènes. **C.** La production de facteurs angiogènes conduit à une néovascularisation sous-rétinienne avec de nombreux saignements, pouvant engendrer un décollement rétinien suivi de la dégénérescence de la macula. EP, épithélium pigmentaire; MB, membrane de Bruch; CH, choroïde (d'après la thèse de doctorat de Lambert. ULg. 2005).

Actuellement, il existe plusieurs traitements pour les patients atteints de la forme humide de la DMLA, la photocoagulation au laser, la thérapie photodynamique et le traitement médicamenteux. La photocoagulation ne permet pas de recouvrer la vision en partie du moins. En cas de succès, on note une cicatrice rétinienne avec la persistance d'un scotome (zone noire du champ visuel). La thérapie photodynamique ne s'adresse qu'à certaines formes des DMLA exsudatives (néovaisseaux non occultés). Elle ne possède qu'une efficacité partielle mais permet néanmoins de diminuer le risque d'évolution vers la cécité sévère. Récemment un nouveau traitement antiangiogène a été approuvé par la FDA : l'injection par voie intravitréenne du Macugène. Cette molécule, un ARN aptamère, est dirigé contre le VEGF-165, qui est l'isoforme essentiellement responsable de la néovascularisation oculaire pathologique et de la perméabilité vasculaire. Ce médicament cible la néovascularisation choroïdienne et réduit la perte de la vision d'environ 50% lors de la 1<sup>ère</sup> année et stabilise la vision lors de la 2<sup>ème</sup> année (Ng *et al.*, 2006).

## 2.2 Les rétinopathies prolifératives

Les rétinopathies prolifératives dont font partie la rétinopathie du prématuré (RP) et la rétinopathie diabétique proliférative (RDP) sont des pathologies de la rétine associées à une prolifération rapide des vaisseaux. Le stimulus initial de la néovascularisation rétinienne serait l'ischémie ou l'hypoxie qui mène à une surexpression de facteurs de croissance, d'intégrines

et de protéases, résultant en la formation de nouveaux vaisseaux qui percent la membrane interne du vitré (Das *et al.*, 2003) (Fig. 13).



**Fig. 13. Rétinopathies prolifératives. A.** Rétinopathie diabétique proliférative. Hémorragie pré-rétinienne obscurcissant une portion de la rétine postérieure. **B.** Rétinopathie du prématuré. Angiogenèse survenant juste postérieure à la région avasculaire (flèches) (d'après Gariano, 2005).

### 2.2.1 La rétinopathie du prématuré

La rétinopathie du prématuré est une maladie touchant les enfants nés prématurément et exposés à des concentrations élevées en oxygène en couveuse. Les taux élevés d'oxygène entraînent une obstruction des vaisseaux rétiniens, particulièrement en périphérie. La rétine périphérique étant mal vascularisée, des néovaisseaux prolifèrent afin d'améliorer l'apport sanguin en périphérie. Lors du passage à la normoxie, la rétine devient hypoxique, ce qui entraîne une surrégulation du VEGF et une formation de nouveaux vaisseaux sanguins perméables, pouvant mener à la cécité suite au décollement de la rétine (Saint-Geniez *et al.*, 2004).

### 2.2.2 La rétinopathie diabétique proliférative

La rétinopathie diabétique est l'affection oculaire la plus grave associée au diabète ; si elle n'est pas maîtrisée, elle peut conduire à la cécité. Cette pathologie débute par une phase non proliférative caractérisée par une hyperperméabilité capillaire qui progresse vers l'occlusion des capillaires rétiniens, provoquant une ischémie rétinienne. La RD proliférative est caractérisée par la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins sur la rétine et sur la surface

postérieure du vitré. Ces vaisseaux peuvent exsuder des liquides ou commencer à saigner (Fong *et al.*, 2004).

Dans leurs premiers stades, les rétinopathies du prématuré ou chez le diabétique peuvent être traitées par photocoagulation au laser. Ce traitement permet d'éviter la cécité mais le patient gardera un rétrécissement du champ visuel et sa vision nocturne sera réduite. Parfois, la maladie peut progresser en dépit du traitement. Dans d'autres cas, une intervention chirurgicale à l'intérieur de l'œil peut être nécessaire (Das *et al.*, 2003; Gariano *et al.*, 2005).

### **3. L'approche adénovirale**

Les traitements actuels (photocoagulation au laser, thérapie photodynamique) pour soigner les rétinopathies prolifératives ainsi que la DMLA ne sont pas optimaux et ont leurs limitations. Ces pathologies étant associées à une angiogenèse excessive, l'utilisation de facteurs antiangiogènes semblait intéressante. Nous avons donc testé la hPRL 16K dans un modèle murin de rétinopathie. Jusqu'à présent, l'évaluation de la hPRL 16K dans des expériences menées *in vivo* a été limitée par la difficulté de produire de grandes quantités de protéines recombinantes biologiquement actives. De plus, les protéines recombinantes peuvent être contaminées par des endotoxines, les lipopolysaccharides (LPS) de la paroi des bactéries à Gram négatif, lors de leur production en *E. coli*. Or, *in vitro*, les LPS présentent aussi certaines propriétés antiangiogènes (induction de l'apoptose, stimulation de la production de PAI-1). Afin de surmonter ces problèmes, une approche adénovirale nous permettant de produire la hPRL 16K directement *in situ* a été développée.

Les adénovirus sont des virus non enveloppés à ADN double brin de 26 à 45 kb qui peuvent infecter des cellules quiescentes ou en division. Pour leur utilisation en thérapie génique, leur génome est délété des régions nécessaires à la réplication (E1, E2, E3 et plus récemment E4). Il existe 50 sérotypes d'adénovirus mais la plupart des vecteurs actuels dérivent des sérotypes 2 et 5 qui affectent l'homme (Ad2 et Ad5). La plupart des sérotypes lient les cellules cibles via l'interaction entre une protéine fibre virale et le récepteur CAR (*coxsackie adenovirus receptor*) largement distribué au niveau épithélial dans l'organisme. Il s'ensuit une endocytose de l'adénovirus lié au récepteur CAR. L'expression du transgène est transitoire puisque l'ADN viral ne s'intègre pas dans le génome de la cellule infectée.

Plusieurs générations de vecteurs adénoviraux ont été développées afin de limiter les réponses immunitaires et d'augmenter la capacité du transgène. Ainsi, la génération d'adénovirus « gutless » peut accepter un transgène de 37 kb (Young *et al.*, 2006).

Le vecteur adénoviral utilisé dans cette étude correspond à l'adénovirus de type 5 commercialisé sous le nom de Adeno-X (BD Biosciences).

## II. Présentation des résultats

### **1. Construction du vecteur adénoviral 16K-Ad**

Le système d'expression AdenoX a été choisi pour produire les vecteurs adénoviraux 16K-Ad qui permettent l'expression de la hPRL 16K. Nous avons cloné l'insert codant la hPRL 16K au sein de la cassette d'expression du vecteur pShuttle. L'insert était constitué de l'intron de la  $\beta$ -globine de lapin et de l'ADNc de la hPRL 16K précédé de son peptide signal (voir Fig. 1A de l'article). La cassette d'expression a ensuite été clonée dans le vecteur pAdenoX, qui contient le génome de l'adénovirus délété en deux régions E1A et E1B nécessaires à sa répllication. L'amplification du vecteur adénoviral s'est effectuée dans les cellules embryonnaires humaines de rein HEK 293 qui produisent les deux protéines E1A et E1B.

### **2. Les cellules ABAE infectées par 16K-Ad sécrètent de la hPRL 16K biologiquement active**

Après avoir purifié et titré les vecteurs adénoviraux, nous avons déterminé l'activité biologique de la hPRL 16K produite via le vecteur adénoviral 16K-Ad. Nous avons tout d'abord infecté des cellules endothéliales ABAE (*adult bovine aortic endothelial*) avec le vecteur 16K-Ad et montré par Western-blotting que la hPRL 16K est produite par ces cellules (Fig. 1B). Un retard de migration en SDS-PAGE est observé entre la hPRL 16K produite en *E. coli* et celle produite en cellules eucaryotes et serait probablement dû à la glycosylation de la protéine par les cellules eucaryotes. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons traité du milieu conditionné, des cellules ABAE infectées par le vecteur 16K-Ad, avec la N-Glycosidase. Le produit de déglycosylation a été analysé par Western-blotting et démontre que la protéine hPRL 16K est majoritairement produite sous forme glycosylée (Fig. 1C).

Nous avons ensuite montré une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales ABAE infectées par le vecteur 16K-Ad alors que le vecteur contrôle Null-Ad n'a pas d'effet

(voir Fig. 2). Cette inhibition ayant déjà été observé sur les cellules ABAE traitées par la hPRL 16K recombinante.

### **3. La hPRL 16K réduit la néovascularisation dans un modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène**

En collaboration avec le docteur Maria Grant (Département d'Ophtalmologie et de Thérapie, Université de Floride, Floride, Etats-Unis), nous avons ensuite montré que la hPRL 16K réduit la néovascularisation de la rétine dans un modèle murin de rétinopathie induite par l'oxygène. En effet, l'injection intravitréenne du vecteur 16K-Ad dans les yeux de ces souris entraîne une réduction de la néovascularisation pré-rétinienne de 66% en comparaison aux yeux non traités (Fig. 3-4). L'injection du vecteur contrôle Null-Ad ne révèle pas de différence entre les yeux traités ou non. Cette étude a par ailleurs permis de montrer que le traitement avec la hPRL 16K réduit le nombre de vaisseaux perméables (Fig. 5). Chez les souris ne développant pas de rétinopathie, aucune différence n'est observée entre les yeux traités ou non avec les vecteurs adénoviraux.

### **4. La hPRL 16K induit l'apoptose des cellules endothéliales humaines de la rétine (HREC)**

Enfin, la stimulation des cellules HREC par la hPRL 16K produite en *E. coli* induit l'apoptose de ces cellules. L'effet de la hPRL16K sur les cellules endothéliales rétinienne est 100 fois supérieur à celui du facteur antiangiogène endostatine (Fig. 6).

### III. Discussion

Notre étude examine l'effet du facteur antiangiogène hPRL 16K sur la néovascularisation pathologique de la rétine. Dans les rétinopathies prolifératives, la rétine non perfusée produit des facteurs de croissance tels que le VEGF et le bFGF, qui en compensation, stimulent la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins. De précédentes études ont montré que la hPRL 16K inhibe la prolifération induite par le VEGF ou le bFGF d'une variété de cellules endothéliales (Ferrara *et al.*, 1991; Clapp *et al.*, 1993), incluant les cellules endothéliales de la rétine (Ochoa *et al.*, 2001) et de la cornée de rat (Duenas *et al.*, 1999). Les voies de signalisation concernant l'action antiproliférative de la hPRL 16K incluent l'inhibition de l'activation de Ras induite par le VEGF et le bFGF (D'Angelo *et al.*, 1999). Ces données suggèrent que la hPRL 16K pourrait être particulièrement efficace dans l'inhibition de la rétinopathie induite par le VEGF et le bFGF.

Les résultats présentés ici montrent que la hPRL 16K utilisée avec des concentrations de l'ordre du nanomolaire est capable d'activer l'apoptose des cellules HREC. Dans cet essai, la hPRL 16K est 100 fois plus efficace que l'endostatine testée. Ces résultats sont en concordance avec de précédentes études montrant que la hPRL 16K induit la fragmentation de l'ADN dans les cellules endothéliales BBE et HUVE (Martini *et al.*, 2000) et BACE (Tabruyn *et al.*, 2003). L'activation de l'apoptose induite par la hPRL 16K est dépendante de l'activation de NF- $\kappa$ B, des caspases initiatrices 8 et 9 et de la caspase effectrice 3 et, peut être bloquée par l'addition d'inhibiteurs de caspases (Tabruyn *et al.*, 2003).

Une première estimation du pouvoir d'infection du vecteur adénoviral a tout d'abord été effectuée *in vitro* sur des cellules endothéliales ABAE. Les cellules infectées sécrètent des quantités de hPRL 16K biologiquement active puisque l'infection des cellules ABAE avec des quantités croissantes de vecteur adénoviral 16K-Ad inhibe leur prolifération cellulaire. Récemment, Tabruyn et ses collaborateurs ont montré que la hPRL 16K provoque l'arrêt du cycle cellulaire des cellules ABAE en activant les kinases inhibitrices p21 et p27 et en régulant négativement les cyclines D1 et B1 (Tabruyn *et al.*, 2005).

L'utilisation du vecteur adénoviral 16K-Ad a permis d'étendre les recherches sur la hPRL 16K *in vivo*. L'injection du vecteur adénoviral 16K-Ad dans les yeux de souris, dont la

rétinopathie est induite par l'oxygène, montre une réduction dramatique de la néovascularisation pré-rétinienne comparé aux yeux non injectés. Cet effet n'est pas observé sur les animaux en condition de normoxie. Cette étude suggère que la hPRL 16K peut être un agent thérapeutique de choix pour le traitement de la néovascularisation aberrante de la rétine.

L'implication potentielle de la PRL 16K dans l'angiogenèse oculaire est suggérée par des études montrant que la PRL 16K inhibe l'angiogenèse induite par le bFGF dans la cornée de rat et que des implants contenant des anticorps anti-PRL induisent l'angiogenèse dans la cornée (Duenas *et al.*, 1999). De plus, les ARNm de la PRL, de même que la PRL et la PRL 16K ont été détectés dans la cornée, l'iris et la rétine de rat (Duenas *et al.*, 2004). Les cultures de capillaires de rétine de rat sécrètent également de la PRL (Ochoa *et al.*, 2001). Par ailleurs, la PRL 16K est détectée par Western-blotting dans l'œil de prématurés atteints d'une rétinopathie avancée. Cette PRL 16K serait générée à partir de la PRL par des protéases du fluide sous-rétinien. D'autre part, l'injection intravitréenne d'anticorps anti-PRL inhibe l'apoptose des vaisseaux hyaloïdiens chez des rats nouveaux-nés. Selon les auteurs, ces données suggèrent que chez les patients atteints de rétinopathie du prématuré, la PRL 16K stimulerait la régression vasculaire médiée par l'apoptose des vaisseaux sanguins nouvellement formés et des vaisseaux hyaloïdiens oculaires après la naissance (Duenas *et al.*, 2004).

L'utilisation de la thérapie antiangiogène dans le traitement des pathologies oculaires liées à une angiogenèse excessive semble être une approche prometteuse. D'autres facteurs antiangiogènes tels que l'angiostatine ou l'endostatine se sont également révélés de bons agents thérapeutiques dans des modèles murins de rétinopathies induites par l'oxygène (Drixler *et al.*, 2001). Comme signalé précédemment, en décembre 2004, la FDA a d'ailleurs approuvé l'utilisation du Macugène, un anti-VEGF, dans le traitement de la forme humide de la DMLA (Ng *et al.*, 2006).

Jusqu'à présent, la majorité des mesures d'activité antiangiogène a été réalisée avec la hPRL 16K produite dans *E. coli*. Cette approche requiert le passage par une étape de dénaturation-renaturation des agrégats insolubles et la mise au point du processus de repliement correct de la molécule lors de la purification. L'élimination des endotoxines n'étant jamais complète, l'utilisation de ces productions protéiques de hPRL 16K bactériennes reste un problème préoccupant dans le cas d'une administration locale ou systémique chez l'animal.



La stratégie de transfert de gène via un vecteur adénoviral a donc permis de produire de la hPRL 16K biologiquement active et en quantités suffisantes que pour être efficace dans des expériences menées *in vivo*. Par ailleurs, l'utilisation de ce vecteur adénoviral a permis de lever les ambiguïtés liées à une éventuelle présence de LPS lors des productions de la hPRL 16K en bactéries.

En conclusion, ce travail a permis de démontrer l'efficacité de la hPRL 16K sur le traitement de la rétinopathie en modèle murin tout en validant la construction adénovirale 16K-Ad. Ce vecteur 16K-Ad ouvre la porte à de nouvelles utilisations *in vivo*. Il sera notamment utilisé pour tester l'effet de la hPRL 16K dans deux nouveaux modèles murins, l'un développant des tumeurs dans le tissu sous-cutané et l'autre des métastases pulmonaires (voir article n°2).

#### **IV. Contributions à ce travail**

L'équipe du Dr. Maria Grant a mené les expériences animales. Le Dr. Frauke Bentzien (Centre d'Endocrinologie de la Reproduction de l'Université de San Francisco, USA) a réalisé le test d'apoptose sur les cellules endothéliales rétinienne. Nous avons construit le vecteur adénoviral 16K-Ad qui permet l'expression de la hPRL 16K au sein de notre laboratoire. Nous avons ensuite produit, purifié par gradient de chlorure de césium et titré les adénovirus recombinants lors de notre séjour au sein du laboratoire du professeur Weiner (Centre d'Endocrinologie de la Reproduction de l'Université de San Francisco, USA) avec l'aide du Dr. Hiroshi Yoshida. Les tests de déglycosylation, les analyses par Western blotting ainsi que l'expérience d'inhibition de prolifération des cellules endothéliales ABAE ont été réalisées au sein de notre laboratoire.



# Molecular Targeting of Antiangiogenic Factor 16K hPRL Inhibits Oxygen-Induced Retinopathy in Mice

Hao Pan,<sup>1</sup> Ngoc-Quynh-Nhu Nguyen,<sup>2</sup> Hiroshi Yoshida,<sup>3</sup> Frauke Bentzien,<sup>3</sup> Lynn C. Shaw,<sup>1</sup> Françoise Rentier-Delrue,<sup>2</sup> Joseph A. Martial,<sup>2</sup> Richard Weiner,<sup>3</sup> Ingrid Struman,<sup>2</sup> and Maria B. Grant<sup>1</sup>

**PURPOSE.** To examine the ability and mechanism of the 16 kDa N-terminal fragment of human prolactin (16K hPRL) in the inhibition of abnormal retinal neovascularization.

**METHODS.** The 16K hPRL-encoding sequence was inserted into an adenoviral vector (16K-Ad). Western blot analysis verified the expression of 16K hPRL and inhibition of proliferation, confirming functional activity of the 16K hPRL in virus-infected adult bovine aortic endothelial (ABAE) cells. 16K hPRL inhibited retinal neovascularization in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. The ability of recombinant 16K hPRL expressed in *E. coli* (r16K hPRL) was compared to that of endostatin in inducing apoptosis of cultured human retinal endothelial cells (HREC).

**RESULTS.** 16K was expressed in virus-infected ABAE cells and resulted in a dose-dependent inhibition of cell proliferation. Eyes injected with 16K-Ad showed a reduction in preretinal neovascularization of  $82.3 \pm 9.3\%$  ( $P < 0.00001$ ) when compared to uninjected controls. r16K hPRL was 100 times more potent than endostatin in inducing apoptosis in HRECs.

**CONCLUSIONS.** Intravitreal administration of 16K hPRL inhibited neovascularization in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. 16K hPRL stimulated apoptosis in HRECs and inhibited cell proliferation in ABAE cells. These results suggested a potential therapeutic role for 16K hPRL in the treatment of proliferative retinopathies. (*Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004; 45:2413-2419) DOI:10.1167/iovs.03-1001

**P**roliferative retinopathies, which include retinopathy of prematurity (ROP), proliferative diabetic retinopathy (PDR), and "wet" age-related macular degeneration (ARMD),

are the leading causes of blindness in the western world. The underlying etiology common to these diseases is the proliferation of aberrant blood vessels.<sup>1</sup> To date, photocoagulation is the mainstay of management of patients with PDR. While effective at reducing severe vision loss, there can be serious side effects, including diminished night vision, reduced peripheral vision, and decreased visual acuity. Moreover, in some patients the disease progresses despite costly maximal laser therapy. ROP therapies are limited to laser and cryosurgery of the avascular zone. Clearly, the development of an affordable and efficacious drug therapy for the proliferative retinopathies would be a major breakthrough in medicine.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is currently viewed as the major effector for retinal neovascularization in all proliferative retinopathies. One approach in inhibiting neovascularization associated with eye disease is the use of antiangiogenic peptides. This concept has been extensively tested in animal models. The antiangiogenic peptides shown to inhibit retinal neovascularization in rat and mouse models include: angiostatin,<sup>2,3</sup> plasminogen kringle 5 fragment,<sup>4</sup> thrombospondin type 1 repeat fragments,<sup>5</sup> carboxyl-terminal fragment of tryptophanyl-tRNA synthases,<sup>6</sup> and pigment epithelium-derived factor.<sup>5</sup>

The study of inhibition of retinal vascularization by antiangiogenic peptides was extended to the antiangiogenic factor 16K hPRL for several reasons. 16K hPRL is a naturally occurring, specific antiangiogenic factor that has been evaluated in multiple in vitro and in vivo systems.<sup>7</sup> 16K hPRL is endothelial cell specific and extremely potent. 16K hPRL inhibits VEGF- and fibroblast growth factor-2 (FGF-2)-induced capillary endothelial cell growth by blocking activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling cascade and induces apoptosis by inhibiting NF- $\kappa$ B activation.<sup>8</sup>

An adenovirus vector expressing 16K hPRL was developed to test the possibility that this well-characterized angiogenic factor could be used to prevent retinal neovascularization.<sup>9</sup> Primary cultures of human retinal endothelial cells (HREC) were used to test the efficacy of r16K hPRL to induce apoptosis, a well-characterized action of antiangiogenic factors.<sup>10</sup> Primary cultures of ABAE cells were infected with the 16K-Ad to show that sufficient 16K hPRL was expressed after infection to inhibit endothelial cell proliferation. In vivo studies were carried out in the mouse model of oxygen-induced retinopathy.<sup>11</sup> This model is well established and resembles the human disease with extra retinal neovascularization. Increases in VEGF and VEGF receptors are closely correlated with neovascularization in this model.<sup>12</sup> 16K-adenoviral infection of the eye dramatically inhibited neovascularization in the mouse model of oxygen-induced retinopathy.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Culture

Human embryonic kidney (HEK) 293 cells, adenoviral E1-transformed HEK cells (BD Biosciences, San Diego, CA) were grown in Minimal

From the <sup>1</sup>Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Florida, Gainesville, Florida; <sup>2</sup>Laboratoire de Biologie Moléculaire et de Génie Génétique, Université de Liège, Liège, Belgium; and <sup>3</sup>Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, University of California at San Francisco, San Francisco, California.

Supported by grants from The Juvenile Diabetes Research Foundation International; NIH Grants EY012601 and EY007739 (MBG); University California CRCC Grant (RW); the Fond pour la Recherche Industrielle et Agricole (N-Q-NN); the Fond National pour la Recherche Scientifique (IS); Télévie, les Services Fédéraux des Affaires Scientifiques, Techniques et Culturelles de Belgique (PAI5/35); Fortis Bank Assurances, l'Université de Liège (fonds spéciaux); and 4C Biotech, Senefle, Belgium.

Submitted for publication September 10, 2003; revised January 23, 2004; accepted February 2, 2004.

Disclosure: **H. Pan**, None; **N.-Q.-N. Nguyen**, None; **H. Yoshida**, None; **F. Bentzien**, None; **L.C. Shaw**, None; **F. Rentier-Delrue**, None; **J.A. Martial**, None; **R. Weiner**, None; **I. Struman**, None; **M.B. Grant**, None

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

Corresponding author: Maria B. Grant, Department of Pharmacology and Therapeutics, University of Florida, Gainesville, FL; grantma@pharmacology.ufl.edu.

Essential Medium (MEM) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1% nonessential amino acids and 100 U/mL penicillin/streptomycin and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fungisome.

ABAE cells were isolated as previously described.<sup>13</sup> The cells were grown and serially passaged in low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 10% FCS and 100 U/mL penicillin/streptomycin and 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  fungisome (10% FCS/DMEM medium). Recombinant human FGF-2 (Promega, Madison, WI) was added (1 ng/mL) to the culture every other day. Confluent cells corresponding to passages 7 to 12 were used in the experiments.

Primary cultures of HRECs were prepared and maintained in DMEM/Hams F12 with 10% plasma-derived serum (PDS), 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  transferrin, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  selenium, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 0.584 mg/mL glutamine, and 15 mg/mL endothelial growth supplement (Sigma, St. Louis, MO)<sup>10</sup> and cells in passages 3 to 6 were used in the studies. The identity of endothelial cells in cultures was validated by demonstrating endothelial cell incorporation of fluorescence-labeled acetylated LDL and by flow cytometry analysis, as previously described.<sup>14</sup> To maintain purity of HRECs, the cells were grown in PDS, which is free of platelet-derived growth factor and does not promote the growth of pericytes (the contaminating cell type in these preparations). r16K hPRL was produced as previously described.<sup>15</sup> Endotoxin levels in the preparations were 100 times lower than amounts needed to mimic the actions of 16K hPRL. Endostatin was obtained from Sigma.

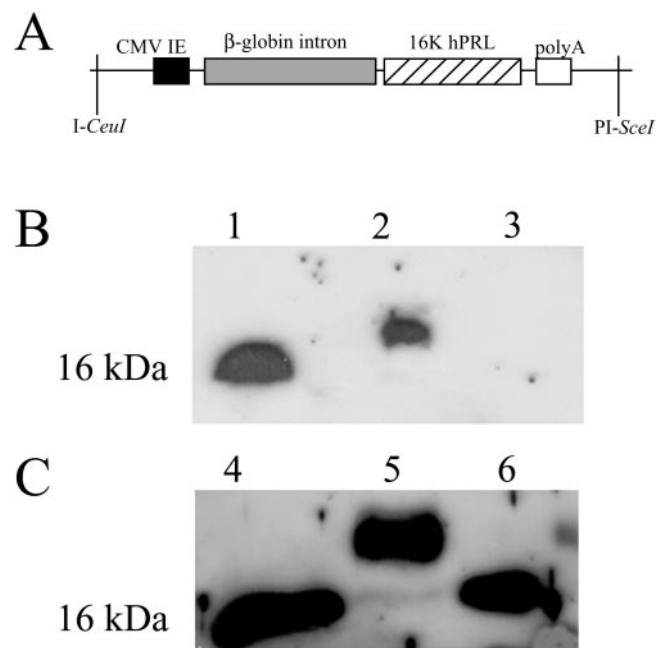
### Construction and Generation of Adenovirus Vectors

All recombinant adenovirus was prepared using Adeno-X expression system purchased from BD Biosciences. The cDNA encoding 16K hPRL was excised from the pRC/CMV-hPRL 16K vector (Fig. 1A).<sup>9</sup> This construct was engineered to produce a secreted peptide consisting of the first 139 amino acids of the PRL. Codon 140 was replaced by a stop codon using PCR-directed mutagenesis.<sup>16</sup> Cysteine 58 (TGG) was replaced by a serine (TCC) to avoid non-native disulfide bridges. The rabbit  $\beta$ -globin intron was inserted 5' of the 16K hPRL signal peptide. The restriction sites *NheI* and *KpnI* were added respectively to 5' and 3' ends by PCR. The sense primer was 5'-GGGCTAGCGATCCT-GAGAAGCTTCAGGGT-3' and the antisense primer, containing a stop codon (underlined), was 5'-CGGTACC/UNDERLN/TCA/UNDERLN/AGGATGAACCTGGCTGAC-3'.

A replication defective adenoviral vector based on human Ad 5 serotype was used for the study. The 16K hPRL coding sequence was inserted in the expression cassette into the adenoviral shuttle vector, pShuttle, at the *NheI* and *KpnI* restriction sites and was verified by sequencing. The cytomegalovirus (CMV) promoter drives the expression of the expression cassette. The expression cassette was then excised from pShuttle and inserted to Adeno-X Viral DNA via the *I-CeuI* and *PI-SceI* restriction sites. The recombinant Adeno-X vector (16K-Ad) was propagated in HEK 293 cells, purified by cesium chloride density gradient ultracentrifugation, and stored at  $-80^\circ\text{C}$ . Adenovirus vector titer was determined by tissue culture infectious dose 50 (TCID<sub>50</sub>). Adenovirus vector carrying an empty expression cassette was used as control (Null-Ad).

### Western Blot Analysis

ABAE cells ( $1.5 \times 10^4$ ) were plated in 24-well plates in 0.5 mL 10% FCS/DMEM medium. On the following day the cells were infected with 16K-Ad or Null-Ad at a multiplicity of infection (MOI) of 200 pfu/cell, and the conditioned media were collected 48 hours postinfection. Since the cDNA for 16K hPRL contains a signal peptide, 16K hPRL is secreted into the culture medium. Conditioned media (20  $\mu\text{L}$ ) was heated in sample buffer containing 1% 2-mercaptoethanol for 5 minutes at  $95^\circ\text{C}$  and separated by SDS/PAGE 15%/4% before being transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond ECL; Amersham, Piscataway, NJ). The membrane was saturated overnight in TBS-8% dry milk, followed by 1 hour of incubation with a 1/200 dilution of polyclonal antiserum directed against 16K hPRL (SB30) and 1 hour of incubation



**FIGURE 1.** Construction and characterization of 16K hPRL adenovirus vector: (A) Schematic representation of the 16K hPRL expression vector, the I-CeuI/PI-SceI restriction fragment cloned in adenovirus5 genome is shown. CMV IE, human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer;  $\beta$ -globin intron, rabbit  $\beta$ -globin intron; 16K hPRL, 16K hPRL coding sequence including the signal peptide; polyA, SV40 polyadenylation signal. (B) Analysis of protein expression by Western blot analysis from ABAE cells uninfected or infected at an MOI of 200 pfu/cell with 16K-Ad or Null-Ad. Lane 1: *E. coli* 16K hPRL; lane 2: protein from cells infected with 16K-Ad; lane 3: protein from cells infected with Null-Ad. Twenty  $\mu\text{L}$  of conditioned media were subjected to SDS-PAGE and probed with an anti-PRL antibody. The band corresponding to 16K hPRL (16 kDa) is labeled. Thirty nanograms of recombinant 16K hPRL produced in *E. coli* was loaded as a control. (C) Analysis of glycosylation. Lane 4: *E. coli* 16K hPRL; lane 5: protein from cells infected with 16K-Ad; lane 6: deglycosylated protein from cells infected with 16K-Ad. Twenty microliters of conditioned media from 16K-Ad-infected ABAE cells were incubated or not with N-glycosidase and subjected to Western blotting as in B. The band corresponding to 16K hPRL (16 kDa) is labeled.

with a 1/5000 dilution peroxidase-conjugated goat antirabbit serum (Gamma; BioWhittaker, Verviers, Belgium). 16K hPRL detection was then carried out by chemiluminescence using the ECL Plus kit (Amersham). For the deglycosylation experiments, the N-Glycosidase F deglycosylation Kit was used according to the manufacturer's instructions (Roche, Palo Alto, CA). Briefly, 20  $\mu\text{L}$  of conditioned medium from Ad-16K hPRL-infected ABAE cells were incubated with 10  $\mu\text{L}$  of denaturation buffer for 3 minutes at  $95^\circ\text{C}$ . Twenty microliter of reaction buffer and 15  $\mu\text{L}$  of N-glycosidase F (1.2 units/ $\mu\text{L}$ ) were added and incubated for 1 hour at  $37^\circ\text{C}$ . The deglycosylated product was precipitated with two volumes of cold methanol and analyzed by Western blotting as described above.

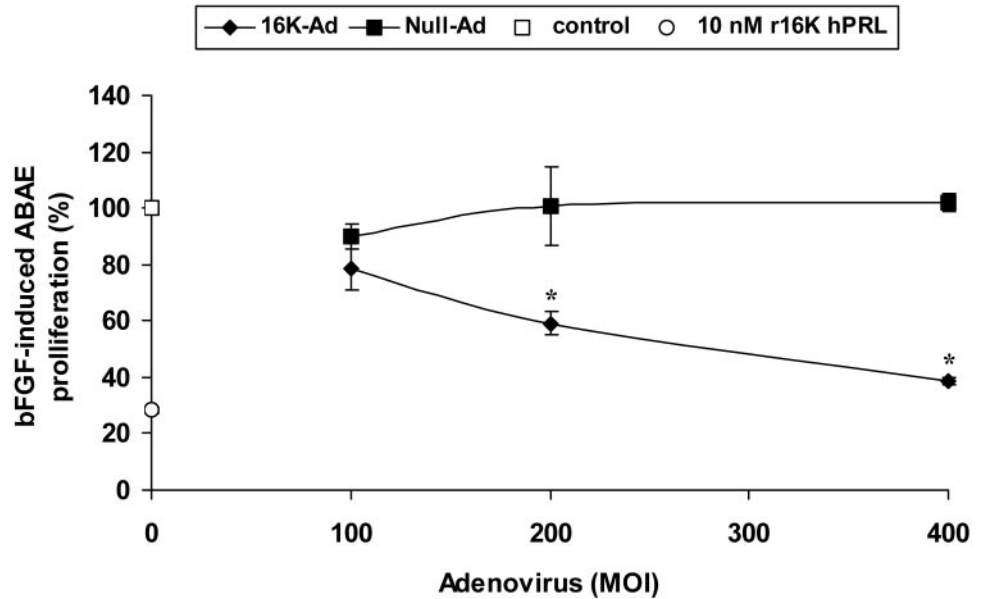
### Experimental Animals

All animal procedures used were in agreement with the *NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, with the ARVO Statement for the Use of Animals and with institutional guidelines, and approved by the University of Florida Institutional Animal Care and Use Committee. Timed pregnant C57BL/6J mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME).

### Intravitreal Injection into Mouse Model

In the mouse model of oxygen-induced retinopathy,<sup>11</sup> mice at postnatal day (P)7 are placed with their nursing dams in a 75% oxygen

**FIGURE 2.** Inhibition of endothelial cell proliferation by direct infection of 16K hPRL adenovirus vector. ABAE cells were infected with indicated MOI (pfu/cell) of 16K-Ad or Null-Ad and treated, 24 hours later, with FGF-2 (1 ng/mL). Proliferation was assessed by <sup>3</sup>H-thymidine incorporation 48 hours postinfection. The data are expressed as percentages of the stimulation obtained with FGF-2 alone, 0% being the basal growth level. Data are the mean of triplicate wells; bars ± SE. The experiments were repeated at least three times, with similar results.



atmosphere for 5 days. On return to normal air, these mice develop retinal neovascularization, with peak development occurring 5 days (P17) after their return to normoxia. Newborn mice (P1) were chilled on ice for 30 to 45 seconds to reduce their activity. Using a 32G needle attached to a 10 μL Hamilton syringe, 0.5 μL of a mixture containing the adeno-construct and 0.1% (v/v) fluorescein sodium (Angiofluor; Alliance Pharmaceuticals, Richmond, TX) was injected into the vitreous OD (Ad-16k = 9 × 10<sup>9</sup> pfu/mL) or OS (Ad-Null = 2.2 × 10<sup>10</sup> pfu/mL); 0.1% fluorescein sodium was used to visualize the injection. After the fifth day following return to normoxia, the animals were killed, the eyes removed, fixed in 4% paraformaldehyde, and embedded in paraffin. Three hundred serial sections (6 μm) were cut sagittally through the cornea parallel to the optic disc. Every thirtieth section was placed on a slide and stained with hematoxylin-eosin (H&E). This resulted in ten sections from each eye being scored in a masked fashion using light microscopy to count endothelial nuclei extending beyond the inner limiting membrane into the vitreous as previously described.<sup>11</sup> The efficacy of treatment with a particular plasmid was then calculated as the percent average nuclei per section in the injected eye versus the uninjected eye.

For qualitative analysis the retinas from some mice were dissected and flatmounted, as described by D'Amato et al.<sup>17</sup> These animals were perfused with 3 mL of fluorescein-isothiocyanate (FITC)-dextran (FD-2000S; Sigma) in 4% paraformaldehyde. The eyes were enucleated and the retinas removed and flatmounted for fluorescence microscopic analysis.

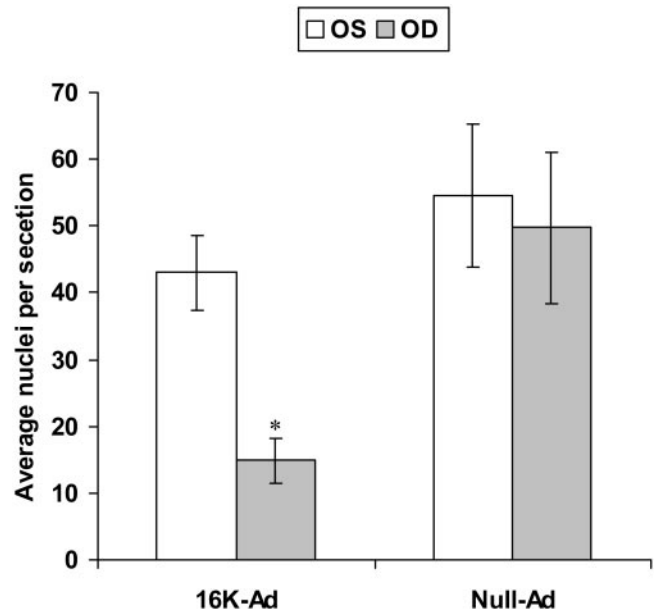
**In Vitro Endothelial Cell Proliferation Assay**

On day 1, ABAE cells were plated at a density of 1.5 × 10<sup>4</sup> cells per well in a 24-well plate, in 0.5 mL 10% FBS/DMEM medium. On day 2, cells were infected for 4 hours with increasing MOI of adenovirus vector. On day 3, the cells were stimulated with FGF-2 (1 ng/mL) for 16 hours. On day 4, the cells were incubated with 5 × 10<sup>6</sup> cpm of thymidine for 4 hours,<sup>18</sup> washed in 5% trichloroacetic acid, solubilized in NaOH, and counted as previously described.<sup>16</sup>

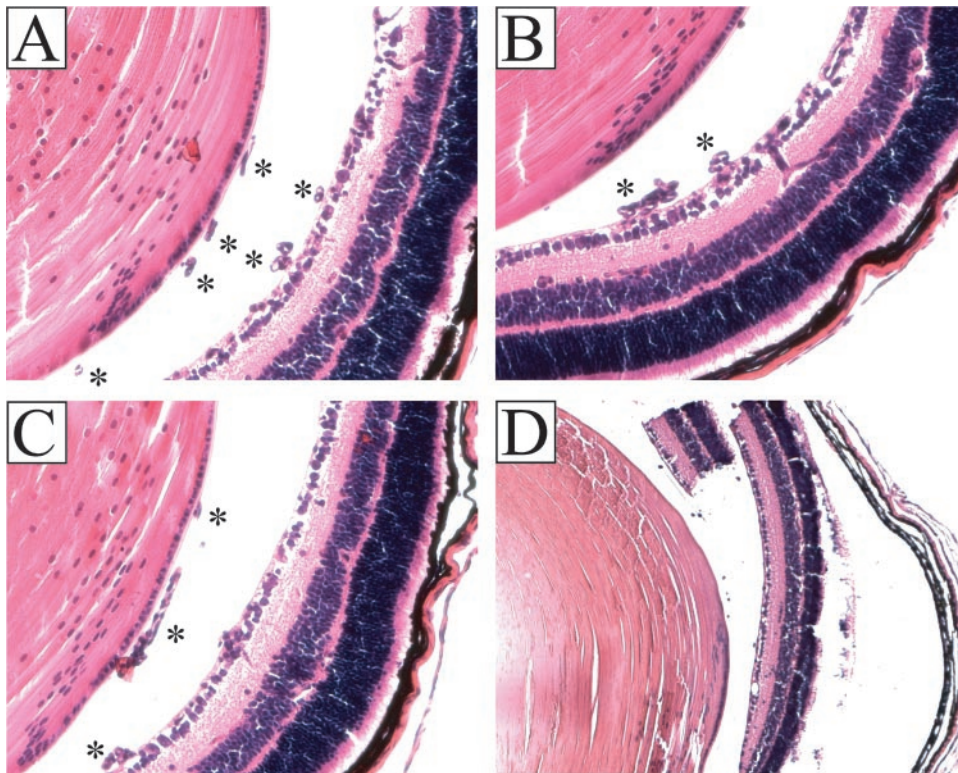
**DNA Fragmentation ELISA Assay**

The levels of mono- and oligonucleosomal DNA released in the cytosol of apoptotic cells were measured using the Cell Death Detection ELISA kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany). This is a quantitative sandwich-enzyme-immunoassay using antibodies against DNA and histones. By isolating nucleosomes in the cytosol with antibodies to histones, this assay specifically measures apoptosis and not necrosis.

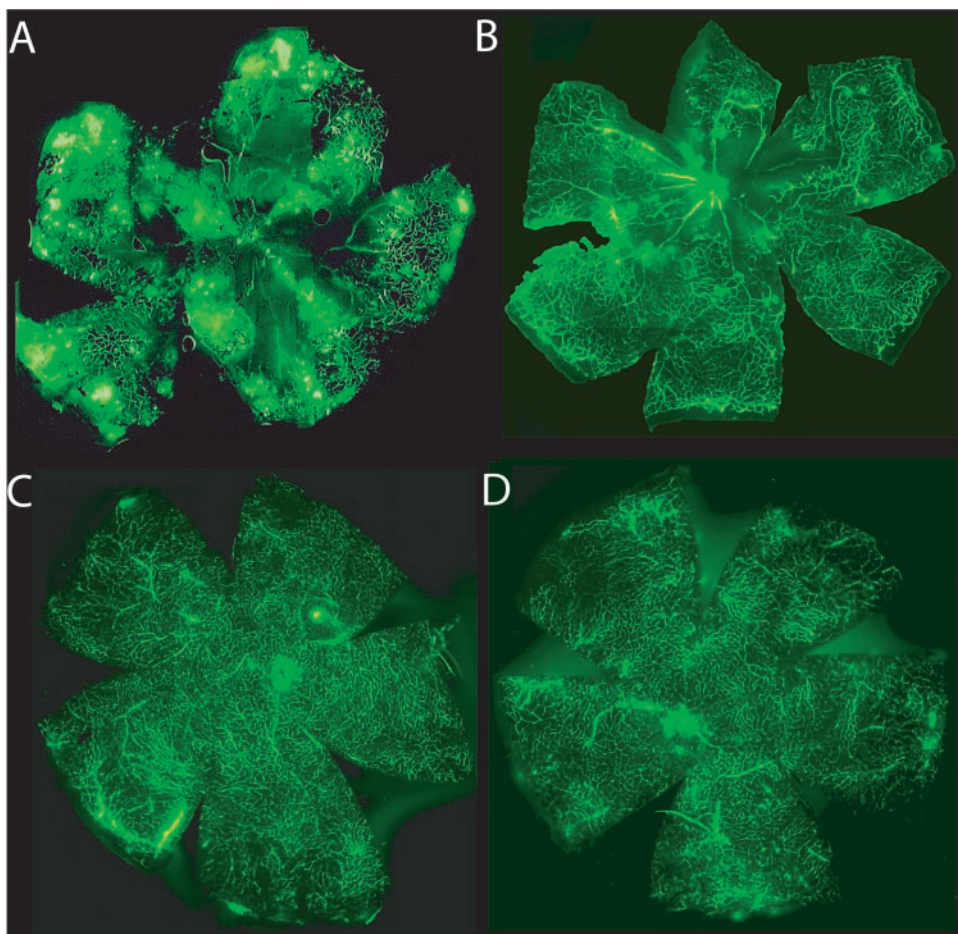
For these studies, 100,000 HREC were plated per well in 12-well plates. Twenty-four hours later, r16K hPRL, r23K hPRL, endostatin or endotoxin were added for 24 hours. The Cell Death Detection assay was performed on cytosolic fractions prepared using reagents supplied with the kit according to instructions. Levels of DNA fragmentation were expressed as an enrichment factor, calculated by dividing the absorbance of a given sample by the absorbance of the corresponding 10% FCS control.



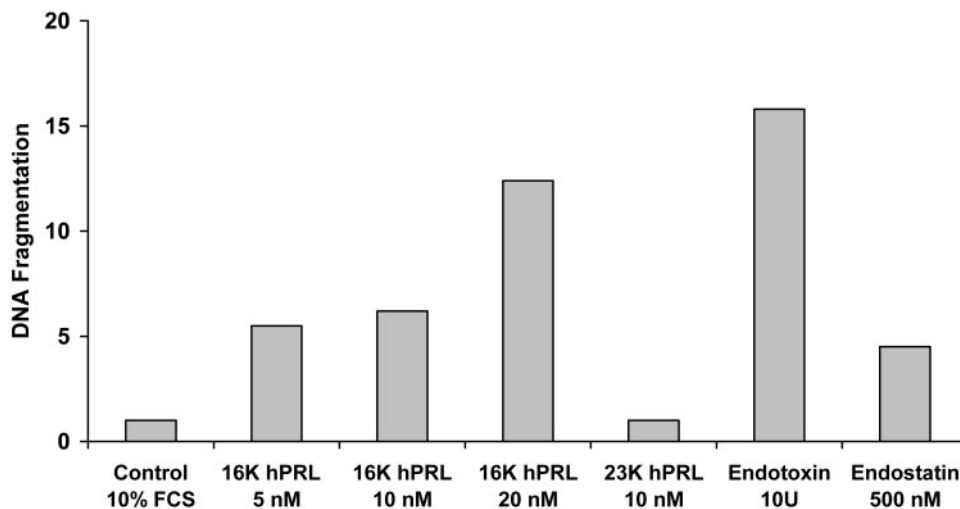
**FIGURE 3.** Results of the injection of the adeno-constructs in the oxygen-induced mouse model of retinopathy. The y-axis indicates the average number of nuclei of preretinal endothelial cells per section. For each mouse the right eye (OD) was injected with the adeno-construct and the left eye was uninjected. For the 16K-Ad eyes (n = 11) and for the Null-Ad eyes (n = 4). Neovascularization was reduced by 66 ± 8% (P = 3 × 10<sup>-8</sup>) in the 16K-Ad injected eyes, while there was no significant reduction in the Null-Ad injected eyes (P = 0.3).



**FIGURE 4.** Retinal cross-sections of eyes from mice that have undergone the oxygen-induced model of retinopathy. (A) [OS] and (B) [OD] paired eyes from a mouse that received no injection OS and was injected OD with the Ad-Null virus. (C) [OS] and (D) [OD] paired eyes from a mouse that received no injection OS and was injected OD with the Ad-16K virus. Only the eye injected with the Ad-16K virus shows significant reduction in preretinal nuclei (\*). Original magnification,  $\times 5$ .



**FIGURE 5.** Flatmounted retinas from mice perfused with FITC-dextran. (A) Retina from an uninjected mouse eye on postnatal day 17 after the OIR timecourse; (B) Retina from a mouse eye injected with the 16K-Ad construct on postnatal day 17 after the OIR timecourse; (C) Retina from an uninjected normoxic mouse eye on postnatal day 17; (D) Retina from a normoxic eye injected with the 16k-Ad construct on postnatal day 17.



**FIGURE 6.** Activation of apoptosis by recombinant 16K hPRL in HREC. The level of DNA fragmentation (cytosolic mono- and oligonucleosomes) was measured in HREC treated with increasing concentrations of recombinant 16K hPRL produced in *E. coli* (5, 10, and 20 nM), 10 U of endotoxin or 10  $\mu$ g/mL endostatin.

### Statistical Analysis

All statistical analysis was done using the student *t*-test in Microsoft Excel. *P*-values < 0.001 are indicated with an asterisk on the graphs.

## RESULTS

### 16K-Ad Infected ABAE Cells Express and Secrete Biologically Active 16K hPRL

To extend findings with 16K hPRL to an *in vivo* setting, a 16K-Ad vector was engineered. To validate the usefulness of the 16K-Ad vector, ABAE cells were infected to determine that the infected cells expressed and secreted substantial amounts of biologically active 16K hPRL. ABAE cells were infected with a MOI of 200 pfu/cell of 16K-Ad or Null-Ad as a control for viral infection. ABAE cells infected with the 16K-Ad vector expressed 16K hPRL (Fig. 1A). Western blot analysis revealed a band running higher than that seen for recombinant 16K hPRL produced in *Escherichia coli* (Fig. 1B), possibly the result of N-glycosylation of Asn31 within 16K hPRL. After deglycosylation of the conditioned media with N-Glycosidase F, the band co-migrated with the r16K hPRL made in *E. coli* (Fig. 1C).

The amount of 16K hPRL produced in 16K-Ad infected ABAE cells, as estimated by Western blot analysis, appeared sufficient to obtain a biologically active concentration to inhibit cell proliferation. Consistent with this, FGF-2-induced ABAE proliferation was inhibited in a dose-dependent manner with increasing MOI of 16K-Ad while Null-Ad had no effect (Fig. 2).

### Reduced Neovascularization by 16K hPRL in Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy

The oxygen-induced model of retinopathy<sup>11</sup> was used to test the effect of the 16K hPRL *in vivo*. Mice, at P1, were injected in the right eye with the adeno-constructs (Null-Ad or 16K-Ad). The extent of preretinal neovascularization was scored by counting the average number of preretinal nuclei per section of eye (Fig. 3). Injection of the Null-Ad construct exhibited no significant difference from control (*P* = 0.41), as expected. The 16K-Ad construct showed a reduction in the average number of preretinal nuclei per section when compared to control left eyes of  $66 \pm 8\%$  (*P* =  $3 \times 10^{-8}$ ). Cross-sections from representative eyes (Fig. 4) confirm the reduction in preretinal vessels in mice injected with the 16K-Ad construct.

Perfusion of uninjected eyes from mice that underwent the time course of the OIR model demonstrated the leaky nature of

the preretinal blood vessels that resulted from the hypoxic stimulus of this model (Fig. 5A). Injection of the 16K-Ad construct significantly reduced the number of leaky vessels in mice subjected to the OIR model (Fig. 5B). No difference in vasculature was found between uninjected eyes (Fig. 5C) and eyes injected with the 16k-Ad construct (Fig. 5D) from mice that had not been subjected to the OIR model.

### 16K hPRL-Induced Apoptosis in HRECs

Increasing concentrations of r16K hPRL progressively increased the level of DNA fragmentation (Fig. 6). Although the stimulation of DNA fragmentation was similar with 20 nM r16K hPRL and 10 U of endotoxin, there was <0.01 U of endotoxin in the 20 nM r16K hPRL preparation. Endostatin (10  $\mu$ g/mL, 500 nM) gave the same response as 5 nM r16K hPRL (80 ng/mL); that is, the potency of r16K hPRL was 100 times greater. Although intact 23 kDa prolactin (10 nM) contained similar amounts of endotoxin to the r16K hPRL preparation, it had no effect on DNA fragmentation, as previously reported in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) and bovine brain endothelial (BBE) cells.<sup>15</sup>

## DISCUSSION

Vascular retinopathies are significant vision-threatening diseases.<sup>19</sup> Occlusion of capillaries leads to retinal ischemia. Attempts to reperfuse areas of retinal ischemia with new, albeit aberrant, blood vessels lead to further vascular pathology. In all proliferative retinopathies the state of the nonperfused retina produces angiogenic growth factors such as VEGF and FGF-2, which stimulate this new, compensatory, blood vessel growth.

This study explored the effect of the antiangiogenic peptide 16K hPRL in both *in vitro* and *in vivo* systems relevant to the retina. Previously it was demonstrated that 16K hPRL, but not intact PRL, inhibits VEGF- and FGF-2-induced proliferation of a variety of capillary endothelial cells in nM concentrations<sup>16,20</sup> including endothelial cells isolated from the rat retina.<sup>21</sup> The signaling pathways for the antiproliferative action of 16K hPRL include the inhibition of VEGF- and FGF-2-induced Ras activation.<sup>22</sup> This is consistent with the idea that 16K hPRL might be particularly efficacious in inhibiting VEGF-driven retinopathy.

The inhibition of VEGF- and FGF-2-induced proliferation appears to be mediated through blocking of the MAPK signaling pathway. Activation and tyrosine phosphorylation of the Flk1 receptor by VEGF are not affected by the addition of 16K hPRL<sup>23</sup>; neither is the association of the receptor with Shc, and

Grb2 or the recruitment of Sos.<sup>22</sup> However, activation of Ras is inhibited. When activated by VEGF alone, Ras is converted from the GDP- to the GTP-bound state. This conversion is blocked when 16K hPRL is added to VEGF. The blockade of Ras activation is consistent with the downstream inhibition of the VEGF-induced translocation of Raf-1 to the plasma membrane and the blockade of the activation of MEK and MAPK 42 and 44.<sup>22</sup>

16K hPRL activates apoptosis in capillary endothelial cells,<sup>15</sup> inhibits capillary endothelial cell migration, their organization into capillaries,<sup>16</sup> and urokinase activity.<sup>24</sup> Importantly, 16K hPRL inhibits neovascularization in the chick chorioallantoic assay,<sup>16</sup> rat corneal assay,<sup>25</sup> and in solid tumors in mice.<sup>9</sup> The 16 K hPRL fragment is naturally formed in rodents and in humans by proteolytic processing,<sup>26-28</sup> and PRL, the precursor molecule, is expressed by retinal endothelial cells.<sup>21</sup> 16K hPRL had been used successfully in gene therapy to inhibit the growth of the HCT116 human colon cancer cell line in immuno-incompetent mice.<sup>9</sup> 16K hPRL has no direct effect on the growth of HCT116 cells, but acts directly on the tissue vasculature.

The studies described here support the efficacy of this peptide in inhibiting growth of the relevant cell type (i.e., HREC). Furthermore, the 16 K hPRL fragment is unique in having endothelial cell specificity. Thus, unlike many other anti-angiogenic agents considered for possible therapy, the 16 K hPRL would not be expected to affect other cell types adversely in the retina.

These data demonstrate that 16K hPRL is potent in the nM range to activate apoptosis in HREC. 16K hPRL has also been reported to inhibit cell proliferation of rat corneal and retinal endothelial cells.<sup>21,25</sup> Clearly, 16K hPRL was considerably more potent than the preparation of endostatin tested. This is in close agreement with earlier findings that r16K hPRL stimulates DNA fragmentation in BBE and HUVE cells<sup>15</sup> and that activation of 16K hPRL-induced apoptosis is dependent on activation of the caspase cascade and can be blocked by the addition of caspase inhibitors. The activity of the r16K hPRL does not involve contamination with endotoxin. Heat denaturation of 16K hPRL by boiling, digestion with trypsin, or co-incubation with the endotoxin blocker polymyxin-B has no effect on the action of 16K hPRL. Furthermore, immuno-neutralization of 16K hPRL with specific antibodies to 16K hPRL can block its ability to induce DNA fragmentation in BBE cells.

These findings with 16K hPRL were extended to an in vivo setting by using an engineered 16K-Ad vector. The usefulness of the 16K-Ad vector was validated by first infecting ABAE cells and demonstrating that the infected cells secreted substantial amounts of biologically active 16K hPRL. However, the 16K hPRL expressed in ABAE cells infected with the 16K-Ad vector was highly N-glycosylated. This is in agreement with observations made in HCT116 cells stably transfected with a 16K hPRL expression vector.<sup>9</sup> Glycosylated peptide produced in both cells was biologically active while the 16K hPRL expressed in *E. coli* as expected was not glycosylated.

In conclusion, the ability of 16 K hPRL to inhibit retinal neovascularization was studied because it is a potent and specific antiangiogenic factor.<sup>20</sup> 16K hPRL is a naturally occurring fragment found in rodents<sup>26</sup> and in humans,<sup>27,28</sup> and the parent protein prolactin is specifically expressed by retinal endothelial cells.<sup>21</sup> The signaling pathways regulating the inhibition of endothelial cell proliferation by 16K hPRL include the unique action of inhibiting Ras activation by both VEGF and FGF-2.<sup>29</sup> Previously, 16K hPRL was shown to activate apoptosis in BBCE.<sup>15</sup> But the present study demonstrated that r16K hPRL was 100 times more potent than endostatin in inducing apoptosis in the most relevant cell type, HRECs.

Infection of ABAE cells with increasing amounts of 16K-Ad inhibited cell proliferation and eyes injected with 16K-Ad showed a dramatic reduction in preretinal neovascularization when compared to uninjected controls, while having no effect on animals exposed to normoxia. This combination of studies supports 16K hPRL as an endothelial cell-specific candidate therapeutic agent for the treatment of aberrant neovascularization of the retina.

### Acknowledgments

The authors thank Sébastien Tabrun for his help in proliferation studies set-up.

### References

1. Frank RN. On the pathogenesis of diabetic retinopathy. A 1990 update. *Ophthalmology*. 1991;98:586-593.
2. Meneses PI, Hajjar KA, Berns KI, Duvoisin RM. Recombinant angiostatin prevents retinal neovascularization in a murine proliferative retinopathy model. *Gene Ther*. 2001;8:646-648.
3. Drixler TA, Rinkes IH, Ritchie ED, et al. Angiostatin inhibits pathological but not physiological retinal angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:3325-3330.
4. Zhang D, Kaufman PL, Gao G, Saunders RA, Ma JX. Intravitreal injection of plasminogen kringle 5, an endogenous angiogenic inhibitor, arrests retinal neovascularization in rats. *Diabetologia*. 2001;44:757-765.
5. Stellmach VV, Crawford SE, Zhou W, Bouck N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:2593-2597.
6. Otani A, Slike BM, Dorrell MI, et al. A fragment of human TrpRS as a potent antagonist of ocular angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:178-183.
7. Struman I, Bentzien F, Lee H, et al. 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 USA*. 1999;96:1246-1251.
8. Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, et al. The antiangiogenic factor 16K human prolactin induces caspase-dependent apoptosis by a mechanism that requires activation of nuclear factor-kappaB. *Mol Endocrinol*. 2003;17:1815-1823.
9. Bentzien F, Struman I, Martini JF, Martial J, Weiner R. Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Res*. 2001;61:7356-7362.
10. Grant MB, Guay C. Plasminogen activator production by human retinal endothelial cells of nondiabetic and diabetic origin. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1991;32:53-64.
11. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994;35:101-111.
12. Suzuma K, Takagi H, Otani A, Honda Y. Hypoxia and vascular endothelial growth factor stimulate angiogenic integrin expression in bovine retinal microvascular endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39:1028-1035.
13. Gospodarowicz D, Cheng J, Lorette M. Bovine brain and pituitary fibroblast growth factors: comparison of their abilities to support the proliferation of human and bovine vascular endothelial cells. *J Cell Biol*. 1983;97:1677-1685.
14. Grant MB, Tarnuzzer RW, Caballero S, et al. Adenosine receptor activation induces vascular endothelial growth factor in human retinal endothelial cells. *Circ Res*. 1999;85:699-706.
15. Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI. The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Mol Endocrinol*. 2000;14:1536-1549.
16. Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F, Weiner RI. The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology*. 1993;133:1292-1299.



17. D'Amato R, Wesolowski E, Smith LE. Microscopic visualization of the retina by angiography with high-molecular-weight fluorescein-labeled dextrans in the mouse. *Microvasc Res*. 1993;46:135-142.
18. Dong Z, Yoneda J, Kumar R, Fidler IJ. Angiostatin-mediated suppression of cancer metastases by primary neoplasms engineered to produce granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1998;188:755-763.
19. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy. IV. Diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 1984;91:1464-1474.
20. Ferrara N, Clapp C, Weiner R. The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology*. 1991;129:896-900.
21. Ochoa A, Montes de Oca P, Rivera JC, et al. Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42:1639-1645.
22. D'Angelo G, Martini JF, Iiri T, Fantl WJ, Martial J, Weiner RI. 16K human prolactin inhibits vascular endothelial growth factor-induced activation of Ras in capillary endothelial cells. *Mol Endocrinol*. 1999;13:692-704.
23. D'Angelo G, Struman I, Martial J, Weiner RI. 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 USA*. 1995;92:6374-6378.
24. Lee H, Struman I, Clapp C, Martial J, Weiner RI. Inhibition of urokinase activity by the antiangiogenic factor 16K prolactin: activation of plasminogen activator inhibitor 1 expression. *Endocrinology*. 1998;139:3696-3703.
25. Duenas Z, Torner L, Corbacho AM, et al. Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1999;40:2498-2505.
26. Clapp C, Torner L, Gutierrez-Ospina G, et al. The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:10384-10388.
27. Kineman RD, Bullesbach EE, Schwabe C, Boggs KP, Frawley LS. Purification from human pregnancy serum of a low molecular weight mitogen similar to placental lactogen and growth hormone. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1991;197:441-449.
28. Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW, Hollingsworth D, Markoff E. Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J Clin Endocrinol Metab*. 1985;60:239-243.
29. D'Angelica M, Tung C, Allen P, et al. Herpes simplex virus (HSV)-mediated ICAM-1 gene transfer abrogates tumorigenicity and induces anti-tumor immunity. *Mol Med*. 1999;5:606-616.



Article n°2

---



## Article n°2

« *Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by Adenovirus-Mediated Gene Transfer of 16K hPRL* »

Nguyen NQN, Cornet AM, Blacher S, Tabruyn SP, Foidart J-M, Noël A, Martial JA and Struman I. *Submitted publication.*

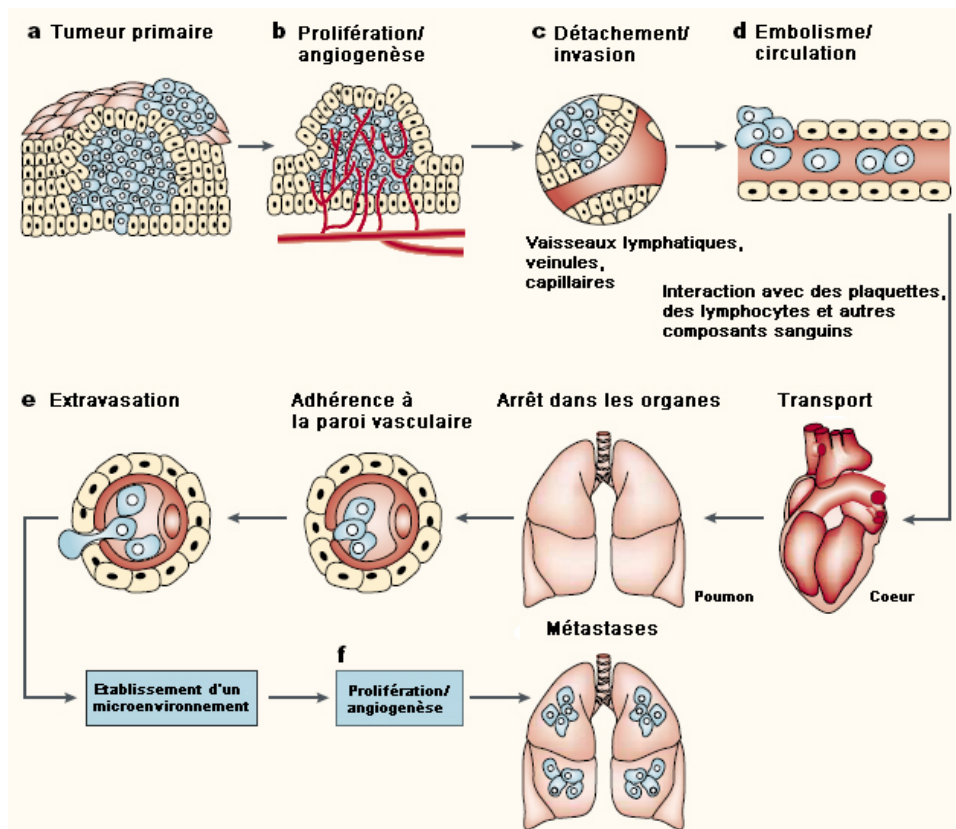
### I. Introduction

L'évolution naturelle de la progression d'une tumeur maligne est la formation des métastases, c'est à dire la formation de foyers tumoraux secondaires implantés dans des organes distants de la tumeur primaire. Les métastases représentent l'aspect le plus redoutable du cancer puisqu'elles sont responsables de la morbidité et de la mortalité chez la plupart des patients cancéreux. Les métastases sont résistantes aux thérapies conventionnelles à cause notamment de leur hétérogénéité biologique (Steeg, 2006). Les stratégies thérapeutiques luttant contre la formation des métastases ont le potentiel de réduire la mortalité due aux cancers. L'angiogenèse étant une composante essentielle de la formation des métastases (voir paragraphe I.1 ci-dessous) une thérapie antiangiogène est une alternative prometteuse. Dans ce contexte, il est donc important de déterminer si la hPRL 16K pourrait inhiber la dissémination des métastases en inhibant l'angiogenèse tumorale.

#### **1. L'angiogenèse/la lymphangiogenèse et la formation des métastases**

L'acquisition d'une capacité métastatique par les cellules tumorales nécessite un changement biologique qui implique un événement génétique (mutation), l'expression de propriétés cellulaires nouvelles (perte de connections intercellulaires, initiation d'angiogenèse, gain de motilité,...), et la constitution d'un environnement favorisant l'implantation des cellules tumorales dans différents organes. Le processus de formation des

métastases consiste en une longue série d'étapes séquentielles liées entre elles. La tumeur induit l'angiogénèse, ce qui permet sa croissance au delà d'un volume de  $1 \text{ mm}^3$ . La tumeur continue son expansion au sein du stroma puis envahit les tissus sains adjacents. Ce processus nécessite la perte d'adhésion intercellulaire mais aussi la synthèse de protéases sécrétées par les cellules tumorales ou par les cellules normales de l'hôte. Par la suite, les cellules s'échappent dans la circulation sanguine ou lymphatique. Les cellules survivant aux défenses immunitaires et aux turbulences de la circulation s'arrêtent dans le lit capillaire des organes réceptifs. Ces cellules quittent alors les vaisseaux sanguins ou lymphatiques et prolifèrent dans le parenchyme de l'organe où elles s'établissent et forment des micrométastases (Fidler, 2003; Steeg, 2006) (Fig. 14).



**Fig. 14. Etapes principales dans la formation des métastases.** **a.** Transformation cellulaire et croissance tumorale **b.** Une vaste vascularisation doit se dérouler si une masse tumorale dépasse 1-2 mm de diamètre. **c.** L'invasion locale du stroma hôte par quelques cellules tumorales se déroule par plusieurs mécanismes parallèles. **d.** Le détachement et l'embolisation de cellules tumorales ou d'agrégats se déroulent ensuite, la plupart des cellules tumorales circulantes sont rapidement détruites. **e.** Extravasation. **f.** La prolifération dans le parenchyme de l'organe termine le processus de formation des métastases. Pour continuer à croître, les micrométastases doivent développer un réseau vasculaire et échapper à la destruction menée par les défenses de l'hôte. Les cellules peuvent alors envahir les vaisseaux sanguins, entrer dans la circulation et produire des métastases supplémentaires (d'après Fidler, 2003).

L'angiogenèse est un composant essentiel de la voie métastatique. La néovascularisation d'une tumeur primaire augmente la possibilité d'entrée des cellules tumorales dans la circulation sanguine et ainsi leur dissémination dans d'autres organes. La corrélation entre angiogenèse et métastases est mise en évidence lors d'expériences dans lesquelles des animaux portant des tumeurs primaires préétablies sont traités avec des inhibiteurs de l'angiogenèse. Une diminution de la densité vasculaire de la tumeur primaire est associée avec une diminution de la formation des colonies métastatiques. Cela a été montré lors des expériences menées avec des facteurs antiangiogènes comme l'angiostatine (Sauter *et al.*, 2000).

L'angiogenèse joue également un rôle dans le contrôle de la dormance des métastases. En effet, O'Reilly et ses collaborateurs ont montré que certaines tumeurs murines et humaines peuvent produire dans la circulation des inhibiteurs de l'angiogenèse qui agissent afin de supprimer le développement des métastases au site secondaire (O'Reilly *et al.*, 1994; O'Reilly *et al.*, 1997).

La dissémination des cellules cancéreuses vers les organes distants peut aussi emprunter la voie des vaisseaux lymphatiques. Contrairement à l'angiogenèse, la régulation de la lymphangiogenèse est moins connue puisque des marqueurs spécifiques des vaisseaux lymphatiques n'ont été identifiés que récemment. Le facteur de transcription PROX1 (*prospero related homeobox protein 1*), le récepteur LYVE1 (*lymphatic vessel hyaluronan receptor 1*) et la glycoprotéine membranaire podoplanine sont des marqueurs des vaisseaux lymphatiques. Deux facteurs de croissance appartenant à la famille VEGF, le VEGF-C et le VEGF-D, et le récepteur VEGFR-3 jouent un rôle prépondérant dans les lymphangiogenèses normale et pathologique (Alitalo *et al.*, 2005).

Les vaisseaux lymphatiques sont plus fins et irréguliers que les vaisseaux sanguins. L'endothélium lymphatique est composé d'une couche de cellules endothéliales aux jonctions intercellulaires lâches et d'une membrane basale discontinue ou absente. Des filaments d'ancrage, connectés à la matrice extracellulaire, maintiennent les vaisseaux ouverts quand la pression tissulaire augmente, facilitant probablement le passage des fluides, des molécules et des cellules provenant des tissus interstitiels. A la différence des vaisseaux sanguins, les péricytes sont absents dans les capillaires lymphatiques et quelques cellules musculaires lisses sont observées dans les vaisseaux lymphatiques collecteurs. Comparés aux vaisseaux

sanguins, les vaisseaux lymphatiques ont un flux et une pression plus faibles et sont beaucoup moins sujets à la coagulation (Alitalo *et al.*, 2002; Dupuy *et al.*, 2003).

Bien qu'il soit évident que les vaisseaux péritumoraux contribuent à la dissémination des métastases, l'implication de vaisseaux intratumoraux, néosynthétisés lors du développement tumoral, est plus controversée. C'est notamment le cas dans des modèles animaux où les vaisseaux lymphatiques intratumoraux ne seraient pas fonctionnels, à cause d'une pression intratumorale élevée (Padera *et al.*, 2004; Wong *et al.*, 2005). Toutefois, des vaisseaux lymphatiques intratumoraux en prolifération sont présents dans certains cancers humains tels que des mélanomes (Dadras *et al.*, 2003), des carcinomes de la tête et du cou (Maula *et al.*, 2003) et des carcinomes de la thyroïde (Hall *et al.*, 2003). Pour ces cancers, ils pourraient contribuer à la dissémination des métastases dans les nodules lymphatiques. De plus, dans des modèles de tumeurs xenogreffes surexprimant les facteurs lymphangiogènes VEGF-C et VEGF-D, une lymphangiogenèse intratumorale est détectée et favorise la dissémination des métastases par voie lymphatique (Skobe *et al.*, 2001; Stacker *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2005)

Angiogenèse et lymphangiogenèse sont impliquées dans la dissémination métastatique et la part respective de ces deux mécanismes est probablement différente selon le type de tumeur et le type d'organe touché.



## **II. Présentation des résultats**

Afin d'analyser l'effet de la hPRL 16K sur la croissance tumorale et la formation des métastases nous avons utilisé les cellules murines de mélanome B16-F10 connues pour être très agressives et former des métastases. La construction adénovirale (16K-Ad) validée dans l'article précédent, a été utilisée pour médier l'expression de la hPRL 16K tandis que le vecteur Null-Ad a servi de contrôle.

### **1. Le vecteur adénoviral 16K-Ad permet l'expression de la hPRL16K**

La présence de la hPRL 16K détectable par Western-blotting sur le milieu conditionné de cellules COS infectées par le vecteur adénoviral 16K-Ad a permis de vérifier l'efficacité d'infection de ce vecteur. Trois bandes pour la hPRL 16K sont détectées par Western-Blotting, la bande principale migrant légèrement plus lentement que celle observée avec la hPRL 16K recombinante produite en *E. coli* (voir Fig. 1 de l'article).

### **2. La hPRL 16K et le vecteur adénoviral 16K-Ad n'affectent pas la viabilité des B16-F10**

Nous avons voulu déterminer si la hPRL 16K recombinante ou l'administration de vecteurs adénoviraux a un effet direct sur les cellules tumorales B16-F10. Pour cela, nous avons examiné la viabilité cellulaire après incubation des B16-F10 avec la hPRL 16K ou en les infectant avec les vecteurs 16K-Ad et Null-Ad. Nous avons ainsi montré que la hPRL 16K produite en *E. coli* ou celle obtenue avec les vecteurs adénoviraux n'a pas d'effet direct sur la croissance des cellules tumorales B16-F10 (Fig. 2).

### **3. La hPRL 16K réduit la croissance tumorale en affectant la morphologie des vaisseaux tumoraux**

Dans le but de déterminer si la hPRL 16K pouvait agir sur le développement tumoral des B16-F10, nous avons injecté en sous-cutané des cellules B16-F10 dans le flanc des souris syngéniques C57BL/6J. Les vecteurs 16K-Ad ou Null-Ad ont été inoculés en périphérie de la tumeur à cinq reprises. Nous avons montré que la hPRL 16K administrée via le vecteur adénoviral 16K-Ad pouvait inhiber de façon significative la croissance tumorale des B16-F10 (Fig. 3A-C). L'incidence tumorale est réduite d'environ 50% (Fig. 3A) tandis que le volume tumoral est réduit de 80% dans les souris traitées avec la hPRL 16K (Fig. 3B-C). Le marquage immunohistochimique des vaisseaux sanguins par CD31 a montré des différences intéressantes au niveau de la morphologie des vaisseaux sanguins dans les deux groupes : les vaisseaux sanguins dans les tumeurs traitées avec 16K-Ad apparaissent plus petits et collapsés (Fig. 4A). En collaboration avec le Dr. Silvia Blacher, une analyse d'images assistée par informatique a été utilisée pour quantifier la densité moyenne vasculaire (nombre de vaisseaux par mm<sup>2</sup>), la surface totale occupée par les vaisseaux et la taille moyenne des vaisseaux (Fig. 4B). De façon surprenante, la densité moyenne vasculaire est réduite dans les tumeurs des souris contrôles par rapport aux souris 16K-Ad (Fig. 4C) alors que la surface totale occupée par les vaisseaux est similaire (Fig. 4D). La différence entre ces deux résultats peut être expliquée par la longueur et la largeur des vaisseaux tumoraux qui apparaissent réduites dans les souris inoculées avec le vecteur 16K-Ad, ce qui se traduit par une réduction de 57% de la taille moyenne des vaisseaux (Fig. 4F). Une analyse de la distribution de la taille des vaisseaux tumoraux montre effectivement une réduction remarquable du nombre de vaisseaux de taille supérieure à 1000  $\mu\text{m}^2$  suite au traitement avec la hPRL 16K (Fig. 4E).

### **4. La hPRL 16K inhibe la formation des métastases**

Nous avons ensuite étudié les effets antimétastatiques de la hPRL 16K dans un modèle expérimental de métastases. Dans cette expérience, les cellules B16-F10 ont été injectées par voie systémique aux souris syngéniques C57BL/6J. Les vecteurs 16K-Ad ou Null-Ad ont été ensuite inoculés par la même voie. L'analyse par Western-blotting a montré que la hPRL 16K

pouvait encore être détectée dans le sérum 13 jours après l'injection adénovirale 16K-Ad (Fig. 5A). Comme décrit précédemment, *in vitro*, l'isoforme prédominante de la hPRL 16K présente dans le sérum migre plus lentement que la hPRL 16K recombinante.

La hPRL 16K est capable de réduire de façon significative la croissance des métastases puisque nous avons observé une diminution de 60% du nombre de métastases à la surface des poumons de souris injectées avec le vecteur adénoviral 16K-Ad en comparaison aux souris traitées avec le vecteur contrôle (Fig. 5B-C). Des études histologiques effectuées sur des coupes de poumons ont montré une réduction de 50% du nombre de métastases dans les poumons des souris traitées avec 16K-Ad (Fig. 5D-E). Par ailleurs, la graduation du diamètre des métastases en trois niveaux, à savoir, petit (<200 µm de diamètre), moyen (200 µm à 1 mm de diamètre) et grand (>1 mm de diamètre) a révélé une diminution du nombre de métastases de tailles moyenne et grande (Fig. 5E).

### III. Discussion

Dans cette étude, nous avons investigué les effets de la hPRL 16K sur la croissance tumorale et métastatique, toutes deux dépendantes de l'angiogenèse. Pour cela, nous avons utilisé des cellules murines B16-F10 issues d'un mélanome, connues pour être très agressives et pouvant métastasier aux poumons.

Nous avons montré que la hPRL 16K produite par le vecteur adénoviral 16K-Ad est capable de réduire la croissance tumorale des B16-F10 *in vivo*. L'action antitumorale de la hPRL 16K ne semble pas résulter d'un effet direct sur la croissance des cellules B16-F10 puisque ni la hPRL 16K produite en *E. coli*, ni le vecteur adénoviral 16K-Ad n'ont aucun effet toxique sur des cellules B16-F10 en culture. Ce résultat permet d'étendre le pouvoir d'inhibition de la hPRL 16K sur le développement tumoral puisque, jusqu'à présent, seuls deux articles ont décrit son action antitumorale. Bentzien *et al.* ont montré que la transfection de la hPRL 16K dans les cellules humaines de cancer du colon HCT116 inhibait la croissance tumorale dans les souris Rag1-/- (Bentzien *et al.*, 2001). Kim *et al.* ont montré que l'expression de la hPRL 16K dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 et DU145 inhibait la croissance tumorale en souris *nu/nu* (Kim *et al.*, 2003). Ces deux articles ont démontré que l'inhibition de la croissance tumorale *in vivo* par la hPRL 16K était corrélée avec une diminution de la densité microvasculaire de la tumeur, suggérant que la réduction du nombre de vaisseaux sanguins pouvait contribuer à la diminution de la croissance tumorale suite à un traitement avec la hPRL 16K. Dans notre étude, la densité microvasculaire n'est pas réduite et est au contraire légèrement augmentée. Cette observation ne signifie pas que la hPRL 16K est inefficace puisqu'une réduction de la croissance tumorale a été remarquée. Comme le souligne Hlatky, la détection de la réduction de la densité microvasculaire pendant le traitement avec un inhibiteur antiangiogène indique que cet agent est actif. Toutefois, l'absence d'une diminution ne signifie pas que cet agent est inefficace. Cette constatation est corroborée par une étude impliquant des tumeurs xenogreffes de liposarcome humain traitées ou non avec le facteur antiangiogène endostatine. Dans cette étude, bien que le volume tumoral soit réduit dans les tumeurs traitées avec l'endostatine par rapport aux tumeurs contrôles, l'analyse de la densité microvasculaire sur deux tumeurs traitées révèle, pour l'une une diminution de la densité et pour l'autre une légère augmentation (Hlatky *et al.*, 2002).

Notre étude montre pour la première fois que la hPRL 16K affecte la morphologie des vaisseaux sanguins tumoraux. En effet, le marquage immunohistochimique de CD31 montre des vaisseaux tumoraux plus petits et collapsés suite au traitement avec le vecteur adénoviral 16K-Ad. Cette observation est corroborée par les résultats de l'analyse d'images montrant une diminution de 57% de la taille moyenne des vaisseaux sanguins dans les tumeurs traitées avec le vecteur adénoviral 16K-Ad en comparaison aux tumeurs contrôles. Des études précédentes, réalisées avec l'inhibiteur de l'angiogenèse thrombospondine-2 (TSP-2) ou des dérivés du cannabis, ont également montré une modification similaire dans la morphologie des vaisseaux sanguins tumoraux (Streit *et al.*, 1999; Blazquez *et al.*, 2003). Dans la première étude, une diminution de la taille moyenne des vaisseaux au sein de tumeurs squameuses humaines hA431 surexprimant la TSP-2 est observée par rapport aux tumeurs contrôles. Dans la seconde étude, l'administration de cannabinoïdes ne révèle pas d'effet significatif sur le nombre de vaisseaux dans des gliomes formés par des cellules C6 de rat ou dans des astrocytomes humains. Toutefois, un effet notable est observé au niveau de la morphologie des vaisseaux tumoraux, ceux-ci étant caractérisés par des capillaires plus petits et étroits.

La hPRL 16K pourrait modifier la morphologie des vaisseaux tumoraux en affectant le tonus vasculaire. En effet, la hPRL 16K inhibe l'activation d'eNOS en bloquant la mobilisation intracellulaire de  $Ca^{2+}$ . Il en résulte une inhibition de l'angiogenèse et de la vasodilatation (Gonzalez *et al.*, 2004).

La dissémination des métastases provoque, à moyen ou plus long terme, la mort chez la plupart des patients atteints d'un cancer. L'angiogenèse qui est un processus important pour la prolifération des tumeurs primaires est aussi essentielle à la formation de métastases. Une corrélation négative est observée entre la survie du patient et le degré de vascularisation de plusieurs types de tumeurs incluant les tumeurs gastriques, mammaires, prostatiques, oesophagiques, vulvaires et les mélanomes. Un degré élevé de vascularisation tumorale augmente les chances des cellules tumorales d'entrer dans le système circulatoire et de métastasier (Woodhouse *et al.*, 1997). L'inhibition de l'angiogenèse apparaît donc comme une approche prometteuse pour limiter la croissance des métastases. L'angiostatine et l'endostatine font partie des facteurs antiangiogènes non seulement capables d'inhiber le développement tumoral mais aussi la dissémination et la croissance des métastases (Sauter *et al.*, 2000; Lalani *et al.*, 2004). Jusqu'à maintenant, aucune étude n'a rapporté l'effet potentiel d'inhibition de la hPRL 16K sur la croissance des métastases. C'est pourquoi, nous avons

décidé d'investiguer cette voie en utilisant un modèle expérimental de métastases se développant au poumon. Les étapes générales du processus de formation des métastases comprennent la croissance et la vascularisation de la tumeur primaire, l'intravasation, le transport des cellules vers des organes distants, l'extravasation, la croissance et la vascularisation de tumeurs métastatiques. Le modèle de métastases que nous avons employé imite la seconde moitié de ce processus (Steeg, 2006).

Les résultats montrent clairement un remarquable effet d'inhibition de la hPRL 16K sur le développement des métastases. Des examens macroscopiques et histologiques révèlent que le nombre et la taille des métastases sont réduits sur la surface et à l'intérieur des poumons de souris traitées avec le vecteur adénoviral 16K-Ad. La graduation des métastases en petite, moyenne et grande taille, suggère que les métastases des souris hPRL 16K sont moins invasives que celles des souris contrôles. En effet, une diminution significative du nombre de métastases de taille moyenne (200 µm à 1 mm de diamètre) et grande (> 1 mm de diamètre) est observée. Cette observation suggère que la hPRL 16K peut affecter l'implantation des cellules tumorales au niveau d'un site secondaire et la croissance tumorale dans ce nouvel environnement. Ces résultats sont en accord avec une précédente étude montrant que l'inhibiteur de l'angiogenèse thiénoypyridine SR 25989 réduit la taille et le nombre de métastases dans un modèle similaire de métastases (Mah-Becherel *et al.*, 2002). Ces résultats montrent qu'il est possible de limiter la croissance des métastases à une petite taille, de faible conséquence pour les patients.

L'inhibition du développement des métastases dans le poumon est en corrélation avec la présence de la hPRL 16K dans le sérum des souris traitées avec le vecteur adénoviral 16K-Ad. La forme principale de hPRL 16K détectée dans le sérum migre plus lentement que la hPRL 16K produite en *E. coli*. Ce résultat concorde avec des résultats préalables indiquant qu'une hPRL 16K biologiquement active est détectée sous de multiples formes comme étant le résultat de modifications post-traductionnelles (Kim *et al.*, 2003; Pan *et al.*, 2004). L'isoforme de la hPRL 16K est probablement la forme glycosylée comme cela a été montré dans l'étude de Pan (Pan *et al.*, 2004). La protéine entière (hPRL 23K) contient un site de N-glycosylation au niveau de l'Asn<sup>31</sup> (Lewis *et al.*, 1985) que l'on retrouve dans la hPRL 16K. Chez l'homme, on retrouve dans l'hypophyse une forme glycosylée de la protéine entière, de 25 kDa, dont la quantité varie de 13 % à 25 % (Lewis *et al.*, 1989). Elle constitue aussi la

forme prédominante de la hPRL monomérique circulante (Hashim *et al.*, 1990). La signification biologique de la forme glycosylée demeure peu connue.

Dans cette étude, nous avons utilisé un vecteur adénoviral comme moyen d'expression de la hPRL 16K. L'utilisation thérapeutique de protéines recombinantes dans les traitements cliniques est confrontée à de nombreux obstacles comme une administration prolongée et répétée due à la courte demi-vie des protéines, un dosage élevé, un risque de toxicité due à une production en microorganismes ou encore un coût élevé de production. Dès lors, l'utilisation de la thérapie génique dans le traitement antiangiogène représente une alternative prometteuse (Cao, 2001). L'emploi de vecteurs viraux ciblant spécifiquement les vaisseaux tumoraux semble également être une approche potentielle pour le traitement du cancer. En effet, ces vecteurs modifiés de façon à lier des marqueurs présents spécifiquement sur les cellules vasculaires tumorales, présentent plusieurs avantages : (1) le contournement d'anticorps neutralisants ; (2) la réduction de la toxicité envers le tissu normal ; et (3) le ciblage des cellules tumorales voisines qui sont souvent difficiles à atteindre via la voie intravasculaire (Liu *et al.*, 2006).

De nombreux essais cliniques utilisent les vecteurs adénoviraux comme vecteur génique pour traiter le cancer. L'emploi de vecteurs adénoviraux en thérapie génique a eu, en effet, un regain d'intérêt depuis que la FDA chinoise a approuvé, en octobre 2003, l'utilisation d'un vecteur adénoviral codant le gène p53 humain (Gendicine) pour le traitement des carcinomes de la tête et du cou (Peng, 2005).

En conclusion, cette étude démontre que la hPRL 16K véhiculée par thérapie génique peut non seulement inhiber le développement tumoral mais aussi, pour la première fois, montre une inhibition de la croissance des métastases. Ces résultats suggèrent que le facteur antiangiogène hPRL 16K possède un potentiel élevé dans le traitement thérapeutique contre le développement cancéreux et métastatique.

## IV. Perspectives

Le modèle expérimental de métastases que nous avons utilisé dans ce travail permet d'étudier la formation des métastases après l'étape d'intravasation. Parmi les perspectives, nous envisageons d'étudier l'effet de la hPRL 16K sur la dissémination des métastases dans un modèle spontané de formation de métastases. Dans ce modèle, les cellules tumorales sont injectées à un site et forment une tumeur primaire. Par la suite, les métastases se développent à partir de cette tumeur primaire. Cet essai permettra de mesurer le processus complet de formation des métastases.

Nous tenterons également de déterminer davantage les effets de la hPRL 16K sur le processus de maturation des vaisseaux tumoraux en caractérisant les péricytes et les muscles lisses présents sur ces vaisseaux.

Comme décrit dans l'introduction de cet article, la lymphangiogenèse peut également contribuer à la dissémination des métastases. Parmi les divers inhibiteurs de l'angiogenèse identifiés jusqu'à présent, certains comme l'inhibiteur des métalloprotéinases de la matrice (MM1270) (Nakamura *et al.*, 2004) ou l'endostatine (Fukumoto *et al.*, 2005) inhibent également la lymphangiogenèse, alors que d'autres pas comme la thrombospondine-1 (Hawighorst *et al.*, 2002). Des expériences sont actuellement en cours au sein de notre laboratoire afin de déterminer si la hPRL 16K est capable d'inhiber la lymphangiogenèse. Si c'est effectivement le cas, des études seront menées afin d'analyser si la hPRL 16K peut inhiber la propagation des métastases par inhibition de la lymphangiogenèse.



## **V. Contributions à ce travail**

Les marquages immunohistologiques ont été réalisés par Isabelle Dasoul et les analyses informatiques d'images ont été effectuées par le Dr. Silvia Blacher du laboratoire de Biologie des Tumeurs et du Développement (Professeurs Agnès Noël et Jean-Michel Foidart). Les injections intraveineuses ont été réalisées avec l'aide de Luc Duwez de l'Animalerie centrale du CHU (Dr. Pierre Drion).



# **Inhibition of Tumor Growth and Metastasis by Adenovirus-Mediated Gene Transfer Delivery of 16K hPRL**

Ngoc-Quynh-Nhu Nguyen,<sup>1</sup> Anne Cornet,<sup>1</sup> Silvia Blacher,<sup>2</sup> Sébastien Tabruyn,<sup>1</sup> Jean-Michel Foidart,<sup>2</sup> Agnès Noël,<sup>2</sup> Joseph A. Martial<sup>1</sup> and Ingrid Struman<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Molecular Biology and Genetic Engineering, Center for Biomedical Integrative Genoproteomics, University of Liège, Belgium; <sup>2</sup>Laboratory of Tumor and Development Biology, Centre for Biomedical Integrative Genoproteomics, University of Liège, Belgium

Corresponding author: Dr. Ingrid Struman, Laboratory of Molecular Biology and Genetic Engineering, CBIG, University of Liège, B6, Allée du 6 août, B-4000, Sart Tilman Belgique  
Tel: 32-43663566; Fax: 32-43662968; e-mail: I.Struman@ulg.ac.be

Cet article est en cours de révision.



Article n°3

---



## Article n°3

« *Prolactin/Growth Hormone–Derived Antiangiogenic Peptides Highlight a Potential Role of Tilted Peptides in Angiogenesis* »

Nguyen NQN, Tabruyn S, Lins L, Lion M, Cornet A, Lair F, Rentier-Delrue F, Brasseur R, Martial JA and Struman I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (103)39: 14319-14324. 2006.

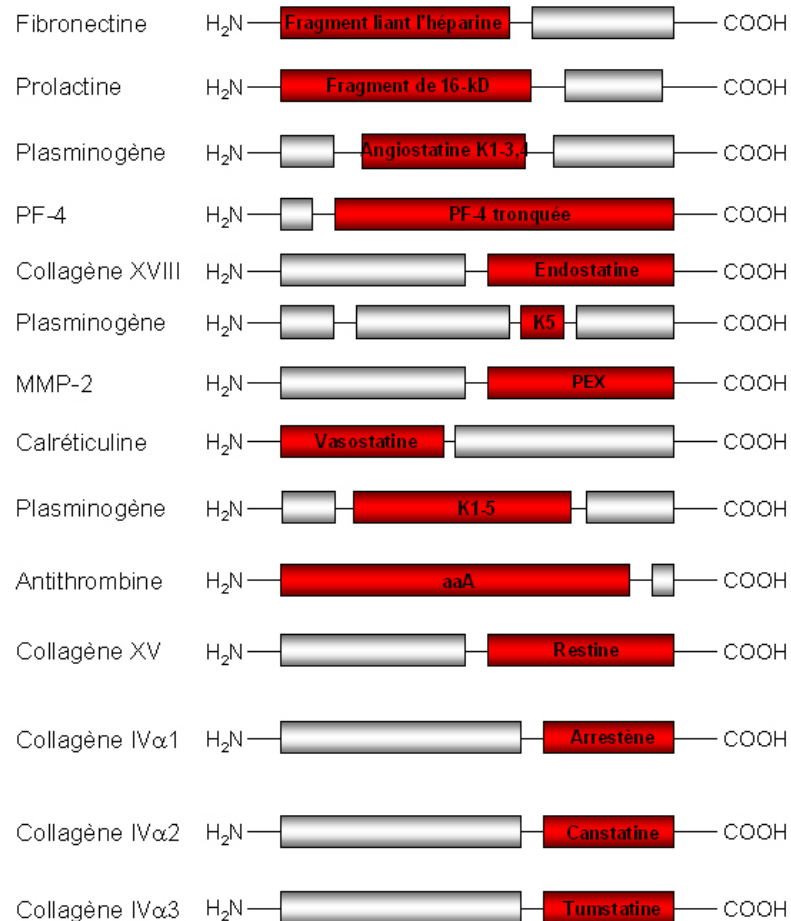
### I. Introduction

En parallèle aux deux études décrites ci-dessus, nous nous sommes attachés à identifier une région responsable de l'activité antiangiogène de la hPRL 16K et des trois autres fragments de la famille PRL/GH.

Dans le domaine de l'angiogenèse, de nombreux inhibiteurs sont des fragments cryptiques de molécules endogènes qui ne présentent pas d'activité antiangiogène : c'est le cas de l'angiostatine, de l'endostatine, de la tumstatine ou du PF-4 (*platelet factor-4*) (Cao, 2001) (Fig. 15). Parmi certains de ces fragments, de plus petits peptides conservant leur activité antiangiogène ont été isolés, comme par exemple le peptide 47-70 du PF-4 (Jouan *et al.*, 1999), les peptides 2 (60-70 AA) et 5 (171-183 AA) (Wickstrom *et al.*, 2004) et les peptides T3 (69-88 AA) et T7 (74-98 AA) de l'endostatine (Maeshima *et al.*, 2001). Les fragments 16K N-terminaux de la famille PRL/GH sont également des fragments cryptiques antiangiogènes tandis que les protéines entières sont angiogènes (Struman *et al.*, 1999). Nous avons émis l'hypothèse que ces fragments seraient exposés dans les molécules clivées et enfouis dans la protéine entière.

Malgré que la similarité de séquence des quatre fragments 16K des membres de la famille humaine PRL/GH est faible (environ 35% de similarité entre les séquences de la PRL et de la GH), ces fragments sont de puissants facteurs antiangiogènes. Cette constatation nous a amené à chercher une caractéristique structurale commune partagée par ces différents

fragments. En collaboration avec l'équipe du Professeur Brasseur (Centre de Biophysique Moléculaire Numérique, Faculté universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux), nous avons identifié un domaine susceptible d'adopter une structure en peptide oblique dans les séquences protéiques des fragments de 16 kDa de la famille PRL/GH.



**Fig. 15. Fragments cryptiques antiangiogènes.** Représentation schématique des domaines des inhibiteurs de l'angiogenèse générés par protéolyse. Les domaines antiangiogènes peuvent être localisés en N- ou C-terminal, ou comme fragments internes de protéines précurseurs. ■ domaines antiangiogènes. □ domaines non antiangiogènes (d'après Cao, 2001).

## 1. Les Peptides Obliques

### *1.1 Généralités*

Les peptides obliques ont été mis en évidence, fin des années 80, par modélisation moléculaire et expérimentalement par l'équipe du professeur Brasseur. Ce sont de courts fragments de séquences (12-20 résidus) qui possèdent un gradient d'hydrophobicité



asymétrique le long de leur séquence lorsqu'ils adoptent une structure hélicoïdale. De part ce gradient hydrophobe, ces peptides s'insèrent dans une interface lipide/eau avec un angle de  $45^{\circ} \pm 15^{\circ}$  et déstabilisent les lipides. Les peptides obliques ont été identifiés dans des protéines ayant différentes fonctions. Ils ont été identifiés dans diverses protéines d'enveloppes virales (SIV, *Simian Immunodeficiency Virus* ; HIV, *Human Immunodeficiency Virus* ; BLV, *Bovine Leukemia Virus*), dans des peptides signaux, dans des protéines neurodégénératives ainsi que dans des protéines de transfert lipidique (Brasseur *et al.*, 1997; Brasseur, 2000). A l'exception des peptides viraux impliqués dans des processus de fusion induits par les virus, le rôle de beaucoup de peptides obliques reste inconnu (Lins *et al.*, 2001).

La comparaison des peptides obliques a démontré l'absence d'homologie de séquence. Les seules caractéristiques qu'ils partagent sont une hydrophobicité moyenne ( $H_o$ ) entre 0,2 et 0,9, un gradient hydrophobe asymétrique quand ils sont en hélice et un angle d'insertion de cette hélice dans les lipides entre  $30^{\circ}$  et  $60^{\circ}$  (Lins *et al.*, 2001). Une autre caractéristique commune de ces peptides est qu'ils induisent la fusion des liposomes *in vitro* (Pillot *et al.*, 1996; Pillot *et al.*, 1997; Perez-Mendez *et al.*, 1998).

Récemment, Lins et ses collaborateurs ont créé par « de novo design » un peptide oblique constitué d'acides aminés non naturels. Par analyse infrarouge de Fourier, ils ont montré que ce peptide adoptait une structure hélicoïdale en solution ou dans des lipides et qu'il était capable d'induire la fusion de liposome (Lins *et al.*, 2006).

## 1.2 Classifications

Tous les peptides obliques ne sont pas strictement identiques, ils varient par leur hydrophobicité moyenne, leur stabilité structurale, leur longueur, leur composition en acides aminés...et leurs fonctions. Une première classification de ces peptides a été effectuée en fonction de leur hydrophobicité moyenne (Ho). Les peptides obliques ont été divisés en deux sous-classes :

-Les peptides de classe A ont une Ho proche de 0,9 et peuvent interagir avec des bicouches lipidiques et des membranes cellulaires. Ils sont constitués presque entièrement de résidus hydrophobes, ont une faible amphipathicité et un faible moment hydrophobe. Cette classe comprend des peptides viraux de fusion, des peptides signaux, le domaine C-terminal du peptide  $\beta$ -amyloïde et le peptide 118-135 de la protéine prion humaine.

-Les peptides de classe B ont une Ho entre 0,2 et 0,6, une amphipathicité élevée et un moment hydrophobe aux alentours de 0,4. Ces peptides déstabilisent préférentiellement l'ester de cholestérol et le cœur triglycéride des lipoprotéines et les émulsions lipidiques. Cette sous-classe inclut l'hélice C-terminale de l'apolipoprotéine A-II (Apo A-II), le peptide C-terminal du CETP (*Cholesteryl Ester Transport Protein*), les enzymes lipolytiques telles que les lipases ou la LCAT (*Leithin Cholesterol Acyl Transferase*) (Brasseur *et al.*, 1997).

Une seconde classification des peptides obliques en fonction de leur propriété d'insertion dynamique au sein d'une bicouche lipidique modélisée a été réalisée par Lins et ses collaborateurs, en utilisant une technique de simulation du mode d'insertion appelée IMPALA (*Integral Membrane Protein And Lipid Association*). Ici aussi, deux classes de peptides émergent :

-Les peptides de 1<sup>ère</sup> classe ont accès aux deux côtés de la bicouche lipidique et interagissent avec la membrane. Ce groupe de peptides comprend la LCAT, les protéines d'enveloppes virales, le prion, etc..

-Les peptides de 2<sup>nde</sup> classe sont confinés dans une seule couche lipidique et interagissent avec les lipides des lipoprotéines. Cette classe inclut l'Apo A-II, l'Apo C-III, le CETP, l'HPL (*Hepatic Lipase*), la LPL (*Lipoprotein Lipase*).

De plus, il est prédit que les peptides obliques ont accès à un espace conformationnel plus large dans les bicouches lipidiques que les segments transmembranaires et les hélices amphipathiques. Ce qui suggère que les configurations métastables des peptides obliques pourraient perturber l'organisation des chaînes d'acyle et être un mécanisme général pour la déstabilisation des lipides (Lins *et al.*, 2001).

### ***1.3 Stratégie de détection des peptides obliques***

L'approche permettant la détection d'un peptide oblique dans une séquence protéique est un processus séquentiel faisant intervenir plusieurs programmes d'analyse. La 1<sup>ère</sup> étape de détection consiste à déterminer l'hydrophobicité moyenne ( $H_o$ ) distribuée le long de la séquence en utilisant les méthodes d'analyse HAC (*Hydrophobic Cluster Analysis*) et Jähnig. La séquence est sélectionnée quand  $H_o > 0$ . La séquence sélectionnée est ensuite testée pour son insertion dans les lipides. Les énergies de transfert hydrophobes ( $E_{tr\ pho}$ ) et hydrophiles ( $E_{tr\ phi}$ ) sont calculées et seules les séquences qui remplissent la condition suivante  $\left| \frac{E_{tr\ pho}}{E_{tr\ phi}} \right| > 0,4$  sont gardées. Par la suite, l'angle d'insertion ( $\delta$ ) du peptide dans une interface hydrophobe/hydrophile est calculé. Le peptide est seulement sélectionné si son angle  $\delta$  est compris entre  $30^\circ$  et  $60^\circ$  (Brasseur, 2000). La dernière étape de détection consiste à calculer le mode d'interaction du peptide avec une couche lipidique en suivant la procédure ci-dessous. La structure 3D du peptide est tout d'abord construite (la structure en hélice  $\alpha$  est calculée par le programme AMBER et la conformation des chaînes latérales est optimisée par minimisation d'énergie), la méthode IMPALA est ensuite utilisée pour étudier l'insertion du peptide dans un modèle membranaire (Lins *et al.*, 2001).

Par cette procédure et en analysant une banque de séquences, un peptide oblique est détecté dans 85% des protéines connues pour interagir avec des lipides (Brasseur, 2000).

## II. Présentation des résultats

### **1. Identification de séquence peptide oblique dans les fragments 16K de la famille PRL/GH humaine**

Des analyses structurales ont révélé dans chaque fragment N-terminal de 16-kDa de la famille PRL/GH humaine une région susceptible d'adopter une structure en peptide oblique. La structure 3D des peptides a été construite sous forme d'hélice  $\alpha$  et l'insertion de ces peptides dans une membrane a été simulée. Comme attendu, ces peptides adoptent une orientation oblique dans la membrane ( voir Fig. 1A de l'article, pour le peptide oblique de la hPRL 16K.).

Les séquences et propriétés de ces peptides obliques sont reprises dans la table 1. Les mutants des peptides obliques de la 16K hPRL et de la 16K hGH ont été conçus et nommés respectivement POPRLmut et POGHmut. Les mutations ont été introduites de façon à abolir le gradient hydrophobe du peptide, sans en changer leur contenu global en acides aminés.

Tous les membres de la famille PRL/GH partagent une structure tertiaire caractérisée par un tonneau à quatre hélices  $\alpha$ . Le peptide oblique est situé dans la région N-terminale de la seconde hélice et est enfoui dans la structure, étant entouré par les trois autres hélices et la troisième boucle (Fig. 1 B-C).

### **2. Induction de la fusion des liposomes par le peptide oblique de la hPRL 16K**

Dans ce travail nous voulions déterminer si le peptide oblique est responsable de l'activité antiangiogène des fragments de la famille PRL/GH. En vue de tester l'activité des peptides obliques de la hPRL 16K et de la hGH 16K nous avons tout d'abord synthétisé ces peptides et montré qu'ils induisent la fusion des liposomes (Fig. 1D).

### **3. Production de protéines recombinantes**

Ces peptides étant fort hydrophobes et donc trop peu solubles, nous n'avons pu tester leur activité sur les cellules endothéliales. Nous avons alors produit ces peptides en fusion C-terminale avec la *maltose binding protein* (MBP). Cette protéine améliore la solubilité et le repliement du peptide fusionné. Nous avons nommé ces protéines poPRL (fusion de la MBP avec le peptide oblique de la hPRL 16K) et poGH (fusion de la MBP avec le peptide oblique de la hGH 16K). Comme contrôle, nous avons produit la protéine MBP fusionnée avec le peptide oblique muté de la hPRL 16K (*m-poPRL*) et la MBP fusionnée avec le peptide oblique muté de la hGH 16K (*m-poGH*). Enfin, nous avons produit la protéine MBP sans fusion avec le peptide oblique comme dernier contrôle.

### **4. Les peptides obliques de la hPRL 16K et de la hGH 16K inhibent la prolifération des cellules endothéliales et induisent leur apoptose**

Nous avons dans un premier temps déterminé si les peptides obliques étaient responsables de l'activité antiangiogène des fragments 16K. Il a été au préalable montré que la hPRL 16K induit l'apoptose des cellules endothéliales et inhibe la prolifération de ces cellules ainsi que la formation des capillaires. Une analyse par FACS montre que les protéines fusions poPRL et poGH induisent l'apoptose des cellules endothéliales de type BACE et ABAE (Fig. 2A-B). Il a déjà été montré que la hPRL 16K active la caspase 3 qui est une protéase activée dans les dernières étapes de l'apoptose. C'est pourquoi, nous avons analysé l'activation de cette caspase par les peptides obliques. Les cellules BACE traitées avec des concentrations croissantes en poPRL et poGH montrent une augmentation de l'activité de la caspase 3 et ce, de manière dose dépendante (Fig. 2C). Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules ABAE (données non montrées).

L'effet des peptides obliques sur la prolifération des cellules ABAE a été examiné en analysant l'incorporation de la [<sup>3</sup>H]-thymidine par les cellules endothéliales cultivées en présence de concentrations croissantes en poPRL et poGH. Les protéines poPRL et poGH ainsi que le contrôle hPRL 16K réduisent l'incorporation en [<sup>3</sup>H]-thymidine de façon dose dépendante (Fig. 6 en *supporting information*).

## **5. Les peptides obliques de la hPRL 16K et de la hGH 16K inhibent la formation des capillaires *in vitro* et *in vivo***

Enfin, nous avons montré que les protéines poPRL et poGH sont capables d'inhiber la formation des capillaires *in vitro* (Fig. 3A-B). Les contrôles *m*-poPRL, *m*-poGH et MBP utilisés au double des plus hautes concentrations employées dans ces trois tests effectués *in vitro*, n'exercent aucun effet.

Nous avons ensuite étudié l'effet des peptides obliques *in vivo* en analysant la formation des capillaires dans la CAM (Fig 3C-D). Nous montrons la présence d'une région avasculaire sur les membranes traitées avec la hPRL 16K, le poPRL et le poGH tandis que les membranes traitées avec la *m*-poPRL et la *m*-poGH ne présentent pas d'effet significatif.

## **6. La hPRL 16K mutée de façon à abolir le gradient d'hydrophobicité de son peptide oblique montre une activité réduite**

Afin de vérifier si le peptide oblique de la hPRL 16K est responsable de l'activité antiangiogène de ce fragment, nous avons introduit des mutations au sein de la hPRL 16K afin de rompre le caractère oblique de la région identifiée. Le fragment mutant ainsi que le fragment natif ont été produits en fusion avec la MBP. Les mutations dans la région du peptide oblique réduisent d'environ 50% l'activation de la caspase 3 par la hPRL 16K (Fig. 4).

## **7. Les peptides obliques de la gp32 du virus SIV et du peptide A $\beta$ inhibent l'angiogenèse**

Afin de voir s'il est possible de généraliser l'effet antiangiogène des peptides obliques, nous avons étudié l'activité des peptides obliques de deux protéines qui ne semblent pas apparentées à l'angiogenèse, la protéine fusion gp32 du virus SIV et le peptide  $\beta$ -amyloïde (peptide A $\beta$ ) impliqué dans la maladie d'Alzheimer. La MBP fusionnée avec le peptide oblique du virus SIV (poSIV) et la MBP fusionnée avec le peptide oblique du peptide A $\beta$  (poBamyl) ont été produites.

Nous avons montré que les protéines fusions poSIV et poBamyl activent la caspase 3 des cellules endothéliales BACE (Fig. 5A) et inhibent la prolifération des cellules ABAE *in vitro* (Fig. 5B). Ces activités sont spécifiques aux cellules endothéliales. De plus, ces mêmes protéines fusions inhibent la formation des capillaires *in vitro* (Fig. 5C-D) et *in vivo* (test de CAM) (Fig. 5E-F).

### III. Discussion

Il a été précédemment montré que les molécules intactes de la famille PRL/GH stimulent la croissance des vaisseaux sanguins alors que leurs fragments N-terminaux inhibent l'angiogenèse. Partant de cette observation, nous avons tenté de trouver un point commun entre les différents fragments 16K de la famille PRL/GH qui pourrait expliquer leur similarité d'action. Précédemment, diverses études ont été réalisées dans ce but : recherche de zones conservées, de peptides conservés (ex : type RGD) ou encore de séquences conservées avec d'autres facteurs antiangiogènes. Finalement, en collaboration avec l'équipe du Pr. Brasseur, nous avons identifié un domaine susceptible d'adopter une structure en peptide oblique dans les séquences protéiques des fragments de 16 kDa de la famille PRL/GH.

Cette étude montre pour la première fois l'effet antiangiogène des peptides obliques. Non seulement des peptides obliques de deux inhibiteurs de l'angiogenèse (hPRL 16K et hGH 16K) mais aussi ceux de deux peptides, le peptide de fusion gp32 du virus SIV et le peptide A $\beta$ .

Les effets antiangiogènes de la hPRL 16K et de la hGH 16K ont été démontrés à trois niveaux : inhibition de la prolifération (D'Angelo *et al.*, 1999), induction de l'apoptose (Martini *et al.*, 2000), et inhibition de la formation de capillaires (Clapp *et al.*, 1993; Struman *et al.*, 1999). Nous montrons que les peptides obliques de ces molécules fusionnés à la MBP exercent tous ces effets, au contraire des variants de ces peptides, mutés de façon à rompre le gradient d'hydrophobicité. La même stratégie de mutation a été utilisée avec succès afin de supprimer la capacité des peptides obliques à induire la fusion des liposomes *in vitro* (Pillot *et al.*, 1996) et de réduire, voire même abolir, le processus de fusion des virus dans les cas des peptides obliques des glycoprotéines d'enveloppe des virus SIV et BLV (Horth *et al.*, 1991; Voneche *et al.*, 1992). Dans le cadre de son mémoire de licence, Esben Gab (laboratoire du Dr. Birthe Kragelund, Laboratoire de Biologie Structurale et de RMN, Institut de biologie moléculaire et de physiologie, Université de Copenhague, Danemark) a étudié les interactions de la hPRL 16K avec la membrane, en utilisant des vésicules unilamellaires comme modèle membranaire. Il a montré par dichroïsme circulaire que les peptides H1, H2 et H3 (correspondant aux hélices 1, 2 et 3 de la hPRL) interagissent tous les trois avec la membrane, adoptant des structures secondaires en hélice. Les peptides H1 et H2 induisent la fusion des



liposomes et la perméabilisation vésiculaire. Le peptide H3 n'induit la perméabilisation vésiculaire qu'à plus haute concentration. Comme contrôle, la hPRL et la hPRL 16K fusionnée avec la thiorédoxine (Trx-16K) ont été testées. La hPRL est inactive dans ces deux essais tandis que la hPRL 16K est active. Ces résultats caractérisent la hPRL 16K comme une protéine pouvant interagir avec la membrane et confortent les résultats obtenus avec le peptide oblique de la hPRL 16K.

Par la suite, nous avons produit un mutant de la hPRL 16K, caractérisé par des mutations qui respectent la composition en acides aminés mais perturbent le gradient hydrophobe de la région peptide oblique. Ce mutant fusionné à la MBP est moins antiangiogène que la hPRL 16K fusionnée à la MBP. L'activité antiangiogène de la hPRL 16K est donc au moins partiellement due à son peptide oblique. Il reste à expliquer pourquoi les peptides obliques des fragments 16K ne peuvent conférer les propriétés antiangiogènes aux protéines entières. La structure tertiaire de la hPRL a été résolue de façon plus précise par spectroscopie RMN (Teilum *et al.*, 2005). Dans cette structure (Figures 1B et 1C de l'article), le peptide oblique est localisé dans la région N-terminale de la seconde hélice et est enfoui car cette hélice est entourée par les trois autres hélices et la troisième boucle. Bien que la structure de la hPRL 16K ne soit pas encore connue, nous pouvons spéculer qu'une coupure par une protéase libèrerait un fragment où le peptide oblique serait plus exposé. Piwnica et ses collaborateurs ont récemment montré que la coupure de la PRL par la cathepsine D génère trois fragments correspondant aux acides aminés 1-132, 1-147, et 1-150, caractérisés respectivement par une masse moléculaire de 15, 16,5, et 17 kDa (Piwnica *et al.*, 2004). Ces trois fragments présentent une activité antiangiogène. Les sites de coupure identifiés sont tous localisés dans la même région de la protéine native, très proche de la boucle 3 et de l'extrémité C-terminale de la troisième hélice qui cache le peptide oblique. Cette localisation suggère que le peptide oblique pourrait, en effet, être plus exposé dans le fragment 16K que dans la molécule parente, la PRL. La détermination de la structure tertiaire de la hPRL 16K, actuellement en cours au sein du laboratoire du Dr. Kragelund, permettra de vérifier si le peptide oblique de la hPRL 16K est bien plus exposé dans le fragment 16K par rapport à la protéine entière.

Malgré que le poPRL et poGH soient très antiangiogènes, ils restent respectivement 4 et 32 fois moins puissants que la hPRL 16K *in vitro*. Une inconnue dans ces expériences est la façon dont la fusion avec la MBP pourrait affecter la présentation du peptide oblique. La

MBP est une protéine chaperonne qui permet d'améliorer la solubilité et la stabilité du peptide qui lui est fusionné (Bach *et al.*, 2001). C'est une grande protéine avec deux domaines globulaires distincts séparés par un sillon. Elle lie à sa surface plusieurs groupes de résidus hydrophobes (Spurlino *et al.*, 1991). Etant donné le profil d'hydrophobicité des peptides obliques, la MBP pourrait interagir avec eux de telle façon qu'elle pourrait réduire leur activité.

Une autre hypothèse serait que l'action antiangiogène de la hPRL 16K et de la hGH 16K pourrait être médiée par plusieurs régions présentes au sein de ces fragments. Des peptides isolés correspondant à plusieurs régions distinctes de l'endostatine ou de la tumstatine se sont révélés antiangiogènes (Maeshima *et al.*, 2001; Chillemi *et al.*, 2003). Tenant en compte cette hypothèse, les mutations qui abolissent complètement l'activité du poPRL réduisent d'environ 50% l'activité de la MBP-16K hPRL.

La propriété d'inhiber l'angiogenèse serait-elle une caractéristique commune à tous les peptides obliques ? Nous avons tenté de répondre à cette question en testant l'activité de divers peptides obliques provenant de protéines non apparentées à l'angiogenèse. Les peptides obliques de la gp32 du virus SIV, du peptide A $\beta$ , de la protéine prion et du CEPT ont été produits en fusion avec la MBP et testés pour leur activité antiangiogène. Les peptides obliques des deux premières protéines se sont révélés antiangiogènes. Le gp32 du virus SIV est une glycoprotéine d'enveloppe jouant un rôle important dans la fusion du virus avec les cellules ; le peptide A $\beta$  est impliqué dans la neurotoxicité. Les propriétés "d'orientation oblique" de ces peptides obliques ont déjà été décrites dans d'autres études (Horth *et al.*, 1991; Pillot *et al.*, 1996). Ces peptides ont été choisis car nous pensions qu'ils provenaient de protéines non apparentées à l'angiogenèse. Cependant, au cours de nos recherches bibliographiques, nous nous sommes rendus compte que le peptide A $\beta$  n'était pas inapparenté à l'angiogenèse. En effet, ce peptide produit sous forme synthétique peut présenter des effets angiogènes ou antiangiogènes selon sa concentration (Donnini *et al.*, 2006). Lors de nos tests d'activité, le peptide oblique fusionné à la MBP montre déjà une activité antiangiogène à 80 nM.

En ce qui concerne le peptide oblique du prion et du CEPT, les problèmes rencontrés lors de leur production et de leur purification avec la protéine de fusion MBP ne nous ont pas permis d'obtenir des résultats quant à leur éventuel pouvoir antiangiogène.

Il nous reste encore beaucoup à apprendre au sujet des mécanismes via lesquels les peptides obliques inhibent l'angiogénèse. Est-ce que ces mécanismes impliquent des interactions protéine-membrane comme c'est le cas avec les protéines de fusion des virus ? Dans ces protéines de fusion, le peptide oblique est requis lors de l'entrée du virus dans la cellule hôte. Son insertion oblique prédite à travers l'interface lipide-eau déclencherait la désorganisation phospholipidique locale et générerait une nouvelle phase lipidique favorisant la fusion (Brasseur *et al.*, 1997). La modification de l'angle d'insertion des peptides des virus SIV et BLV est apparemment suffisante pour abolir la fusion (Horth *et al.*, 1991; Voneche *et al.*, 1992).

Une autre possibilité est que l'activité antiangiogène est initiée par une interaction protéine-protéine, comme suggéré pour le peptide A $\beta$  et les apolipoprotéines. Lins et ses collaborateurs suggèrent que des interactions spécifiques et complémentaires pourraient exister entre les apolipoprotéines et les peptides obliques (Lins *et al.*, 1999). En effet, des interactions existent entre le peptide oblique du peptide A $\beta$  et ApoE2 et ApoE3 et entre le peptide oblique du virus SIV et ApoA1. Par contre, les ApoE et le peptide oblique du virus SIV n'interagissent pas ensemble de même que l'ApoA1 et le peptide A $\beta$  (Pillot *et al.*, 1997). Ces données suggèrent une spécificité dans l'action des peptides obliques. Nos résultats sur des cellules tumorales (B16F10 et MDA-MB-231, données non montrées) suggèrent que l'action antiangiogène du poPRL et du poGH cible spécifiquement des cellules endothéliales, comme il a été précédemment montré pour la hPRL 16K (Martini *et al.*, 2000). En gardant à l'esprit cette spécificité d'action, nous favorisons l'hypothèse qu'un événement initial dans la signalisation impliquerait une interaction protéine-protéine plutôt qu'une interaction protéine-membrane.

Si une interaction protéine-protéine est nécessaire pour conférer l'activité au peptide oblique, les peptides agissent-ils via des récepteurs? Pendant des années, notre laboratoire ainsi que d'autres ont cherché un récepteur qui relayerait l'activité antiangiogène de la PRL 16K. Différentes approches furent envisagées : analyses de séquences sur la PRL 16K afin de chercher des motifs consensus susceptibles d'être reconnus par un récepteur ; constitution d'une librairie de cellules COS exprimant à leur surface des protéines des cellules endothéliales suivie d'hybridations avec la PRL 16K de rat marquée à l' $^{125}\text{I}$  sur les coupes de ces cellules ; cross-linking entre la PRL 16K marquée à l' $^{125}\text{I}$  et les cellules endothéliales (Clapp *et al.*, 1992) ; recherches d'homologie avec les récepteurs de la PRL et de la GH.

Malgré les nombreux efforts consentis par les différents laboratoires pour trouver un récepteur, jusqu'à maintenant aucun récepteur n'a pu être identifié. Cependant, Clapp et ses collaborateurs ont identifié un site de liaison spécifique saturable et de haute affinité pour la PRL 16K sur les cellules endothéliales (Clapp *et al.*, 1992). Parmi les inhibiteurs de l'angiogenèse, la hPRL 16K n'est pas le seul inhibiteur dont le récepteur spécifique n'a pas été identifié. Ainsi, le mécanisme moléculaire décrivant l'activité antiangiogène de l'endostatine, un facteur antiangiogène beaucoup plus étudié, n'est pas complètement élucidé. L'endostatine peut lier l'intégrine  $\alpha 5\beta 1$  avec une haute affinité (Wickstrom *et al.*, 2002) ou avec une plus faible affinité, les glycopicans -1 et -4. Elle lie aussi des récepteurs non identifiés (Karumanchi *et al.*, 2001). Cependant, aucun de ces sites ne peut expliquer l'action antiangiogène de l'endostatine.

Bien que le récepteur de la hPRL 16K n'ait pas encore été identifié, nous adhérons à l'hypothèse de Esben Gad (mémoire de licence) qui propose un mécanisme dans lequel un récepteur spécifique présent sur les cellules endothéliales provoquerait une augmentation de la concentration de la hPRL 16K, suivi par une déstabilisation spécifique de la membrane par la hPRL 16K.

Enfin, la question de savoir si d'autres facteurs antiangiogènes possèdent un peptide oblique se pose. En collaboration avec le Dr. Laurence Lins nous avons analysé les séquences de différents fragments antiangiogènes. Il s'avère que pour l'endostatine, la canstatine, la tumstatine ou l'arrestene, ces molécules se présentent essentiellement en feuillet  $\beta$  et les segments potentiellement obliques sont en fait des feuillets  $\beta$  dans la structure tertiaire, ce qui ne correspond pas aux caractéristiques d'un peptide oblique. L'analyse des séquences de l'angiostatine montre que celle-ci est trop hydrophile pour posséder les caractéristiques d'un peptide oblique. Le PF-4 quant à lui possède une structure qui serait susceptible d'avoir une conformation en peptide oblique.

Mayo et ses collaborateurs suggèrent que les peptides antiangiogènes auraient tendance à contenir un taux élevé de résidus hydrophobes et à se replier en structure à feuillets  $\beta$  antiparallèles (Mayo *et al.*, 2001). Malgré que les peptides obliques adoptent une structure en hélice  $\alpha$  en solution, nous ne pouvons exclure qu'ils pourraient exister sous forme de feuillets  $\beta$ . En effet, Martin et ses collaborateurs ont montré que le peptide synthétique N-terminal de la gp41 du virus HIV-1 adopte principalement une conformation en feuillet  $\beta$  en absence de

lipides, mais qu'après interaction avec des LUV (*large unilamellar vesicle*), le feuillet  $\beta$  est partiellement converti en hélice  $\alpha$  au voisinage d'une bicouche lipidique (Martin *et al.*, 1993).

En conclusion, nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour l'investigation des propriétés des fragments 16K des membres de la famille PRL/GH. Ils soulignent un rôle potentiel des peptides obliques dans l'angiogenèse, ce qui pourrait avoir d'importantes implications pour le développement de nouvelles thérapies antiangiogènes.

## IV. Perspectives

Des expériences de liaison de la rPRL 16K sur les membranes des cellules endothéliales BBE ont mis en évidence un site de liaison spécifique, de haute affinité ( $K_d = 9,9$  nM), saturable ( $B_{max} = 4,8$  pmol/mg protéine) et réversible (Clapp *et al.*, 1992). Des expériences très préliminaires de liaison sur des membranes de cellules endothéliales ABAE ont permis de montrer le déplacement de la rPRL 16K par le poPRL mais pas par la MBP. D'autre part, la liaison du poPRL sur les membranes est déplacée par la hPRL 16K, par elle-même mais pas par la MBP (résultats non montrés). Ces résultats indiquent que le peptide oblique de la hPRL 16K partage avec la PRL 16K un même site de liaison présent sur les cellules endothéliales confirmant l'idée que le peptide oblique de la hPRL 16K est en partie responsable de son activité antiangiogène. Ces résultats encourageants doivent être confirmés.

Enfin, dans le cadre d'une application thérapeutique antiangiogène éventuelle, l'utilisation de peptides semble profitable. Plusieurs peptides se sont avérés être aussi, voire plus actifs que la protéine parente (Sebti *et al.*, 2000; Griffioen *et al.*, 2001). Les études réalisées *in vitro* montrent que le peptide oblique de la hPRL 16K fusionné à la MBP est 4 fois moins actif que la hPRL 16K. Par contre, les résultats que nous avons obtenus *in vivo* dans le test CAM montrent que les deux peptides présentent une activité équivalente. Il apparaît essentiel, dans le but d'une application thérapeutique éventuelle, de comparer l'effet antitumoral *in vivo* de la hPRL 16K et de son peptide oblique.

## **V. Contributions à ce travail**

Les analyses structurales de même que les expériences de fusion des liposomes ont été réalisées par le Dr. Laurence Lins du Centre de Biophysique Moléculaire Numérique (laboratoire du Professeur Robert Brasseur, FSAGx). Nous avons produit au sein de notre laboratoire les différentes protéines fusion et testé leurs activités dans les expériences réalisées *in vitro* et *in vivo*.

# Prolactin/growth hormone–derived antiangiogenic peptides highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis

Ngoc-Quynh-Nhu Nguyen<sup>†</sup>, Sebastien P. Tabruyn<sup>†</sup>, Laurence Lins<sup>‡</sup>, Michelle Lion<sup>†</sup>, Anne M. Cornet<sup>†</sup>, Florence Lair<sup>†</sup>, Françoise Rentier-Delrue<sup>†</sup>, Robert Brasseur<sup>‡</sup>, Joseph A. Martial<sup>†</sup>, and Ingrid Struman<sup>†§</sup>

<sup>†</sup>Laboratory of Molecular Biology and Genetic Engineering, Center of Biomedical Integrative Genoproteomics, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium; and <sup>‡</sup>Center of Numerical Molecular Biophysics, Gembloux Agricultural University, B-5030 Gembloux, Belgium

Communicated by John D. Baxter, University of California, San Francisco, CA, August 2, 2006 (received for review January 13, 2006)

Angiogenesis is a crucial step in many pathologies, including tumor growth and metastasis. Here, we show that tilted peptides exert antiangiogenic activity. Tilted (or oblique-oriented) peptides are short peptides known to destabilize membranes and lipid cores and characterized by an asymmetric distribution of hydrophobic residues along the axis when helical. We have previously shown that 16-kDa fragments of the human prolactin/growth hormone (PRL/GH) family members are potent angiogenesis inhibitors. Here, we demonstrate that all these fragments possess a 14-aa sequence having the characteristics of a tilted peptide. The tilted peptides of human prolactin and human growth hormone induce endothelial cell apoptosis, inhibit endothelial cell proliferation, and inhibit capillary formation both *in vitro* and *in vivo*. These antiangiogenic effects are abolished when the peptides' hydrophobicity gradient is altered by mutation. We further demonstrate that the well known tilted peptides of simian immunodeficiency virus gp32 and Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide are also angiogenesis inhibitors. Taken together, these results point to a potential new role for tilted peptides in regulating angiogenesis.

16-kDa N-terminal fragment of prolactin

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones, is crucial in both health and disease. Its involvement in tumor growth and metastasis (1) makes it an important potential target for anticancer therapy. Many angiogenesis inhibitors are cryptic fragments of endogenous molecules displaying no angiogenesis-related activity [angiostatin, endostatin, platelet factor-4 (PF-4), tumstatin, and thrombospondin (2)]. From some of these inhibitors, shorter peptides retaining antiangiogenic activity have been isolated, such as the PF-4 peptide 47-70 (3), endostatin fragments 2 and 5 (amino acids 60-70 and amino acids 171-183) (4), and tumstatin peptides T3 and T7 (amino acids 69-88 and amino acids 74-98) (5). This observation suggests that the antiangiogenic regions of these peptides may be exposed in the isolated fragments but buried in the full-length proteins.

The 16-kDa N-terminal fragment of prolactin (16K PRL) is antiangiogenic *in vitro* (6-11) and *in vivo*. Generation of the 16K fragment from PRL has been attributed to cathepsin D (12). Its ability to prevent angiogenesis in tumor and retinopathy mouse models has raised interest in its potential therapeutic use (13-15). We have sought to identify in human 16K PRL (16K hPRL) a peptide that might be responsible for its antiangiogenic activity. Although the 16K fragments of the other three human PRL/GH-family members are also potentially antiangiogenic (16), the sequence similarity of these fragments is low ( $\approx 35\%$  similarity between all mammalian PRL/GH sequences). This consideration led us to seek a peculiar common structural feature rather than a similar sequence.

Tilted (or oblique-oriented) peptides are short helical peptides (11 to 20 aa long) characterized by a peculiar distribution of hydrophobic residues: they are amphipathic and their net hy-

drophobicity increases from one end of the helix to the other. A characteristic of tilted peptides family is that they do not share high similarity in the primary sequence. Molecular modeling therefore predicts that they will adopt a tilted position at a lipid/water interface and that this orientation should disturb the parallelism of lipid acyl chains. Tilted peptides have been detected in various proteins with different functions. They were first identified in viral fusion proteins, protein signal sequences, neurotoxic proteins, and proteins involved in lipid metabolism (17). Little is known of the roles played by tilted peptides, with the exception of viral peptides clearly involved in virus-induced fusion events (18). A common feature of tilted peptides is their ability to induce liposome fusion *in vitro* (19).

Here, we have identified, in all four 16K fragments, a domain showing the characteristic structural features of tilted peptides. We show that the 14-aa tilted peptide sequences of 16K hPRL and the 16-kDa fragment of the human growth hormone (16K hGH) are sufficient to exert the antiangiogenic activity of their parent molecules both *in vitro* and *in vivo*. We also show that two tilted peptides from proteins unrelated to angiogenesis have similar antiangiogenic properties. Our findings may have important implications for the study of antiangiogenic mechanisms.

## Results

**Identification of Tilted Peptide Sequences in 16K Fragments of the Human PRL/GH Family.** Structural analysis (see *Materials and Methods*) revealed in each N-terminal 16-kDa fragment of the human PRL/GH family a region with tilted peptide-like properties. The peptides were 3D constructed as an  $\alpha$ -helix, and their insertion into a modeled membrane was simulated. As expected, they were found to adopt an oblique orientation in the membrane (see Fig. 1A for the 16K hPRL tilted peptide).

The sequences and properties of these tilted peptides are summarized in Table 1. Mutants of the PRL and GH tilted peptides (respectively, POPRLmut and POGHmut) were designed so as to abolish the hydrophobicity gradient. POPRLmut has the same amino acid composition as its wild-type counterpart, but Leu-2 is permuted with Asn-13 and Val-6 with Ser-11. In POGHmut, Leu-2, Leu-6, and Leu-7 are replaced with Ser, Arg-3 with Gln, and Ser-5 with Leu (Table 1).

Author contributions: R.B., J.A.M., and I.S. designed research; N.-Q.-N.N., S.P.T., L.L., M.L., F.L., and I.S. performed research; N.-Q.-N.N., A.M.C., and F.R.-D. analyzed data; and N.-Q.-N.N. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

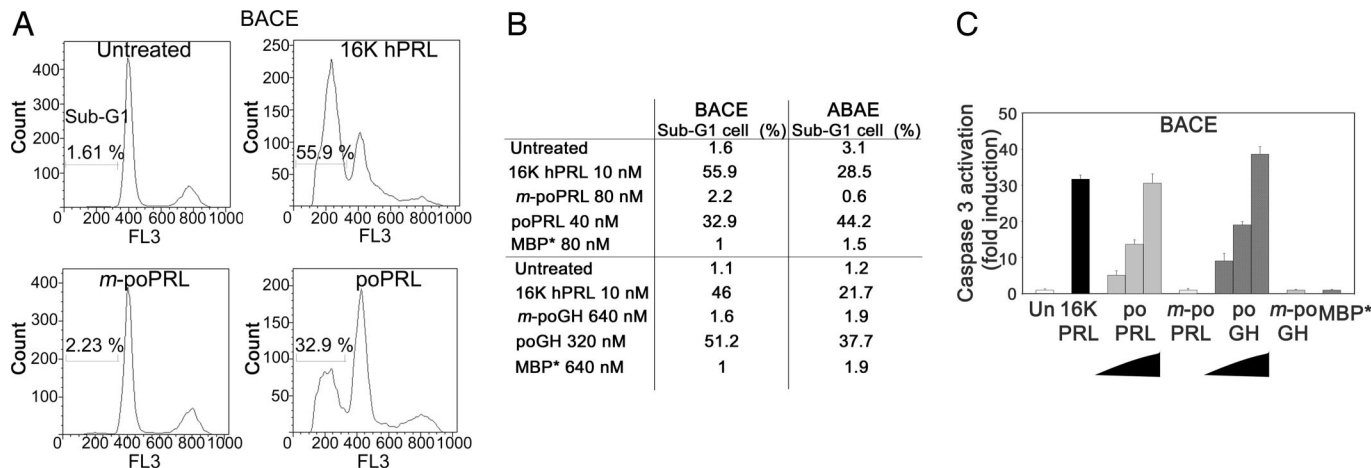
Abbreviations: 16K PRL, 16-kDa N-terminal fragment of prolactin; 16K hPRL, human 16K PRL; 16K hGH, 16-kDa N-terminal fragment of human growth hormone; MBP, maltose-binding protein; ABAE, adult bovine aortic endothelial; BACE, bovine adrenal cortex capillary endothelial; CAM, chorioallantoic membrane; SIV, simian immunodeficiency virus.

<sup>§</sup>To whom correspondence should be addressed at: Laboratory of Molecular Biology and Genetic Engineering, Center of Biomedical Integrative Genoproteomics, University of Liège, B6, Allée du 6 Août, B-4000, Sart Tilman, Belgium. E-mail: i.struman@ulg.ac.be.

© 2006 by The National Academy of Sciences of the USA







**Fig. 2.** The tilted peptides of hPRL and hGH induce apoptosis of BACE and ABAE cells by activating caspase-3. (A and B) poPRL and poGH induce endothelial cell apoptosis. FL3, red fluorescence intensity. (B) Percentage of cells entering apoptosis (sub-G<sub>1</sub> population). BACE (A and B) or ABAE (B) cells were treated with 10 nM 16K hPRL or with a fusion protein for 18 h. Cell cycle progression was monitored by measuring cell DNA content by flow cytometry analysis. (C) poPRL and poGH activate caspase-3 in endothelial cells. poPRL (10, 20, and 40 nM), poGH (80, 160, and 320 nM), or 10 nM 16K hPRL induced caspase-3 activation in endothelial cells as compared with untreated cells (Un). Control proteins, i.e., 80 nM mutated poPRL (*m*-poPRL), 640 nM mutated poGH (*m*-poGH), and 640 nM MBP\* did not. BACE cells were treated for 18 h with the indicated proteins. Each result is expressed as an enhancement factor (treated vs. untreated cells). Each bar represents the mean ± SD; *n* = 3.

of endotoxin in each peptide preparation are not related to the activity of tilted peptides. Furthermore, using the endotoxin blocker polymyxin-B, we showed that poPRL and poGH actions are independent of endotoxin contamination (Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site).

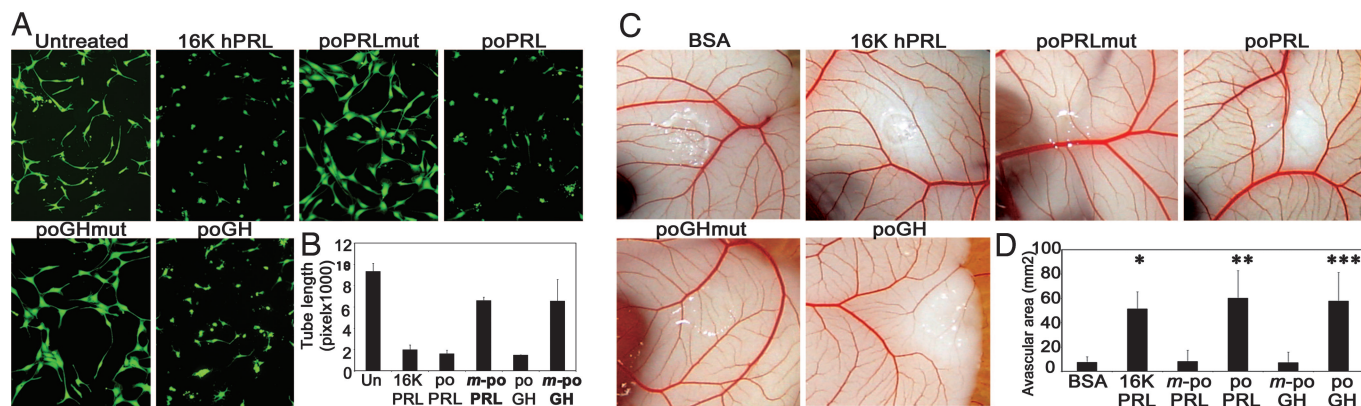
**The tilted Peptides of hPRL and hGH Inhibit Capillary Formation both *in Vitro* and *in Vivo*.** BACE cells plated between two collagen gels develop into a network of new capillary-like vessels and thus provide an *in vitro* model of capillary formation. Both poPRL and poGH prevented network formation, whereas *m*-poPRL and *m*-poGH had no effect (Fig. 3 A and B). The results were similar in three independent experiments.

We next studied the effects of these proteins on *in vivo* neovascularization in the early-stage chick chorioallantoic membrane (CAM) assay (Fig. 3 C and D). Avascular areas appeared around methylcellulose disks containing 40 μg of poPRL or

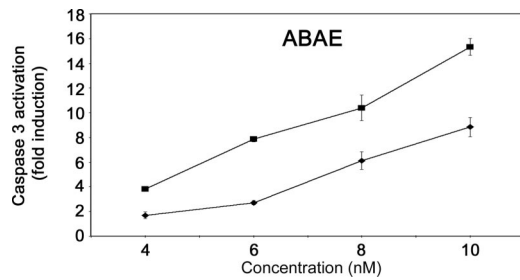
poGH, whereas *m*-poPRL and *m*-poGH had no significant effect.

**16K hPRL Mutated so as to Abolish the Hydrophobicity Gradient of Its Tilted Peptide Shows Reduced Activity.** The poPRL and poGH fusion proteins are thus potent angiogenesis inhibitors. To ascertain that the tilted peptide of 16K hPRL is responsible for its antiangiogenic action, we engineered into the 16K hPRL sequence the same mutations as in POPRLmut. Both the mutant and wild-type fragments were produced as MBP fusion proteins (respectively, MBP-16KhPRLmut and MBP-16KhPRL). In a caspase-3 assay performed on ABAE cells, caspase-3 activation was 40–50% lower in MBP-16KhPRLmut-treated than in MBP-16KhPRL-treated cells (Fig. 4). The results are representative of three similar experiments.

**The Tilted Peptides of SIV (Simian Immunodeficiency Virus) gp32 and Alzheimer's β-Amyloid Peptide Inhibit Angiogenesis.** The tilted properties of peptides of SIV gp32 and Alzheimer's β-amyloid



**Fig. 3.** The tilted peptides of hPRL and hGH inhibit capillary network formation *in vitro* and *in vivo*. BACE cells were plated between two collagen gels and treated with the indicated protein for 16 h. Living cells were labeled with calcein-AM. (A) Photographs were taken under a fluorescence microscope. (B) Quantitative analysis of network structure performed by measuring tube lengths. Each bar represents the mean ± SD, *n* = 3. (C) Representative examples of CAMs taken from a typical experiment. CAMs were treated with 40 μg of 16K hPRL, *m*-poPRL, poPRL, *m*-poGH, or poGH. (D) Quantification performed by measuring the area devoid of capillaries in the region surrounding the disk. Values are means ± SD, *n* (BSA) = 8, *n* (16K hPRL) = 7, *n* (poPRL) = 6, *n* (*m*-poPRL) = 7, *n* (poGH) = 8, and *n* (*m*-poGH) = 12. \*, *P* < 10<sup>-5</sup> vs. BSA; \*\*, *P* < 10<sup>-4</sup> vs. *m*-poPRL; \*\*\*, *P* < 10<sup>-6</sup> vs. *m*-poGH.



**Fig. 4.** 16K hPRL mutated so as to abolish the hydrophobicity gradient of its tilted peptide shows reduced activity. MBP-16KhPRLmut (■) and MBP-16KhPRL (◆). ABAE cells were treated for 18 h with the indicated protein. Each result is expressed as an enhancement factor (treated vs. untreated cells). Data are means  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

peptide have been extensively studied elsewhere. Their characteristics are shown in Table 1. Although the parent molecules display no angiogenesis-related function, we produced these tilted peptides as MBP fusion proteins (poSIV and poBamyI, respectively) and tested them for antiangiogenic activity.

Both poSIV and poBamyI were found to exert concentration-dependent inhibition of endothelial cell proliferation (Fig. 5A) and to activate caspase-3 in endothelial cells (Fig. 5B). At the highest concentration tested, proliferation decreased by 30 to 35%, and caspase-3 activation reached 30-fold with poSIV and 40-fold with poBamyI. The results are representative of three similar experiments. Both poSIV and poBamyI prevented BACE cells plated between two collagen gels from forming a capillary network (Fig. 5C and D), and both were found to inhibit blood vessel formation significantly in a bioassay where CAM was treated for 48 h with 40  $\mu$ g of fusion proteins and MBP\* (Fig. 5E and F). Invariably in these assays, MBP\* had no effect.

## Discussion

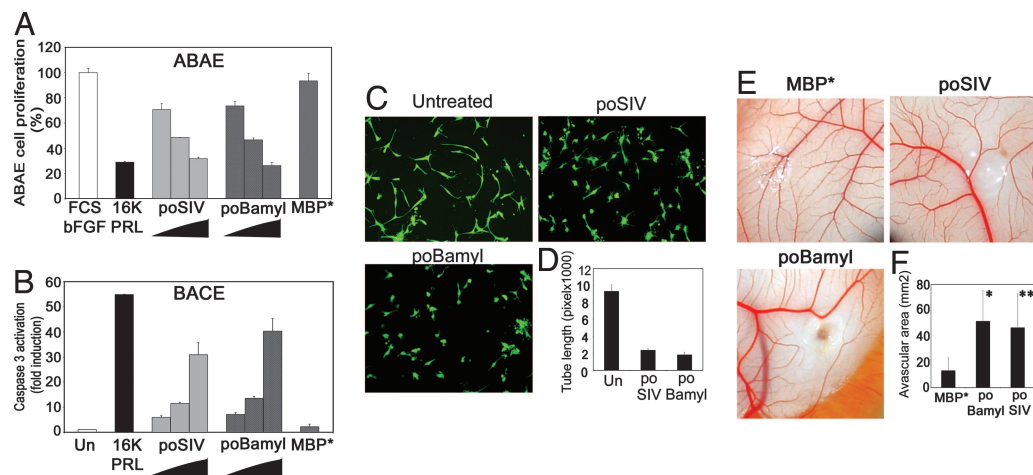
This study demonstrates the antiangiogenic activity of tilted peptides. Strikingly, not only do the tilted peptides of two known

angiogenesis inhibitors (16K hPRL and 16K hGH) display such activity, but also so do those of two proteins unrelated to angiogenesis.

Antiangiogenic effects of 16K GH and 16K PRL have been demonstrated at three levels: inhibition of endothelial cell proliferation (7), apoptosis induction (9), and inhibition of capillary formation (16, 21). Here, we show that the MBP-fused isolated tilted peptides of these molecules exert all these effects, unlike MBP-fused variants of these peptides, mutated so as to disrupt the hydrophobicity gradient.

The same mutational strategy has been used successfully to suppress the ability of tilted peptides to induce liposome fusion *in vitro* (19) and, when applied to the tilted peptides of the SIV and bovine leukemia virus (BLV) envelope glycoproteins, to reduce strongly or even abolish virus fusion processes (22, 23). Here, likewise we show that an MBP-fused variant of 16K hPRL, characterized by mutations that respect the amino acid composition but disrupt the hydrophobicity gradient in the tilted peptide region, is less antiangiogenic than MBP-fused wild-type 16K hPRL. The antiangiogenic activity of 16K hPRL is thus at least partially due to its tilted peptide.

It remains necessary to explain why the tilted peptides of 16K fragments fail to confer antiangiogenic properties to the full-length hormones. The 3D structure of hPRL has been solved recently, more precisely, by NMR spectroscopy (20). In it (Fig. 1B and C), the tilted peptide is located in the N-terminal region of the second helix and is quite buried by the three other helices and the third loop. Although the structure of 16K hPRL is not yet known, we might speculate that protease cleavage yields a fragment where the tilted peptide is more exposed. Piwnica *et al.* (12) have recently shown that cleavage of PRL by cathepsin D generates three fragments corresponding to amino acids 1–132, 1–147, and 1–150, characterized by molecular masses of 15, 16.5, and 17 kDa, respectively (12). All of them show antiangiogenic activity. The identified cleavage sites are all located in the same region of the folded protein, very close to loop 3 and to the C-terminal end of the third helix hiding the tilted peptide. This



**Fig. 5.** The tilted peptides of SIV pg32 and the  $\beta$ -amyloid peptide inhibit angiogenesis. (A) poSIV and poBamyI inhibit ABAE cell proliferation. Proliferation was assessed by measuring [ $^3$ H]thymidine uptake. Cells were treated with 1% FCS and 1 ng/ml basic FGF (bFGF) and increasing concentrations of fusion proteins (80, 160, or 320 nM poSIV or poBamyI, 640 nM MBP\*) or with 10 nM 16K hPRL (16K PRL). The data are expressed as percentages of the incorporation measured with 1% FCS and 1 ng/ml bFGF alone. (A and B) Each bar represents a mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . (B) The poSIV and poBamyI fusion proteins activate caspase-3 in BACE cells. BACE cells were treated for 18 h with the indicated protein (40, 80, or 160 nM poSIV or poBamyI). We used 10 nM 16K hPRL (16K PRL) as a positive control and 640 nM MBP\* as a negative control. Each result is expressed as an enhancement factor [treated vs. untreated (Un) cells]. (C and D) poSIV and poBamyI inhibit capillary network organization *in vitro*. BACE cells were plated between two collagen gels and treated with the indicated protein for 16 h. Living cells were labeled with calcein-AM. (C) Photographs were taken under a fluorescence microscope. (D) Quantitative analysis of network structure performed by measuring tube lengths. Each bar represents a mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . (E and F) poSIV and poBamyI inhibit capillary formation *in vivo*. (E) Representative examples of CAM are taken from a typical experiment. (F) Quantification was done by measuring the area devoid of capillaries in the region surrounding the disk. Values are means  $\pm$  SD,  $n$  (poSIV) = 6,  $n$  (poBamyI) = 8, and  $n$  (MBP) = 7. \*,  $P < 10^{-3}$  vs. MBP\*; \*\*,  $P < 10^{-2}$  vs. MBP\*.

location suggests that the tilted peptide could indeed be more exposed in the fragment than in the parent molecule.

Although poPRL and poGH are very antiangiogenic, they remain, respectively, 4 and 32 times less potent than 16K hPRL *in vitro*. An unknown in these experiments is how fusion with MBP [used as a molecular chaperone to promote peptide solubility and stability (24)] might affect the presentation of the tilted peptide. MBP is a large protein with two distinct globular domains separated by a deep groove, and at its surface lie several clusters of hydrophobic residues (25). Given the hydrophobicity profile of tilted peptides, MBP might interact with them in such a way as to hinder, to some extent, their activity.

Alternatively, the antiangiogenic action of 16K hPRL and 16K hGH might be mediated by several regions within these fragments. Isolated peptides corresponding to several distinct regions of either endostatin or tumstatin have indeed been shown to exert antiangiogenic effects (5, 26). In keeping with this hypothesis, mutations that fully abolish the activity of poPRL reduce only by  $\approx 50\%$  the activity of MBP-16K hPRL.

We show here that the tilted peptides of SIV gp32 and Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide are also antiangiogenic. When fused to MBP, both peptides inhibit endothelial cell proliferation, trigger endothelial cell apoptosis by activating caspase-3, and inhibit capillary formation *in vitro* and *in vivo*. Neither parent protein seems related to angiogenesis. SIV gp32 is an envelope glycoprotein playing an important role in viral fusion; Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide 1-42 is involved in neurotoxicity. The "oblique orientation" properties of these tilted peptides have been described at length (19, 22), but to our knowledge, data on relationships between endothelial cells and SIV gp32 or  $\beta$ -amyloid peptides are scant:  $\beta$ -amyloid peptides have been shown to cause endothelial cell death (27, 28).

Much remains to be learned about the mechanisms through which tilted peptides inhibit angiogenesis. Do these mechanisms involve protein-membrane interactions as in the case of tilted peptides in viral fusion proteins? In virus fusion proteins, the tilted peptide is involved in virus entry into the host cell. Its predicted oblique insertion across the lipid-water interface is proposed to trigger local phospholipid disorganization and to generate a new lipid phase favoring fusion (17). Modification of the insertion angle of the bovine leukemia virus (BLV) and SIV peptides is apparently sufficient to abolish fusion (22, 23).

Another possibility is that antiangiogenic activity is initiated by a protein-protein interaction, as suggested for the  $\beta$ -amyloid peptide and Apo proteins. Lins *et al.* (29) suggest that specific and complementary interactions may exist between apolipoproteins and tilted peptides (29), because the  $\beta$ -amyloid tilted peptide interacts with ApoE2 and ApoE3 but not with ApoA1, and the opposite is true of the SIV tilted peptide (30). This observation suggests that here is evidence of some specificity in the action of tilted peptides. Our results on nonendothelial tumor cells (B16F10 and MDA-MB-231, data not shown) suggest that the antiangiogenic action of poPRL and poGH targets endothelial cells specifically, as previously shown for 16K hPRL (9). Keeping in mind this specificity of action, we favor the view that an initial event in signaling should involve a protein-protein interaction rather than a protein-membrane interaction.

If a protein-protein interaction is necessary to confer activity to the tilted peptide, do the peptides act via receptors? Although Clapp *et al.* (31) identified a saturable high-affinity specific binding site for 16K PRL on endothelial cell membranes, and despite numerous efforts by different laboratories to find a receptor, until now no receptor has been found. Among angiogenesis inhibitors, 16K hPRL is not the only one whose specific receptor has not yet been identified. For example, the molecular mechanism underlying the antiangiogenic activity of endostatin, a much more extensively studied antiangiogenic factor, is not yet fully elucidated. Endostatin

has been shown to bind to  $\alpha 5\beta 1$  integrin (32), or with low affinity to glycopican-1 and glycopican-4, or to as yet unidentified receptors (33). So far, none of these binding sites can fully explain the antiangiogenic action of endostatin.

In conclusion, our results open new avenues for investigating the antiangiogenic properties of the 16K fragments of PRL/GH family members. They highlight a potential role of tilted peptides in angiogenesis. These results could have important implications for the development of novel therapies.

## Materials and Methods

**Molecular Modeling: Sequence Analysis.** Tilted peptides were detected in the hPRL and hGH protein sequences by using different methods to analyze the distribution of the mean hydrophobicity along the sequence (34). These methods are described in *Supporting Text*, which is published as supporting information on the PNAS web site.

**Membrane Insertion.** We used IMPALA (Integral Membrane Protein and Lipid Association), developed in ref. 35, to insert peptides 3D constructed as an  $\alpha$ -helix into an implicit bilayer. IMPALA simulates the insertion of any molecule (protein, peptide, or drug) into a bilayer by adding energy restraint functions to the usual energy description of molecules (35, 36).

The position of the structure with the lowest restraint values is considered the most stable in the bilayer. This method is discussed in *Supporting Text*.

**Production of Recombinant Proteins.** Recombinant 16K hPRL was produced in *E. coli* as described (10). Oligonucleotides encoding tilted and mutated peptides were inserted into the pMal-C2x plasmid at the 3' end of the MBP coding sequence (New England Biolabs, Hitchin, U.K.). A modified MBP, named MBP\*, was engineered to have a C terminus identical to that of the fusion protein but no tilted peptide sequence. MBP fusion proteins were also made with the full-length 16K hPRL sequence, mutated or not in its tilted peptide region. All recombinant fusion proteins were produced in *E. coli* as soluble proteins. The cells were disrupted, and soluble proteins were recovered by centrifugation. The proteins were first purified by affinity chromatography on amylose resin (New England Biolabs) and then by anion exchange chromatography (Hitrap Q; Amersham Pharmacia Biotech, Arlington Heights, IL) according to the manufacturer's instructions. In each protein preparation, the endotoxin level was lowered to  $<175$  endotoxin units/mg (as quantified by the "endotoxin testing service" at Cambrex Biosciences, Verviers, Belgium) by means of an endotoxin affinity chromatography on EndoTrap resin (Profos, Regensburg, Germany).

**Cell Cultures.** BACE and ABAE cells were isolated as described (11, 37).

**Synthesis of the PRL Tilted Peptide (POPRL).** The tilted peptide of 16K hPRL was chemically synthesized by Eurogentec S.A. (Seraing, Belgium). Its sequence is FLSLIVSILRSWNE. The peptide is N-acetylated and C-amidated.

**Liposome Fusion Experiments.** Large unilamellar vesicles (LUVs) were prepared and the lipid phase fusion assay was performed as described in ref. 18 and in *Supporting Text*.

**Endothelial Cell Proliferation Assay.** ABAE cells were growth-arrested by contact inhibition for 48 h and plated at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well (in 24-well plates) in 0.5 ml of 1% FCS/DMEM. They were treated with 1 ng/ml basic FGF (bFGF) and the specified recombinant protein at the indicated dose for 16 h. Then, they were incubated with [methyl- $^3$ H]-

thymidine 5' triphosphate (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, U.K.), and measurement of [<sup>3</sup>H]thymidine incorporation was performed as described in ref. 11.

**DNA Fragmentation Assay.** BACE or ABAE cells were plated at a density of  $3.5 \times 10^5$  cells per 5-cm plate in 5 ml of 10% FCS/DMEM. They were treated or not with increasing concentrations of a recombinant protein for 18 h, then harvested by trypsinization, washed with ice-cold PBS, and fixed for 3 h at 4°C with 80% ethanol in PBS. After centrifugation followed by a 15-min incubation at 37°C in PBS containing 50 μg/ml propidium iodide and 300 ng/ml RNase (Boehringer Mannheim, Ingelheim, Germany), the cells were analyzed with a Coulter EPICS XL flow cytometer equipped with an argon laser emitting at 488 nm (Coulter, Hialeah, FL). Graphical and population analyses were performed with FlowJo 6.01 software (TreeStar, San Carlos, CA).

**Caspase-3 Assay.** BACE or ABAE cells were plated at a density of  $2 \times 10^4$  cells per well (in 24-well plates) in 0.5 ml of 10% FCS/DMEM. After 24 h, they were treated for 18 h with the specified protein at the indicated dose. Caspase-3 activity was measured with the CasPACE Assay System, Fluorimetric (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions.

**In Vitro Capillary Formation.** A collagen gel assay for angiogenesis was performed as described (38) with some modifications. Briefly, 5 vol of rat tail collagen (4 mg/ml; Serva, Heidelberg, Germany), 10× M199 medium (1 vol), and 500 mM NaHCO<sub>3</sub> (1

vol), PBS (4 vol) were mixed on ice. Two hundred microliters of this mixture was poured per well (of 24-well plates) and allowed to gel at 37°C for 2 h. BACE cells (200 cells per well) were plated, overlaid with a second gel layer, and incubated with 500 μl of 10% FCS/DMEM for 16 h with the specified recombinant protein. The cells were incubated with calcein-AM (2 μM). Quantitative analysis of the network structure was performed by measuring tube lengths on a PC computer with Scion Image Software (Scion, Frederick, MD). Each sample was analyzed in triplicate, and a representative field of each well was examined at ×200 magnification. Pictures were made with an Olympus fluorescence microscope and camera linked to the Analysis software (Soft Imaging System GmbH, Münster, Germany).

**In Vivo Early-Stage Chick CAM Bioassay.** On day 3 of development, fertilized chick embryos were removed from their shells, placed in Petri dishes, and incubated at 37°C. On the 7th day, disks (5 mm) of methylcellulose (0.5%, Sigma) containing 40 μg of recombinant protein and 4 μg of BSA were placed on the chick CAM. After 48 h, white India ink was injected into the chorioallantoic sac, and the avascular area was determined with Analysis software (Soft Imaging System GmbH) and by phase analysis allowing automatic quantitative evaluation of the area.

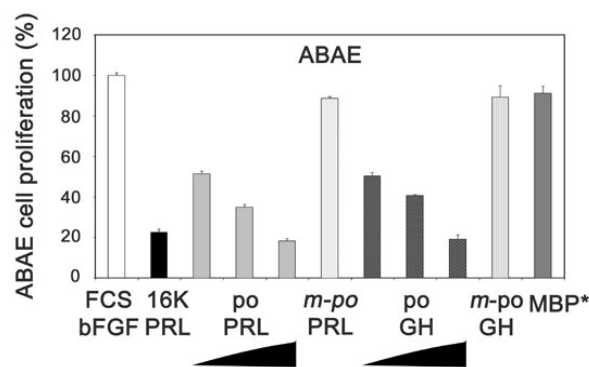
This work was supported by grants from the Fonds pour la Recherche Industrielle et Agricole (FRIA) and Télévie (to N.-Q.-N.N. and S.P.T.) and from the Fonds National pour la Recherche Scientifique (FNRS), the Fédération Belge Contre le Cancer, and the Université de Liège (Fonds Spéciaux). L.L. and R.B. are, respectively, Research Associate and Research Director at the FNRS of Belgium.

- Carmeliet P (2005) *Nature* 438:932–936.
- Cao Y (2001) *Int J Biochem Cell Biol* 33:357–369.
- Jouan V, Canron X, Alemany M, Caen JP, Quentin G, Plouet J, Bikfalvi A (1999) *Blood* 94:984–993.
- Wickstrom SA, Alitalo K, Keski-Oja J (2004) *J Biol Chem* 279:20178–20185.
- Maeshima Y, Yerramalla UL, Dhanabal M, Holthaus KA, Barbashov S, Kharbanda S, Reimer C, Manfredi M, Dickerson WM, Kalluri R (2001) *J Biol Chem* 276:31959–31968.
- D'Angelo G, Struman I, Martial JA, Weiner RI (1995) *Proc Natl Acad Sci USA* 92:6374–6378.
- D'Angelo G, Martini JF, Iiri T, Fantl WJ, Martial JA, Weiner RI (1999) *Mol Endocrinol* 13:692–704.
- Lee H, Struman I, Clapp C, Martial JA, Weiner RI (1998) *Endocrinology* 139:3696–3703.
- Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI (2000) *Mol Endocrinol* 14:1536–1549.
- Tabruyn SP, Sorlet CM, Rentier-Delrue F, Bours V, Weiner RI, Martial JA, Struman I (2003) *Mol Endocrinol* 17:1815–1823.
- Tabruyn SP, Nguyen NQ, Cornet AM, Martial JA, Struman I (2005) *Mol Endocrinol* 19:1932–1942.
- Piwnica D, Touraine P, Struman I, Tabruyn S, Bolbach G, Clapp C, Martial JA, Kelly PA, Goffin V (2004) *Mol Endocrinol* 18:2522–2542.
- Bentzien F, Struman I, Martini JF, Martial JA, Weiner RI (2001) *Cancer Res* 61:7356–7362.
- Kim J, Luo W, Chen DT, Earley K, Tunstead J, Yu-Lee LY, Lin SH (2003) *Cancer Res* 63:386–393.
- Pan H, Nguyen NQ, Yoshida H, Bentzien F, Shaw LC, Rentier-Delrue F, Martial JA, Weiner RI, Struman I, Grant MB (2004) *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2413–2419.
- Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96:1246–1251.
- Brasseur R, Pillot T, Lins L, Vandekerckhove J, Rosseneu M (1997) *Trends Biochem Sci* 22:167–171.
- Lins L, Charlotiaux B, Thomas A, Brasseur R (2001) *Proteins* 44:435–447.
- Pillot T, Goethals M, Vanloo B, Talussot C, Brasseur R, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Lins L (1996) *J Biol Chem* 271:28757–28765.
- Teilum K, Hoch JC, Goffin V, Kinet S, Martial JA, Kragelund BB (2005) *J Mol Biol* 351:810–823.
- Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delrue F, Weiner RI (1993) *Endocrinology* 133:1292–1299.
- Horth M, Lambrecht B, Khim MC, Bex F, Thiriart C, Ruyschaert JM, Burny A, Brasseur R (1991) *EMBO J* 10:2747–2755.
- Voneche V, Callebaut I, Kettmann R, Brasseur R, Burny A, Portetelle D (1992) *J Biol Chem* 267:15193–15197.
- Bach H, Mazor Y, Shaky S, Shoham-Lev A, Berdichevsky Y, Gutnick DL, Benhar I (2001) *J Mol Biol* 312:79–93.
- Spurlino JC, Lu GY, Quioco FA (1991) *J Biol Chem* 266:5202–5219.
- Chillemi F, Francescato P, Ragg E, Cattaneo MG, Pola S, Vicentini L (2003) *J Med Chem* 46:4165–4172.
- Xu J, Chen S, Ku G, Ahmed SH, Xu J, Chen H, Hsu CY (2001) *J Cereb Blood Flow Metab* 21:702–710.
- Suhara T, Magrane J, Rosen K, Christensen R, Kim HS, Zheng B, McPhie DL, Walsh K, Querfurth H (2003) *Neurobiol Aging* 24:437–451.
- Lins L, Thomas-Soumarmon A, Pillot T, Vandekerckhove J, Rosseneu M, Brasseur R (1999) *J Neurochem* 73:758–769.
- Pillot T, Goethals M, Vanloo B, Lins L, Brasseur R, Vandekerckhove J, Rosseneu M (1997) *Eur J Biochem* 243:650–659.
- Clapp C, Weiner RI (1992) *Endocrinology* 130:1380–1386.
- Wickstrom SA, Alitalo K, Keski-Oja J (2002) *Cancer Res* 62:5580–5589.
- Karumanchi SA, Jha V, Ramchandran R, Karihaloo A, Tsiokas L, Chan B, Dhanabal M, Hanai JI, Venkataraman G, Shriver Z, et al. (2001) *Mol Cell* 7:811–822.
- Brasseur R (2000) *Mol Membr Biol* 17:31–40.
- Ducarme P, Rahman M, Brasseur R (1998) *Proteins* 30:357–371.
- Lins L, Charlotiaux B, Heinen C, Thomas A, Brasseur R (2006) *Biophys J* 90:470–479.
- Gospodarowicz D, Massaglia S, Cheng J, Fujii DK (1986) *J Cell Physiol* 127:121–136.
- Cavallaro U, Tenan M, Castelli V, Perilli A, Maggiano N, Van Meir EG, Montesano R, Soria MR, Pepper MS (2001) *J Cell Biochem* 82:619–633.
- Eisenberg D, Weiss RM, Terwilliger TC (1982) *Nature* 299:371–374.

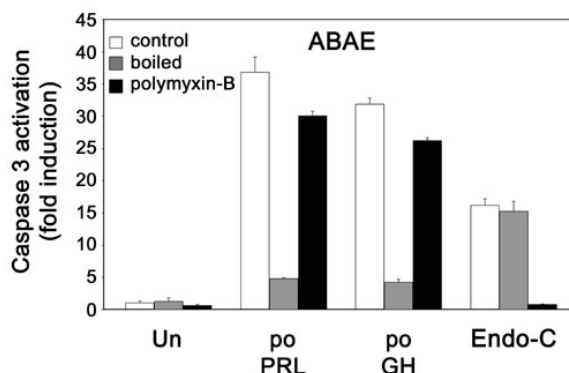
« *Prolactin/Growth Hormone–Derived Antiangiogenic Peptides Highlight a Potential Role of Tilted Peptides in Angiogenesis* »

Nguyen NQN, Tabruyn S, Lins L, Lion M, Cornet A, Lair F, Rentier-Delrue F, Brasseur R, Martial JA and Struman I. *Proceedings of the National Academy of Sciences* (103)39: 14319-14324. 2006.

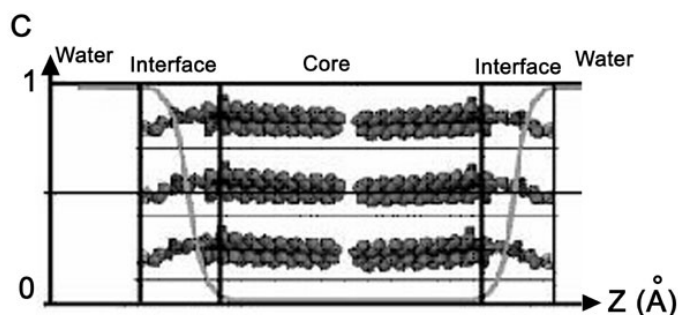
**Supporting Information**



**Fig. 6.** The tilted peptides of hPRL and hGH inhibit ABAE cell proliferation. Shown is the ability of poPRL and poGH to inhibit ABAE cell proliferation as assessed by measuring [<sup>3</sup>H]thymidine uptake. Cells were treated with 1% FCS and 1 ng/ml bFGF and increasing concentrations of fusion proteins (10, 20, or 40 nM poPRL; 80, 160, or 320 nM poGH; 80 nM *m*-poPRL; 640 nM *m*-poGHmut, 640 nM MBP\*) or with 10 nM 16K hPRL (16K PRL). Data are expressed as percentages of the incorporation measured in the presence of 1% FCS and 1 ng/ml bFGF alone. Each bar represents the mean ± SD of the measurements performed on triplicate wells.



**Fig. 7.** The effect of tilted peptides of hPRL and hGH is independent of endotoxin. ABAE cells were treated for 18 h with 160 nM poPRL and 320 nM poGH or 10 EU/ml endotoxin (Endo-C). Peptides and endotoxin were pretreated with polymyxin-B or boiling 2 min before being added to the cells. Each bar represents the mean ± SD; *n* = 3.



**Fig. 8.** Representation of the  $C(z)$  function (gray line) varying between 0 and 1. Lipids are depicted for a sake of understanding but are not physically present in the IMPALA simulation.

## Supporting Text

### Supporting Materials and Methods

**Molecular Modeling.** The following analyses were performed on the human prolactin and growth hormone sequences to identify the tilted peptide regions.

*Sequence analysis.* Tilted peptides were detected in a protein sequence by using different methods (1) to analyze the distribution of the mean hydrophobicity along the sequence.

*Hydrophobic cluster analysis (HCA).* This method involves analyzing the shapes and positions of hydrophobic clusters in a given protein sequence (2). To generate hydrophobic clusters, the sequence is coiled around a cylinder, simulating an  $\alpha$ -helix. The cylinder is then cut along the axis, projected on a plane, and duplicated to restore the environment of each amino acid. Hydrophobic residues are blackened. This method reveals secondary structure patterns (1, 2).

*Jähnig's method.* The Jähnig profile allows detection of amphipathic patterns in a sequence (3). The mean hydrophobicity is calculated by moving a 17-residue window along the sequence, attributing the value to the central residue. In this method, more importance is given to residues adjacent to the central residue in terms of secondary structure.

The equation for an alpha helix is as follows:

$$\langle H\alpha(i) \rangle = [h(i\pm 8) + h(i\pm 7) + 1/4 h(i\pm 5) + h(i\pm 4) + 3/4 h(i\pm 3) + 1/2 h(i\pm 1) + h(i)] / 10$$

*3D construction of the peptides.* The peptides were then 3D constructed as  $\alpha$ -helices attributing the  $\phi/\psi$  angle values corresponding to a classical  $\alpha$ -helix using Hyperchem 6.0 (Hypercube Inc., Gainesville, FL). Their conformation was minimized by the Polak-Ribiere algorithm in an AMBER force field with a gradient delta inferior to 0.1 Kcal/(Å•mol).

**Membrane Insertion.** We used IMPALA (Integral Membrane Protein and Lipid Association) developed by Ducarme *et al.* (4) to insert peptides into an implicit bilayer. IMPALA simulates the insertion of any molecule (protein, peptide, or drug) into a bilayer by adding energy restraint functions to the usual energy description of molecules.

The lipid bilayer is defined by  $C_{(z)}$ , an empirical function describing membrane properties (Fig. 8). This function is constant in the membrane plane ( $x$  and  $y$  axes) but varies along the bilayer thickness ( $z$  axis) and, more specifically, at the lipid/water interface corresponding to the transition between lipid acyl chains and the hydrophilic aqueous environment. This function can be seen as the water

concentration, varying between 1 (outside the membrane) and 0 (in the membrane core). It is defined by :

$$C(z) = 1 - \frac{1}{1 + e^{\alpha(z-z_0)}}$$

where  $\alpha$  is a constant equal to 1.99,  $z_0$  corresponds to the middle of polar heads, and  $z$  is the position in the membrane.

To mimic the membrane properties, two restraints are added, one simulating the bilayer hydrophobicity ( $E_{\text{pho}}$ ), and the other, the lipid perturbation ( $E_{\text{lip}}$ ).

The hydrophobicity of the membrane is simulated by  $E_{\text{pho}}$  :

$$E_{\text{pho}} = - \sum_{i=1}^N S_{(i)} E_{\text{tr}(i)} C(z)$$

where  $N$  is the total number of atoms,  $S_{(i)}$  the solvent-accessible surface of the  $i$  atom,  $E_{\text{tr}(i)}$  its transfer energy per unit of accessible surface area, and  $C_{(z)}$  the  $z$  position of atom  $i$ .

This term constrains accessible hydrophobic atoms to get into the membrane whereas hydrophilic atoms do not.

The perturbation of the bilayer caused by insertion of the molecule is simulated by the lipid perturbation restraint ( $E_{\text{lip}}$ ):

$$E_{\text{lip}} = a_{\text{lip}} \sum_{i=1}^N S_{(i)} (1 - C(z))$$

where  $a_{\text{lip}}$  is an empirical factor set at  $0.018 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{\AA}^{-2}$ .

This restraint tends to minimize the contact surface between the peptide and the membrane.

The total restraint applied to the peptide that inserts into the membrane becomes equal to:

$$E_{\text{tot}} = E_{\text{pho}} + E_{\text{lip}}$$

The interaction of the peptide with the modeled bilayer is simulated by a Monte-Carlo (MC) procedure of 50,000 steps at 298 K. Three degrees of freedom are tested (two rotations and one translation along the  $z$  axis). Maximal rotations of  $5^\circ$  and translations of  $1 \text{ \AA}$  are allowed per step.

The position of the structure with the lowest total restraint ( $E_{\text{tot}}$ ) value is considered the most stable in the bilayer.

**Preparation of Large Unilamellar Vesicles (LUVs).** LUVs were prepared by extrusion. Briefly, dry lipid films composed of 26.6% (wt/wt) phosphatidylcholine (PC), 26.6% phosphatidylethanolamine (PE), 26.6% sphingomyelin (SM), and 20.2% cholesterol were hydrated for 1 h at  $37^\circ\text{C}$ . The suspension was subjected to five freeze-and-thaw cycles followed by 10 successive passages through

two polycarbonate filters (0.08  $\mu\text{m}$  pore diameter) under 20-bar nitrogen pressure. The phospholipid concentration was determined by phosphorus analysis (Barlett's method).

**Lipid Phase Fusion Assay.** Lipid phase fusion was measured by monitoring the fluorescence of a lipophilic probe, R18. When R18 is incorporated into liposomes at high surface density, its fluorescence is attenuated. Upon dilution of the probe through fusion of labeled and unlabeled liposome membranes, quenching is relieved and R18 fluorescence increases. Labeled liposomes were obtained by incorporating R18 into the dry lipid film at the concentration of 6.3% total lipid weight. Labeled and unlabeled liposomes were mixed at a weight ratio of 1:4 and a final concentration of 50  $\mu\text{M}$  in 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.01% EDTA, 1 mM  $\text{NaN}_3$ , pH 8. Incubation of labeled and unlabeled vesicles in buffer alone did not modify the fluorescence intensity.

Fluorescence was measured at room temperature (excitation  $\lambda$ , 560 nm; emission  $\lambda$ , 590 nm) on a PerkinElmer (Wellesley, MA) LS-50B fluorimeter.

**Endotoxin Controls.** Recombinant proteins or 10 endotoxin units (EU)/ml (LPS) were preincubated for 10 min at 37°C with Polymyxin-B (Amresco, Solon, OH), an antibiotic that binds and inactivates LPS, at a final concentration of 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Alternatively, peptide activity was destroyed by boiling for 2 min before peptides were added to the culture cells.

## Supporting Results

**The Tilted Peptides of Human Prolactin (hPRL) and Human Growth Hormone (hGH) Inhibit Endothelial Cell Proliferation.** Because endothelial cell proliferation is an important step in angiogenesis, we tested the ability of the poPRL and poGH to inhibit it. For this assay, we measured [ $^3\text{H}$ ]thymidine incorporation into the DNA of synchronized adult bovine aortic endothelial (ABAE) cells treated for 16 h with 1% FCS, 1 ng/ml basic FGF (bFGF), and different concentrations of poPRL or poGH. The data, expressed as percentages of the incorporation measured in untreated ABAE cells, show that poPRL and poGH both cause a significant and concentration-dependent decrease in cell proliferation (Fig. 6). The 80% inhibition observed at the highest concentrations tested (40 nM poPRL or 320 nM poGH) is similar to the effect of 10 nM 16K hPRL (the 16-kDa N-terminal fragment of human prolactin). Proliferation is unaffected by *m*-poPRL, *m*-poGH, and MBP\* even at twice the highest concentrations used with poPRL and poGH. The results are representative of three similar experiments.

**The Endotoxin Contents in Recombinant Proteins.** The amounts of endotoxin present in the recombinant proteins are as follows: 16K hPRL, 3,000 EU/mg; poPRL, 64 EU/mg; *m*-poPRL, 7 EU/mg; poGH, 37 EU/mg; *m*-poGH, <5 EU/mg; poSIV, 123 EU/mg; poBamyl, 170 EU/mg; maltose-binding protein (MBP), 6 EU/mg). All measures were performed by the European Endotoxin Service (Cambrex, Verviers, Belgium). For each sample, an additional test was performed in the presence of a positive control (spike test) to make sure that the sample did not contain inhibitors that could make the results false.

**The Effect of Tilted Peptides of hPRL and hGH Is Independent of Endotoxin.** Because the peptides were produced in *Escherichia coli*, it was important to demonstrate that the activity of the preparations used was not caused by endotoxins, bacterial contaminants. The peptides (160 nM poPRL and 320 nM poGH) were still active after pretreatment with the endotoxin blocker polymyxin-B (10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) but lost their activity in a caspase 3 activity assay when they were boiled for 2 min (Fig. 7). The concentration of the polymyxin-B added is sufficient to inhibit activity of 10 EU/ml endotoxin that is  $\approx 20$  times the amount of endotoxin contained in the highest concentrations tested of the poPRL



peptides. These results demonstrate that the observed effects of the peptides were not due to endotoxin. The results were similar in three independent experiments.

1. Brasseur R. (2000) *Mol Membr Biol* 17:31-40.
2. Gaboriaud C, Bissery V, Benchetrit T, Mornon JP (1987) *FEBS Lett* 224:149-155.
3. Jahnig F (1990) *Trends Biochem Sci* 15:93-95.
4. Ducarme P, Rahman M, Brasseur R (1998) *Proteins* 30:357-371.



# Conclusion générale

---



## Conclusion générale

Au cours de ce doctorat, nous avons construit un vecteur adénoviral qui nous a permis d'exprimer la hPRL 16K. Grâce à l'utilisation de ce vecteur, nous montrons que la hPRL 16K est capable d'inhiber la néovascularisation pathologique dans un modèle murin de rétinopathie. Nous montrons aussi, pour la première fois, que la hPRL 16K est non seulement efficace dans l'inhibition de la croissance tumorale mais aussi dans celle du développement des métastases. Cette capacité de la hPRL 16K à prévenir l'angiogenèse dans un modèle de rétinopathie et dans des modèles tumoraux font de ce peptide un candidat potentiel pour d'éventuelles applications thérapeutiques.

De plus, nous avons identifié un peptide oblique présent dans chacun des fragments N-terminaux de 16 kDa de la famille PRL/GH. Les peptides obliques de la hPRL 16K et de la hGH 16K se sont révélés antiangiogènes. Celui de la hPRL 16K est en partie responsable de l'activité antiangiogène de sa protéine parente. Nous montrons également que le peptide oblique de la protéine d'enveloppe gp32 du virus SIV et celui du peptide A $\beta$  d'Alzheimer présentent des effets antiangiogènes. Ces résultats mettent pour la première fois en évidence l'effet antiangiogène de peptides obliques et ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension du mode d'action de la hPRL 16K.



# Bibliographie

---





---

## Bibliographie

- Alitalo, K. and Carmeliet, P. (2002). "Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease." Cancer Cell **1**(3): 219-27.
- Alitalo, K., Tammela, T. and Petrova, T. V. (2005). "Lymphangiogenesis in development and human disease." Nature **438**(7070): 946-53.
- Alsat, E., Guibourdenche, J., Couturier, A. and Evain-Brion, D. (1998). "Physiological role of human placental growth hormone." Mol Cell Endocrinol **140**(1-2): 121-7.
- Anderson, L. L., Jeftinija, S. and Scanes, C. G. (2004). "Growth hormone secretion: molecular and cellular mechanisms and in vivo approaches." Exp Biol Med (Maywood) **229**(4): 291-302.
- 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): 2947-53.
- Aston, R. and Ivanyi, J. (1983). "Antiangenic receptor binding and mitogenic activity of proteolytic fragments of human growth hormone." Embo J **2**:493-497.
- Bach, H., Mazor, Y., Shaky, S., Shoham-Lev, A., Berdichevsky, Y., Gutnick, D. L. and Benhar, I. (2001). "Escherichia coli maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies." J Mol Biol **312**(1): 79-93.
- 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): 935-8.
- Bentzien, F., Struman, I., Martini, J. F., Martial, J. A. and Weiner, R. I. (2001). "Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice." Cancer Res **61**(19): 7356-62.
- Bergers, G. and Benjamin, L. E. (2003). "Tumorigenesis and the angiogenic switch." Nat Rev Cancer **3**(6): 401-10.
- Bikfalvi, A. (2003). "[Tumor angiogenesis]." Bull Cancer **90**(5): 449-58.
- Blazquez, C., Casanova, M. L., Planas, A., Del Pulgar, T. G., Villanueva, C., Fernandez-Acenero, M. J., Aragonés, J., Huffman, J. W., Jorcano, J. L. and Guzman, M. (2003). "Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids." Faseb J **17**(3): 529-31.

- 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): 225-68.
- Brasseur, R. (2000). "Tilted peptides: a motif for membrane destabilization (hypothesis)." Mol Membr Biol **17**(1): 31-40.
- Brasseur, R., Pillot, T., Lins, L., Vandekerckhove, J. and Rosseneu, M. (1997). "Peptides in membranes: tipping the balance of membrane stability." Trends Biochem Sci **22**(5): 167-71.
- Browder, T., Butterfield, C. E., Kraling, B. M., Shi, B., Marshall, B., O'Reilly, M. S. and Folkman, J. (2000). "Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer." Cancer Res **60**(7): 1878-86.
- Byrne, A. M., Bouchier-Hayes, D. J. and Harmey, J. H. (2005). "Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF)." J Cell Mol Med **9**(4): 777-94.
- Cao, Y. (2001). "Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications." Int J Biochem Cell Biol **33**(4): 357-69.
- Cao, Y. (2004). "Antiangiogenic cancer therapy." Semin Cancer Biol **14**(2): 139-45.
- Carmeliet, P. (2000). "Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis." Nat Med **6**(4): 389-95.
- Carmeliet, P. (2003). "Angiogenesis in health and disease." Nat Med **9**(6): 653-60.
- Carmeliet, P. (2004). "Manipulating angiogenesis in medicine." J Intern Med **255**(5): 538-61.
- Carmeliet, P. (2005). "Angiogenesis in life, disease and medicine." Nature **438**(7070): 932-6.
- Carmeliet, P. and Jain, R. K. (2000). "Angiogenesis in cancer and other diseases." Nature **407**(6801): 249-57.
- Chillemi, F., Francescato, P., Ragg, E., Cattaneo, M. G., Pola, S. and Vicentini, L. (2003). "Studies on the structure-activity relationship of endostatin: synthesis of human endostatin peptides exhibiting potent antiangiogenic activities." J Med Chem **46**(19): 4165-72.
- Chilton, B. S. and Hewetson, A. (2005). "Prolactin and growth hormone signaling." Curr Top Dev Biol **68**: 1-23.
- Clapp, C., Aranda, J., Gonzalez, C., Jeziorski, M.C. and de la Escalera G.M. (2006). "Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function." Trends in Endocr and Metab. *In press*
- Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delrue, F. and Weiner, R. I. (1993). "The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis." Endocrinology **133**(3): 1292-9.

- Clapp, C., Torner, L., Gutierrez-Ospina, G., Alcantara, E., Lopez-Gomez, F. J., Nagano, M., Kelly, P. A., Mejia, S., Morales, M. A. and Martinez de la Escalera, G. (1994). "The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(22): 10384-8.
- 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): 1380-6.
- Conway, E. M., Collen, D. and Carmeliet, P. (2001). "Molecular mechanisms of blood vessel growth." Cardiovasc Res **49**(3): 507-21.
- Cunningham, B. C., Jhurani, P., Ng, P. and Wells, J. A. (1989). "Receptor and antibody epitopes in human growth hormone identified by homolog-scanning mutagenesis." Science **243**(4896): 1330-6.
- Cursiefen, C., Chen, L., Saint-Geniez, M., Hamrah, P., Jin, Y., Rashid, S., Pytowski, B., Persaud, K., Wu, Y., Streilein, J. W. and Dana, R. (2006). "Nonvascular VEGF receptor 3 expression by corneal epithelium maintains avascularity and vision." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(30): 11405-10.
- D'Angelo, G., Martini, J. F., Iiri, T., Fantl, W. J., Martial, J. A. 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. A. 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): 6374-8.
- Dadras, S. S., Paul, T., Bertoncini, J., Brown, L. F., Muzikansky, A., Jackson, D. G., Ellwanger, U., Garbe, C., Mihm, M. C. and Detmar, M. (2003). "Tumor lymphangiogenesis: a novel prognostic indicator for cutaneous melanoma metastasis and survival." Am J Pathol **162**(6): 1951-60.
- Das, A. and McGuire, P. G. (2003). "Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition." Prog Retin Eye Res **22**(6): 721-48.
- Dawson, D. W., Volpert, O. V., Gillis, P., Crawford, S. E., Xu, H., Benedict, W. and Bouck, N. P. (1999). "Pigment epithelium-derived factor: a potent inhibitor of angiogenesis." Science **285**(5425): 245-8.
- de Vos, A. M., Ultsch, M. and Kossiakoff, A. A. (1992). "Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex." Science **255**(5042): 306-12.
- Dhanabal, M., Ramchandran, R., Waterman, M. J., Lu, H., Knebelmann, B., Segal, M. and Sukhatme, V. P. (1999). "Endostatin induces endothelial cell apoptosis." J Biol Chem **274**(17): 11721-6.

- Dixelius, J., Cross, M. J., Matsumoto, T. and Claesson-Welsh, L. (2003). "Endostatin action and intracellular signaling: beta-catenin as a potential target?" Cancer Lett **196**(1): 1-12.
- Donnini, S., Cantara, S., Morbidelli, L., Giachetti, A. and Ziche, M. (2006). "FGF-2 overexpression opposes the beta amyloid toxic injuries to the vascular endothelium." Cell Death Differ **13**(7): 1088-96.
- Drixler, T. A., Borel Rinkes, I. H., Ritchie, E. D., Treffers, F. W., van Vroonhoven, T. J., Gebbink, M. F. and Voest, E. E. (2001). "Angiostatin inhibits pathological but not physiological retinal angiogenesis." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(13): 3325-30.
- Duenas, Z., Rivera, J. C., Quiroz-Mercado, H., Aranda, J., Macotela, Y., Montes de Oca, P., Lopez-Barrera, F., Nava, G., Guerrero, J. L., Suarez, A., De Regil, M., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (2004). "Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression." Invest Ophthalmol Vis Sci **45**(7): 2049-55.
- Duenas, Z., Torner, L., Corbacho, A. M., Ochoa, A., Gutierrez-Ospina, G., Lopez-Barrera, F., Barrios, F. A., Berger, P., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (1999). "Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules." Invest Ophthalmol Vis Sci **40**(11): 2498-505.
- Dupuy, E. and Tobelem, G. (2003). "[Mechanisms and role of lymphangiogenesis in cancer metastasis]." Bull Cancer **90**(7): 595-9.
- Eliceiri, B. P., Paul, R., Schwartzberg, P. L., Hood, J. D., Leng, J. and Cheresh, D. A. (1999). "Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability." Mol Cell **4**(6): 915-24.
- Felbor, U., Dreier, L., Bryant, R. A., Ploegh, H. L., Olsen, B. R. and Mothes, W. (2000). "Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII." Embo J **19**(6): 1187-94.
- Feron, O. (2004). "Targeting the tumor vascular compartment to improve conventional cancer therapy." Trends Pharmacol Sci **25**(10): 536-42.
- 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. and Kerbel, R. S. (2005). "Angiogenesis as a therapeutic target." Nature **438**(7070): 967-74.
- Ferreras, M., Felbor, U., Lenhard, T., Olsen, B. R. and Delaisse, J. (2000). "Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases." FEBS Lett **486**(3): 247-51.
- Fidler, I. J. (2003). "The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited." Nat Rev Cancer **3**(6): 453-8.
- Folkman, J. (1971). "Tumor angiogenesis: therapeutic implications." N Engl J Med **285**(21): 1182-6.

- Folkman, J. (2004). "Endogenous angiogenesis inhibitors." *Apmis* **112**(7-8): 496-507.
- Folkman, J. (2006). "Angiogenesis." *Annu Rev Med* **57**: 1-18.
- Folkman, J. (2006). "Antiangiogenesis in cancer therapy--endostatin and its mechanisms of action." *Exp Cell Res* **312**(5): 594-607.
- Fong, D. S., Aiello, L., Gardner, T. W., King, G. L., Blankenship, G., Cavallerano, J. D., Ferris, F. L., 3rd and Klein, R. (2004). "Retinopathy in diabetes." *Diabetes Care* **27 Suppl 1**: S84-7.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A. and Nagy, G. (2000). "Prolactin: structure, function, and regulation of secretion." *Physiol Rev* **80**(4): 1523-631.
- Fuglsang, J. and Ovesen, P. (2006). "Aspects of placental growth hormone physiology." *Growth Horm IGF Res* **16**(2): 67-85.
- Fukumoto, S., Morifuji, M., Katakura, Y., Ohishi, M. and Nakamura, S. (2005). "Endostatin inhibits lymph node metastasis by a down-regulation of the vascular endothelial growth factor C expression in tumor cells." *Clin Exp Metastasis* **22**(1): 31-8.
- Gab, E. (2006). "The antiangiogenic 16 kDa fragment of human prolactin is a membrane active protein. *Mémoire de licence*. Université de Copenhague.
- Gariano, R. F. and Gardner, T. W. (2005). "Retinal angiogenesis in development and disease." *Nature* **438**(7070): 960-6.
- Goffin, V., Bernichtein, S., Touraine, P. and Kelly, P. A. (2005). "Development and potential clinical uses of human prolactin receptor antagonists." *Endocr Rev* **26**(3): 400-22.
- 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.
- Goffin, V., Martial, J. A. and Summers, N. L. (1995). "Use of a model to understand prolactin and growth hormone specificities." *Protein Eng* **8**(12): 1215-31.
- 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): 5714-22.
- Gould, J., Aramburo, C., Capdevielle, M. and Scanes, C. G. (1995). "Angiogenic activity of anterior pituitary tissue and growth hormone on the chick embryo chorio-allantoic membrane: a novel action of GH." *Life Sci* **56**(8): 587-94.
- Griffioen, A. W., van der Schaft, D. W., Barendsz-Janson, A. F., Cox, A., Struijker Boudier, H. A., Hillen, H. F. and Mayo, K. H. (2001). "Anginex, a designed peptide that inhibits angiogenesis." *Biochem J* **354**(Pt 2): 233-42.

- Hall, F. T., Freeman, J. L., Asa, S. L., Jackson, D. G. and Beasley, N. J. (2003). "Intratympanic lymphatics and lymph node metastases in papillary thyroid carcinoma." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **129**(7): 716-9.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). "Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis." Cell **86**(3): 353-64.
- Handwerger, S. and Freemark, M. (2000). "The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development." J Pediatr Endocrinol Metab **13**(4): 343-56.
- Hashim, I. A., Aston, R., Butler, J., McGregor, A. M., Smith, C. R. and Norman, M. (1990). "The proportion of glycosylated prolactin in serum is decreased in hyperprolactinemic states." J Clin Endocrinol Metab **71**(1): 111-5.
- Hawighorst, T., Oura, H., Streit, M., Janes, L., Nguyen, L., Brown, L. F., Oliver, G., Jackson, D. G. and Detmar, M. (2002). "Thrombospondin-1 selectively inhibits early-stage carcinogenesis and angiogenesis but not tumor lymphangiogenesis and lymphatic metastasis in transgenic mice." Oncogene **21**(52): 7945-56.
- Hlatky, L., Hahnfeltdt, P. and Folkman, J. (2002). "Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us." J Natl Cancer Inst **94**(12): 883-93.
- Holash, J., Maisonpierre, P. C., Compton, D., Boland, P., Alexander, C. R., Zagzag, D., Yancopoulos, G. D. and Wiegand, S. J. (1999). "Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF." Science **284**(5422): 1994-8.
- Horth, M., Lambrecht, B., Khim, M. C., Bex, F., Thiriart, C., Ruyschaert, J. M., Burny, A. and Brasseur, R. (1991). "Theoretical and functional analysis of the SIV fusion peptide." Embo J **10**(10): 2747-55.
- Jackson, D., Volpert, O. V., Bouck, N. and Linzer, D. I. (1994). "Stimulation and inhibition of angiogenesis by placental proliferin and proliferin-related protein." Science **266**(5190): 1581-4.
- Jain, R. K. (2003). "Molecular regulation of vessel maturation." Nat Med **9**(6): 685-93.
- Jain, R. K. (2005). "Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy." Science **307**(5706): 58-62.
- Jouan, V., Canron, X., Alemany, M., Caen, J. P., Quentin, G., Plouet, J. and Bikfalvi, A. (1999). "Inhibition of in vitro angiogenesis by platelet factor-4-derived peptides and mechanism of action." Blood **94**(3): 984-93.
- Jussila, L. and Alitalo, K. (2002). "Vascular growth factors and lymphangiogenesis." Physiol Rev **82**(3):673-700.

Karumanchi, S. A., Jha, V., Ramchandran, R., Karihaloo, A., Tsiokas, L., Chan, B., Dhanabal, M., Hanai, J. I., Venkataraman, G., Shriver, Z., Keiser, N., Kalluri, R., Zeng, H., Mukhopadhyay, D., Chen, R. L., Lander, A. D., Hagihara, K., Yamaguchi, Y., Sasisekharan, R., Cantley, L. and Sukhatme, V. P. (2001). "Cell surface glypicans are low-affinity endostatin receptors." Mol Cell **7**(4): 811-22.

Kawauchi, H., Yasuda, A. and Rand-Weaver, M. (1990). "Evolution of prolactin and growth hormone family." Prog Clin Biol Res **342**: 47-53.

Kerbel, R. and Folkman, J. (2002). "Clinical translation of angiogenesis inhibitors." Nat Rev Cancer **2**(10): 727-39.

Kerbel, R. S. and Kamen, B. A. (2004). "The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy." Nat Rev Cancer **4**(6): 423-36.

Khurana, S., Liby, K., Buckley, A. R. and Ben-Jonathan, N. (1999). "Proteolysis of human prolactin: resistance to cathepsin D and formation of a nonangiostatic, C-terminal 16K fragment by thrombin." Endocrinology **140**(9): 4127-32.

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): 386-93.

Lacroix, M. C., Guibourdenche, J., Frenzo, J. L., Muller, F. and Evain-Brion, D. (2002). "Human placental growth hormone--a review." Placenta **23 Suppl A**: S87-94.

Lalani, A. S., Chang, B., Lin, J., Case, S. S., Luan, B., Wu-Prior, W. W., VanRoey, M. and Jooss, K. (2004). "Anti-tumor efficacy of human angiostatin using liver-mediated adeno-associated virus gene therapy." Mol Ther **9**(1): 56-66.

Lambert, V. (2005). "Rôle des protéinases et de leurs inhibiteurs dans les formes associées à une néovascularisation anormale sous-rétinienne. Caractérisation par l'étude de modèles animaux transgéniques et développements thérapeutiques." Thèse de doctorat. ULg.

Lee, H., Struman, I., Clapp, C., Martial, J. A. 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): 3696-703.

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): 7984-92.

Lewis, U.J., Sinha, Y.N. and Haro, L.S. (1994). "Variants forms and fragments of human growth hormone in serum." Acta Paediatr **399**: 29-31.

Lewis, U. J., Singh, R. N. and Lewis, L. J. (1989). "Two forms of glycosylated human prolactin have different pigeon crop sac-stimulating activities." Endocrinology **124**(3): 1558-63.

- Lewis, U. J., Singh, R. N., Sinha, Y. N. and Vanderlaan, W. P. (1985). "Glycosylated human prolactin." Endocrinology **116**(1): 359-63.
- Liekens, S., De Clercq, E. and Neyts, J. (2001). "Angiogenesis: regulators and clinical applications." Biochem Pharmacol **61**(3): 253-70.
- Lin, J., Lalani, A. S., Harding, T. C., Gonzalez, M., Wu, W. W., Luan, B., Tu, G. H., Koprivnikar, K., VanRoey, M. J., He, Y., Alitalo, K. and Jooss, K. (2005). "Inhibition of lymphogenous metastasis using adeno-associated virus-mediated gene transfer of a soluble VEGFR-3 decoy receptor." Cancer Res **65**(15): 6901-9.
- Lins, L., Charloteaux, B., Heinen, C., Thomas, A. and Brasseur, R. (2006). "'De novo' design of peptides with specific lipid-binding properties." Biophys J **90**(2): 470-9.
- Lins, L., Charloteaux, B., Thomas, A. and Brasseur, R. (2001). "Computational study of lipid-destabilizing protein fragments: towards a comprehensive view of tilted peptides." Proteins **44**(4): 435-47.
- Lins, L., Thomas-Soumarmon, A., Pillot, T., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. and Brasseur, R. (1999). "Molecular determinants of the interaction between the C-terminal domain of Alzheimer's beta-amyloid peptide and apolipoprotein E alpha-helices." J Neurochem **73**(2): 758-69.
- Liu, Y. and Deisseroth, A. (2006). "Tumor vascular targeting therapy with viral vectors." Blood **107**(8): 3027-33.
- 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): 1790-800.
- Maeshima, Y., Yerramalla, U. L., Dhanabal, M., Holthaus, K. A., Barbashov, S., Kharbanda, S., Reimer, C., Manfredi, M., Dickerson, W. M. and Kalluri, R. (2001). "Extracellular matrix-derived peptide binds to alpha(v)beta(3) integrin and inhibits angiogenesis." J Biol Chem **276**(34): 31959-68.
- Mah-Becherel, M. C., Ceraline, J., Deplanque, G., Chenard, M. P., Bergerat, J. P., Cazenave, J. P. and Klein-Soyer, C. (2002). "Anti-angiogenic effects of the thienopyridine SR 25989 in vitro and in vivo in a murine pulmonary metastasis model." Br J Cancer **86**(5): 803-10.
- Maniotis, A. J., Folberg, R., Hess, A., Seftor, E. A., Gardner, L. M., Pe'er, J., Trent, J. M., Meltzer, P. S. and Hendrix, M. J. (1999). "Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry." Am J Pathol **155**(3): 739-52.
- Martin, I., Defrise-Quertain, F., Decroly, E., Vandenbranden, M., Brasseur, R. and Ruyschaert, J. M. (1993). "Orientation and structure of the NH<sub>2</sub>-terminal HIV-1 gp41 peptide in fused and aggregated liposomes." Biochim Biophys Acta **1145**(1): 124-33.



- 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): 1536-49.
- Maula, S. M., Luukkaa, M., Grenman, R., Jackson, D., Jalkanen, S. and Ristamaki, R. (2003). "Intratumoral lymphatics are essential for the metastatic spread and prognosis in squamous cell carcinomas of the head and neck region." Cancer Res **63**(8): 1920-6.
- Mayo, K. H., van der Schaft, D. W. and Griffioen, A. W. (2001). "Designed beta-sheet peptides that inhibit proliferation and induce apoptosis in endothelial cells." Angiogenesis **4**(1): 45-51.
- 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): 333-57.
- Mitra, I. (1980). "A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part II. In vivo mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety." Biochem Biophys Res Commun **95**(4): 1760-7.
- Nakamura, E. S., Koizumi, K., Kobayashi, M. and Saiki, I. (2004). "Inhibition of lymphangiogenesis-related properties of murine lymphatic endothelial cells and lymph node metastasis of lung cancer by the matrix metalloproteinase inhibitor MMI270." Cancer Sci **95**(1): 25-31.
- Neri, P., Antoni, G., Bigio, M., Borri, G., Casagli, C. and Presentini, R. (1982). "Presence of nick components in highly purified preparations of human chorionic somatomammotropin HCS." Ital J Biochem **31**:342-348.
- Neri, D. and Bicknell, R. (2005). "Tumour vascular targeting." Nat Rev Cancer **5**(6): 436-46.
- Ng, E. W., Shima, D. T., Calias, P., Cunningham, E. T., Jr., Guyer, D. R. and Adamis, A. P. (2006). "Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease." Nat Rev Drug Discov **5**(2): 123-32.
- O'Reilly, M. S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W. S., Flynn, E., Birkhead, J. R., Olsen, B. R. and Folkman, J. (1997). "Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth." Cell **88**(2): 277-85.
- O'Reilly, M. S., Holmgren, L., Shing, Y., Chen, C., Rosenthal, R. A., Moses, M., Lane, W. S., Cao, Y., Sage, E. H. and Folkman, J. (1994). "Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma." Cell **79**(2): 315-28.
- Ochoa, A., Montes de Oca, P., Rivera, J. C., Duenas, Z., Nava, G., de La Escalera, G. M. and Clapp, C. (2001). "Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(7): 1639-45.
- Okada, S. and Kopchick, J. J. (2001). "Biological effects of growth hormone and its antagonist." Trends Mol Med **7**(3): 126-32.

- Ortega, N., Sordello, S. and Plouet, J. (1997). "[Tumoral vascularization: physiopathology and therapeutic prospects]." Bull Cancer **84**(4): 391-5.
- Padera, T. P., Stoll, B. R., Tooredman, J. B., Capen, D., di Tomaso, E. and Jain, R. K. (2004). "Pathology: cancer cells compress intratumour vessels." Nature **427**(6976): 695.
- Pan, H., Nguyen, N. Q., Yoshida, H., Bentzien, F., Shaw, L. C., Rentier-Delrue, F., Martial, J. A., Weiner, R. I., 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.
- Papetti, M. and Herman, I. M. (2002). "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis." Am J Physiol Cell Physiol **282**(5): C947-70.
- Peng, Z. (2005). "Current status of gendicine in China: recombinant human Ad-p53 agent for treatment of cancers." Hum Gene Ther **16**(9): 1016-27.
- Pepper, M. S. (1997). "Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(4): 605-19.
- Pepper, M. S. (2000). "Angiogenèse et morphogenèse de l'arbre vasculaire: de la biologie cellulaire à la clinique." médecine/sciences **16**: 1378-86.
- Perez-Mendez, O., Vanloo, B., Decout, A., Goethals, M., Peelman, F., Vandekerckhove, J., Brasseur, R. and Rosseneu, M. (1998). "Contribution of the hydrophobicity gradient of an amphipathic peptide to its mode of association with lipids." Eur J Biochem **256**(3): 570-9.
- Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Lins, L., Brasseur, R., Vandekerckhove, J. and Rosseneu, M. (1997). "Specific modulation of the fusogenic properties of the Alzheimer beta-amyloid peptide by apolipoprotein E isoforms." Eur J Biochem **243**(3): 650-9.
- Pillot, T., Goethals, M., Vanloo, B., Talussot, C., Brasseur, R., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. and Lins, L. (1996). "Fusogenic properties of the C-terminal domain of the Alzheimer beta-amyloid peptide." J Biol Chem **271**(46): 28757-65.
- Pillot, T., Lins, L., Goethals, M., Vanloo, B., Baert, J., Vandekerckhove, J., Rosseneu, M. and Brasseur, R. (1997). "The 118-135 peptide of the human prion protein forms amyloid fibrils and induces liposome fusion." J Mol Biol **274**(3): 381-93.
- 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): 2522-42.
- Rundhaug, J. E. (2005). "Matrix metalloproteinases and angiogenesis." J Cell Mol Med **9**(2): 267-85.
- Russel, J., Schneider, A.B., Katzhendler, J., Kowalski, K., and Sherwood, L.M. (1979). "Modification of human placental lactogen with plasmin." J Biol Chem **254**: 2296-2301.

- Rymaszewski, Z., Cohen, R. M. and Chomczynski, P. (1991). "Human growth hormone stimulates proliferation of human retinal microvascular endothelial cells in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(2): 617-21.
- Saint-Geniez, M. and D'Amore, P. A. (2004). "Development and pathology of the hyaloid, choroidal and retinal vasculature." Int J Dev Biol **48**(8-9): 1045-58.
- Sauter, B. V., Martinet, O., Zhang, W. J., Mandeli, J. and Woo, S. L. (2000). "Adenovirus-mediated gene transfer of endostatin in vivo results in high level of transgene expression and inhibition of tumor growth and metastases." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4802-7.
- Sebti, S. M. and Hamilton, A. D. (2000). "Design of growth factor antagonists with antiangiogenic and antitumor properties." Oncogene **19**(56): 6566-73.
- Silvestre, J. S. and Levy, B. I. (2002). "[Role of matrix proteolysis in angiogenesis]." Journ Annu Diabetol Hotel Dieu: 23-32.
- Singh, R.N.P., Seavey, B.K., Rice, V.P., Lindsey, T.T. and Lewis, U.J. "Modified forms of growth hormone with increased biological activities." Endocrinology **94**: 883-891.
- Sinha, Y. N. (1992). "Prolactin variants." Trends Endocrinol. Metab. **3**: 100-106.
- Sinha, Y. N. and Gilligan, T. A. (1984). "A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors." Endocrinology **114**(6): 2046-53.
- Sinha, Y. N., Gilligan, T. A., Lee, D. W., Hollingsworth, D. and Markoff, E. (1985). "Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma." J Clin Endocrinol Metab **60**(2): 239-43.
- Skobe, M., Hawighorst, T., Jackson, D. G., Prevo, R., Janes, L., Velasco, P., Riccardi, L., Alitalo, K., Claffey, K. and Detmar, M. (2001). "Induction of tumor lymphangiogenesis by VEGF-C promotes breast cancer metastasis." Nat Med **7**(2): 192-8.
- Sounni, N. E., Janssen, M., Foidart, J. M. and Noel, A. (2003). "Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis." Matrix Biol **22**(1): 55-61.
- Springer, M. L. (2006). "A balancing act: therapeutic approaches for the modulation of angiogenesis." Curr Opin Investig Drugs **7**(3): 243-50.
- Spurlino, J. C., Lu, G. Y. and Quioco, F. A. (1991). "The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis." J Biol Chem **266**(8): 5202-19.
- Stacker, S. A., Caesar, C., Baldwin, M. E., Thornton, G. E., Williams, R. A., Prevo, R., Jackson, D. G., Nishikawa, S., Kubo, H. and Achen, M. G. (2001). "VEGF-D promotes the metastatic spread of tumor cells via the lymphatics." Nat Med **7**(2): 186-91.
- Steeg, P. S. (2006). "Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges." Nat Med **12**(8): 895-904.

- Streit, M., Riccardi, L., Velasco, P., Brown, L. F., Hawighorst, T., Bornstein, P. and Detmar, M. (1999). "Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 14888-93.
- 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): 1246-51.
- 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): 1932-42.
- Tabruyn, S. P., Sabatel, C., Verhaeghe, C., Nguyen, N. Q. N., Cornet, A. M., Griffioen, A. W., Martial, J. A. and Struman, I. (2006). "New angiostatic mechanisms of 16K human prolactin revealed by gene profiling."
- 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): 1815-23.
- 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): 810-23.
- Torner, L., Mejia, S., Lopez-Gomez, F. J., Quintanar, A., Martinez de la Escalera, G. and Clapp, C. (1995). "A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat." Endocrinology **136**(12): 5454-60.
- Tozer, G. M., Kanthou, C. and Baguley, B. C. (2005). "Disrupting tumour blood vessels." Nat Rev Cancer **5**(6): 423-35.
- Ueda, E., Ozerdem, U., Chen, Y. H., Yao, M., Huang, K. T., Sun, H., Martins-Green, M., Bartolini, P. and Walker, A. M. (2006). "A molecular mimic demonstrates that phosphorylated human prolactin is a potent anti-angiogenic hormone." Endocr Relat Cancer **13**(1): 95-111.
- Vilour, J. (1999). Mesure de l'activité antiangiogène et antitumorale du fragment de 16kDa de la hPRL. Mémoire de licence, ULg.
- Voneche, V., Callebaut, I., Kettmann, R., Brasseur, R., Burny, A. and Portetelle, D. (1992). "The 19-27 amino acid segment of gp51 adopts an amphiphilic structure and plays a key role in the fusion events induced by bovine leukemia virus." J Biol Chem **267**(21): 15193-7.
- Wahl, M. L., Kenan, D. J., Gonzalez-Gronow, M. and Pizzo, S. V. (2005). "Angiostatin's molecular mechanism: aspects of specificity and regulation elucidated." J Cell Biochem **96**(2): 242-61.

---

Walker, W. H., Fitzpatrick, S. L., Barrera-Saldana, H. A., Resendez-Perez, D. and Saunders, G. F. (1991). "The human placental lactogen genes: structure, function, evolution and transcriptional regulation." Endocr Rev **12**(4): 316-28.

Warner, M. D., Sinha, Y. N. and Peabody, C. A. (1993). "Growth hormone and prolactin variants in normal subjects. Relative proportions in morning and afternoon samples." Horm Metab Res **25**(8): 425-9.

Wickstrom, S. A., Alitalo, K. and Keski-Oja, J. (2002). "Endostatin associates with integrin alpha5beta1 and caveolin-1, and activates Src via a tyrosyl phosphatase-dependent pathway in human endothelial cells." Cancer Res **62**(19): 5580-9.

Wickstrom, S. A., Alitalo, K. and Keski-Oja, J. (2004). "An endostatin-derived peptide interacts with integrins and regulates actin cytoskeleton and migration of endothelial cells." J Biol Chem **279**(19): 20178-85.

Wong, S. Y., Haack, H., Crowley, D., Barry, M., Bronson, R. T. and Hynes, R. O. (2005). "Tumor-secreted vascular endothelial growth factor-C is necessary for prostate cancer lymphangiogenesis, but lymphangiogenesis is unnecessary for lymph node metastasis." Cancer Res **65**(21): 9789-98.

Woodhouse, E. C., Chuaqui, R. F. and Liotta, L. A. (1997). "General mechanisms of metastasis." Cancer **80**(8 Suppl): 1529-37.

Yancopoulos, G. D., Davis, S., Gale, N. W., Rudge, J. S., Wiegand, S. J. and Holash, J. (2000). "Vascular-specific growth factors and blood vessel formation." Nature **407**(6801): 242-8.

Young, L. S., Searle, P. F., Onion, D. and Mautner, V. (2006). "Viral gene therapy strategies: from basic science to clinical application." J Pathol **208**(2): 299-318.

## Résumé

L'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants, joue un rôle important dans de nombreuses pathologies incluant la croissance tumorale et la dissémination des métastases.

Nous avons développé un vecteur adénoviral (16K-Ad) nous permettant de produire le facteur antiangiogène hPRL 16K directement *in situ*. Une première analyse permettant d'étudier les effets de la hPRL 16K produite par l'approche adénovirale a été réalisée *in vivo*. Nous montrons tout d'abord que la hPRL 16K produite est capable de prévenir la néovascularisation rétinienne dans un modèle murin de rétinopathie.

Par la suite, en utilisant le vecteur 16K-Ad, nous montrons que la hPRL 16K peut inhiber le développement tumoral dans un modèle murin développant des tumeurs formées par les cellules de mélanome B16-F10 dans le tissu sous-cutané. Cette inhibition de la croissance tumorale est corrélée avec une diminution de la taille des vaisseaux. Nous montrons aussi, pour la première fois, que la hPRL 16K peut considérablement réduire l'établissement des métastases B16-F10 dans un modèle expérimental de métastases se développant dans le poumon. Ces résultats soulignent le rôle potentiel de la hPRL 16K dans la thérapie anticancéreuse dirigée contre les tumeurs primaires et les métastases.

Parallèlement à ces travaux, nous nous sommes attachés à identifier une région responsable de l'activité de la hPRL 16K. Partant du fait que les fragments 16K des trois autres membres de la famille humaine PRL/GH sont aussi de puissants facteurs antiangiogènes, malgré que leur similarité de séquence soit faible (environ 35% de similarité entre les séquences de la PRL et de la GH), nous avons recherché une caractéristique structurale commune partagée par ces différents fragments. Nous avons identifié un domaine susceptible d'adopter une structure en peptide oblique dans les séquences protéiques des fragments de 16 kDa de la famille PRL/GH. L'effet antiangiogène des peptides obliques de la hPRL 16K et de la hGH 16K est montré dans des expériences menées *in vitro* et *in vivo*. Nous montrons également l'effet antiangiogène des peptides obliques du peptide de fusion gp 32 du virus SIV et du peptide  $\beta$ -amyloïde.

## Summary

Angiogenesis, the formation of new blood vessels from pre-existing ones, is a crucial step in many pathologies, including tumor growth and metastasis.

We developed an adenovirus vector allowing the 16K hPRL expression, an antiangiogenic factor, *in situ*. We show 16K hPRL inhibits oxygen-induced retinopathy in mice.

Then, using the 16K-Ad vector, we investigated the ability of 16K hPRL to prevent metastatic spread through inhibition of angiogenesis. We show that 16K hPRL administered via adenovirus-mediated gene transfer inhibits tumor growth in a subcutaneous B16-F10 mouse melanoma model by reducing the size and width of tumor vessels. We also show, for the first time, that 16K hPRL considerably reduces the establishment of B16-F10 metastases in an experimental lung metastasis model. These results highlight a potential role for 16K hPRL in anticancer therapy for both primary tumors and metastases.

In parallel, we have sought to identify in human 16K PRL (16K hPRL) a peptide that might be responsible for its antiangiogenic activity. Although the 16K fragments of the other three human PRL/GH-family members are also potently antiangiogenic, the sequence similarity of these fragments is low (around 35% similarity between all mammalian PRL/GH sequences). This led us to seek a peculiar common structural feature rather than a similar sequence. We demonstrate that all these fragments possess a 14-amino-acid sequence having the characteristics of a tilted peptide. We show for the first time that tilted peptides exert antiangiogenic activity. The tilted peptides of hPRL and hGH induce endothelial cell apoptosis, inhibit endothelial cell proliferation, and inhibit capillary formation both *in vitro* and *in vivo*. These antiangiogenic effects are abolished when the peptides' hydrophobicity gradient is altered by mutation. We further demonstrate for the first time that the well-known tilted peptides of SIV gp32 and Alzheimer's beta-amyloid peptide are also angiogenesis inhibitors. Taken together these results point to a potential new role for tilted peptides in regulating angiogenesis.