



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Carline CHAVES-ALMAGRO

le 29 septembre 2015

Titre :

Signalisation apeline : nouvelle cible thérapeutique de l'adénocarcinome
pancréatique ?

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Cancérologie

Unité de recherche :

Inserm U1048, Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires : Equipe 3 Pr. P. Valet

Directeur/trice(s) de Thèse :

Docteur Bernard Masri et Professeur Bernard Knibiehler

Jury :

Docteur Nelson DUSETTI, Directeur de recherche INSERM - Président du jury

Docteur Gilles PAGES, Directeur de recherche INSERM - Rapporteur

Docteur Abdel-Majid KHATIB, Directeur de recherche INSERM - Rapporteur

Docteur Bernard MASRI, Chargé de recherche CNRS - Directeur de thèse

Professeur Bernard KNIBIEHLER, Professeur des Universités-Codirecteur de thèse

Si nous avons le courage de les poursuivre,
tous les rêves deviennent réalité.

Walt Disney

Remerciements :

Que dire... si ce n'est un grand MERCI !!

Merci à tous ceux et à toutes celles dont j'ai eu la chance de croiser la route au cours de ces 4 années de thèse. A tous ceux qui m'ont aidée, écoutée, encouragée, remotivée par leur présence ou simplement par un sourire ou une parole réconfortante. A ceux qui ont fait que ces années ont été plus belles et plus faciles malgré les quelques embûches que j'ai pu traverser, grâce à eux, à peu près sans encombre et sans séquelle (même si cela reste à confirmer ^^).

J'ai appris beaucoup..., scientifiquement bien sûr, mais aussi humainement. J'ai appris sur moi, sur les autres. La thèse a été pour moi une école de la vie, riche en rencontres et forte en émotions de tout genre.

Je remercie mes équipes d'accueil,

L'équipe 5 du CRCT, notamment Hervé Prats

et également l'équipe 3 de l'I2MC, plus particulièrement Philippe Valet,

pour leur accueil, leur gentillesse et leur humanité. Merci de m'avoir accueillie.

Merci aussi à tous les membres de ces deux équipes (chercheurs, techniciens, étudiants) cela aura été un grand plaisir d'apprendre avec vous et de travailler à vos côtés.

Un merci plus particulier à Aurélie et à Jeannot, mes deux plus fervents supporters et aide psychologique. Mais aussi à Audren, Simon, Gwendo, Alysson, Claire, Nancy, Ophélie, Nicolas. Merci pour votre accueil plein de joie, de bonne humeur, de partage et d'entre aide. C'était important pour moi....et j'ai été comblée...

Je remercie également l'équipe 6 du CRCT, qui a un peu été mon équipe adoptive, l'équipe 10 du CRCT, et l'équipe de Daniel Fourmy. Merci à tous les étudiants, compagnons de galère avec qui nous nous sommes serrés les coudes et avec qui j'ai eu un immense plaisir à arpenter les couloirs du L3 et à rester jusqu'à des heures inavouables au labo, lorsque les couloirs se transforment en train fantôme... : Camille, PA, Romain, Marion, Mounira, Darine, Nico, et tous les autres...

Je remercie bien sur la micro-équipe Apeline, qui m'a fait confiance depuis mes débuts dans la saga apeline et qui m'a prise sous leurs ailes : Yves, Bernard K, FX et bien entendu Bernard M. Là aussi, que dire à part merci pour toutes ces discussions scientifiques, idéologiques et personnelles qui ont été très enrichissantes. Merci de m'avoir transmis votre savoir, la curiosité et le goût de la découverte !

Spéciale dédicace à Bernard, merci pour tout et bien plus encore. Tu as été un Chef, un compagnon de paillasse, un ami,... en tous cas tu as été un soutien sans faille ! Tu m'as toujours soutenue, épaulée, écoutée, tu m'as couvée... peut-être trop parfois ... ^^, mais tu as cru en moi, et c'est en grande partie ce qui m'a aidé à relever tous les défis qui se présentaient à moi. MERCI.

Enfin, merci à tous mes amis et à ma famille de m'avoir soutenue et supportée depuis le début, et j'espère pour longtemps encore ^^ . Merci d'être comme vous êtes. Ne changez rien et restez toujours près de moi. Merci de me supporter, même quand le stress se fait trop présent et me change en tornade déchaînée...

Merci maman, merci Ben, merci pour votre soutien et votre amour inconditionnels.

RESUME :

L'apeline, ligand endogène du Récepteur Couplé aux Protéines G, APJ, joue un rôle majeur au niveau cardiovasculaire, notamment dans l'angiogenèse physiologique et la néovascularisation tumorale. Par une étude *profiling array*, notre équipe a mis en évidence que le gène de l'apeline est surexprimé dans un tiers des adénocarcinomes humains, et de manière intéressante, avec une fréquence très élevée (2/3) dans les cancers du pancréas. Ainsi, mon projet de thèse avait pour but de caractériser l'implication du système apelinergique dans le cancer du pancréas.

L'adénocarcinome pancréatique canalaire (ADK) est la forme la plus commune des cancers du pancréas et la découverte de biomarqueurs et nouvelles cibles potentielles est particulièrement importante pour ce cancer dont le diagnostic est tardif et les traitements peu efficaces.

Par une approche immunohistochimique sur des coupes d'ADK humains (49 patients), nous avons mis en évidence que l'apeline et APJ sont fortement exprimés par les cellules tumorales pancréatiques.

Dans le but de caractériser l'expression spatio-temporelle de l'apeline et de son récepteur au cours de la carcinogenèse pancréatique, nous avons étudié par immunohistochimie leur expression dans des modèles murins d'ADK. Ainsi, dans les souris K-ras (Lox-Stop-Lox-K-ras^{G12D/+}/Pdx1-Cre) récapitulant les stades précoces de la pathologie, et le modèle murin KPC (Lox-Stop-Lox- K-ras^{G12D/+} ; Lox-Stop-Lox-Trp53^{R172H/+}/Pdx1-Cre) qui développe un ADK jusqu'au stade invasif, nos résultats mettent en évidence que l'apeline et son récepteur APJ sont exprimés par les cellules tumorales et ce, dès les premiers stades de la carcinogenèse.

Afin d'étudier la fonction de la voie de signalisation apeline, nous avons caractérisé les cascades de transduction activées par l'apeline dans la lignée tumorale pancréatique humaine MiaPaCa qui exprime de façon endogène APJ et l'apeline comme retrouvé *in vivo*.

Dans ces cellules, l'apeline induit la stimulation transitoire des ERKs et de la p70S6 Kinase, l'activation prolongée d'Akt et la phosphorylation inhibitrice de GSK3 stabilisant ainsi la Beta-caténine. De manière intéressante, mes travaux mettent en évidence que l'activation de la voie MAPK induite par l'apeline est dépendante de la protéine Gi. A l'inverse, la stimulation soutenue de la voie PI3K/Akt est indépendante de la voie G mais implique l'internalisation du récepteur. De plus, l'apeline régule positivement la quantité protéique de c-myc et cycline D1 tous deux impliqués dans la prolifération cellulaire, ainsi que de l'Hexokinase 2 permettant de maintenir un fort flux glycolytique, essentiel aux besoins énergétiques de la cellule tumorale. Ces résultats sont en accord avec les effets cellulaires que nous observons puisque l'apeline stimule la prolifération, la capture du glucose ainsi que la migration des cellules tumorales, des propriétés essentielles participant à la progression tumorale.

Dans ce contexte, la surexpression de l'apeline et de son récepteur dans l'ADK et l'effet de cette voie de signalisation sur la cellule tumorale fait de ce couple ligand/récepteur une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement du cancer du pancréas.

ABSTRACT :

Apelin, the endogenous ligand of the human G-protein coupled receptor, APJ, is a key regulator of cardiovascular system, notably during physiological and tumor angiogenesis. Using a cancer profiling array approach, our team clearly showed that apelin gene is overexpressed in one third of the human carcinomas, with the highest frequency (2/3) in pancreatic cancers. Thus, the aim of my PhD project was to characterize apelin signaling function during pancreatic carcinogenesis.

Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is the most common form of pancreatic cancer and the discovery of biomarkers and new therapeutic targets is of crucial interest for this cancer since this cancer is diagnosed too late and there is no effective therapy.

By an immunohistochemistry approach on human PDAC slides (49 patients), we show that apelin and APJ are strongly expressed by pancreatic tumor cells.

In order to characterize apelin and APJ spatio-temporal expression during pancreatic carcinogenesis, we have studied their expression by immunohistochemistry in genetically engineered mouse models of PDAC. In the K-ras mouse model (Lox-Stop-Lox-K-ras^{G12D/+}/Pdx1-Cre) which recapitulates early stages of the disease, and in the KPC mouse model (Lox-Stop-Lox- K-ras^{G12D/+} ; Lox-Stop-Lox-Trp53^{R172H/+}/Pdx1-Cre) which develops PDAC until invasive stages, our results demonstrate that apelin and its receptor are expressed by tumor cells since the first steps of carcinogenesis.

In order to study apelin signaling function, we have characterized signal transduction pathways activated by apelin in MiaPaCa human pancreatic cancer cell line endogenously expressing apelin and APJ as observed *in vivo*.

In these cells, apelin induces transient activation of ERKs and p70S6 Kinase, a sustained Akt activation and an inhibitory phosphorylation of GSK3 thus allowing Beta-catenin stabilization. Interestingly, my results demonstrate that the MAPK pathway activation apelin induced is Gi protein dependent. Conversely, long term stimulation of PI3K/Akt pathway is G protein independent but instead involves receptor internalization. Moreover, apelin positively regulates on one hand c-myc and cyclin D1 protein levels, both of them being implicated in cell proliferation and on the other hand, intracellular protein content of Hexokinase 2 in order to ensure high glycolytic flux which is essential for tumor cells energy supply. These results are in agreement with cellular effects that we observed since apelin stimulates proliferation, glucose uptake and migration of tumor cells which are essential properties for tumor progression.

Accordingly, apelin and APJ overexpression in PDAC and the effects of this signaling pathway on tumor cells make of this ligand/receptor couple a new potential therapeutic target for pancreatic cancer treatment.

Sommaire :

ABREVIATIONS :	1
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	5
Le pancréas : De la physiologie à l'adénocarcinome :	7
Chapitre I Le pancréas sain : structure et fonctions	7
I.A Partie exocrine :	8
I.B Partie endocrine :	8
Chapitre II Développement embryonnaire pancréatique : facteurs de transcription et de différenciation :	11
II.A La première transition : engagement des progéniteurs dans la voie pancréatique :	11
II.B La seconde transition : différenciation des progéniteurs :	13
Chapitre III Le cancer du pancréas :	16
III.A Généralités :	16
A.1 Pathologie :	16
A.2 Epidémiologie :	17
III.B Facteurs de risques :	18
B.1 Facteurs non modifiables :	18
B.2 Facteurs comportementaux :	18
i. Tabagisme :	18
ii. Alcool :	19
B.3 Autres facteurs de risques :	19
i. Prédispositions et facteurs génétiques :	19
ii. Pancréatite chronique :	20
iii. Obésité :	21
iv. Diabète de type 2 (T2DM) : cause ou conséquence de l'ADK ?	24
Chapitre IV Caractéristiques histologiques de l'adénocarcinome pancréatique :	26
IV.A Histologie : Des lésions préneoplasiques à l'adénocarcinome :	26

A.1	Les PanINs (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia) :.....	26
A.2	Les IPMNs (Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm) :.....	27
A.3	Les MCNs (Mucinous Cystic Neoplasm) :.....	28
Chapitre V	Caractéristiques moléculaires de l'ADK:	29
V.A	Activation d'oncogènes :.....	29
A.1	L'oncogène K-RAS et ses voies de signalisation :.....	29
i.	La voie Raf-MAPK :	33
ii.	La voie PI3K/Akt :.....	33
A.2	K-RAS et métabolisme énergétique :	35
A.3	K-RAS et métabolisme du glucose :.....	37
A.4	K-RAS et métabolisme de la glutamine :	38
A.5	K-RAS, autophagie et macropinocytose :	40
V.B	Suppresseurs de tumeurs :	42
B.1	p16/CDKN2A ou INK4A :.....	42
B.2	TP53 :	42
B.3	TGFβ et SMAD4/DPC4 :	43
V.C	Voies de signalisation dérégulées :.....	44
C.1	Réactivation de voies de signalisation associées au développement embryonnaire:	44
C.2	Surexpression des voies de signalisation associées aux facteurs de croissance : 45	
i.	EGFR/EGF :.....	46
ii.	Insulin-like Growth Factor Receptor 1 (IGFR-1) et Insulin like Growth factors (IGFs) : 46	
iii.	Insuline et récepteurs à l'insuline :.....	47
V.D	Autres altérations :.....	48
D.1	Le raccourcissement des télomères :	48
D.2	Les micros ARNs ou miRNAs :	48

D.3	Modifications épigénétiques : méthylation de l'ADN et acétylation des histones :.....	50
Chapitre VI	Origine(s) cellulaire (s) de l'ADK :.....	53
VI.A	Les cellules canalaire(s) :.....	53
VI.B	Les cellules acineuses :.....	53
VI.C	Les cellules endocrines :.....	55
VI.D	Les cellules centro-acineuses (CAC) :.....	56
VI.E	Les cellules souches cancéreuses :.....	56
Chapitre VII	Thérapeutique :.....	58
VII.A	Traitement standard :.....	58
A.1	Tumeur localisée :.....	58
A.2	Stades avancés : envahissement loco-régional et métastases :.....	58
VII.B	Combinaisons et thérapies ciblées :.....	58
B.1	Cibler la tumeur :.....	59
B.2	Cibler le stroma :.....	59
B.1	Perspectives thérapeutiques :.....	62
Le système apelinergique :.....		65
Chapitre I	Le récepteur APJ :.....	65
I.A	Découverte du récepteur APJ :.....	68
I.B	Structure du récepteur :.....	69
I.C	Sites d'expression du récepteur APJ :.....	69
I.D	Régulations de l'expression du récepteur APJ :.....	71
Chapitre II	Les ligands du récepteur APJ :.....	73
II.A	L'apeline :.....	73
A.1	Découverte :.....	73
A.2	Structure et maturation :.....	73
A.3	Sites d'expression de l'apeline :.....	77

A.4	Régulations de l'expression du gène de l'apeline :	79
II.B	Apela, Toddler ou ELABELA :	81
B.1	Découverte :	81
B.2	Structure :	81
B.3	Sites d'expression et fonctions :	82
Chapitre III	KO APJ et KO Apeline :	84
Chapitre IV	Signalisation Apelinergique :	86
IV.A	Couplage aux protéines G :	86
IV.B	Cascades de transduction : Effecteurs et effets cellulaires :	87
IV.C	Internalisation du récepteur APJ :	89
IV.D	Hétérodimérisation :	92
IV.E	Signalisation indépendante du ligand : étirement mécanique :	93
IV.F	Agonistes et antagonistes d'APJ :	94
Chapitre V	Fonctions physiopathologiques de l'apeline :	97
V.A	L'apeline dans le SNC : contrôle de l'homéostasie des fluides, prise hydrique et prise alimentaire :	97
V.B	Apeline et fonctions cardiovasculaires :	98
B.1	Fonctions vasculaires :	99
i.	Tonus vasculaire :	99
B.2	Fonctions cardiaques :	100
i.	Effet inotrope :	100
B.3	Pathologies cardiovasculaires :	101
i.	Pathologies vasculaires :	101
ii.	Pathologies cardiaques :	101
V.C	Apeline et tractus gastro-intestinal :	102
C.1	Pathologies gastro-intestinales :	104
V.D	Apeline et métabolisme énergétique : rôle de l'axe adipo-insulaire :	106
D.1	Apeline, sécrétion d'insuline et régulation du métabolisme glucidique :	107

D.2	Apeline et métabolisme lipidique :.....	110
V.E	Apeline, angiogenèse et lymphangiogenèse :.....	111
E.1	Apeline et angiogenèse physiologique :.....	111
E.2	Angiogenèse pathologique :	113
E.3	Apeline et lymphangiogenèse :.....	117
	RESULTATS EXPERIMENTAUX :.....	119
	INTRODUCTION :.....	121
	MATERIEL ET METHODES :.....	123
	RESULTATS :.....	133
	CONCLUSION :.....	161
	DISCUSSION ET PERSPECTIVES :	163
	ANNEXES :	175
	Références bibliographiques :.....	177

Table des illustrations :

Figures :

Figure 1: Anatomie générale du pancréas	7
Figure 2 : Structure anatomo-histologique du pancréas sain humain.	10
Figure 3 : Représentation simplifiée du développement pancréatique et des principaux facteurs de transcription impliqués.	14
Figure 4 : Modification du profil sécrétoire du tissu adipeux viscéral au cours l'obésité.	23
Figure 5 : Influences endocrine et paracrine de l'excès de tissu adipeux viscéral sur l'environnement et la cellule tumorale.	23
Figure 6: Modèle de progression de la carcinogenèse pancréatique et évènements génétiques associés.....	28
Figure 7: Représentation schématique du modèle murin K-RAS.	31
Figure 8 : Modèle d'activation de K-RAS et des voies de signalisation induites en aval de l'oncogène dans l'ADK.	32
Figure 9 : Représentation schématique des voies métaboliques régulées par l'hypoxie dans les cellules tumorales pancréatiques.	37
Figure 10 : Représentation schématique des voies métaboliques régulées par l'oncogène K-RAS dans les cellules tumorales pancréatiques.	37
Figure 11 : Reprogrammation du métabolisme de la glutamine par l'oncogène K-RAS dans l'ADK.....	40
Figure 12 : Diversité des molécules activant un récepteur couplé aux protéines G.....	65
Figure 13 : Distribution tissulaire de l'ARNm du récepteur APJ chez le rat.....	70
Figure 14 : Représentation schématique du processus de maturation de l'apeline.	74
Figure 15 : Distribution tissulaire de l'ARNm de l'apeline chez le rat.	78
Figure 16 : Séquence peptidique d'Apela dans les différentes espèces.	82
Figure 17 : L'interaction du récepteur APJ avec Apela mais pas l'apeline est essentielle à la mise en place du système cardiovasculaire au cours des phases précoces du développement embryonnaire.....	85
Figure 18 : Présentation des différentes voies de signalisation et effets cellulaires induits par l'apeline en aval du récepteur APJ.....	88

Figure 19 : L'apeline induit l'activation de voies de signalisation dépendantes des protéines G et/ou des β-arrestines.	91
Figure 20 : L'activation du récepteur APJ par l'étirement mécanique sur des cardiomyocytes induit l'hypertrophie cardiaque par l'intermédiaire d'une voie de signalisation dépendante de la β-arrestine.....	94
Figure 21 : L'apeline stimule la néovascularisation tumorale.	115
Figure 22 : Surexpression du gène de l'apeline dans les carcinomes humains.....	116

Tableaux :

Tableau 1 : Classification des principaux types de cancers du pancréas.....	17
Tableau 2 : Liste des prédispositions génétiques associées au développement du cancer du pancréas.	20
Tableau 3 : miRNAs dérégulés dans le cancer du pancréas.....	50
Tableau 4 : Liste des essais cliniques de phase 3 comparant l'effet de la chimiothérapie standard, la gemcitabine, à des approches combinées.....	61

ABBREVIATIONS :

3' UTR : 3' UnTranslated Region

5-FU : 5-FluoroUracile

ACE2 : Angiotensin Converting Enzyme related carboxypeptidase

ADAM : A Disintegrin And Metalloproteinase

ADK : Adénocarcinome canalaire pancréatique

ADN : Acide DesoxyriboNucléique

AMPc : Adenosine MonoPhosphate cyclique

AMPK : AMP-activated protein Kinase

Apela : APelin receptor Early endogenous LigAnd

Apelin : APJ Endogenous LIgaNd

ARN : Acide RiboNucléique

AT1R : Angiotensine Type 1 Receptor

BRET : Bioluminescence Resonance Energy Transfert

CACs : Centro Acinar Cells

CHO : Chinese Hamster Ovary cells

COX2 : CycloOXygenase 2

DNMT : DNA MethylTransférases

DPC4 : Deleted in Pancreatic Cancer locus 4

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

FGF : Fibroblast Growth Factor

GAPs : GTPase Activating Protein

GEFs : Guanine nucleotide Exchange Factor

GLS : GLutaminaSe

GLUD1 : GLUtamate Dehydrogenase 1

GOT1 : Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 1

GRK : G-protein coupled Receptor Kinases

hAPJ : human APJ

HAT : Histones Acétyl Transférases

HBP : Hexosamine Biosynthetic Pathway

HDAC : Histones Déacétylases

HEK : Human embryonic kidney

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HIF α :Hypoxia-Inducible Factor 1 α

HK2 : HexoKinase 2

HUVECs : Human Umbilical Vein Endothelial Cells

HRE : Hypoxia Responsive Element

IGF-1 : Insulin like Growth Factor 1

IGFR : Insulin-like Growth Factor Receptor

Il-6 : Interleukine-6

IPMNs : Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm

IRS-1 : Insulin Receptor Substrate 1	PI3K : PhosphoInositide-3-Kinase
JNK : c-Jun N-terminal kinase	PKA : Protéine Kinase AMPc dépendante
LDHA : Lactate DésHydrogenase A	PKC : Protéine Kinase C
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase	PLC- β : PhosphoLipase-C β
MCNs : Mucinous Cystic Neoplasm	ppENK : préproENKéphaline
MCT1 : MonoCarboxylate Transporter 1	PPP : Pentose Phosphate Pathway
MCT4 : MonoCarboxylate Transporter 4	PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
MDM2 : Mouse Double Minute 2 homolog	Ptf1a : Pancreatic Transcription Factor 1 α
MEF2 : Myocyte Enhancer Factor 2	PTX : Pertussis ToXin
MEK : MAPK/ERK Kinase	RCPG : Récepteurs Couplés aux Protéines G
Mist1 : Muscle Intestine STomach 1	RISC : RNA Induced Silencing Complex
MMP : Matrix MetalloProtease	RTK : Récepteur à Tyrosine Kinase
NADP : Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate	RT-PCR : Real Time Polymerase in Chain Reaction
NFKB : Nuclear Factor kappa-B	SHH : Sonic HedgeHog
Ngn3 : Neurogenin 3	SMAD : Mother Against Decapentaplegic homolog
NICD : Notch IntraCellular Domain	SMO : SMOothened
P70S6K : P70 S6 Kinase	Sp1 : Specificity protein 1
PanINs : Pancreatic Intraepithelial Neoplasia	SPARC : Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine
PC : Pancréatite Chronique	STAT3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3
PCR : Polymerase in Chain Reaction	T2DM : Type 2 Diabetes Mellitus
PCSK3 : Protein Convertase Subtilisin/Kexin 3	TEM : Transition Epithelio Mésenchymateuse
Pdx1 : Pancreatic and Duodenal homeobox 1	TGF β : Transforming Growth Factor β
Pfk1 : Phosphofructokinase 1	
PDGF : Platelet Derived Growth Factor	

TNF- α : Tumor Necrosis Factor- α

USF : Upstream Stimulatory Factor

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

X-msr: Xenopus-mesenchyme associated
serpentine receptor

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Le pancréas : De la physiologie à l'adénocarcinome :

Chapitre I Le pancréas sain : structure et fonctions

Le pancréas est un organe profond situé dans la cavité péritonéale derrière l'estomac. Il pèse en moyenne 100 grammes et mesure de 15 à 25 cm de long divisé en trois parties que sont :

- la tête qui représente la plus grande partie de l'organe et qui est au contact du duodénum,
- le corps,
- et la queue du pancréas qui est en contact avec la rate (**Figure 1**).

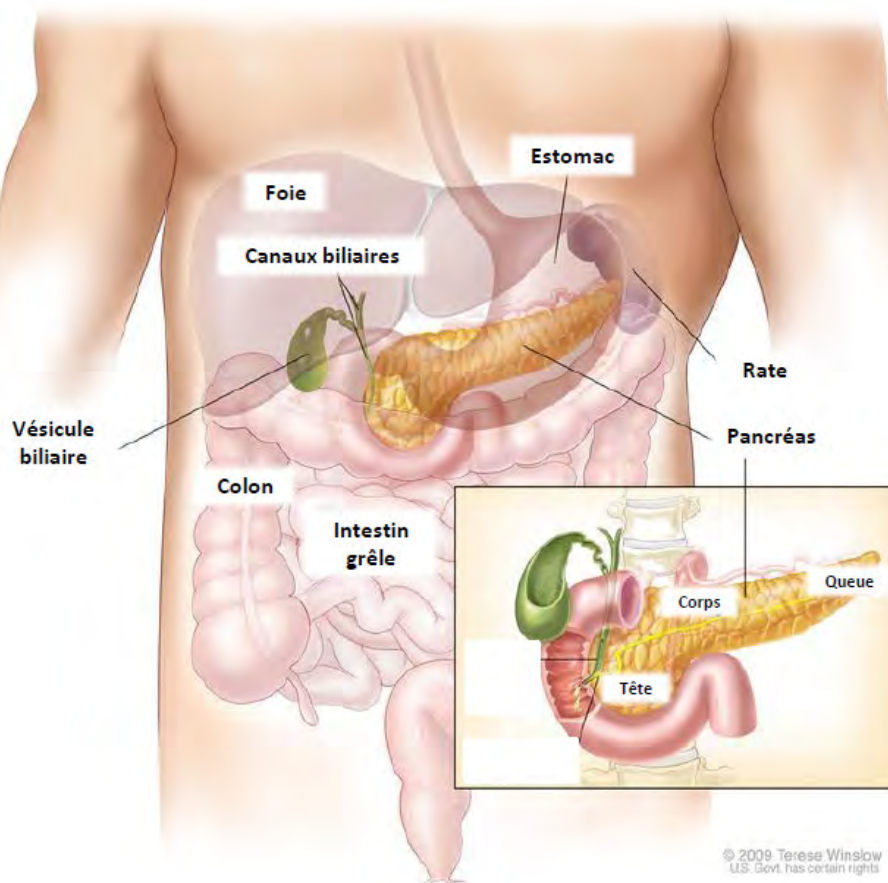


Figure 1: Anatomie générale du pancréas

Le pancréas est une glande dite amphicrine ou mixte puisque cet organe se compose à la fois de tissu endocrine et exocrine (**Figures 2A et 2B**).

I.A Partie exocrine :

Le pancréas exocrine représente 80% de la masse de l'organe. Il est constitué d'un réseau complexe formé par les cellules acineuses et canalaire qui ont pour fonction la production, la sécrétion et le transport des enzymes digestives dans le tractus gastro-intestinal. Les cellules acineuses sont de forme pyramidale, possédant de nombreux granules de zymogènes renfermant les enzymes digestives et sont organisées en unités fonctionnelles nommées acini. Les enzymes produites sont principalement des protéases (endopeptidases : trypsinogène, chymotrypsinogène, proélastase et exopeptidases : procarboxypeptidases), l'amylase qui est une glycosidase (α -amylase), des lipases (phospholipase) et des nucléases (Slack, 1995). Celles-ci sont sécrétées dans les canaux pancréatiques majoritairement sous forme inactive de façon à protéger le pancréas de l'autodigestion. De plus, situées au centre des acini et à l'interface avec les cellules canalaire, on trouve également les cellules centro-acineuses dont l'origine cellulaire et les fonctions restent encore méconnues. Cependant, ces cellules possèderaient des caractéristiques de progéniteur pancréatique multipotent (Cleveland et al., 2012).

Le tissu exocrine est également constitué de cellules épithéliales de type canalaire. Celles-ci sécrètent majoritairement de l'eau et des électrolytes et ont pour fonction de drainer les enzymes pancréatiques produites par les acini depuis les canaux secondaires vers le canal pancréatique principal aussi nommé canal de Wirsung. Enfin, le suc pancréatique est déversé dans le duodénum où les enzymes seront activées par clivage protéolytique. C'est l'entérokinase, une enzyme produite par l'épithélium intestinal qui permet l'activation duodénale du trypsinogène en trypsine qui à son tour induira l'activation des autres enzymes qui participent ainsi à la digestion du bol alimentaire (Cours Médecine, 2010).

I.B Partie endocrine :

Le compartiment endocrine constitué par les îlots de Langerhans participe quant à lui à la régulation du métabolisme énergétique et module très finement l'homéostasie du glucose dans l'organisme. Ce tissu endocrine représentant seulement 1 à 2% du volume de l'organe reçoit cependant jusqu'à 10% de l'apport sanguin irriguant le pancréas. Cette hyper-vascularisation permet ainsi une relation étroite entre le réseau de capillaires sanguins et les cellules endocrines spécialisées composant ces îlots. Les études réalisées chez l'Homme

mettent en évidence que les îlots de Langerhans sont composés de 5 types cellulaires régulant l'homéostasie du glucose par leur action sur les tissus périphériques (muscle, foie, tissu adipeux):

- **Les cellules α** : Elles représentent 35% de la masse cellulaire des îlots et sécrètent le glucagon qui agit comme une hormone hyperglycémisante. Elle cible principalement le foie où elle stimule la glycogénolyse et la néoglucogenèse.

- **Les cellules β** : Ces cellules représentent approximativement 55% des cellules des îlots et produisent l'insuline qui agit en tant qu'hormone hypoglycémisante. En effet, l'insuline favorise l'entrée du glucose dans les tissus périphériques et elle exerce un rôle inhibiteur paracrine sur la sécrétion de glucagon.

- **Les cellules δ** : Ces cellules sont moins représentées et sécrètent la somatostatine qui joue le rôle de régulateur local inhibant la sécrétion d'insuline et de glucagon par les cellules β et α respectivement.

- **Les cellules ϵ** : Les cellules ϵ qui sécrètent la ghréline sont très peu présentes dans le pancréas adulte et inhibent la sécrétion d'insuline.

- **Les cellules PP** : Les cellules PP sécrètent le polypeptide pancréatique qui joue un rôle inhibiteur sur la sécrétion du pancréas exocrine.

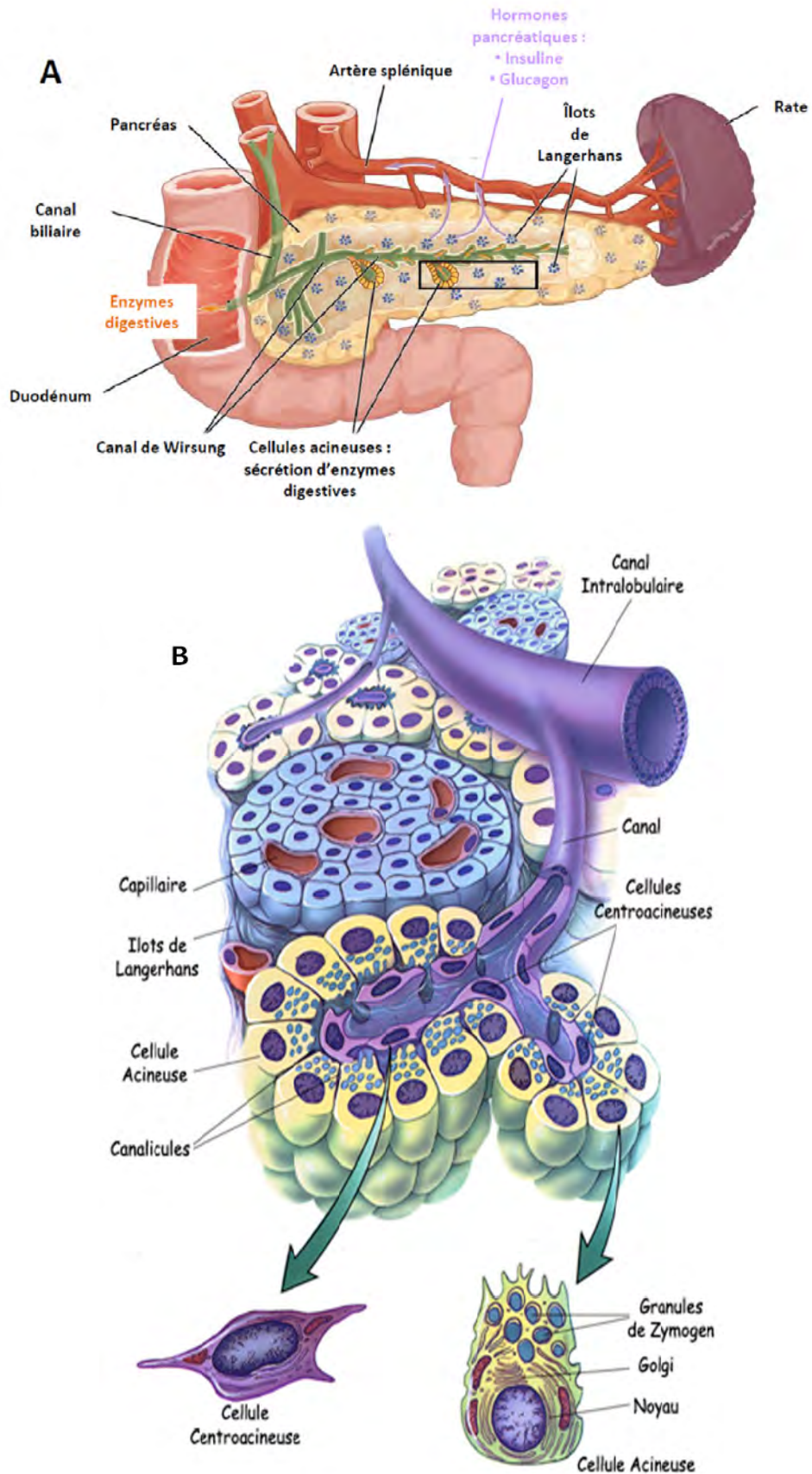


Figure 2 : Structure anatomo-histologique du pancréas sain humain.
 A) Anatomie détaillée du pancréas. B) Organisation histologique du tissu pancréatique.

Chapitre II Développement embryonnaire pancréatique : facteurs de transcription et de différenciation :

Lors du développement embryonnaire, de nombreux signaux et facteurs de transcription coordonnent leurs activités afin d'induire la différenciation des progéniteurs pancréatiques dans des lignages cellulaires spécifiques aboutissant au pancréas mature. Les acteurs impliqués au cours de ce processus sont nombreux et leurs interactions complexes. Ainsi, je porterai plus particulièrement mon attention sur :

- l'expression et le rôle des facteurs de transcription Pdx1 et Ptf1 α dans le pancréas, en accord avec les modèles murins utilisés au cours de ma thèse,
- ainsi que sur les voies de signalisation Notch et Sonic Hedgehog (Shh) qui sont réactivées au cours de l'ADK.

Chez la souris, le pancréas devient visible lors du 9^{ème} jour du développement embryonnaire (e9.0). Celui-ci se développe à partir de l'évagination de deux bourgeons épithéliaux issus de l'endoderme qui fusionneront pour ne donner qu'un seul organe au jour e12.5. Au cours de cette **première transition**, les progéniteurs pancréatiques indifférenciés prolifèrent rapidement et s'organisent pour former un réseau de structure tubulaire, qui évoluera pour aboutir à une structure morphologiquement plus proche du pancréas mature. La **seconde transition** a lieu au cours de la période allant de e12.5 à la naissance. Cette phase est associée à des modifications morphologiques permettant la finalisation de l'organisation tissulaire et la différenciation des progéniteurs en cellules exocrines ou endocrines.

II.A La première transition : engagement des progéniteurs dans la voie pancréatique :

Le développement du tissu pancréatique est régulé par de nombreux facteurs et interactions cellulaires. Il implique notamment la régulation de la voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh) qui participe à l'organogenèse du tractus gastro-intestinal. La famille Hedgehog comporte plusieurs ligands nommés Sonic, Desert et Indian Hedgehog (Shh, Dhh, Ihh) dont la liaison inactive le récepteur transmembranaire Patched. Cette inactivation permet la levée d'inhibition de Patched sur le récepteur à sept domaines transmembranaires Smoothed (SMO) (Maitra and Hruban, 2008). Ainsi activé, SMO induit la translocation

nucléaire du facteur de transcription Gli et la transcription de gènes cibles tels que les cyclines D/E, Bcl-2 stimulant respectivement la prolifération et la survie cellulaire, ou encore SNAIL et SLUG qui stimulent la transition épithélio-mésenchymateuse (Katoh and Katoh, 2009). Le bon déroulement de l'organogenèse pancréatique nécessite notamment la répression de cette voie de signalisation Sonic Hedgehog (Shh). Cette répression est exercée par la notochorde adjacente à la zone de l'endoderme correspondant au domaine pancréatique via la sécrétion des facteurs FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2) et de l'activine- β B (membre de la famille du TGF- β). L'extinction de Shh est essentielle et suffisante pour la spécialisation pancréatique et induit l'expression de marqueurs pancréatiques tels que le facteur de transcription **Pdx1** (Pancreatic and duodenal homeobox 1) ou l'insuline (Hebrok et al., 1998) (**Figure 3a**). Confirmant l'importance de cette inhibition, le maintien de l'expression de Shh dans cette région de l'endoderme aboutit au développement d'un phénotype intestinal (Apelqvist et al., 1997).

D'autre part, la voie de signalisation Notch est un autre régulateur majeur du développement embryonnaire. Cette voie de signalisation est activée par l'interaction membranaire entre les récepteurs Notch, identifiés au nombre de 4 (Notch1, Notch2, Notch3 et Notch4) et les ligands membranaires Delta-like (Dll-1, Dll-3 et Dll-4) et Jagged (Jagged-1, Jagged-2) portés à la surface des cellules voisines. La liaison d'un de ces ligands à un de ses récepteurs induit le clivage du récepteur et fait intervenir successivement des métalloprotéases ADAM 10 ou ADAM 17 (aussi nommée TNF- α converting enzyme) libérant la partie extracellulaire du récepteur, ainsi qu'une γ -sécrétase pour le clivage de la partie intracellulaire. Ceci permet de libérer le domaine intracellulaire de Notch nommé NICD (Notch IntraCellular Domain). Celui-ci est relocalisé au niveau nucléaire et permet d'activer la transcription de ses gènes cibles tels que Hes-1 en s'associant à un complexe protéique de liaison à l'ADN nommé CSL (CBF1/RBPjk/Su(H)/Lag-1) et en recrutant des co-activateurs de la transcription tels que Mastermind (Kopan and Ilagan, 2009). Au cours du développement pancréatique, le mésenchyme adjacent à l'endoderme pancréatique joue un rôle important en activant cette voie de signalisation notamment *via* la sécrétion du facteur FGF10 (Fibroblast Growth Factor 10). Sa liaison au récepteur FGFR2 présent sur les cellules épithéliales de l'endoderme permet le maintien de l'expression de Notch dans les progéniteurs pancréatiques, stimule l'expression des facteurs de transcription **Ptf1 α** (Pancreatic Transcription Factor 1 α) et Sox9 garantissant ainsi l'expansion du pool de progéniteurs et leur maintien dans un état indifférencié (Apelqvist et al., 1999; Hart et al., 2003; Jacquemin et al., 2006; Murtaugh et al., 2003; Seymour et al., 2012) (**Figure 3b**).

L'expression des facteurs de transcription **Pdx1** et **Ptf1 α** est un évènement majeur participant au développement pancréatique. **Pdx1** est exprimé très précocement dans l'endoderme pré-pancréatique (dès e8.5) et son expression est maintenue dans les cellules endocrines β dans le tissu adulte (Ohlsson et al., 1993). Ce facteur est essentiel puisqu'il permet de réguler le développement, la prolifération et la différenciation du pancréas. En ce sens, les animaux n'exprimant plus Pdx1 se caractérisent par l'absence de pancréas à la naissance (Jonsson et al., 1994; Offield et al., 1996). **Ptf1 α** est également exprimé précocement (e9.5) par les progéniteurs pancréatiques et participe à l'organogenèse du pancréas. Des travaux de lignage cellulaire réalisés *in vivo* montrent que les cellules exprimant Ptf1 α sont à l'origine des différents types cellulaires pancréatiques. Son absence à pour conséquence la modification du devenir des progéniteurs qui se redirigent alors vers une destinée intestinale affectant profondément le développement du tissu pancréatique (Kawaguchi et al., 2002).

II.B La seconde transition : différenciation des progéniteurs :

Au cours de cette seconde phase, le pool de cellules progénitrices va entamer son processus de différenciation dont la première étape consiste en la ségrégation de 2 domaines tissulaires appelés « Tip » et « Trunk ». Alors que Ptf1 α régule l'orientation vers la voie **Tip** dont seront issues les **cellules acineuses**, la voie Notch induit l'expression du facteur de transcription Nkx6.1 qui stimule la différenciation des cellules progénitrices vers la voie **Trunk** qui permettra le développement des **cellules endocrines et canalaire** (Shih et al., 2013) (**Figure 3c**).

La différenciation de la cellule Tip en cellule acineuse est principalement orchestrée par l'expression des facteurs de transcription Ptf1 α et Mist1 (Muscle Intestine Stomach 1) qui permettront la mise en place du phénotype acineux (production des enzymes digestives et granules de zymogènes) *via* l'activation d'un programme transcriptionnel spécifique. En revanche, la cellule Trunk possède quant à elle 2 possibilités de différenciation : canalaire ou endocrine. C'est une balance entre l'expression de la voie Notch et du facteur de transcription Neurogenin 3 (Ngn3) qui permettra de déterminer le devenir cellulaire. En effet, la voie Notch qui est active dans l'ensemble des cellules de type Trunk inhibe l'expression et l'activité de Ngn3, celle-ci permettant la différenciation endocrine. Ainsi, c'est le niveau d'expression de Notch, qui permettra (niveau faible) ou non (niveau élevé) la différenciation vers une destinée

endocrine. Cependant, pour le moment, les mécanismes permettant de réguler différemment le niveau d'expression de Notch au sein de la population des progéniteurs pancréatiques sont encore méconnus (Murtaugh et al., 2003; Shih et al., 2013).

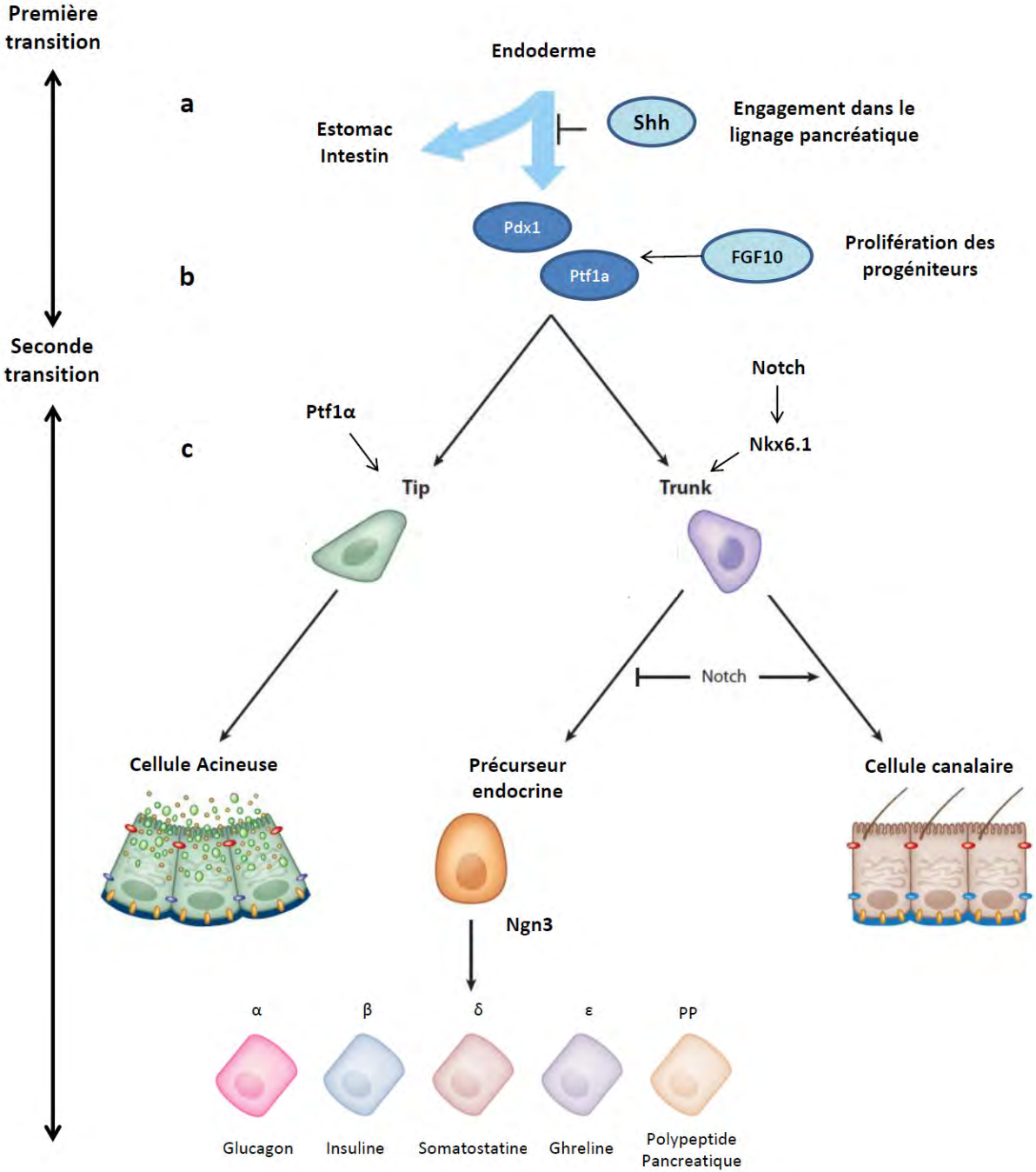


Figure 3 : Représentation simplifiée du développement pancréatique et des principaux facteurs de transcription impliqués.
(Adapté de Shih et al., 2013)

L'étude du développement pancréatique a ainsi mis en évidence le rôle majeur et précoce des facteurs de transcription Pdx1 et Ptf1 α au sein des progéniteurs pancréatiques. Par la suite, l'identification de ces facteurs de transcription a permis de réaliser de grandes avancées dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la carcinogénèse pancréatique. En effet, l'utilisation des promoteurs Pdx1 et Ptf1 α permet de cibler spécifiquement l'expression de différents transgènes dans le pancréas. Ces manipulations ont ainsi permis de générer des modèles murins génétiquement modifiés récapitulant l'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADK) tels que les souris nommées K-RAS ou KPC constituant des modèles de référence pour l'étude de ce cancer. La description approfondie de ces modèles murins sera abordée dans le chapitre VI : « Origines cellulaires de l'ADK ».

Chapitre III Le cancer du pancréas :

III.A Généralités :

A.1 Pathologie :

Le terme de cancer du pancréas regroupe différents types de tumeurs (**Tableau 1**) mais est principalement associé à l'adénocarcinome canalaire pancréatique (ADK) qui représente 85 à 90% des tumeurs pancréatiques (Wolfgang et al., 2013).

Dans la plupart des cas, l'ADK se développe au niveau de la tête du pancréas et se présente sous la forme d'une masse tumorale dense aux contours mal délimités. D'un point de vue clinique, le développement de ce cancer ne présente pas de symptômes caractéristiques (douleur abdominale diffuse, perte de poids, jaunisse, prurit..) et son évolution silencieuse entraîne un diagnostic tardif. En conséquence, les patients présentent généralement une invasion tumorale péri-pancréatique affectant les organes adjacents (foie, estomac, péritoine, ...), le système lymphatique, les nerfs (invasion péri-neurale), les vaisseaux sanguins ainsi que des métastases à distance (foie, poumons) excluant la possibilité d'une résection chirurgicale à des fins curatives.

TUMOR TYPE	GROSS	MICROSCOPY	CLINICAL IMPORTANCE
Acinar cell carcinoma	Large, soft, fleshy, solid masses	Pyramidal cells neoplastic cells form small lumina. Expression of digestive enzymes can be demonstrated by immunolabeling.	Rare, fully malignant neoplasm. 15% associated with metastatic fat necrosis caused by the release of digestive enzymes into the bloodstream.
Invasive ductal adenocarcinoma	Poorly defined, firm, solid, infiltrative masses	The neoplastic cells form glands and infiltrate tissues. Vascular and perineural invasion are common. Associated with a dense desmoplastic stroma.	Most common type of pancreatic cancer. Very poor prognosis.
Intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN)	Cystic tumors that arise in the larger pancreatic ducts. Finger-like papillae of neoplastic cells project into mucin-filled ducts	Papillae lined by mucin-producing neoplastic cells with varying degrees of dysplasia	IPMNs are detectable and curable noninvasive precursors to invasive pancreatic cancer. The challenge is not to over-treat low-grade IPMNs.
Mucinous cystic neoplasm (MCN)	Cystic neoplasm that almost always arises in the tail of the pancreas. Cysts filled with mucin.	Mucin-producing neoplastic epithelium resting on ovarian-type stroma	Can progress to invasive cancer if untreated
Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN)	Microscopic lesions	Noninvasive epithelial proliferations in the smaller pancreatic ducts. Associated with lobulocentric atrophy.	PanINs are a curable noninvasive precursor to invasive pancreatic cancer, but most are too small to detect
Pancreatoblastoma	Large, soft, solid masses	Similar to acinar carcinoma but also have squamoid nests	More common in children than adults
Pancreatic neuroendocrine tumor (PanNET)	Well-demarcated and soft, solid masses	Nests and trabeculae of relatively uniform cells with "salt and pepper" chromatin. Expression of neuroendocrine markers and hormones can be demonstrated by immunolabeling.	Some arise in the setting of a familial genetic syndrome. Aberrant hormone production can cause clinical syndromes. Fully malignant, with a 45% 10-year survival rate.
Serous cystadenoma	Cystic neoplasms with thin septa, and straw-colored fluid. Often have a central scar.	Clear cuboidal cells without atypia line cysts	Virtually always benign
Solid-pseudopapillary neoplasm	Solid masses that undergo cystic change caused by hemorrhage and necrosis	Poorly cohesive cells surround delicate blood vessels	Most arise in young women. Low-grade malignant neoplasms.
Variants of ductal carcinoma (adenosquamous, colloid, medullary, undifferentiated, etc.)	Most are solid	Varies based on tumor type	Can be clinically important to recognize

Tableau 1 : Classification des principaux types de cancers du pancréas.

(Adapté de (Wolfgang et al., 2013)

IPMN : Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm; MCN : Mucinous Cystic Neoplasm; PanIN : Pancreatic Intraepithelial Neoplasia; PanNET : Pancreatic NeuroEndocrine Tumor; SPN : Solid-Pseudopapillary Neoplasm.

A.2 Epidémiologie :

Malgré sa faible représentation dans la population, avec seulement 4% des cas de cancer dans le monde, le cancer du pancréas représente un problème de santé publique majeur. Son extrême agressivité, avec une médiane de survie n'excédant pas les six mois post-diagnostic ainsi qu'une mortalité avoisinant son incidence (266 669 décès pour 278 684 nouveaux cas en 2008) en font un des cancers les plus létaux, le plaçant au 4^{ème} rang de décès par cancer en Europe et aux Etats-Unis (Wörmann and Algül, 2013).

Ce pronostic très sombre est notamment lié à son évolution asymptomatique et à son fort potentiel métastatique. En effet, l'absence de signes cliniques et de biomarqueurs

spécifiques aboutissent à une prise en charge tardive des patients se présentant à un stade avancé voire invasif.

De plus, face à un arsenal thérapeutique déjà limité, le cancer du pancréas est considéré comme l'un des plus résistants à la chimio- et radio-thérapie. A l'heure actuelle, le seul traitement curatif disponible reste la résection chirurgicale dont seulement 15% des patients pourront bénéficier au moment du diagnostic. Cependant, l'exérèse n'offre qu'un bénéfice limité, avec un taux de survie à 5 ans de seulement 20 à 25% dû à la morbidité associée à l'acte chirurgical mais également en raison de rechutes loco-régionales ou à distance.

III.B Facteurs de risques :

Les causes et origines précises du cancer du pancréas restent encore méconnues à ce jour. Cependant, de nombreux facteurs de risques potentialisant la mise en place de la carcinogénèse pancréatique ont d'ores et déjà pu être identifiés.

B.1 Facteurs non modifiables :

Selon les données recueillies par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et la Société Américaine du Cancer, le cancer du pancréas est une pathologie préférentiellement associée à la vieillesse avec un âge moyen de 71 à 73 ans au moment du diagnostic et dont l'incidence est plus élevée chez les hommes que chez les femmes. De manière intéressante, cette différence liée au sexe pourrait trouver en partie son explication dans des différences de mode de vie, concernant notamment la consommation de tabac ou d'alcool, plus fréquentes dans la population masculine.

B.2 Facteurs comportementaux :

i. Tabagisme :

Avec 25% de cas lui étant attribuable, le tabagisme représente le facteur de risque majeur associé au développement du cancer du pancréas (Maisonneuve and Lowenfels, 2010). Une étude récente à grande échelle confirme cette forte association en démontrant un risque

deux fois plus élevé chez les fumeurs par rapport aux non fumeurs (Bosetti et al., 2012). De plus, ce risque augmente en fonction de la durée ainsi que de la quantité de tabac consommé et des analyses génétiques menées sur des résections pancréatiques démontrent une augmentation du nombre de mutations chez les fumeurs par rapport aux non fumeurs (Blackford et al., 2009).

Les effets délétères induits par le tabac peuvent être considérablement réduits. En effet, le risque de développement du cancer du pancréas diminue progressivement chez les ex-fumeurs jusqu'à rejoindre celui des non fumeurs 10 à 20 ans après l'arrêt de la cigarette (Bosetti et al., 2012). Ces données ont un impact important puisqu'elles suggèrent que l'arrêt du tabagisme à lui seul permettrait de diminuer significativement l'incidence de ce cancer dans la population.

ii. Alcool :

De nombreuses études mettent en évidence l'existence d'une corrélation positive entre la consommation excessive d'alcool et l'augmentation du risque de pathologies pancréatiques telles que la pancréatite chronique. Il demeure cependant une controverse concernant son influence sur le cancer du pancréas et la forte connexion existant entre le tabagisme et la consommation d'alcool rendent difficile l'analyse indépendante de ce facteur. Cependant, des études démontrent qu'il existerait bien une augmentation du risque (2 fois plus important) de développer un cancer du pancréas chez les personnes consommant plus de six verres d'alcool par jour en moyenne (Lucenteforte et al., 2012).

B.3 Autres facteurs de risques :

i. Prédispositions et facteurs génétiques :

La majorité des cancers du pancréas apparaissent de manière sporadique. Cependant, **10%** des ADK seraient liés à des **mutations génétiques héréditaires** prédisposant à développer la maladie. Ces prédispositions peuvent être classées selon différentes grandes catégories et concernent, les cancers pancréatiques familiaux, des syndromes génétiques associés au développement de différents types de tumeurs (Peutz–Jeghers Syndrome : PJS,

Familial-Atypical Multiple Mole Melanoma : FAMMM, Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer : HNPCC), les syndromes héréditaires impliquant un dysfonctionnement de l'organe (pancréatite chronique familiale) ainsi que différentes mutations germinales impliquant par exemple des gènes essentiels à la réparation de l'ADN (BRCA1/ BRCA2) (Wörmann and Algül, 2013). Le **tableau 2** représente différents syndromes et leur niveau de risque associé pour le développement de l'ADK.

GENETIC RISK	
Family history	Around 10% of PC are referable to inherited genetic factors Life-time risk for PC is 1.3–1.5% in general population; for individuals with a family history of PC increased risk of to two- to threefold; risk is around 6.4-fold greater in individuals with two FDRs and 32-fold greater in individuals with three or more FDRs
Hereditary cancer syndromes	Hereditary breast and ovarian cancer (<i>BRCA1/BRCA2</i>): RR: 3.5 (BRCA2); RR 2.3 (BRCA1) The Peutz–Jeghers syndrome (<i>STK11/LKB1</i>): PC life-time-risk: 11–36% Familial-atypical multiple mole melanoma syndrome (<i>CDKN2A</i>): cumulative PC risk 17% Li–Fraumeni (<i>TP53</i>): PC RR: 7.3 Hereditary non-polyposis colorectal cancer (<i>MLH1, MSH2, MSH6, PMS2</i>): PC life-time-risk: 3.7% Familial adenomatous polyposis (<i>APC</i>): PC RR 4.46 Ataxia teleangiectasia (<i>ATM</i>): PC RR 2.41
Hereditary syndromes with chronic inflammation/dysfunction of gland	Hereditary pancreatitis (<i>PRSS1, SPINK1, PRSS2, CTRC</i>): PC cumulative risk: 40–55% Cystic fibrosis (<i>CFTR</i>): PC RR: 5.3
Other causative germ-line mutation for FPC	<i>PALB2</i> in 4.9% of FPC <i>BCRA2</i> in 3–17% of FPC

Tableau 2 : Liste des prédispositions génétiques associées au développement du cancer du pancréas.

FDR : First-Degree Relative; FPC : Familial Pancreatic Cancer; PC : Pancreatic Cancer. (Adapté de Wörmann and Algül, 2013).

ii. Pancréatite chronique :

En association avec d'autres facteurs (génétiques, régime alimentaire riche en graisses, obésité, agents infectieux), l'excès d'alcool est considéré comme un facteur de risque majeur

sensibilisant le pancréas au développement d'une pancréatite chronique (PC) dont la survenue est elle-même associée au développement de l'ADK. En effet, l'alcool et ses métabolites provoquent de nombreux effets délétères affectant à la fois les fonctions des cellules acineuses (sécrétion des enzymes digestives, régénération cellulaire, intégrité de la membrane mitochondriale) et des cellules pancréatiques étoilées ou « pancreatic stellate cells » jouant un rôle important dans la réparation tissulaire (Clemens et al., 2014). La PC est associée à une dérégulation de la sécrétion et l'activation prématurée des enzymes digestives dans les cellules acineuses. Ceci provoque une inflammation chronique du pancréas, une forte réaction fibrotique, l'atrophie du tissu acineux et le développement de canaux pancréatiques anormaux aboutissant au dysfonctionnement progressif de l'organe (Pinho et al., 2014).

Une méta-analyse réalisée par Raimondi et coll. en 2010 a permis d'évaluer le risque relatif de cancer du pancréas lié à la PC. Cette étude réalisée à grande échelle révèle que les patients atteints de PC ou de forme héréditaire de PC présentent respectivement 13 et 70 fois plus de risques de développer un cancer du pancréas (Raimondi et al., 2010). On peut supposer que les lésions induites au cours de la PC associées à l'altération de la réparation tissulaire pourraient fragiliser le pancréas et le rendre plus sensible à la transformation, favorisant ainsi son évolution en ADK.

iii. Obésité :

L'obésité, dont l'incidence est en constante progression dans le monde entier représente un enjeu de santé publique majeur. En effet, en dehors des désordres métaboliques et des problèmes cardiovasculaires associés, de nombreuses études mettent en évidence un risque accru de développer différents cancers affectant l'œsophage, le sein, le colon, le rein ou encore le pancréas (Renehan et al., 2008). Les personnes obèses et notamment celles avec un indice de masse corporel (IMC) supérieur à 35 présentent 1,5 fois plus de risques de développer un cancer du pancréas que les personnes non obèses. Cette augmentation du risque n'est pas associée avec l'adiposité globale des individus mais plus particulièrement à l'adiposité abdominale et à la quantité de tissu adipeux viscéral (Arslan AA et al., 2010). De plus, l'obésité chez le jeune adulte augmente le risque et favorise le développement plus précoce d'un cancer du pancréas tandis que l'obésité chez les patients âgés est associée à une diminution de la survie par rapport aux patients non obèses (Li et al., 2009).

Une étude réalisée dans un modèle murin récapitulant le cancer du pancréas par

l'expression de l'oncogène K-RAS muté dans l'ensemble des cellules pancréatiques (souris K-RAS) renforce le lien entre alimentation, obésité et cancer du pancréas. En effet, un régime alimentaire riche en graisses induit la sur-activation de l'oncogène K-RAS muté, l'augmentation de la fibrose ainsi que du nombre de lésions préneoplasiques dans les pancréas de ces animaux. Ainsi, ce régime gras accélère la progression tumorale pancréatique et corrèle avec la diminution de la survie des animaux (Philip et al., 2013).

Même si les mécanismes précis reliant l'obésité à l'augmentation du risque de cancers sont encore méconnus, la présence d'adipocytes dans le microenvironnement tumoral peut donc jouer un rôle sur la progression tumorale. En ce sens, une étude réalisée sur le cancer du sein *via* un modèle de co-culture entre des adipocytes matures et des cellules tumorales mammaires murines ou humaines montre l'existence d'un dialogue bidirectionnel stimulant les capacités d'invasion et de chimio-/radio-résistance des cellules tumorales. Ce dialogue modifie le profil sécrétoire des adipocytes en induisant notamment l'augmentation de la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire IL-6 qui stimule à son tour les propriétés invasives des cellules tumorales. D'autre part, ce dialogue provoque la délipidation des adipocytes, la perte d'expression de leurs marqueurs adipocytaires et induit la surexpression de protéines impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire (Matrix Metallo Protéase : MMP11). L'existence de ces adipocytes péri-tumoraux (ou Adipocytes Associés au Cancer (AAC)) dont le phénotype est modifié, a été validée sur des coupes de tumeurs mammaires humaines (Dirat et al., 2011; Muller, 2013).

Considérant l'existence de ce dialogue entre adipocytes et cellules tumorales et du lien entre obésité et cancer, il sera intéressant d'étudier les conséquences de ce même dialogue en situation d'obésité. En ce sens, diverses études mettent en avant le rôle central joué par l'excès de tissu adipeux viscéral. Par rapport au tissu adipeux sous-cutané, le tissu adipeux viscéral est métaboliquement et immunologiquement plus actif et se caractérise par le recrutement de cellules inflammatoires (macrophages), une production et sécrétion plus intenses de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6), d'adipokines (leptine), de facteurs angiogéniques (VEGF) ou encore de facteurs de croissance (insuline, IGF-1, HGF). De plus, ce phénotype sécrétoire et pro-inflammatoire est accentué en condition d'obésité (Laurent et al., 2014) (**Figure 4**).

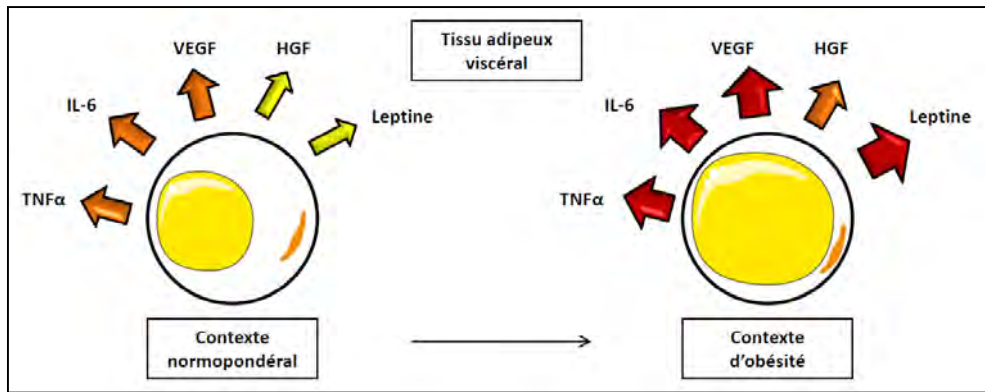


Figure 4 : Modification du profil sécrétoire du tissu adipeux viscéral au cours de l'obésité.
 Schéma de gauche : profil sécrétoire du tissu adipeux viscéral dans un contexte normo-pondéral.
 Schéma de droite : profil sécrétoire du tissu adipeux viscéral dans un contexte d'obésité.
 Flèches jaunes : sécrétion faible, flèches orangées : sécrétion moyenne, flèches rouges : sécrétion forte.

Ainsi, *via* ces sécrétions, le tissu adipeux pourrait donc agir, de manière paracrine, et/ou endocrine sur la tumeur à distance, en stimulant leur prolifération, l'angiogenèse et la formation de métastases (Doyle et al., 2012; Vongsuvan et al., 2013) (**Figure 5**). Ce phénotype sécréteur et pro-inflammatoire étant accentué chez les patients obèses, on peut supposer que l'obésité pourrait amplifier le potentiel pro-tumoral du tissu adipeux.

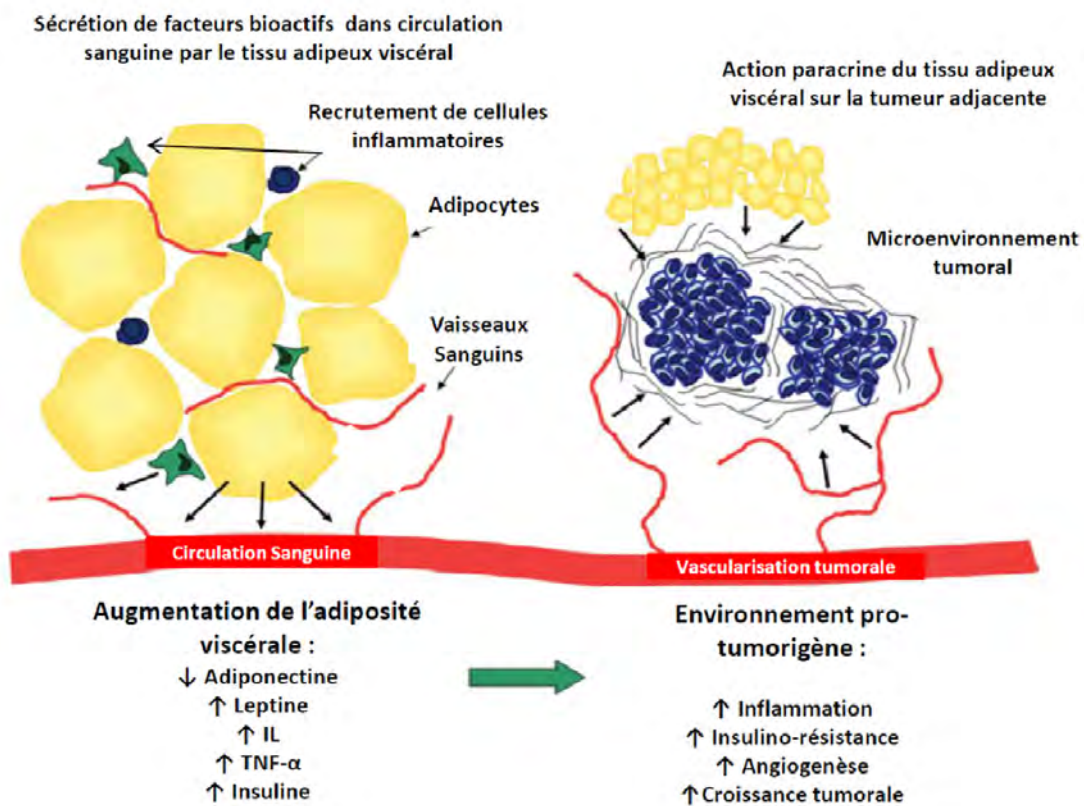


Figure 5 : Influences endocrine et paracrine de l'excès de tissu adipeux viscéral sur l'environnement et la cellule tumorale.
 (Adapté de Doyle et al., 2012)

iv. Diabète de type 2 (T2DM) : cause ou conséquence de l'ADK ?

Compte tenu du fait qu'un grand nombre de patients présentent un profil diabétique ou une intolérance au glucose au moment du diagnostic, la corrélation entre diabète et cancer du pancréas est établie depuis de nombreuses années. Cependant, les mécanismes reliant ces deux pathologies sont complexes et selon les études, le diabète se positionne comme un facteur de risque favorisant le développement de l'ADK ou comme une conséquence de l'évolution de la pathologie.

Alors que la proportion de patients diabétiques ou intolérants au glucose ne dépasse pas 30% dans certains cancers (prostate, sein), celle-ci atteint environ 70% dans le cas du cancer du pancréas (Aggarwal et al., 2013). Présentant le diabète comme un facteur de risque, certaines études mettent en évidence que les patients présentant un diabète de longue durée (> 5 ans) ont environ 1.5 fois plus de risques de développer un ADK que la population non diabétique (Huxley et al., 2005). Des hypothèses reliant le diabète à l'augmentation du risque de développer un ADK mettent en avant le rôle pro-tumoral de l'hyperinsulinémie et de l'hyperglycémie. Les rôles mitogènes et métaboliques de l'insuline et du glucose sur la cellule tumorale seront décrits par la suite.

Cependant, en plus d'être un facteur de risque, le diabète peut également être considéré comme un phénomène dépendant de l'initiation et de l'évolution de la tumeur. Dans ce contexte, ces diabètes dus au développement d'une pathologie sont dits secondaires et sont classés dans la catégorie des diabètes de type 3 (Type 3 Diabetes Mellitus : T3cDM) (Cui and Andersen, 2012). Soutenant que le diabète pourrait être une conséquence de l'ADK, Chari et coll. ont montré qu'environ 40% des patients analysés présentaient un diabète d'origine récente, diagnostiqué dans les 2 à 3 années précédant la mise en évidence du cancer (Chari et al., 2008). L'ADK étant une pathologie évoluant silencieusement sur de nombreuses années, cette cinétique implique que le diabète se développerait au cours de la carcinogenèse pancréatique. De plus, une analyse à grande échelle prenant en compte l'association temporelle entre la déclaration du diabète et de l'ADK révèle que le risque de cancer du pancréas diminue avec la longévité du diabète alors que le risque maximal est associé aux diabétiques nouvellement diagnostiqués (<1an) (risque relatif : 5.38 pour <1an, 1.95 de 1 à 4 ans, 1.49 de 5 à 9 ans et 1.47 >10 ans) (Ben et al., 2011).

Ainsi, d'après la littérature on peut supposer que les diabètes de longue durée constituent plutôt un facteur de risque pour le développement de l'ADK tandis que les nouveaux diabètes se développeraient en conséquence du cancer. De manière intéressante, un

diabète d'origine récente pourrait donc constituer une manifestation précoce du cancer (avant même sa détection grâce aux techniques d'imagerie médicale) et pourrait potentiellement permettre d'identifier une population à haut risque nécessitant une attention particulière pour le dépistage de l'ADK.

Chapitre IV Caractéristiques histologiques de l'adénocarcinome pancréatique :

Au niveau microscopique, l'ADK se caractérise par la présence de lésions de type épithéliales glandulaires, infiltrantes, mimant la structure des canaux pancréatiques sains entourés par une forte fibrose. Cette réaction fibrotique aussi nommée réaction desmoplasiq ue constitue le microenvironnement tumoral composé de fibroblastes, de cellules immunitaires, de cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques et d'une abondante matrice extracellulaire.

IV.A Histologie : Des lésions préneoplasiques à l'adénocarcinome :

L'ensemble des analyses cliniques et histopathologiques de biopsies issues de patients atteints d'ADK ont permis de mieux définir le déroulement de la carcinogènèse pancréatique.

Dès 1976, Cubilla et coll. identifient à proximité de l'adénocarcinome infiltrant, des lésions ou « hyperplasies » au niveau des canaux pancréatiques et suggèrent que ces lésions pourraient être précurseurs du cancer du pancréas (Cubilla and Fitzgerald, 1976). Par la suite, un faisceau d'arguments concernant la morphologie et la génétique de ces lésions pancréatiques ont permis de mettre en place un modèle de progression tumorale (Hruban et al., 2000). Celui-ci fait intervenir un processus multi-étapes associé à une atypie architecturale et génétique croissantes au cours de la carcinogènèse. Enfin, c'est en 2004 que Hruban et coll. ont participé à la mise en place d'une terminologie et d'une classification uniformisées en identifiant différents types de lésions préneoplasiques pouvant aboutir au développement de l'ADK : les Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanINs), les Mucinous Cystic Neoplasm (MCNs) et les Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm (IPMNs) (Hruban et al., 2004) (**Figure 6**). Cependant, la cinétique et la mutuelle exclusivité de ces différentes lésions préneoplasiques restent encore à déterminer clairement.

A.1 Les PanINs (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia) :

Les PanINs sont de loin les plus fréquentes et les plus étudiées des lésions préneoplasiques. Il s'agit de lésions microscopiques de phénotype canalaire se développant au sein des petits canaux et classifiées en PanINs 1a, PanINs 1b, PanINs 2 et PanINs 3 en fonction de leur aspect morphologique et de leur atypie cellulaire.

- Les PanINs de type 1 sont considérées comme étant de bas grade. Leur

morphologie est cuboïdale (PanIN 1a) ou micro-papillaire avec des pseudos-stratifications (PanIN 1b). Ces PanINs 1 présentent peu d'atypie nucléaire et conservent leur polarité avec un noyau localisé au pôle basal.

- Les PanINs 2 sont de grade intermédiaire, d'architecture micro-papillaire et possèdent une atypie nucléaire modérée avec peu de mitoses.
- Enfin, les PanINs de type 3 sont de haut grade et sont classées comme « carcinome in situ ». Le stade PanIN 3 se caractérise par une morphologie papillaire, une atypie nucléaire marquée avec une perte de polarité, de fréquentes mitoses et le détachement de groupes de cellules dans la lumière du canal (Distler et al., 2014; Ottenhof et al., 2011).

Associé à ces modifications morphologiques, on observe de nombreux événements génétiques dont l'accumulation et la séquence jouent un rôle majeur dans la progression vers l'ADK en créant un contexte permissif, favorable à la transformation tumorale. En effet, des analyses moléculaires des PanINs mettent en évidence l'activation précoce d'oncogènes tel que K-RAS dans 30% des PanINs 1 et dont la fréquence augmente au cours de la carcinogenèse puisqu'elle est retrouvée dans la quasi-totalité des stades invasifs. D'autre part, suite à cet événement considéré comme initiateur ferait suite la perte de suppresseurs de tumeurs tels que p16 à des grades intermédiaires tandis que les mutations inactivatrices touchant p53 ou encore SMAD4 auraient lieu plus tardivement au cours de la carcinogenèse (Klimstra and Longnecker, 1994; Maitra and Hruban, 2008).

A.2 Les IPMNs (Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm) :

Les IPMNs sont de volumineuses tumeurs de l'épithélium canalaire visibles radiographiquement et font partie des lésions pancréatiques de types kystiques. Elles se développent dans les canaux principaux ou secondaires et sont caractérisées par une prolifération papillaire de l'épithélium et une forte production de mucines (MUC1, 2, 5 et 6). Sur le plan histomorphologique, ces lésions sont proches des PanINs et ont en commun plusieurs altérations génétiques retrouvées dans l'ADK (K-RAS, p16, SMAD4 et p53) (Maitra and Hruban, 2008; Zamboni et al., 2013).

A.3 Les MCNs (Mucinous Cystic Neoplasm) :

Les MCNs représentent quant à elles les lésions préneoplasiques de l'ADK les moins fréquentes. Ces lésions de type kystique peuvent être très volumineuses et se développent plutôt au niveau de la tête et de la queue du pancréas mais à la différence des PanINs et IPMNs, celles-ci ne communiquent pas avec les canaux. Les MCNs se développent majoritairement chez les femmes et se caractérisent par une monocouche de cellules épithéliales surmontant un stroma de type ovarien. Les altérations génétiques présentes dans ces lésions ont été moins étudiées mais semblent être similaires à celles retrouvées dans l'ADK (Distler et al., 2014; Maitra and Hruban, 2008).

De part la taille des lésions associées aux MCNs et aux IPMNs, celles-ci sont détectables plus précocement par les techniques d'imagerie médicale courantes, à l'inverse des lésions microscopiques associées aux PanINs. Ainsi, d'autres études seront nécessaires afin d'identifier des événements moléculaires et/ou des marqueurs spécifiques et précoces présents dans les PanINs, permettant ainsi d'accélérer la prise en charge des patients et d'établir de nouvelles cibles thérapeutiques.

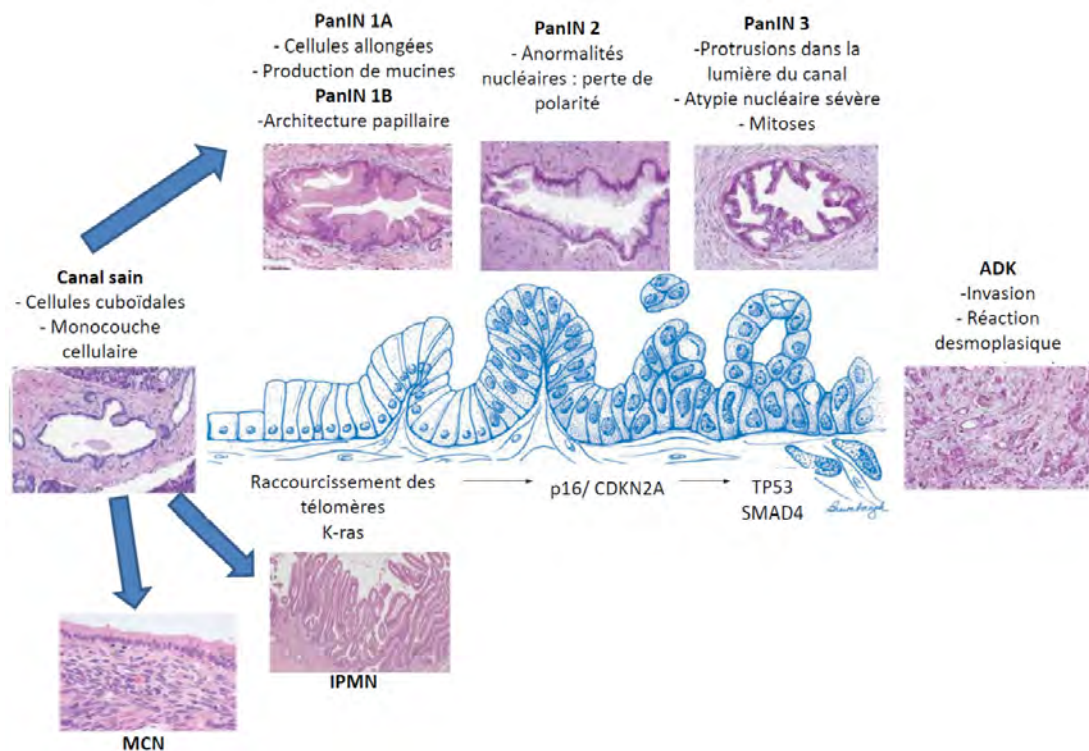


Figure 6: Modèle de progression de la carcinogenèse pancréatique et évènements génétiques associés.

(Adapté de Bardeesy and DePinho, 2002; Distler et al., 2014; Hezel et al., 2006).

Chapitre V Caractéristiques moléculaires de l'ADK:

Dans le but de découvrir des marqueurs précoces ainsi que de nouvelles cibles thérapeutiques, les évènements génétiques et moléculaires liés à la progression tumorale font l'objet d'une grande attention. A l'heure actuelle, l'ADK constitue une des pathologies les mieux caractérisées et il est désormais bien établi qu'elle résulte d'un processus multi-génique, faisant intervenir successivement l'activation d'oncogènes et la perte de suppresseurs de tumeurs. Dans ce chapitre je m'attacherai donc à décrire les évènements moléculaires majeurs survenant au cours de la progression tumorale. Je débiterai par les conséquences de l'activation de l'oncogène K-RAS et de la perte du suppresseur de tumeur p16 retrouvés dans 90% des tumeurs, avant de m'intéresser à la perte de p53, muté dans 50 à 70% des cas, et de SMAD4 muté et/ou délété chez environ 55% des patients. De plus, je décrirai succinctement certaines des voies de signalisation fréquemment dérégulées dans l'ADK avant de m'intéresser aux facteurs pouvant participer à la dérégulation de l'expression du génome.

V.A Activation d'oncogènes :

Proto-oncogène : gène classiquement présent dans la cellule et qui, par le biais de mutations gain de fonction ou d'amplifications devient un gène transformant, conférant un phénotype cancéreux à une cellule normale.

A.1 L'oncogène K-RAS et ses voies de signalisation :

La protéine K-RAS fait partie de la famille des petites protéines G. La mutation de cet oncogène, très fréquemment retrouvée associée à l'ADK (90 à 95%) est connue depuis de nombreuses années (Almoguera et al., 1988). Cet évènement génétique correspond à une mutation ponctuelle concernant plus particulièrement le codon 12 et qui induit la substitution de la glycine (GGT) en aspartate (GAT) (K-RAS^{G12D}), la plus fréquente, ou en valine (GTT) (K-RAS^{G12V}).

La protéine K-RAS possède une activité GTPase et fonctionne en collaboration avec une GEF (Guanine nucleotide Exchange Factor) et une GAP (GTPase Activating Protein). Alors que les GEFs favorisent le chargement en GTP de la protéine, représentant sa forme

active, les GAPs permettent l'hydrolyse du GTP en GDP induisant son inactivation. Les mutations concernant K-RAS ont pour effet de diminuer l'activité GTPasique de la protéine en affectant l'interaction protéique entre K-RAS et la GAP. Ainsi, l'association préférentielle de K-RAS au GTP a pour conséquence son activation « constitutive » (Bryant et al., 2014).

La mutation de l'oncogène *KRAS* est retrouvée dans 36% des PanINs 1A, 44% des PanINs 1B et 87% des PanINs 2/3 (Maitra et al., 2005). Cette fréquence élevée ainsi que son apparition dès les stades précoces laissent supposer que cette mutation est une des premières altérations génétiques ayant lieu au cours de la progression tumorale. *In vitro*, l'extinction de K-RAS par une approche d'ARN interférence dans des cellules tumorales pancréatiques humaines atténue leurs propriétés pro-tumorales (prolifération, migration, expression de facteurs angiogéniques) montrant l'importance de la signalisation K-RAS au maintien d'un phénotype tumoral (Fleming et al., 2005).

Parallèlement, les premiers modèles murins génétiquement modifiés ont permis d'effectuer des avancées considérables pour la compréhension de l'ADK avec notamment la publication en 2003 du **modèle murin K-RAS** (Lox-Stop-Lox-K-RAS^{G12D/+}/Pdx1-Cre) récapitulant les stades précoces de la pathologie (Hingorani et al., 2003). Ces souris sont hétérozygotes pour la mutation activatrice ciblant le gène K-RAS (K-RAS^{G12D/+}). Cette séquence portant la mutation ponctuelle est précédée d'un codon stop inhibant ainsi l'expression de l'oncogène muté. Cependant, l'utilisation de sites de recombinaison de part et d'autre de la séquence du codon stop (Lox-Stop-Lox ou LSL) permet d'exprimer de manière conditionnelle l'oncogène K-RAS constitutivement actif. En effet, ces souris expriment une Cre recombinase sous la dépendance d'un promoteur exprimé par les cellules progénitrices pancréatiques (Pdx1) permettant ainsi l'excision du codon stop et l'expression de l'oncogène K-RAS muté spécifiquement dans l'ensemble du pancréas (Hingorani et al., 2003) (**Figure 7**). Ces animaux récapitulent les stades précoces de la pathologie et confirment ainsi l'importance de la mutation K-RAS dans la carcinogenèse pancréatique.

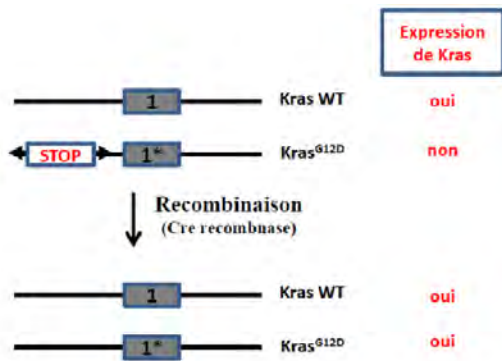


Figure 7: Représentation schématique du modèle murin K-RAS.

L'expression de la Cre recombinase permet l'expression conditionnelle de l'allèle K-RAS^{G12D} après la recombinaison et l'excision de la cassette Lox-Stop-Lox. (Adapté de Hingorani et al., 2003).

Utilisant le même principe de recombinaison, d'autres modèles murins génétiquement modifiés ont été créés afin de combiner la mutation de l'oncogène K-RAS à d'autres mutations fréquemment retrouvées dans l'ADK. C'est le cas du **modèle KPC** (Pdx1-Cre; Lox-Stop-Lox-K-RAS^{G12D/+} ; Lox-Stop-Lox-Trp53^{R172H/+}) exprimant K-RAS constitutivement actif et un mutant inactif de p53 (p53^{R172H}), ou bien du modèle K-RAS/p16 (Pdx1-Cre; Lox-Stop-Lox-K-RAS^{G12D/+}; Ink4a/Arf^{lox/lox}) combinant l'expression de l'oncogène K-RAS constitutivement actif à la délétion du gène suppresseur de tumeur p16 (Aguirre et al., 2003; Hingorani et al., 2005). Ces modèles multi-géniques induisent l'accélération de la carcinogenèse et le développement des stades invasifs et métastatiques se rapprochant ainsi des caractéristiques de l'ADK développé chez l'Homme.

Cependant, ces modèles murins ne permettent pas d'identifier l'origine cellulaire de l'ADK. En effet, l'expression de la recombinase sous la dépendance du promoteur Pdx1 ou Ptf1 α entraîne l'évènement de recombinaison dans l'ensemble des cellules pancréatiques et ce, dès le stade embryonnaire. La création de modèles murins permettant l'expression de la recombinase sous la dépendance de promoteurs spécifiques d'un type cellulaire (cellules canalaire, acinaires, endocrines) ont depuis vu le jour et ces modèles seront présentés et discutés dans le chapitre VI « Origines cellulaires de l'ADK ». D'autres approches consistent à utiliser des systèmes d'expression inductible afin de contrôler la période d'expression du transgène. En ce sens, Collins et coll. ont utilisé un modèle murin génétiquement modifié (Ptf1 α -Cre; Rosa26-rtTa-IRES-EGFP; TetO-K-RAS^{G12D}) dans lequel l'expression de la recombinase est placée sous la dépendance du promoteur Ptf1 α et permet l'expression de rtTa (reverse tetracycline transactivator) dans l'ensemble des cellules pancréatiques dès le stade embryonnaire et tout au long de la vie de l'animal. Dans ce modèle, seul l'ajout de doxycycline permet d'activer le rtTa qui induit à son tour l'expression de l'allèle K-RAS muté précédé d'un élément de réponse aux tétracyclines (système Tet-On). Ainsi, grâce à ce modèle

les auteurs mettent en évidence que l'induction de l'expression de l'oncogène K-RAS pendant plusieurs semaines chez une souris adulte induit la formation de PanINs dans le pancréas de ces animaux. D'autre part, les auteurs ont également utilisé ce même modèle murin afin de contrôler l'expression du transgène à différents stades de la carcinogenèse. Ils démontrent ainsi que l'inactivation de K-RAS, par l'arrêt du traitement à la doxycycline à des stades précoces (PanINs de bas grade) et avancés (PanINs de haut grade et ADK) permet la régression tumorale et le rétablissement partiel ou total du tissu sain (Collins et al., 2012). Ainsi, ces études confirment que la mutation de l'oncogène K-RAS est un pré-requis à l'initiation et au maintien de la carcinogenèse.

L'activation constitutive de la protéine K-RAS se répercute sur de nombreuses voies de signalisation telles que les voies Raf-MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et PI3K (PhosphoInositide-3-Kinase)/Akt impliquées dans la prolifération, la migration ou encore la survie cellulaire. Ainsi, ces voies pourraient constituer des alternatives thérapeutiques prometteuses (**Figure 8**).

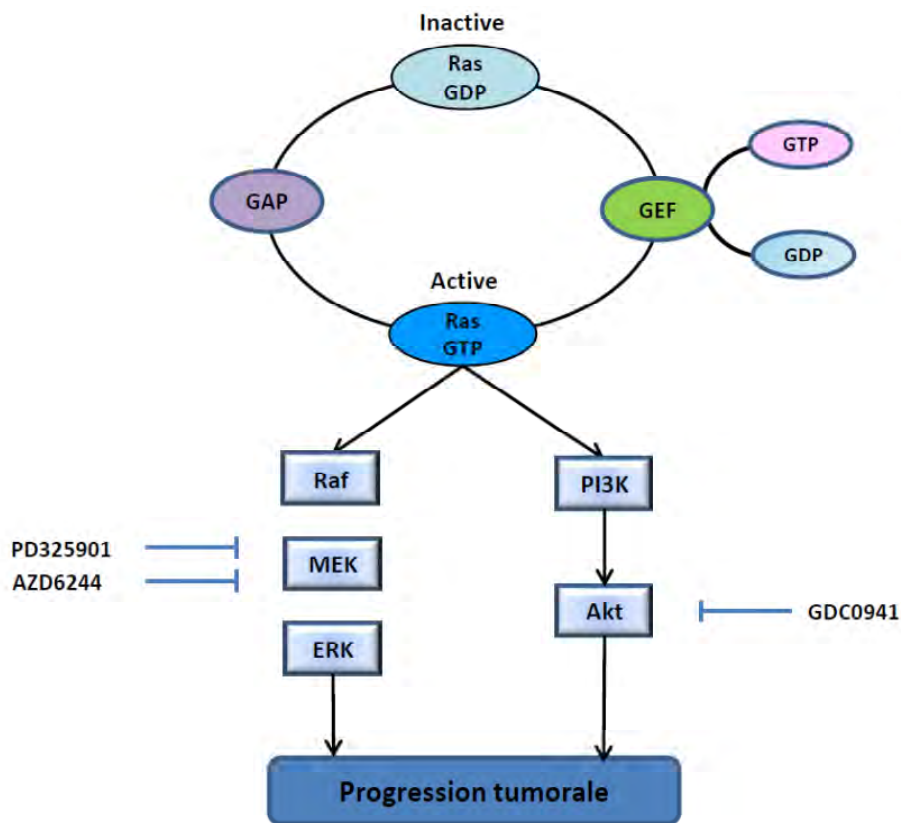


Figure 8 : Modèle d'activation de K-RAS et des voies de signalisation induites en aval de l'oncogène dans l'ADK.

i. La voie Raf-MAPK :

L'activation de Ras permet son interaction avec la sérine/thréonine kinase B-Raf qui à son tour induit l'activation de la voie MAPK. De manière intéressante, un tiers des ADK non mutés pour K-RAS comportent une mutation de B-Raf. Ces mutations mutuellement exclusives aboutissent toutes deux à l'activation de la voie MAPK (Calhoun et al., 2003).

L'importance de cette voie MAPK hyper-activée dans les cellules tumorales pancréatiques a été démontrée *in vitro* par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques des MEKs provoquant un effet cytostatique sur les cellules d'ADK (Gysin et al., 2005). Très récemment, une approche similaire a été réalisée *in vivo* avec l'injection de PD325901 (un inhibiteur de MEK) dans le modèle murin nommé KC (Ptf1 α -Cre; Lox-Stop-Lox-K-RAS^{G12D/+}) qui exprime l'oncogène K-RAS muté dans l'ensemble des cellules pancréatiques grâce à l'expression de la recombinaison sous la dépendance du promoteur Ptf1 α . Ce travail met en évidence que dans un contexte où K-RAS est hyper-activé, le maintien de l'activation de la voie de signalisation MAPK est nécessaire à l'initiation et à la progression tumorale. De plus, son inactivation à des stades avancés permet également la régression tumorale via la mise en place d'un processus de redifférenciation des cellules de PanINs en cellules acineuses (Collins et al. 2014).

ii. La voie PI3K/Akt :

La voie de signalisation PI3K/Akt est suractivée dans de nombreux cancers (prostate, colon, sein). Son importance vis-à-vis de la cellule tumorale est liée à la régulation de multiples fonctions cellulaires. Celles-ci incluent la survie, la prolifération ou encore la migration via l'activation d'effecteurs intracellulaires tels que Akt, P70S6K et Rac.

Cette voie est suractivée dans 60% des cancers du pancréas (Schlieman et al., 2003). En effet, l'amplification du gène AKT2, retrouvée dans 20% des ADK, ou bien la dérégulation de l'expression de PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), qui antagonise l'action de la PI3K via la déphosphorylation du PI(3,4,5)P (PIP₃) en PI(4,5)P (PIP₂), peuvent être responsables de cette activation soutenue (Ruggeri et al., 1998). De manière intéressante, dans un modèle murin exprimant K-RAS muté (K-RAS^{G12D}) combiné à la délétion homo- ou hétérozygote du gène suppresseur de tumeur *PTEN*, il a été mis en évidence que ces deux événements coopèrent pour accélérer la progression tumorale (médiane de survie de ~ 12 mois pour les souris K-RAS^{G12D} contre 3,5 mois et 3 semaines respectivement pour les souris

invalidées de façon hétérozygote ou homozygote pour *PTEN*), soulignant l'importance de la voie PI3K/Akt dans la carcinogenèse pancréatique (Hill et al., 2010).

Malgré ce rôle important, Colisson et coll. révèlent que la participation de la voie PI3K/Akt ne serait pas impliquée au cours de l'initiation tumorale. Dans cette étude, les auteurs comparent les conséquences de l'hyper-activation des voies MAPK ou PI3K/Akt sur la carcinogenèse pancréatique. Pour ce faire, ils utilisent des modèles animaux inductibles dont la forme oncogénique de B-Raf ($BRAF^{V600E}$) ou bien la forme constitutivement active de la sous-unité catalytique p110 α ($PI3KCA^{H1047R}$) de la PI3K sont exprimées spécifiquement dans le pancréas par l'induction de l'évènement de recombinaison suite au traitement par le tamoxifène. Alors que l'expression de la forme mutée de B-raf, impliquant l'hyper-activation de la voie MAPK provoque le développement de PanINs, les animaux exprimant une forme active de la PI3K ne développent pas de lésions. Cette étude met ainsi en évidence que la voie K-RAS/Raf/MEK/ERK est la voie de signalisation prépondérante pour l'initiation de l'ADK (Collisson et al., 2012).

Contrairement à ces résultats, une autre étude récente révèle que la voie PI3K/Akt est nécessaire et suffisante à l'initiation de l'ADK. Dans ce cas, la seule expression de la forme active de la PI3K ($PI3KCA^{H1047R}$) dans le pancréas dès le stade embryonnaire permet de récapituler fidèlement la carcinogénèse pancréatique développée par le modèle murin de référence, les souris K-RAS. De plus, dans cette même étude, les auteurs utilisent également le modèle murin KPC (animaux exprimant à la fois K-RAS muté et un mutant inactif de p53 spécifiquement dans le pancréas) et confirment ainsi le rôle central de la voie PI3K en aval de K-RAS dans l'ADK. En effet, dans ce modèle, l'utilisation d'un inhibiteur de l'ensemble des PI3K de classe I (GDC0941 actuellement en cours d'essai clinique dans le cancer du sein et du poumon) permet de bloquer la croissance tumorale chez les animaux traités *via* un effet antiprolifératif (Eser et al., 2013).

La divergence de résultats obtenus par ces deux groupes peut s'expliquer par l'utilisation de modèles murins divergents du point de vue du système d'expression du transgène. En effet, Eser et coll. utilisent le modèle murin $Ptf1\alpha$ -Cre; LSL- $PIK3CA^{H1047R/+}$ exprimant une recombinaise sous la dépendance du promoteur $Ptf1\alpha$. Ce modèle permet l'évènement de recombinaison et par conséquent l'expression de la forme active de PI3K dès le stade embryonnaire et dans l'ensemble des types cellulaires pancréatiques puisque le facteur de transcription $Ptf1\alpha$ est exprimé par les cellules progénitrices pancréatiques. En

revanche, Collisson et coll. utilisent un modèle murin exprimant une recombinaise inducible nommée Cre^{ERT2}. Cette recombinaise, fusionnée au domaine de liaison à l'ADN du récepteur aux œstrogènes ne pourra être relocalisée au niveau nucléaire, et donc permettre la recombinaison qu'après un traitement au tamoxifène. Dans cette étude, les animaux Pdx1-Cre^{ERT2}; PI3KCA^{H1047R} sont traités au tamoxifène en post-natal (animaux âgés de 14 jours). La différence de phénotype observée entre ces deux études pourrait donc provenir du fait du ciblage d'une population cellulaire différente, d'une moins bonne efficacité de recombinaison induite par la recombinaise ou encore d'un niveau d'expression de PI3K α différent entre ces deux modèles murins d'expression inducible.

Ainsi, même si la contribution des différents effecteurs de K-RAS à la carcinogénèse pancréatique reste à clarifier, de nombreuses études s'accordent sur le potentiel thérapeutique d'une approche combinée ciblant à la fois les voies MAPK et PI3K/Akt dans l'ADK. En effet, cette méthode permet d'obtenir une action synergique, potentialisant l'effet anti-tumoral de l'inhibiteur de MEK (AZD6244) et de PI3K (GDC0941) (Hofmann et al., 2012; Zhong et al., 2013).

A.2 K-RAS et métabolisme énergétique :

En raison de la forte réaction desmoplasique environnant la tumeur (réaction fibreuse du stroma associée à d'importants dépôts de matrice extracellulaire), l'ADK est très peu vascularisé et les cellules tumorales évoluent donc dans un environnement hypoxique et pauvre en nutriments. Ainsi, cet environnement stressant participe à la forte résistance de ce cancer en sélectionnant les cellules les plus agressives. Afin de survivre et de proliférer, les cellules tumorales doivent donc s'adapter en utilisant les ressources énergétiques disponibles.

Cette adaptation passe par une reprogrammation des voies régulant le métabolisme énergétique dont l'une fut découverte par Otto Warburg dans les années 1920 et nommée « Effet Warburg ». Ce processus fait référence à la capacité des cellules tumorales à favoriser la glycolyse aérobie au détriment de la phosphorylation oxydative réalisée *via* le cycle de Krebs. C'est notamment le cas des cellules tumorales pancréatiques, caractérisées par une activité glycolytique très élevée et une forte sécrétion de lactate. En effet, dans ces cellules le pyruvate produit au cours de la glycolyse est majoritairement redirigé vers la synthèse de lactate grâce à l'action de la LDHA (Lactate DésHydrogenase A) au lieu d'être dirigé vers le cycle de Krebs. Afin de maintenir la glycolyse et de limiter l'acidification intracellulaire, ce lactate est sécrété dans le milieu extracellulaire grâce aux transporteurs membranaires MCT4

(MonoCarboxylate Transporter 4) mais ce phénomène pourrait également contribuer à la progression tumorale en agissant notamment sur le microenvironnement comme cela a été mis en évidence pour d'autres types de tumeurs (Guillaumond et al., 2014).

Une fois dans le milieu extracellulaire le lactate peut stimuler l'angiogenèse. En effet, les cellules endothéliales expriment le transporteur MCT1 à leur surface qui permet l'import du lactate et l'activation d'une voie NF- κ B/IL-8 stimulant la migration et la tubulogenèse de ces cellules. Révélant *in vivo* l'existence d'un dialogue entre cellules tumorales et cellules endothéliales, Végran et coll. réalisent des co-injections sous cutanées en matrigel de cellules tumorales coliques humaines (WiDr) avec des cellules endothéliales humaines (HUVECs ou Human Umbilical Vein Endothelial Cells) invalidées ou non pour le transporteur d'import du lactate MCT1. Les résultats mettent en évidence que l'extinction de MCT1 dans les HUVECs retarde la croissance tumorale ainsi que le développement du réseau vasculaire tumoral (Végran et al., 2011). De plus, le lactate permet la stabilisation du facteur de transcription HIF- α (même en normoxie) et induit l'expression du récepteur VEGFR2 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) par les cellules endothéliales sensibilisant ainsi ces cellules aux facteurs angiogéniques produits par la tumeur (Sonveaux et al., 2012). En lien avec le pouvoir angiogénique du lactate, l'extinction de la LDHA par ARN interférence dans une lignée cellulaire d'hépatocarcinome humaine (HCCLM3) permet d'inhiber leur potentiel métastatique. En effet, l'absence de LDHA dans ces cellules diminue leur migration ainsi que leur sécrétion de VEGF et de MMP-2 (Matrix Metallo-Protease 2) impliqués dans les processus d'angiogenèse, d'invasion et de métastases (Sheng et al., 2012). Le rôle pro-tumoral de la LDHA est également mis en évidence dans un modèle de xénogreffe sous-cutanée de cellules tumorales pancréatiques humaines (cellules P198) puisque son inhibition pharmacologique par le FX11 ([3-dihydroxy-6-méthyl-7-(phénylméthyl)-4-propylnaphthalène-1-carboxylique acid]), qui est un analogue du gossypol, bloque la progression tumorale (Le et al., 2010).

De manière intéressante, des travaux récents mettent en évidence que le lactate est majoritairement sécrété par les cellules tumorales en hypoxie, celles-ci étant donc plus glycolytiques. Ce lactate est alors capté par les cellules tumorales normoxiques voisines moins glycolytiques qui possèdent le transporteur MCT1 ce qui a pour effet d'induire leur prolifération. On parle alors de « symbiose tumorale » (Guillaumond et al., 2013). L'environnement hypoxique participe à l'agressivité tumorale en stimulant l'activité de différentes voies métaboliques telles que celles du glucose et de la glutamine, deux sources

énergétiques essentielles à la cellule tumorale (Guillaumond et al., 2014) (**Figure 9**). Cependant, l'activation d'oncogènes et/ou la perte de suppresseurs de tumeurs au cours de la carcinogenèse peuvent également participer à cette reprogrammation métabolique comme c'est le cas pour l'oncogène K-RAS (**Figure 10**).

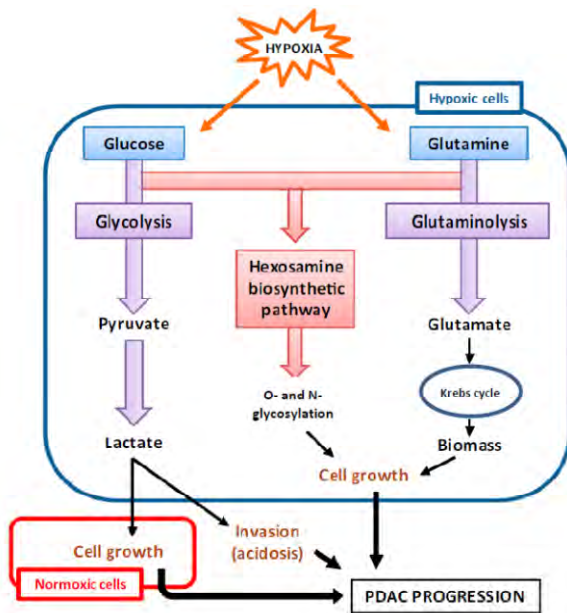


Figure 9 : Représentation schématique des voies métaboliques régulées par l'hypoxie dans les cellules tumorales pancréatiques.

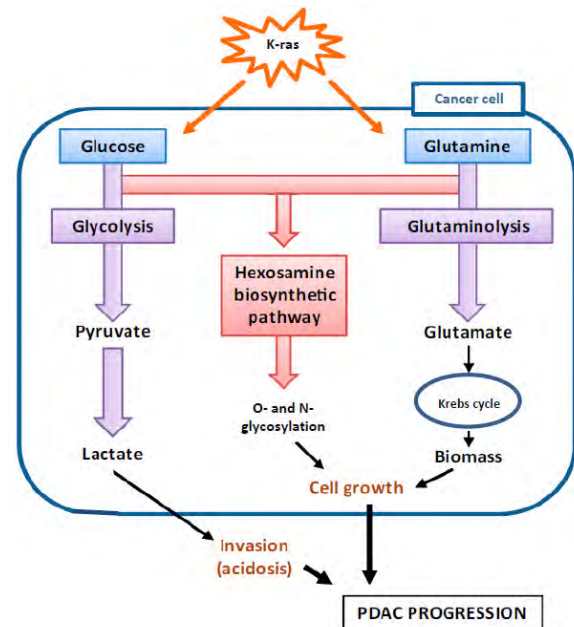


Figure 10 : Représentation schématique des voies métaboliques régulées par l'oncogène K-RAS dans les cellules tumorales pancréatiques.

(Adapté de Guillaumond et al., 2013)

A.3 K-RAS et métabolisme du glucose :

L'oncogène K-RAS est connu pour son rôle dans l'initiation et la progression tumorale de l'ADK, notamment via son action proliférative. Cependant, la présence de K-RAS muté a d'autres conséquences et régule notamment le métabolisme énergétique des cellules tumorales.

Mis en évidence grâce à un modèle murin génétiquement modifié récapitulant l'ADK (expression inductible de l'oncogène K-RAS combinée à l'expression d'un mutant inactif de p53), l'expression de l'oncogène K-RAS induit l'expression transcriptionnelle du transporteur au glucose GLUT-1 ainsi que d'enzymes clés de la glycolyse que sont les hexokinases 1 et 2 (HK1 et HK2), la phosphofructokinase 1 (PFK1) et la lactate déshydrogénase A (LDHA)

(Ying et al., 2012). Cette stimulation de la glycolyse induite par K-RAS pourrait également favoriser la survie et la prolifération des cellules tumorales pancréatiques comme cela a déjà été mis en évidence dans des lignées cellulaires tumorales coliques (Yun et al., 2009).

K-RAS régule également l'expression d'autres enzymes permettant de diriger les intermédiaires du glucose vers la voie de biosynthèse des hexosamines (HBP : Hexosamine Biosynthetic Pathway) et la branche non oxydative de la voie des pentoses phosphates (PPP : Pentose Phosphate Pathway). La voie HBP régule les modifications post-traductionnelles liées à la glycosylation des protéines (N- et O-glycosylations) tandis que la voie des PPP permet de générer du ribose-5-phosphate nécessaire à la biosynthèse des acides nucléiques, participant ainsi à la prolifération cellulaire (**Figure 10**). Il est à noter que l'ensemble de ces effets sont dépendants de l'activation de la voie MAPK et de l'expression du facteur de transcription c-Myc que l'on retrouve fréquemment surexprimé dans l'ADK (Ying et al., 2012).

De manière intéressante, la mise en hypoxie de cellules tumorales pancréatiques induit les mêmes effets métaboliques que l'expression de l'oncogène K-RAS (Guillaumond et al., 2013). Cependant, en normoxie les effets induits par K-RAS sont indépendants de HIF- α . On peut donc supposer que lorsque des cellules tumorales pancréatiques exprimant l'oncogène K-RAS muté se trouvent en hypoxie, K-RAS et HIF- α pourraient potentialiser leurs effets sur le métabolisme. Un argument à cette hypothèse se trouve dans les travaux de Guillaumond et coll. puisque des cellules tumorales exprimant K-RAS muté ont une activité glycolytique plus faible en normoxie qu'en hypoxie (Guillaumond et al., 2013).

A.4 K-RAS et métabolisme de la glutamine :

En plus de leur forte activité glycolytique, les cellules tumorales dépendent également de la glutamine pour couvrir leurs besoins énergétiques. Alors que cet acide aminé est considéré comme non essentiel pour les cellules saines, il devient un acide aminé essentiel et nécessaire à la survie et à la prolifération de cellules tumorales. Dès 1955, Eagle H. met en évidence que des cellules tumorales (HeLa) utilisent jusqu'à 10 fois plus de glutamine que d'autres acides aminés (Eagle, 1955).

Pour les cellules tumorales, la glutamine représente la seconde source de carbone après le glucose. Elle alimente le cycle de Krebs pour la production d'énergie et elle participe conjointement avec le glucose à la voie HBP permettant des modifications post-

traductionnelles des protéines (N- et O-glycosylations) (Guillaumond et al., 2013). De plus, elle joue un rôle en tant que « fournisseur » d'azote pour la synthèse des nucléotides et des acides aminés (Blum and Kloog, 2014).

Soulignant l'importance du métabolisme de la glutamine pour les cellules tumorales pancréatiques, une étude protéomique réalisée sur la lignée cellulaire humaine Panc-1 met en évidence la surexpression de certaines enzymes telle que la glutaminase (GLS) qui réalise la conversion de la glutamine en glutamate, première étape de son métabolisme (Zhou et al., 2012). De plus, des cellules tumorales pancréatiques murines (issues du modèle murin exprimant spécifiquement dans le pancréas la protéine K-RAS mutée combinée à la perte du suppresseur de tumeur p16) placées en hypoxie voient leur viabilité et leur prolifération diminuées suite à une privation en glutamine (Guillaumond et al., 2013).

Alors que la plupart des cellules saines et tumorales utilisent un mécanisme de désamination oxydative de la glutamine, catalysé par la protéine mitochondriale GLUD1 (GLUtamate Dehydrogenase 1), les cellules tumorales pancréatiques utilisent une voie métabolique différente. Celle-ci fait intervenir un mécanisme de transamination réalisée dans le cytoplasme et catalysée par des transaminases telles que GOT1 (Glutamic-Oxaloacetic Transaminase 1). Son et coll. ont montré que la reprogrammation de cette voie est dépendante de l'oncogène K-RAS qui induit l'expression de GOT-1 et diminue celle de GLUD1. Ceci a pour conséquence de rediriger le métabolisme de la glutamine vers cette voie non canonique qui permet aux cellules de proliférer et de maintenir leur potentiel redox via l'augmentation du ratio NADPH/NADP⁺ (**Figure 11**). Ainsi, la privation en glutamine ou bien l'extinction ou l'inhibition d'enzymes impliquées dans cette voie (GOT1, MDH1 ou ME1) induisent une augmentation des espèces réactives de l'oxygène et inhibe la croissance des cellules tumorales pancréatiques *in vitro* et *in vivo*. En revanche, ceci reste sans effets sur des cellules canalaire pancréatiques humaines non tumorales (cellules HPDE : Human Pancreatic Ductal Cells) (Lyssiotis et al., 2013; Son et al., 2013). Ainsi, cette nouvelle voie métabolique semble être une particularité de l'ADK et pourrait représenter une opportunité intéressante pour le développement d'approches thérapeutiques ciblées. Notamment, le rôle de cette voie dans le maintien du potentiel redox de l'ADK pourrait être utilisé afin de sensibiliser les cellules tumorales à un stress oxydatif. Par exemple, une approche potentielle serait de combiner l'inhibition de cette voie à de la radiothérapie générant des espèces réactives de l'oxygène.

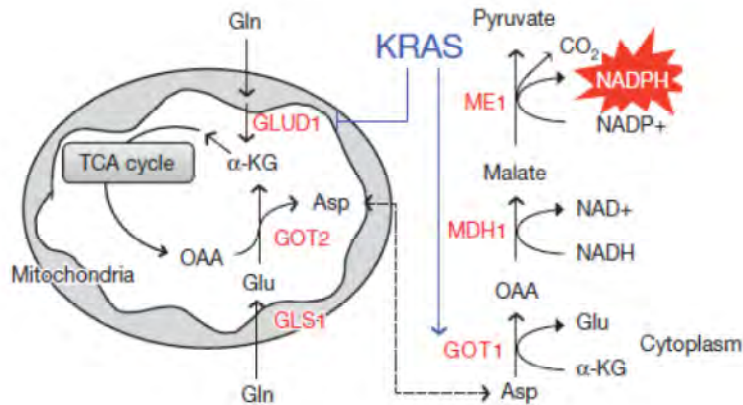


Figure 11 : Reprogrammation du métabolisme de la glutamine par l'oncogène K-RAS dans l'ADK.

α -KG : alpha-ketoglutarate; Asp : Aspartate; Gln : glutamine; Glu : glutamate; GLS1 : glutaminase 1; GLUD1 : glutamate dehydrogenase 1; GOT-1 : Glutamic-oxaloacetic transaminase 1; ME1 : malic enzyme 1; MDH1 : malate dehydrogenase 1; OAA : oxaloacetate. (Adapté de Son et al., 2013).

A.5 K-RAS, autophagie et macropinocytose :

Dans cette partie, je m'attacherai à décrire succinctement les fonctions de l'autophagie et de la macropinocytose dans le contexte de l'ADK. Ces processus cataboliques consistent en la dégradation de composants intracellulaires (protéines, organelles) pour l'autophagie, tandis que la macropinocytose est une forme d'endocytose permettant à la cellule d'incorporer et de dégrader des macromolécules extracellulaires telles que l'albumine. La dégradation de ces composants cellulaires ou extracellulaires permet de générer des acides aminés, des lipides ou encore des nucléosides qui peuvent être recyclés par la cellule (Sousa and Kimmelman, 2014).

Le rôle de l'autophagie et de la macropinocytose dans le cancer est complexe en raison de son rôle protecteur ou au contraire pro-tumoral selon les types de tumeurs considérés. Dans l'ADK, les données de la littérature tendent cependant vers un rôle pro-tumoral, favorisant la survie des cellules cancéreuses dans un environnement stressant, pauvre en nutriments et en oxygène. Ces deux phénomènes permettraient de fournir le matériel nécessaire à la production d'énergie et ainsi de maintenir le métabolisme énergétique élevé de la cellule tumorale.

Comme cela a pu être mis en évidence dans des cellules tumorales pancréatiques humaines, l'oncogène K-RAS participe également à ces processus cellulaires. En effet, Commisso et coll. ont montré que par rapport à des cellules tumorales pancréatiques

exprimant la protéine K-RAS sauvage (cellules BxPC3), des cellules tumorales exprimant l'oncogène K-RAS muté (cellules MiaPaCa) présentent une activité de macropinocytose plus intense. Soulignant l'importance de ce processus, l'inhibition pharmacologique de la macropinocytose affecte la prolifération des cellules MiaPaCa *in vitro* et provoque le ralentissement voire dans certains cas la régression tumorale *in vivo* (xénogreffes sous-cutanées) (Commisso et al., 2013).

Parallèlement à l'utilisation des processus de macropinocytose comme source énergétique pouvant soutenir le maintien et la progression tumorale, les cellules tumorales pancréatiques sont également « dépendantes » de l'autophagie. En effet, son inhibition pharmacologique par l'injection de chloroquine (inhibition de l'acidification des compartiments cellulaires acides nécessaire à l'autophagie) inhibe la croissance tumorale *in vivo* et augmente la survie des animaux dans des modèles murins de xénogreffes sous-cutanée ou orthotopique de cellules d'ADK (Yang et al., 2011). Etayant son rôle pro-tumoral, une analyse réalisée sur des coupes de tumeurs pancréatiques humaines met en évidence qu'un niveau d'autophagie élevé dans la tumeur est associé à un mauvais pronostic et à une diminution de la survie sans rechute chez ces patients (Fujii et al., 2008). Afin d'évaluer le rôle de K-RAS dans ce phénomène, différentes lignées tumorales, mutées (cellules HCT-116 : lignée tumorale colique, H460 : lignée tumorale de poumon, Panc-1 : lignée tumorale pancréatique) ou non (cellules PC3 : lignée tumorale prostatique) pour l'oncogène K-RAS ont été analysées. Les résultats mettent en évidence que l'activation de l'oncogène K-RAS est associée à un niveau basal d'autophagie plus élevé, même en présence de nutriments, par rapport aux cellules tumorales ne possédant pas la mutation. De plus, cette même étude montre que l'expression exogène de l'oncogène K-RAS muté dans des cellules non tumorales (cellules iBMK : immortal Baby Mouse Kidney epithelial cells) induit l'augmentation de leur niveau basal d'autophagie. *In vivo*, ces cellules transformées acquièrent un potentiel tumoral qui est diminué lors de l'inhibition de l'autophagie (Guo et al., 2011).

En conclusion, compte tenu de l'importance de ces différentes voies métaboliques pour la survie et la prolifération des cellules tumorales, les stratégies visant à altérer le fonctionnement de ces voies ou bien à priver les cellules de ces apports énergétiques pourraient aboutir à des stratégies thérapeutiques innovantes et efficaces.

V.B Suppresseurs de tumeurs :

Suppresseur de tumeur : gène ayant pour fonction le contrôle de la prolifération cellulaire et qui, par son inactivation, participe au développement ou à la progression tumorale.

B.1 p16/CDKN2A ou INK4A :

Ce gène code pour un membre de la famille des inhibiteurs de protéines kinases dépendantes des cyclines (CDKI) et est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire. En effet, p16 prévient l'interaction entre la cycline D et les CDK4/6, inhibant ainsi la transition G1/S et par conséquent la prolifération.

La perte de fonction de ce gène est fréquente dans l'ADK (approximativement 90% des cas) et apparaît dans les stades intermédiaires de la carcinogenèse. L'inactivation de ce gène supprimeur de tumeur résulte d'une délétion homozygote (40% des ADK), de mutations perte de fonction ou plus minoritairement de l'hyperméthylation du promoteur (Rozenblum et al., 1997; Schutte et al., 1997).

L'utilisation des modèles murins génétiquement modifiés a permis de caractériser l'importance de cet événement au cours de la carcinogenèse pancréatique. Alors que les souris exprimant l'oncogène K-RAS muté spécifiquement dans le pancréas (modèle murin K-RAS) développent des lésions locales de stades préneoplasiques (PanINs), la délétion de p16 à elle seule ne provoque pas de lésions. Cependant, la combinaison de l'expression de K-RAS constitutivement actif associée à la délétion de p16 agit en synergie et induit l'accélération de la carcinogenèse ainsi que le développement de tumeurs invasives et métastatiques. Ceci révèle que le supprimeur de tumeur p16 n'interviendrait pas au cours de l'initiation tumorale mais agirait en freinant le cours de la progression tumorale (Aguirre et al., 2003).

B.2 TP53 :

p53 est un facteur de transcription essentiel jouant le rôle de « gardien » du génome. Activé lors d'un stress cellulaire, p53 régule les points de contrôle G1/S et G2/M du cycle cellulaire prévenant ainsi l'accumulation d'altérations génétiques et la transformation en induisant l'arrêt du cycle ou l'apoptose. Ce supprimeur de tumeur est muté dans 50 à 70 %

des ADK. Ces mutations ponctuelles affectent sa capacité de liaison à l'ADN et sont associées à la perte de fonction de la protéine (Hezel et al., 2006; Rozenblum et al., 1997). La perte de p53 est un évènement tardif au cours de la carcinogénèse pancréatique et confère un avantage sélectif aux cellules tumorales en leur permettant ainsi d'échapper à la mort cellulaire programmée malgré l'accumulation de mutations.

Parallèlement à la perte de p53, on retrouve la délétion homozygote du locus 9p21 dans 40% des ADK. Cette délétion a pour conséquence la perte simultanée des suppresseurs de tumeur p16^{INK4A} et p19^{ARF} puisque l'utilisation d'un cadre de lecture alternatif sur ce même locus permet de générer deux transcrits différents (Quelle et al., 1995). Permettant de stabiliser la protéine p53, la co-délétion de p19^{ARF} dans de nombreux ADK peut avoir des conséquences importantes sur la régulation du cycle cellulaire et la progression tumorale. En effet, p19 interagit avec la protéine MDM2 (Mouse Double Minute 2 homolog) qui possède une fonction ubiquitine ligase et induit la dégradation de p53 au protéasome. Ainsi l'interaction de p19 avec MDM2 a pour conséquence d'empêcher la dégradation de p53 (Zhang et al., 1998). Dans ce contexte, malgré la perte de fonction d'un seul allèle de p53 dans 50 à 70% des ADK, la délétion homozygote de p19^{ARF} dans 40% des cas permet à la protéine MDM2 d'induire la dégradation de la protéine p53 fonctionnelle entraînant ainsi la perte de contrôle du cycle cellulaire.

L'importance de ce « gardien » du génome est soutenue par le phénotype du modèle murin d'ADK nommé KPC, co-exprimant les protéines K-RAS constitutivement active (K-RAS^{G12D}) et p53 non fonctionnelle (Trp53^{R172H}). En effet, la mutation de ce suppresseur de tumeur associée à l'activation constitutive de K-RAS agit de manière synergique et accélère la progression tumorale (Hingorani et al., 2005).

B.3 TGFβ et SMAD4/DPC4 :

Cette voie de signalisation est impliquée dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la prolifération, la migration, la différenciation ou encore l'apoptose.

Le TGFβ (Transforming Growth Factor β) est une cytokine sécrétée, agissant *via* l'hétérodimérisation des récepteurs serine/thréonine kinase TGFβ-R1 et TGFβ-R2. Leur activation permet la phosphorylation des protéines intracellulaires SMAD2 et 3 qui vont interagir à leur tour avec SMAD4, aussi nommé DPC4 (Deleted in Pancreatic Cancer locus 4), un régulateur transcriptionnel essentiel de la voie de signalisation du TGFβ. En effet,

SMAD4 permet la translocation nucléaire des facteurs de transcription SMAD2 et 3 et assure l'effet antiprolifératif lié à cette voie de signalisation notamment *via* l'inhibition de l'expression de c-myc et l'activation de p21 (Maier et al., 2010). Constituant un évènement tardif de la carcinogenèse, le gène *SMAD4* est la cible de mutations ponctuelles et/ou de délétions dans environ 55% des ADK, assurant ainsi un avantage prolifératif aux cellules tumorales (Hahn et al., 1996; Wilentz et al., 2000).

Cependant, le rôle de la voie TGF β dans la carcinogenèse reste complexe puisqu'en parallèle de son action antiproliférative, elle stimule la migration cellulaire ainsi que la transition épithélio-mésenchymateuse. SMAD4 semble être un acteur central de cette balance existant entre les effets anti- et pro-tumoraux de cette voie de signalisation. A ce titre, les travaux de Levy et coll. réalisés sur des cellules tumorales pancréatiques humaines décrivent deux classes de gènes régulés par la voie TGF β . Alors que les gènes régulés de manière dépendante de SMAD4 engendrent les effets migratoires et cytotatiques, le TGF β stimule la transition épithélio-mésenchymateuse, de manière SMAD4 indépendante. Ainsi, la perte de SMAD4 dans l'ADK pourrait induire un déséquilibre favorisant l'effet pro-tumoral de la voie TGF β aux dépens de son activité anti-tumorale (Levy and Hill, 2005).

V.C Voies de signalisation dérégulées :

C.1 Réactivation de voies de signalisation associées au développement embryonnaire:

Au cours de la carcinogenèse pancréatique différentes voies de signalisation impliquées au cours du développement embryonnaire sont réactivées et participent à la progression tumorale. C'est notamment le cas des voies de signalisation Notch et Shh. Leurs fonctions au cours du développement pancréatique ayant déjà été décrites dans le chapitre II, je m'attacherai donc ici à décrire très succinctement leurs rôles mis en évidence au cours de l'ADK.

Dans les tissus sains chez l'adulte, Notch et ses ligands sont très peu exprimés et dans le pancréas, cette expression est limitée aux cellules centro-acineuses. Cependant, cette voie de signalisation est réactivée dans de nombreux cancers et notamment dans l'ADK. En effet, Miyamoto et coll. ont montré que l'ensemble des ligands et récepteurs de la voie Notch sont surexprimés dans les tumeurs pancréatiques humaines et murines et ce, dès les stades

préneoplasiques. Dans l'ADK, les auteurs démontrent que cette voie Notch est activée en aval de l'EGFR et est essentielle à l'initiation tumorale induite par le TGF- α (Miyamoto et al., 2003). En ce sens, le blocage de la voie de signalisation Notch par un inhibiteur de la γ -sécrétase qui empêche la libération du domaine intracellulaire de Notch (NICD), permet d'inhiber le développement tumoral *in vivo* dans le modèle murin KPC récapitulant l'ADK (Plentz et al., 2009).

D'autre part, la dérégulation de la voie de signalisation Hh est également rapportée dans de nombreux cancers. Ainsi, alors que le ligand Shh est absent du tissu sain, on retrouve son expression dans 70% des ADK, aussi bien dans les lésions préneoplasiques que les stades invasifs. Une étude réalisée *in vitro* et *in vivo* met en évidence que l'utilisation de la cycloamine, un inhibiteur de SMO diminue la survie et la prolifération des cellules tumorales (Thayer et al., 2003). De plus, dans un modèle de xélogreffe orthotopique, l'inhibition de la voie Hh altère fortement les capacités métastatiques des cellules tumorales pancréatiques. Cet effet est potentialisé par l'association de la cycloamine à la gemcitabine, la chimiothérapie de référence pour le traitement de l'ADK (Feldmann et al., 2007). Mais la voie de signalisation Hh joue également un rôle important dans le dialogue entre cellules tumorales et le microenvironnement. En effet, le ligand sécrété par les cellules tumorales pancréatiques agit sur le compartiment stromal et participe à la réaction desmoplastique (Bailey et al., 2008). En ce sens, Olive et coll. ont démontré que l'utilisation d'un inhibiteur de la voie Hh (IPI-926, un dérivé de la cycloamine) chez des souris récapitulant la carcinogenèse pancréatique permet de diminuer la réaction stromale et d'augmenter la perfusion des tumeurs. De ce fait, l'accès des agents chimiothérapeutiques à la tumeur est facilité et permet de stabiliser temporairement la pathologie (Olive et al., 2009).

C.2 Surexpression des voies de signalisation associées aux facteurs de croissance :

Dans l'ADK, on observe la surexpression de nombreux facteurs (et de leurs récepteurs respectifs) pouvant participer à la progression tumorale via leurs activités mitogéniques et angiogéniques tels que l'HGF (Hepatocyte Growth Factor), le FGF, le VEGF, le PDGF β ou encore le TGF β (Ebert et al., 1994; Itakura et al., 1997; Korc, 2003). Compte tenu de la diversité de ces facteurs, j'ai choisi de décrire succinctement les rôles des facteurs de

croissance les mieux caractérisés à ce jour que sont l'EGF, l'IGF et l'insuline.

i. EGFR/EGF :

Dans l'ADK, le récepteur de l'EGF (EGFR) ainsi que ses principaux ligands, l'EGF (Epidermal Growth Factor) et le TGF- α , sont surexprimés par les cellules tumorales (Korc et al., 1992). Cette surexpression est associée à un mauvais pronostic ainsi qu'à la diminution de la survie des patients (Ueda et al., 2004). Cette voie de signalisation, également surexprimée dans de nombreux cancers (poumons, colon, sein, prostate) stimule l'angiogenèse ainsi que de nombreuses fonctions cellulaires (prolifération, survie, migration, invasion) favorisant la progression tumorale. En plus de ces fonctions, dans le contexte du pancréas sain, le traitement *in vitro* d'explants d'acini par le TGF- α induit la métaplasie acino-canalair. Ce phénomène fait référence à la conversion des cellules acineuses en cellules de phénotype canalaire, représentant une origine probable des lésions préneoplasiques (Means et al., 2005). En effet, Ardito et coll. ont démontré que l'initiation tumorale dirigée par l'oncogène K-RAS est dépendante de la surexpression de l'EGFR ainsi que de la présence de la métalloprotéase membranaire ADAM-17 (A Disintegrin And Metalloproteinase). L'ADAM 17 permet l'activation de l'EGFR en clivant le précurseur transmembranaire de l'EGF, nommé proHB-EGF (Heparin-Binding Epidermal-like Growth Factor) qui ainsi libéré dans le milieu extracellulaire peut activer l'EGFR. Cet évènement est essentiel puisque l'extinction génétique de l'EGFR, de l'ADAM17 ou l'inhibition pharmacologique du récepteur avec l'erlotinib (inhibiteur sélectif de la tyrosine kinase de l'EGFR) ou du ligand avec le cetuximab (anticorps monoclonal murin humanisé ciblant et bloquant l'EGFR) dans le modèle murin K-RAS permet de bloquer la carcinogenèse (Ardito et al., 2012).

ii. Insulin-like Growth Factor Receptor 1 (IGFR-1) et Insulin like Growth factors (IGFs) :

Les Insulin-like Growth Factors 1 et 2 (IGF1, IGF2) sont des peptides majeurs impliqués dans la croissance cellulaire et sont les ligands des récepteurs à activité tyrosine kinase Insuline-like Growth Factor Receptor 1 et 2 (IGFR-1, IGFR-2). L'activation de IGFR-

Il stimule principalement les voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt exerçant ainsi des effets prolifératifs et anti-apoptotiques.

Dans l'ADK, on observe une forte augmentation de l'expression d'IGF1 dans les sérums et les tumeurs des patients (Karna et al., 2002). Parallèlement, le récepteur IGFR-1 est surexprimé dans 64% des cas et son niveau d'expression corrèle positivement avec une diminution de la survie des patients (Hakam et al., 2003). De manière intéressante, l'inhibition pharmacologique du récepteur IGFR-1 stimule l'apoptose et bloque la prolifération et la migration des cellules tumorales pancréatiques (BxPC3) *in vitro*. De plus, son inhibition *in vivo*, dans un modèle de xénogreffe sous-cutanée, provoque un ralentissement de la croissance tumorale et permet de sensibiliser les cellules tumorales à un agent chimiothérapeutique couramment utilisé pour le traitement de l'ADK, le 5-FluoroUracile (5-FU) (Piao et al., 2008).

iii. Insuline et récepteurs à l'insuline :

L'insuline sécrétée par les cellules β des îlots de Langerhans permet de réguler l'homéostasie du glucose, mais possède également un rôle de facteur de croissance. Cette hormone agit via sa liaison sur les récepteurs à l'insuline IR-A, exprimés au cours du développement et surexprimés dans l'ADK, et IR-B responsables des effets métaboliques de l'insuline. Sur ses tissus cibles, l'insuline exerce sa fonction proliférative principalement par l'activation de la voie de signalisation MAPK, alors que la voie PI3K/Akt régule plutôt la survie, le transport du glucose et la synthèse protéique (Trajkovic-Arsic et al., 2013).

En raison de leur proximité anatomique, le tissu pancréatique exocrine est soumis aux fortes concentrations hormonales sécrétées (insuline, glucagon, somatostatine) par les îlots de Langerhans, estimées 20 fois supérieures à la concentration retrouvée dans la circulation sanguine (Trajkovic-Arsic et al., 2013). De ce fait, dans l'ADK les cellules tumorales pancréatiques sont également soumises à ces fortes concentrations hormonales et les capacités mitogènes de l'insuline pourraient ainsi participer à la progression tumorale. En ce sens, des études *in vitro* mettent en évidence que le récepteur de l'insuline est exprimé par différentes lignées tumorales pancréatiques (Fisher et al., 1996). Cette expression permet à l'insuline de stimuler leur prolifération ainsi que le transport du glucose *via* l'activation des voies MAPK et PI3K/Akt et l'expression du transporteur du glucose GLUT-1 (Ding et al., 2000).

Ces arguments renforcent donc le lien existant entre le diabète de type 2, associé à un état d'hyperinsulinémie et l'ADK où l'insuline sécrétée en grande quantité et à proximité du tissu tumoral pourrait favoriser le développement et/ou la progression tumorale pancréatique.

V.D Autres altérations :

D.1 Le raccourcissement des télomères :

Les télomères sont des répétitions hexamériques situées aux extrémités des chromosomes, essentielles à leur intégrité et au maintien de la stabilité génomique. Lors du raccourcissement des télomères, les extrémités télomériques des chromosomes peuvent fusionner entre elles. Ceci induit la formation de ponts anaphasiques au cours de la mitose. La rupture de ces ponts induit des extrémités d'ADN libres hautement instables qui vont générer au cours des mitoses suivantes, des cycles de rupture-fusion-ponts anaphasiques amplifiant les réarrangements chromosomiques (amplifications, délétions, translocations) et l'instabilité génomique.

De manière intéressante, le cancer du pancréas possède de nombreuses aberrations chromosomiques et le raccourcissement des télomères est observé précocement, dans 96% des PanINs de bas grade. Ce phénomène permettrait l'accumulation progressive d'anormalités chromosomiques créant un contexte permissif à la progression tumorale (délétion de suppresseur de tumeur, amplification ou dérégulation d'un oncogène) (van Heek et al., 2002).

Il est intéressant de noter que la télomérase, qui n'est pas exprimée en conditions normales, est réactivée dans 85 à 90% des stades avancés de l'ADK (Hiyama et al., 1997). Cette enzyme possède une activité transcriptase inverse dont la fonction est de maintenir la longueur des extrémités télomériques. Sa réactivation est considérée comme un événement tardif de la carcinogénèse permettant de diminuer l'instabilité génomique des cellules tumorales et d'empêcher leur entrée en sénescence répllicative contribuant ainsi à leur prolifération illimitée.

D.2 Les micros ARNs ou miRNAs :

Les microARNs ou miRNAs sont de petits ARNs non codants d'environ 22 nucléotides régulant la stabilité d'ARN cibles complémentaires. Ces miRNAs sont transcrits

par l'ARN polymérase 2 qui génère de longs transcrits primaires, les pri-mRNAs. Ces pri-mRNAs vont par la suite interagir avec les enzymes Drosha, générant un miRNA précurseur (pre-miRNA) exporté dans le cytoplasme, puis avec Dicer qui génère le miRNA mature de 22 nucléotides. Celui-ci va pouvoir se lier au complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) qui assure le transport du miRNA jusqu'à son ARN messager (ARNm) cible. Ainsi, en fonction du degré de complémentarité des séquences, la liaison du miRNA au niveau de la région non traduite 3' UTR (ou 3' UnTranslated Region) de l'ARNm ciblé induit l'inhibition de sa traduction ou sa dégradation.

L'existence de ces micros ARNs a été découverte dans les années 1990 par une équipe travaillant sur la régulation du développement chez le nématode *Caenorhabditis elegans*. Ambros et coll. ont ainsi mis en évidence que lin-4, un ARN non codant de 22 nucléotides régule négativement la traduction de lin-14 (nécessaire à la différenciation) par une interaction complémentaire. Depuis, de nombreuses études ont démontré que ce mécanisme est généralisable à l'ensemble des organismes vivants, y compris chez l'Homme et pourrait participer à la régulation du génome (Park et al., 2011).

Ces miRNAs régulent l'expression de gènes impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires telles que la différenciation, la prolifération ou encore l'apoptose. Différentes études mettent en évidence que l'expression de miRNAs est dérégulée dans le cancer, et notamment dans l'ADK (**Tableau 3**). Ces dérégulations peuvent induire la surexpression de miRNAs au potentiel oncogénique (oncoMirs) et/ou la perte d'expression de miRNAs suppresseurs de tumeur. Le cancer du pancréas est caractérisé par une forte instabilité génomique qui pourrait participer à cette dérégulation puisque certaines zones du génome fréquemment ciblées par des réarrangements chromosomiques (délétions, amplifications...) contiennent des clusters de miRNAs (Hwang and Mendell, 2006; Sun et al., 2014).

Parmi les miRNAs dérégulés dans l'ADK, le miRNA suppresseur de tumeur let7 est sous-exprimé dans l'ADK par rapport au tissu sain adjacent. Let-7, qui cible l'oncogène K-RAS est exprimé dans les acini et totalement perdu dans les stades invasifs. Confirmant son rôle protecteur, la réexpression de let-7 dans des lignées cellulaires tumorales pancréatiques permet d'inhiber leur prolifération et d'atténuer l'activation de K-RAS et de la voie MAPK (Torrisoni et al., 2009). Un autre exemple de dérégulation concerne miR-21. En effet, Moriyama et coll. ont montré que miR-21 est surexprimé dans l'ADK et joue un rôle pro-tumoral en stimulant la prolifération, l'invasion et la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques (Moriyama et al., 2009).

L'analyse comparative de l'expression d'un grand nombre de miRNAs dans le tissu pancréatique sain, la pancréatite et l'ADK, permet de mettre en évidence un profil d'expression spécifique différenciant avec précision ces trois conditions (Szafranska et al., 2007). Ainsi, l'ensemble de ces données laissent supposer que les miRNAs pourraient constituer à terme un puissant outil diagnostique et thérapeutique.

miRNA	Expression status	Target genes
miR-21	Upregulation	PTEN, PDCD4, TPM1, TIMP3
miR-221/222	Upregulation	CDKN1B (p27), PUMA, PTEN
miR-155	Upregulation	TP53INP1, SEL1L
miR-196a	Upregulation	HOXB8, ANXA1, HMGA2
miR-424-5p	Upregulation	SOCS6
miR-10a	Upregulation	HOXA1
miR-373	Upregulation	TP53INP1, LATS2, CD44
miR-27a	Upregulation	Spry2
miR-210	Upregulation	HOXA1, FGFRL1, HOXA9
miR-15b	Upregulation	CCNE1
miR-181	Upregulation	TIMP3, TCL1
miR-148a, b	Downregulation	DNMT3b, Mtif, CCKBR, BCL2
miR-198	Downregulation	MSLN, PBX-1, VCP
miR-146a	Downregulation	TRAF6, IRAK1, Stat1
miR-20a	Downregulation	Stat3
miR-96	Downregulation	KRAS
miR-375	Downregulation	PDK1, 14-3-3zeta
miR-200c	Downregulation	MUC4, MUC16
Let-7	Downregulation	KRAS, MAPK

Tableau 3 : miRNAs dérégulés dans le cancer du pancréas.

(Adapté de Sun et al., 2014)

D.3 Modifications épigénétiques : méthylation de l'ADN et acétylation des histones :

Les modifications épigénétiques sont des changements réversibles, héréditaires au cours des divisions cellulaires qui régulent le niveau d'expression des gènes mais n'impliquent pas de modifications de séquence de l'ADN.

Dans le cancer, les dérégulations de l'expression génique sont fréquemment dues à une modification du statut de méthylation des promoteurs. Des analyses réalisées sur l'ensemble

du génome montrent une hypométhylation globale et une hyperméthylation locale de l'ADN. La méthylation de l'ADN est réalisée par les DNA MethylTransférases (DNMT) qui ajoutent un groupement méthyle sur le résidu en position 5 de la cytosine des dinucléotides CpG. Ces dinucléotides sont regroupés et forment les îlots CpG, fréquemment retrouvés dans les régions promotrices des gènes (Delpu et al., 2011).

L'hyperméthylation de l'ADN a pour conséquence d'inhiber la liaison de l'ARN polymérase et de bloquer l'initiation de la transcription, réprimant ainsi l'expression des gènes concernés. Dans l'ADK, ce mécanisme est fréquemment rencontré et touche par exemple le promoteur du gène suppresseur de tumeurs p16/INK4A, ceci étant associé à la diminution de son expression protéique chez les patients (LI et al., 2012). Un autre exemple concerne le gène codant pour la préproenkephaline (ppENK), un peptide opioïde régulant négativement la prolifération cellulaire. Son promoteur est hyperméthylé dans 93% des cas par rapport au tissu sain, ceci étant associé à sa perte d'expression (Ueki et al., 2001; Zagon et al., 2000). A l'inverse, des gènes sont hypométhylés dans l'ADK et ceci est associé à l'augmentation de leur expression. C'est le cas de la mésothéline, une protéine membranaire absente du tissu sain. En lien avec son hypométhylation dans 92% des ADK, elle est surexprimée dans le tissu tumoral et participerait à la progression tumorale en stimulant la prolifération et la migration cellulaire (Hassan and Ho, 2008; Sato et al., 2003).

Ces modifications épigénétiques ont lieu précocement puisque 70% des PanINs 1a présentent une méthylation aberrante de certains gènes et ce pourcentage augmente au cours de la carcinogenèse (Sato et al., 2008). De plus, Peng et coll. ont démontré que la DNMT1 (DNMT majeure chez l'Homme) est surexprimée dès le stade PanIN1. Son expression augmente également de manière progressive au cours de la carcinogenèse et est associée à un mauvais pronostic (Peng et al., 2005). Une autre étude a mis en évidence que l'expression de la DNMT1 est régulée positivement par le facteur de transcription Gli, acteur de la voie Shh qui est réactivée dans l'ADK (He et al., 2011).

Un autre type de modification épigénétique concerne l'acétylation/désacétylation des histones. Ce mécanisme permet également de réguler l'expression des gènes et fait intervenir les Histones Acétyl Transférases (HATs) et les Histones Déacétylases (HDACs). Ces complexes ciblent les histones et modifient leur niveau d'acétylation, régulant ainsi le degré de condensation de la chromatine. Les HDACs déacétylent les lysines présentes sur la queue des histones aboutissant ainsi à la formation d'hétérochromatine, transcriptionnellement inactive. A l'inverse, les HATs acétylent les histones, permettant la décondensation de la chromatine (euchromatine), transcriptionnellement active (Schneider et al., 2011). De manière

intéressante, différentes études montrent une surexpression de certaines HDACs dans l'ADK. Notamment, l'HDAC 2 est surexprimée dans l'ADK et confère aux cellules tumorales pancréatiques la résistance à l'apoptose *via* l'inhibition transcriptionnelle de gènes pro-apoptotiques tels que NOXA (Fritsche et al., 2009).

Ainsi, les modifications épigénétiques de l'ADN sont des évènements précoces pouvant participer à la progression tumorale en modifiant l'expression d'oncogènes et/ou de suppresseurs de tumeur. Ces processus étant réversibles, le ciblage de ces différents modulateurs de l'expression des gènes pourrait aboutir à de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Chapitre VI Origine(s) cellulaire (s) de l'ADK :

A l'heure actuelle, malgré de nombreuses études et l'apport des modèles murins génétiquement modifiés, le compartiment cellulaire à l'origine du cancer du pancréas fait toujours débat.

VI.A Les cellules canalaire :

Du point de vue histologique, les lésions préneoplasiques aboutissant à l'ADK possèdent un phénotype canalaire, laissant supposer une origine cellulaire issue des canaux pancréatiques. Afin d'étudier cette origine potentielle, Brembeck et coll. ont développé un modèle murin génétiquement modifié exprimant l'oncogène K-RAS muté constitutivement actif (K-RAS^{G12V}) sous la dépendance du promoteur de la cytokératine 19 (CK19). Au niveau pancréatique, l'utilisation de ce promoteur permet ainsi de restreindre l'expression de K-RAS muté aux cellules canalaire pancréatique matures. Alors que la mutation de l'oncogène K-RAS est considérée comme l'évènement initiateur de la carcinogenèse pancréatique, ce modèle murin ne permet pas de récapituler la carcinogenèse. En effet, les auteurs n'observent que de légères régions hyperplasiques au niveau des canaux pancréatique mais pas de lésions préneoplasiques (PanINs) ou invasives (Brembeck et al., 2003).

Ainsi, ces données suggèrent que la contribution des cellules canalaire au développement de l'ADK semble être mineure tandis que les autres compartiments cellulaires pancréatique demeurent des origines potentielles.

VI.B Les cellules acineuses :

Dès 1985, des analyses histologiques de coupes d'adénocarcinome pancréatique humaine mettent en évidence la présence de modifications morphologiques et phénotypiques du compartiment acineux, absentes du tissu sain. En effet, ces observations mettent en évidence que certains groupes d'acini expriment simultanément des marqueurs de surface canalaire et acineux, ceci s'accompagnant d'une augmentation du diamètre de la lumière acineuse ainsi que d'une perte des grains de zymogène. Cette transformation est nommée métaplasie acino-canalaire (Parsa et al., 1985).

Ces modifications tissulaires sont également identifiées précocement *in vivo*, dans les modèles murins génétiquement modifiés exprimant l'oncogène K-RAS constitutivement actif

spécifiquement dans le compartiment acinaire. A la différence des animaux exprimant K-RAS dans le compartiment canalaire, son expression dans les acini grâce à l'utilisation de promoteurs tissu-spécifique (Elastase, Mist1) permet de récapituler les stades précoces de la carcinogenèse et avec une faible fréquence, le stade invasif de l'ADK (Guerra et al. 2007; Habbe et al. 2008).

Cependant, la capacité des cellules acineuses à induire le développement de lésions en réponse à la transformation induite par K-RAS semble varier selon le contexte tissulaire. En effet, Habbe et coll. montrent que l'expression de l'oncogène K-RAS^{G12D} inductible par un traitement au tamoxifène (souris Ela-Cre^{ERT2}; LSL-K-RAS^{G12D} ou Mist1-Cre^{ERT2}; LSL-K-RAS^{G12D}) chez des souris âgées de 6 semaines est suffisant pour induire le développement de lésions préneoplasiques (Habbe et al., 2008). Cependant, une autre étude révèle que dans le tissu adulte, les cellules acineuses sont résistantes à la transformation (Guerra et al., 2007). En effet, alors que l'induction de l'expression de K-RAS^{G12V} par l'arrêt du traitement par la doxycycline (système tet-off : souris Ela-tTA/tetO-Cre ; LSL-K-RAS^{G12V}) chez des souris âgées de seulement 10 jours permet de récapituler la carcinogenèse pancréatique, son expression dans les cellules acineuses adultes (souris âgées de 8 semaines) ne permet le développement de PanINs que lors de l'induction simultanée d'une pancréatite chronique. Selon les auteurs, cette « permissivité » observée chez les souris adultes pourrait être due aux altérations de l'intégrité tissulaire causées par la pancréatite qui permettraient l'expansion d'une population cellulaire acineuse ayant acquis des propriétés progénitrices et potentiellement plus sensibles à la transformation (Guerra et al., 2007).

Ainsi, s'opposant à l'étude de Guerra et coll., Habbe et coll. montrent que l'expression de l'oncogène K-RAS seule dans les cellules acineuses du pancréas adulte est suffisante pour le développement de PanINs. Cette différence de phénotype observée pourrait s'expliquer par le choix des modèles murins utilisés. En effet, les auteurs n'utilisent pas le même système d'induction pour l'expression de l'oncogène muté (système tet-off vs inductible au tamoxifène) ce qui pourrait jouer un rôle sur l'efficacité de l'évènement de recombinaison. De plus, ces modèles murins expriment des mutations différentes de l'oncogène K-RAS (Kras^{G12D} vs K-RAS^{G12V}) qui pourraient avoir un potentiel transformant différent.

Un autre argument à l'origine acinaire des cellules tumorales pancréatiques provient d'une étude de lignage cellulaire réalisée par Means et coll.. Les auteurs utilisent des explants de tissu pancréatique enrichis en cellules acineuses issus d'un modèle murin exprimant le gène rapporteur LacZ spécifiquement dans les cellules acineuses grâce à l'utilisation du

promoteur de l'élastase. Ainsi, la détection de l'activité enzymatique liée à la β -Galactosidase permettra de révéler exclusivement les cellules d'origine acineuse et de suivre leur devenir. Cette étude met en évidence que le traitement de ces explants pancréatiques (cellules acineuses adultes) avec du TGF- α induit un processus de transdifférenciation permettant la conversion des cellules acineuses en cellules de phénotype canalaire. De manière intéressante, ce processus s'effectue en passant par un phénotype cellulaire intermédiaire exprimant à la fois des marqueurs acineux (amylase) et canaux (CK19) ainsi qu'un marqueur de cellules progénitrices, la nestine (filament intermédiaire exprimé par les cellules de type précurseur) (Means et al., 2005).

De plus, des observations réalisées sur des cas de pancréatite aiguë chez l'Homme ainsi que sur des modèles de pancréatites chimiquement induites par un traitement à la céruléine (analogue de la cholécystokinine dont l'injection répétée provoque l'activation aberrante des enzymes digestives dans les acini induisant ainsi leur nécrose) montrent une forte déplétion du tissu pancréatique exocrine. Cependant, les lésions sont rapidement réversibles grâce au fort potentiel de régénération du pancréas. Ce processus implique la dédifférenciation des cellules acineuses restantes, réprimant leur programme transcriptionnel acineux au profit de la réexpression de marqueurs de cellules progénitrices tels que Pdx1 et Hes-1 (Jensen et al., 2005).

Ces données apportent donc des arguments en faveur de l'origine acineuse de l'ADK en démontrant notamment sa plasticité et son potentiel progéniteur.

VI.C Les cellules endocrines :

Chez l'Homme ainsi que dans certains modèles animaux, l'observation de lésions au sein ou à proximité des îlots de Langerhans ainsi que la présence de modifications hormonales pancréatiques laissent supposer une potentielle origine tumorale endocrine. En 1997, Pour et coll. ont étudié le rôle des cellules endocrines dans l'ADK en transplantant des îlots pancréatiques de hamster dans des glandes salivaires. Cette étude met en évidence que l'ensemble des animaux ayant subi un traitement avec un carcinogène (le N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine ou BOP) développent un adénocarcinome sur le lieu de la transplantation (Pour et al., 1997).

Cependant, ces résultats sont nuancés par l'étude de Friedlander et coll. qui montre que l'expression de K-RAS muté (associé ou non à la délétion de P53 ou P16) spécifiquement dans les cellules β des îlots de Langerhans (utilisation du promoteur tissu-spécifique Rip permettant l'expression de K-RAS dans les cellules à insuline) est insuffisante pour promouvoir la carcinogénèse. En effet, les pancréas de ces animaux ne montrent aucune lésion, révélant ainsi que les cellules endocrines sont réfractaires à la transformation induite par l'expression de K-RAS seul ou associé à la délétion d'autres suppresseurs de tumeur. En revanche, dans un contexte de pancréatite induite, alors que l'expression de K-RAS muté dans les cellules endocrines permet l'apparition de lésions prénéoplasiques de bas grade, la co-délétion de P53 récapitule tous les stades de la pathologie. Ces résultats laissent supposer que l'altération du tissu pancréatique et/ou l'inflammation associées à la pancréatite rendraient les cellules endocrines plus prônes à la transformation donnant ainsi une autre origine possible au cancer du pancréas (Friedlander et al., 2009).

VI.D Les cellules centro-acineuses (CAC) :

Les cellules centro-acineuses ou CACs constituent une population cellulaire située à l'interface entre les cellules acineuses et les cellules canalaire. Ces cellules sont les seules à maintenir l'expression de Notch dans le tissu pancréatique adulte et sont considérées comme ayant un potentiel progéniteur. En effet, Notch régule négativement la différenciation cellulaire et permet de maintenir l'expression d'un programme transcriptionnel embryonnaire (Maitra and Hruban, 2008). L'importance de ce type cellulaire dans l'ADK a été mise en évidence dans un modèle murin délété pour le gène suppresseur de tumeur *PTEN* dans l'ensemble des types cellulaires pancréatiques grâce à l'utilisation du promoteur Pdx1. Alors que ce modèle murin était développé afin d'étudier les conséquences de l'hyperactivité de la voie de signalisation PI3K/Akt sur la carcinogénèse pancréatique, la délétion de *PTEN* provoque l'expansion des CACs qui seraient à l'origine d'une forte métaplasie canalaire aboutissant dans certains cas au développement d'un ADK (Stanger et al., 2005).

VI.E Les cellules souches cancéreuses :

Une autre hypothèse concerne l'existence au sein de la tumeur, d'une population restreinte de cellules possédant des caractéristiques de précurseur et capables de reconstituer à

elles seules la tumeur. Ces cellules tumorales initiatrices ou cellules souches cancéreuses sont caractérisées par leurs capacités d'auto-renouvellement et leur pluripotente.

Afin de mettre en évidence une population de cellules souches tumorales pancréatiques, Li et coll. se sont basés sur une étude précédemment réalisée sur le cancer du sein. Ces travaux menés par Al-Hajj et coll. ont permis d'identifier au sein de la tumeur une population cellulaire minoritaire exprimant des marqueurs de surface spécifiques CD24+/CD44-/ESA+ (Epithelial Specific Antigen). Dans un modèle murin de xéno greffe, ces cellules possèdent un fort pouvoir tumorigène, capable de récapituler l'hétérogénéité de la tumeur (Al-Hajj et al., 2003). Concernant l'ADK, Li et coll. mettent en évidence l'existence d'une population cellulaire CD24+/CD44+/ESA+. Ces cellules représentent moins de 1% de la masse tumorale et possèdent un fort pouvoir tumorigène. Lors de leur xéno greffe, seulement 100 cellules CD24+/CD44+/ESA+ sont nécessaires pour permettre la formation d'une nouvelle tumeur. Cette population cellulaire possède les caractéristiques de cellules souches. En effet, celles-ci conservent l'activation de voies de signalisation impliquées au cours du développement (Shh), sont capables de s'auto-renouveler et génèrent différentes cellules filles reconstituant fidèlement l'hétérogénéité cellulaire observée dans la tumeur primaire. L'origine de ces cellules souches cancéreuses reste encore à déterminer mais les auteurs suggèrent qu'elles pourraient provenir de cellules souches résidentes ou bien de cellules pancréatiques différenciées réactivant un potentiel progéniteur suite à un événement oncogénique dérégulant leurs propriétés (Li et al., 2007).

L'ensemble de ces résultats révèle la grande plasticité des différents compartiments cellulaires pancréatiques et le potentiel de chaque compartiment à participer au développement de l'ADK. Cela suggère qu'il n'y aurait donc pas une, mais plusieurs origines cellulaires potentielles dépendantes du contexte, d'événements génétiques et/ou environnementaux. L'identification de la ou des populations cellulaires ainsi que des mécanismes aboutissant à l'initiation de la carcinogenèse sont d'un intérêt majeur pour le développement de stratégies thérapeutiques ciblées. Cependant, l'observation d'un phénotype semblable quel que soit le type cellulaire étudié laisse supposer que la cellule d'origine importerait peu et que l'ADK résulterait plutôt de l'accumulation d'altérations génétiques spécifiques (Hezel et al., 2006).

Chapitre VII Thérapeutique :

VII.A Traitement standard :

A.1 Tumeur localisée :

A l'heure actuelle, la chirurgie reste le traitement le plus efficace pour l'ADK mais en raison de son diagnostic tardif, la majorité des patients sont diagnostiqués à un stade avancé et souvent métastatique. Ainsi, seuls 10 à 15% des patients (tumeur localisée) peuvent bénéficier d'une résection chirurgicale à visée curative. Cependant, malgré la diminution de la mortalité (2 à 3%) et de la morbidité (40 à 60%) post-opératoire, celles-ci restent élevées et la survie à 5 ans de ces patients n'atteint pas les 20% en raison de rechutes régionales ou à distance. Afin de diminuer le risque de récurrence, le traitement thérapeutique standard consiste en l'administration d'une chimiothérapie adjuvante à base de 5-FU (5' FluoroUracile), un substitut de l'uracile permettant de bloquer la synthèse d'ARN (incorporation dans l'ARN : inhibition de la maturation des préARNm) et d'ADN (inhibition de la thymidilate synthase : bloque la réplication et la réparation de l'ADN en inhibant la synthèse de déoxythymidine monophosphate (dTMP)) (Longley et al., 2003), ou de gemcitabine (2'-2'-difluorodesoxycytidine) un analogue nucléosidique qui s'incorpore à l'ADN et permet de bloquer sa synthèse (Wolfgang et al., 2013).

A.2 Stades avancés : envahissement loco-régional et métastases :

Malgré des recherches actives et de nombreux essais cliniques, le traitement standard à peu évolué depuis une vingtaine d'années et les patients présentant une tumeur avancée ne disposent que de stratégies palliatives combinant chimio- et radio-thérapie. Depuis 1997, en raison de son bénéfice clinique et de l'augmentation de la survie des patients par rapport au 5-FU, la gemcitabine est devenue le traitement de première ligne pour le cancer du pancréas (survie à 12 mois : 18% pour la gemcitabine contre 2% pour le 5-FU) (Burriss et al., 1997).

VII.B Combinaisons et thérapies ciblées :

Suite aux travaux de Burriss et coll., l'efficacité de thérapies combinant la gemcitabine à des composés cytotoxiques tels que des analogues du 5-FU (capécitabine), ou des dérivés du

platine (cisplatine ou oxaliplatine) ont été testés sans observer de bénéfice thérapeutique. Parallèlement, d'autres études basées sur les caractéristiques moléculaires de l'ADK et la présence de différents compartiments cellulaires au sein de la tumeur (cellules tumorales et stroma) ont permis le développement de stratégies ciblées et combinées dont je vais présenter quelques exemples prometteurs (**Tableau 4**) (Oberstein and Olive, 2013).

B.1 Cibler la tumeur :

Compte tenu de la surexpression de la voie de signalisation EGFR dans l'ADK et de son rôle pro-tumoral, plusieurs essais cliniques ciblent le récepteur en utilisant l'erlotinib (ou Tarceva : inhibiteur du récepteur à tyrosine kinase EGFR) ou le cetuximab (anticorps monoclonal dirigé contre l'EGFR). Alors que l'association gemcitabine/erlotinib est sans apport par rapport à la gemcitabine seule, l'utilisation de l'erlotinib a été approuvée par les autorités de santé (Philip et al., 2010). En effet, malgré un bénéfice de seulement 2 semaines sur la médiane de survie, l'association erlotinib/gemcitabine permet d'augmenter la proportion de patients toujours en vie à un an (23% pour la combinaison gemcitabine/erlotinib contre 17% pour la gemcitabine seule). De manière intéressante, cette étude met en évidence que les patients présentant un rash (éruption cutanée) au cours du traitement bénéficient d'un fort bénéfice sur la survie. Cette corrélation positive révèle l'existence d'une sous-population de patients plus favorables à cette stratégie thérapeutique (Moore et al., 2007).

D'autres essais thérapeutiques ciblant la tumeur ont été réalisés en utilisant des inhibiteurs de multiples récepteurs tyrosine kinase comme l'axitinib (ciblant VEGFR 1 et 3, PDGFR et c-kit) ou encore le sorafenib (ciblant B-RAF, VEGFR 2 et 3, PDGFR) alors que d'autres agents ciblent l'IGFR (ganitumab), l'angiogenèse tumorale (bevacizumab : anticorps anti-VEGF), l'invasion (marimastat : inhibiteur de MMP) ou bien directement l'oncogène K-RAS (tipifarnib : inhibiteur des farnésyltransférases). Malgré les nombreuses combinaisons testées, ces stratégies demeurent infructueuses, n'apportant pas de bénéfice thérapeutique par rapport au traitement standard. Les résultats de ces différentes études sont détaillés dans le **tableau 4**.

B.2 Cibler le stroma :

Une des caractéristiques de l'ADK est sa forte réaction desmoplasique qui représente

environ 90% de la masse tumorale. Ce stroma tumoral est composé de différents types cellulaires (fibroblastes activés ou CAFs (Cancer Associated Fibroblasts), cellules inflammatoires, vaisseaux sanguins, vaisseaux lymphatiques, cellules nerveuses) entourés d'une importante matrice extracellulaire composée entre autre de collagène, de fibrine et d'hyaluronane. Il est désormais bien établi qu'il existe un dialogue entre les cellules tumorales et le stroma qui participe activement à la progression tumorale en stimulant la prolifération, la migration ou encore l'invasion des cellules cancéreuses. De plus, le stroma crée une barrière physique, limitant la perfusion et donc l'accès des drogues à la tumeur (Rucki and Zheng, 2014).

La voie de signalisation Shh dérégulée au cours de l'ADK est un acteur primordial dans la réaction desmoplasique. En ce sens, l'injection de l'inhibiteur de la voie Shh, nommé IPI-926, dans un modèle murin récapitulant la carcinogenèse pancréatique (souris KPC exprimant K-RAS muté constitutivement actif et un mutant inactif de p53 dans le pancréas) permet de diminuer drastiquement la réaction stromale. Ceci provoque l'augmentation de la perfusion tumorale et de la concentration intra-tumorale en gemcitabine stabilisant ainsi la pathologie et favorisant la survie des animaux traités (Olive et al., 2009). Malgré ces résultats prometteurs, l'essai clinique combinant l'IPI-926 à la gemcitabine a dû être abandonné en raison d'une diminution de la survie globale de ces patients par rapport aux patients traités avec la gemcitabine seule.

Study*	Accrual period	Number of patients	Treatment groups	Median OS		Response rate	
				Months	p	%	p
[Burriss <i>et al.</i> 1997]	1992-1994	126	5-FU	4.4	0.0025	0	NS
			Gemcitabine	5.6		5.4	
[Bramhall <i>et al.</i> 2001]	1997-1998	239	Gem	5.5	NS	11	NS
			G + marimistat	5.5		16	
[Heinemann <i>et al.</i> 2006]	1997-2002	195	Gem	6.0	NS	8.2	NS
			G + cisplatin	7.5		10.2	
[Berlin <i>et al.</i> 2002]	1998-1999	322	Gem	5.4	NS	5.6	NS
			G + 5-FU	6.7		6.9	
[Van Cutsem <i>et al.</i> 2004]	1999-2001	688	Gem	6.1	NS	8	NS
			G + tipifarnib	6.4		6	
[Rocha Lima <i>et al.</i> 2004]	2000-2001	360	Gem	6.6	NS	4.1	<0.001
			G + irinotecan	6.3		16.1	
[Louvet <i>et al.</i> 2005]	2001-2003	313	Gem	7.1	NS	17.3	0.044
			G + oxaliplatin	9.0		26.8	
[Herrmann <i>et al.</i> 2007]	2001-2004	319	Gem	7.2	NS	7.8	NS
			G + capecitabine	8.4		10	
[Moore <i>et al.</i> 2007]	2001-2003	569	Gem	5.9	0.038	8.0	NS
			G + erlotinib	6.2		8.6	
[Colucci <i>et al.</i> 2010]	2002-2007	400	Gem	8.3	NS	10.1	NS
			G + cisplatin	7.2		12.9	
[Cunningham <i>et al.</i> 2009]	2002-2005	533	Gem	6.2	NS	12.4	0.034
			G + capecitabine	7.1		19.1	
[Poplin <i>et al.</i> 2009]	2003-2005	832	Gem [standard rate]	4.9	NS	6	NS
			Gem-FDR	6.2		10	
			Gem-FDR + oxaliplatin	5.7		9	
[Philip <i>et al.</i> 2010]	2004-2006	745	Gem	5.9	NS	7	NS
			G + cetuximab	6.3		8	
[Kindler <i>et al.</i> 2010]	2004-2006	602	Gem	5.9	NS	10	NS
			G + bevacizumab	5.8		13	
[Van Cutsem <i>et al.</i> 2009]	2005-2006	607	Gem + erlotinib	6.0	NS	8.6	NS
			Gem + erlotinib + bevacizumab	7.1		13.5	
[Conroy <i>et al.</i> 2011]	2005-2009	342	Gem	6.8	<0.001	9.4	<0.001
			FOLFIRINOX	11.1		31.6	
[Heinemann <i>et al.</i> 2012]	2006-2008	281	Gem + erlotinib (capecitabine for second line)	6.2	NS	16	NR
			Capecitabine + erlotinib (gem for second line)	6.9		5	
[Goncalves <i>et al.</i> 2012]	2006-2009	104	Gem	9.2	NS	19	NS
			G + sorafenib	8		23	
[Kindler <i>et al.</i> 2011]	2007-2008	632	Gem	8.3	NS	2	0.018
			G + axitinib	8.5		5	

5-FU: fluorouracil; FDR: fixed dose rate. G and Gem: gemcitabine; NR: not reported; NS: not statistically significant ($p > 0.05$); *In addition to these trials, several phase III trials have been completed or terminated and remain unpublished. These include fluorouracil plus triacetylrudin [ClinicalTrials.gov identifier: NCT24427], aflibercept [ClinicalTrials.gov identifier: NCT574275], TS-1 [ClinicalTrials.gov identifier: NCT498225], GV1001 vaccine [ClinicalTrials.gov identifier: NCT358566], virulizin [ClinicalTrials.gov identifier: NCT40092] and AMG 479- ganitumab [ClinicalTrials.gov identifier: NCT1231347].

Tableau 4 : Liste des essais cliniques de phase 3 comparant l'effet de la chimiothérapie standard, la gemcitabine, à des approches combinées.
(Adapté de Oberstein and Olive, 2013)

B.1 Perspectives thérapeutiques :

Malgré des résultats encourageants dans les phases précliniques, aucune approche n'avait permis de démontrer une nette augmentation de la survie des patients avant l'utilisation de la polychimiothérapie FOLFIRINOX (combinaison de 5-FU, de leucovorine, d'irinotecan et d'oxaliplatine). En effet, utilisé dans le cas du traitement du cancer pancréatique métastatique, le FOLFIRINOX permet d'augmenter considérablement la médiane de survie des patients (11.1 mois pour le FOLFIRINOX et 6.8 mois pour la gemcitabine) et la survie à un an (48.4% vs 20.6%) (Conroy et al., 2011).

Un autre essai clinique en phase III très récemment mené utilise la gemcitabine seule ou en association avec l'Abraxane (nab-paclitaxel). Cette molécule se compose de nanoparticules d'albumine liées au paclitaxel, un poison du fuseau mitotique inhibant la dépolymérisation des microtubules et bloquant la mitose. Cette stratégie repose sur la forte expression de SPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine), une glycoprotéine liant l'albumine, par les cellules tumorales pancréatiques et celles du stroma tumoral. Cette surexpression permet ainsi de concentrer la drogue et ses effets cytotoxiques principalement au niveau tumoral (Infante et al., 2007). Les résultats de l'essai mettent en évidence que malgré une augmentation de la toxicité, l'utilisation de cette combinaison thérapeutique permet d'améliorer la médiane de survie (8.5 mois pour l'association et 6.7 mois pour la gemcitabine seule) ainsi que la survie à un an des patients (35% contre 22%) (Von Hoff et al., 2013).

Malgré les nombreuses connaissances acquises et les avancées réalisées ces dernières années, le pronostic des patients atteints de cancer du pancréas reste très sombre. En effet, l'absence de signes cliniques évidents ainsi que de marqueurs précoces et spécifiques de la pathologie ne permettent pas de diagnostiquer ces patients à un stade permettant la résection chirurgicale, seul traitement curatif disponible à l'heure actuelle (Herreros-Villanueva et al., 2013). Cependant, malgré des résultats mitigés et de faibles avancées devant la complexité du cancer du pancréas, un article publié dans Nature en 2010 laisse de grands espoirs. En effet, les auteurs ont étudié les profils de mutations génétiques contenus dans les cellules tumorales pancréatiques issues de la tumeur primaire et de différentes métastases à distance (foie, péritoine, poumon). Cette étude révèle que le délai entre l'apparition des mutations initiatrices et la naissance des cellules tumorales ayant accumulé des mutations leur conférant un pouvoir métastatique est d'environ 15 ans (Yachida et al., 2010). Ce délai offrirait donc une large

fenêtre thérapeutique et dans ce contexte la recherche de nouveaux marqueurs prédictifs et de nouvelles cibles thérapeutiques restent donc des enjeux majeurs afin d'accélérer et d'améliorer la prise en charge de ces patients.

Le système apelinergique :

Chapitre I Le récepteur APJ :

Le récepteur APJ fait partie de la famille des récepteurs à 7 domaines transmembranaires ou récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Avec plus de 800 membres, les RCPGs représentent la plus grande famille de récepteurs membranaires et constituent la cible de 50% des médicaments utilisés à l'heure actuelle. Les RCPGs possèdent une structure commune basée sur la présence d'un corps central constitué de 7 domaines hydrophobes reliés par 3 boucles intracellulaires et 3 boucles extracellulaires contenant des résidus cystéines importants pour la stabilité du récepteur (Bockaert, 1999). Ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance et la transduction de signaux très divers (photons, calcium, phéromones, peptides, ...) et se distinguent par leurs séquences ainsi que par la longueur et la fonction de leur domaine N-terminal extracellulaire et C-terminal intracellulaire (**Figure 11**). Basé sur leurs séquences primaires, les analyses phylogénétiques identifient 5 familles de RCPGs nommées famille rhodopsine, famille glutamate, famille adhésion, famille sécrétine et famille frizzeld/taste2 (Fredriksson et al., 2003; Kobilka, 2007).

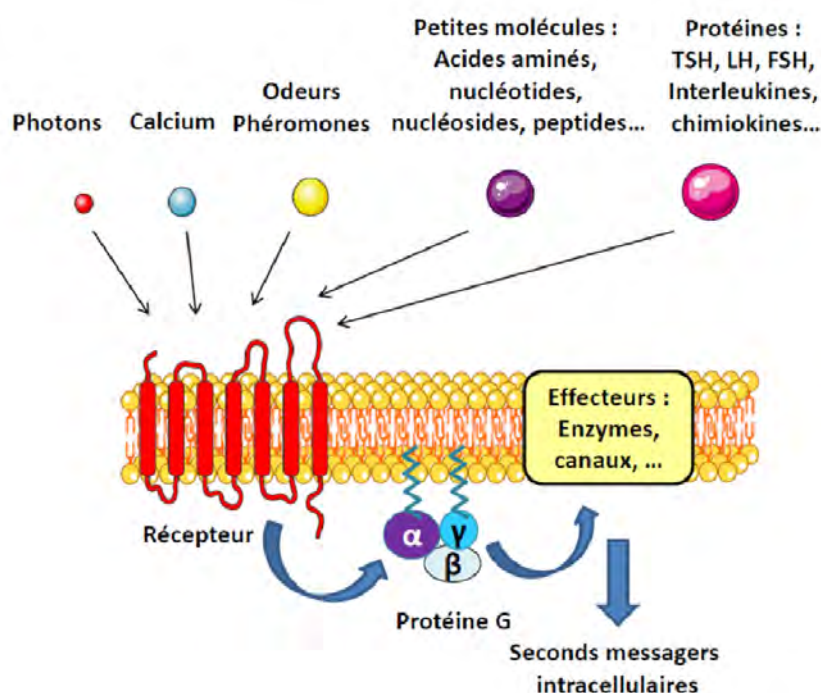


Figure 12 : Diversité des molécules activant un récepteur couplé aux protéines G.

La signalisation en aval d'un RCPG débute par la liaison de son agoniste entraînant l'activation du récepteur et sa modification conformationnelle qui lui permet d'interagir avec les protéines G hétérotrimériques constituées des sous-unités α , β et γ . Le récepteur ainsi activé stimule le chargement en GTP de la sous-unité $G\alpha$ et provoque sa dissociation des sous-unités $G\beta\gamma$. Ces sous-unités $G\alpha$ et $G\beta\gamma$ peuvent moduler l'activité d'un grand nombre d'effecteurs (PLC, adénylylcyclases, ...), de canaux (à conductance calcique, potassique ...) d'échangeurs ioniques (sodium/proton) et de kinases (MAPK, JNK...). L'hydrolyse du GTP sur la sous-unité $G\alpha$ induit sa réassociation avec les sous-unités $G\beta\gamma$ et se retrouve ainsi à l'état de repos, prête à être de nouveau activée par un RCPG. Il existe 16 sous-types de protéines $G\alpha$ fonctionnellement classées en 4 grandes familles nommées G_s , G_i , G_q et $G_{12/13}$, 5 sous-unités β et 12 sous-unités γ pouvant générer de multiples combinaisons trimériques (Bockaert and Pin, 1998; Premont and Gainetdinov, 2007). De manière intéressante, un RCPG peut être couplé à un ou plusieurs types de protéines G, augmentant ainsi les voies de signalisation potentiellement activées par un même récepteur.

L'activation des RCPGs permet leur reconnaissance par les protéines kinases GRKs (G-protein coupled Receptor Kinases) dont il existe 7 types nommées GRK1 à GRK7. Alors que les GRK1, 4 et 7 présentent une distribution tissulaire restreinte (GRK4 exprimée dans les testicules et GRK 1 et 7 dans la rétine), les GRK2, 3, 5 et 6 présentent une expression ubiquitaire et régulent de nombreux RCPGs. Ces protéines phosphorylent le récepteur au niveau de régions spécifiques de son extrémité C-terminale et des boucles intracellulaires permettant le recrutement des arrestines. Augmentant encore la complexité et les possibilités d'interaction, cette famille de protéines comporte les arrestines visuelles 1 et 4, exprimées au niveau des cellules photo-réceptrices de la rétine ainsi que les β -arrestine 1 (ou arrestine 2) et β -arrestine 2 (également nommée arrestine 3) non visuelles exprimées de manière ubiquitaire (Buchanan and DuBois, 2006). Par l'intermédiaire de son interaction avec les protéines adaptatrices AP-2 et la clathrine, la β -arrestine permet la relocalisation membranaire du récepteur au niveau des puits recouverts de clathrine. L'invagination de ces domaines membranaires permet la formation des vésicules d'endocytose recouvertes de clathrines qui seront excisées grâce à l'activité GTPasique de la dynamine. Le récepteur sera ainsi internalisé et dirigé vers les endosomes où il sera soit déphosphorylé et recyclé à la membrane plasmique ou bien dégradé au lysosome (Prossnitz, 2004). De plus, la β -arrestine peut se dissocier rapidement du récepteur permettant ainsi sa resensibilisation et son recyclage. Cependant, la présence d'une région C-terminale riche en résidus sérines et thréonines sur la

séquence du récepteur favorise la forte association du complexe récepteur/ β -arrestine. Dans ce cas, la β -arrestine internalise avec le récepteur ralentissant ainsi sa resensibilisation et son recyclage (Oakley et al., 2001).

Les GRKs et le recrutement de la β -arrestine ont pour rôle de maintenir la dissociation de la protéine G induisant la désensibilisation et l'internalisation du récepteur suite à la liaison de son ligand. Cependant, depuis quelques années de nombreux travaux mettent en évidence qu'en plus d'une voie de signalisation dépendante des protéines G, la β -arrestine peut également servir de protéine d'échafaudage permettant le recrutement de différents effecteurs et la mise en place d'une signalisation au cours de l'internalisation (Shenoy and Lefkowitz, 2011). Ainsi, Luttrell et coll. ont mis en évidence que l'activation du récepteur de l'angiotensine AT1R permet le recrutement de la β -arrestine 2 et l'internalisation du récepteur. De manière intéressante, l'angiotensine 2 stimule l'interaction de la β -arrestine avec les kinases Raf-1, MEK et ERK se retrouvant complexées avec le récepteur au niveau des endosomes. Ainsi, la β -arrestine localise les effecteurs de la voie MAPK au niveau d'un même complexe de signalisation pouvant faciliter le maintien ou la mise en place d'une nouvelle transduction du signal au niveau intracellulaire (Luttrell et al., 2001).

La transduction du signal initiée par l'activation d'un RCPG passe en partie par la stimulation d'effecteurs intracellulaires mais peut également résulter d'un processus de transactivation. Ce terme signifie qu'un RCPG activé par son ligand est capable d'induire l'activation d'un autre récepteur. En effet, certains RCPGs comme les récepteurs de la thrombine, l'endothéline ou l'angiotensine peuvent activer la voie MAPK *via* la transactivation d'un récepteur tyrosine kinase (RTK) comme l'EGFR, le PDGFR ou le FGFR (Delcourt et al., 2007). Cette transactivation peut être dépendante ou bien indépendante de la présence du ligand du RTK. Un exemple concerne la transactivation des récepteurs de l'EGF par l'angiotensine 2. Dans ce cas, l'activation du récepteur AT1R par l'angiotensine induit l'activation de la métalloprotéase ADAM-17 permettant le clivage du précurseur transmembranaire de l'EGF, nommée proHB-EGF (Heparin-Binding Epidermal-like Growth Factor). L'HB-EGF libéré dans le milieu extracellulaire peut ainsi activer l'EGFR et induire un effet prolifératif (Ohtsu et al., 2006a, 2006b). A l'inverse, les RCPGs peuvent également être transactivés par les RTKs, utilisant les mêmes modes d'activation que ceux précédemment mentionnés (ligand dépendant ou indépendant). Un exemple de cette transactivation a été mis en évidence dans des cellules tumorales mammaires humaines (MCF-7). Dans ces cellules, le facteur de croissance IGF-1 *via* son récepteur IGFR1 stimule

l'expression et la sécrétion de RANTES, le ligand du récepteur de chimiokine CCR5 et engendre ainsi la migration cellulaire (Mira et al., 2001).

Ajoutant à cette complexité, un nombre d'études croissant met en évidence la capacité des RCPGs à former des homo- ou hétérodimères. Ces interactions peuvent moduler l'affinité, les voies de signalisation activées, le couplage aux protéines G ou encore le mode d'internalisation du récepteur. Des exemples d'interactions entre le récepteur APJ et d'autres RCPGs ainsi que les modifications engendrées par ces hétérodimérisations seront abordés dans cette seconde partie.

Ainsi, cette vue d'ensemble rend compte de la diversité et de la complexité des mécanismes pouvant participer à la régulation de l'activité des RCPGs et de leurs voies de signalisation associées modulant par conséquent la fonction de ces récepteurs.

I.A Découverte du récepteur APJ :

En 1993, O'Dowd et coll. clonent le récepteur humain APJ par une approche dite de « pêche à la ligne ». Cette méthode utilisant des amorces dégénérées dirigées contre des séquences conservées des RCPG (segments transmembranaires) visait à cloner le récepteur de la vasopressine et des sous-types de ce récepteur. Cependant, le clonage de la séquence obtenue correspond à un autre récepteur codant pour une séquence protéique de 380 acides aminés et présente une forte homologie de séquence (31% de la séquence totale en acides aminés et 54% dans les domaines transmembranaires) avec le récepteur de l'angiotensine 2 (AT1R). Situé sur le chromosome 11, ce gène code pour le récepteur hAPJ (human APJ), également nommé AGTRL1 (AnGiotensin Receptor Like 1) et ses transcrits sont identifiés en grande quantité dans différentes régions du cerveau (O'Dowd et al., 1993). Cependant, malgré la forte homologie de séquence entre hAPJ et AT1R, le récepteur APJ ne lie pas l'angiotensine 2 (De Mota et al., 2000; O'Dowd et al., 1993).

L'utilisation de la même approche de « pêche à la ligne » afin de cloner des RCPGs exprimés au cours du développement embryonnaire a permis à notre équipe d'identifier le récepteur orthologue d'hAPJ chez le xénope. Celui-ci est nommé X-msr (Xenopus mesenchyme-associated serpentine receptor) et présente 60% d'identité (segments transmembranaires) avec le récepteur humain hAPJ (Devic et al., 1996). Par la suite, grâce aux séquences conservées entre l'Homme et le xénope, le récepteur a pu être identifié dans de

nombreux organismes et notamment chez la souris (msr/apj) et le rat (B78/apj) qui présentent respectivement 92% et 90% d'identité avec le récepteur hAPJ (Devic et al., 1999a; De Mota et al., 2000). Cette forte homologie de séquence est le signe de la conservation du gène inter-espèces au cours de l'évolution et suggère que ces gènes partagent une même fonction biologique. De plus, l'étude de la phylogénie du récepteur APJ montre que les récepteurs hAPJ, X-msr et msr/apj possèdent une forte homologie avec deux récepteurs appartenant à la famille des récepteurs aux chimiokines, CXCR4 et CXCR2 (Devic et al., 1999b).

I.B Structure du récepteur :

Le récepteur APJ est un RCPG appartenant à la famille des récepteurs rhodopsine (Fredriksson et al., 2003). Il présente des sites consensus pour la phosphorylation par la PKA (Protéine Kinase AMPc dépendante) ainsi qu'un site de palmitoylation au niveau C-terminal. De plus, le récepteur présente deux sites de N-glycosylation situés dans la région N-terminale extracellulaire ainsi que sur la seconde boucle extracellulaire (O'Dowd et al., 1993; Puffer et al., 2000). APJ possède également un résidu cystéine dans chacun de ses domaines extracellulaire pouvant ainsi générer deux ponts disulfures qui participent à la stabilité du récepteur (De Mota et al., 2000). Une étude réalisée par des délétions de la partie amino-terminale du récepteur et complétée par un test d'alanine scanning visant à remplacer chaque résidu par une alanine met en évidence que l'acide glutamique en position 20 (Glu²⁰) et l'aspartate en position 23 (Asp²³) sont essentiels à la liaison du ligand, l'internalisation et à la fonction du récepteur (Zhou et al., 2003a).

La région carboxy-terminale a également son importance dans la fonctionnalité du récepteur. En effet, la présence de résidus sérines et thréonines dans cette région est décrite comme une caractéristique importante des RCPGs puisque la phosphorylation de ces résidus permet le recrutement de la β -arrestine et l'internalisation du récepteur (Oakley et al., 2001). Le récepteur APJ possède lui aussi une zone riche en sérines et en thréonines et la délétion de cette partie carboxy-terminale empêche sa désensibilisation et provoque la perte de son internalisation (Chen et al., 2014; Masri et al., 2006; Zhou et al., 2003b).

I.C Sites d'expression du récepteur APJ :

Le récepteur APJ est exprimé au niveau du système nerveux central (SNC) ainsi que

dans de nombreux tissus de l'organisme.

Malgré des différences d'expression inter-espèces (Homme, rat, souris), le croisement de nombreuses études et techniques (Northern Blot, RT-PCR (Real Time Polymerase in Chain Reaction), hybridation in situ) montre que l'expression de l'ARNm d'APJ est présent dans l'ensemble du système nerveux central et plus particulièrement au niveau des noyaux SON (supraoptique) et PVN (paraventriculaire) de l'hypothalamus (Lee et al., 2000; De Mota et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; O'Dowd et al., 1993; Pope et al., 2012). De plus, des études réalisées sur le rat mettent en évidence que dans le SON, l'ARNm d'APJ co-localise au niveau des neurones à vasopressine (Reaux et al., 2001). D'autre part, l'étude de la distribution tissulaire du récepteur révèle que ses transcrits sont présents dans de nombreux tissus périphériques de l'organisme. En effet, chez le rat son expression est particulièrement élevée dans les poumons et dans une moindre mesure dans le cœur, les ovaires ou encore le placenta (**Figure 13**) (Hosoya et al., 2000; Medhurst et al., 2003; O'Carroll et al., 2000). D'autre part, les transcrits codant pour le récepteur APJ sont également identifiés dans le pancréas et plus particulièrement dans les îlots de Langerhans chez la souris ainsi que dans le muscle et le tissu adipeux chez l'Homme (Dray et al., 2010; Sörhede Winzell et al., 2005).

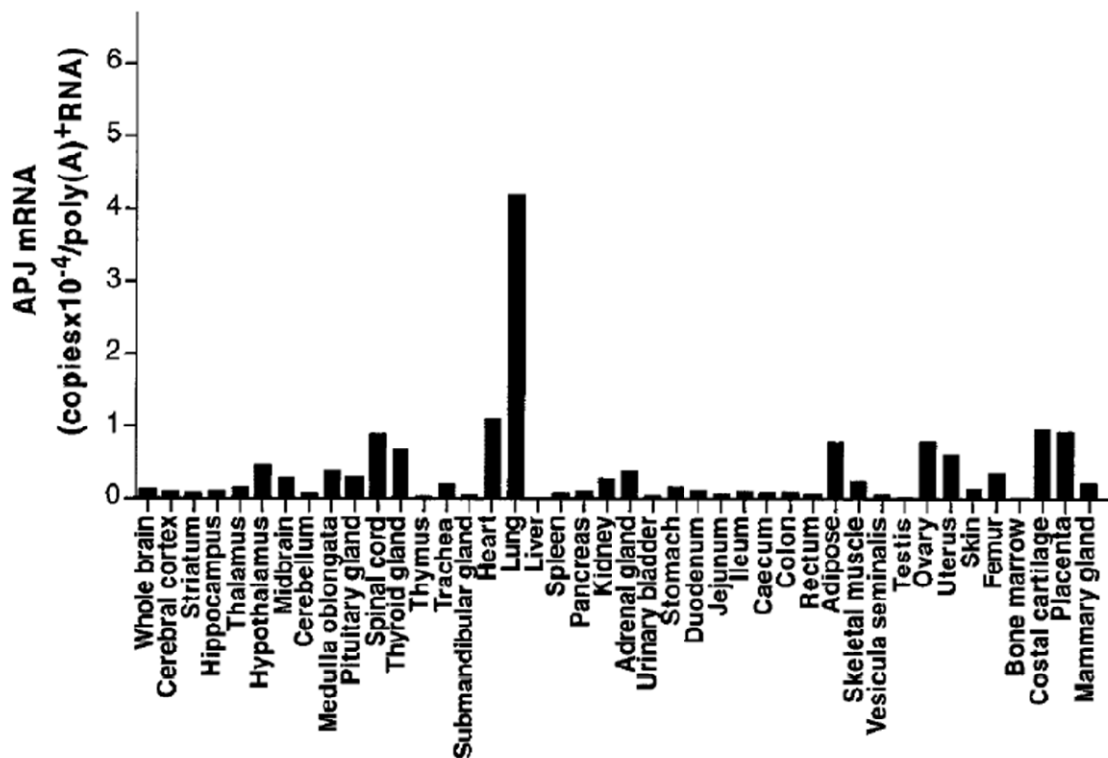


Figure 13 : Distribution tissulaire de l'ARNm du récepteur APJ chez le rat.
(Adapté de Hosoya et al., 2000)

L'expression d'APJ au niveau ARNm est bien caractérisée au niveau de la sphère cardiovasculaire. L'analyse des transcrits réalisée chez le xénope et la souris met en évidence que le récepteur APJ est exprimé très précocement au cours du développement embryonnaire par des cellules précurseurs à l'origine du lignage endothélial (Devic et al., 1996, 1999a). Plus tardivement, le récepteur est également exprimé au niveau de l'endocarde et par les cellules endothéliales vasculaires dans les zones en cours de vascularisation (Devic et al., 1996; Saint-Geniez et al., 2002).

Au niveau protéique, on retrouve une forte expression du récepteur au niveau cardiaque (cardiomyocytes), dans les cellules endothéliales, ainsi que dans les cellules musculaires lisses vasculaires chez l'Homme (Katugampola et al., 2001; Kleinz et al., 2005). De plus, des études récentes réalisées chez le poisson zèbre et la souris révèlent que le récepteur APJ est également exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques (Kim et al., 2014; Sawane et al., 2011).

I.D Régulations de l'expression du récepteur APJ :

Malgré sa découverte depuis le début des années 90, la régulation de l'expression du récepteur APJ a été peu étudiée. Au niveau moléculaire, l'analyse de la région promotrice du gène met en évidence des sites de liaison potentiels pour les facteurs de transcription Sp1 (Specificity Protein 1), CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP α) ainsi que pour les récepteurs des estrogènes et les récepteurs des glucocorticoïdes (O'Carroll et al., 2006). Alors que Sp1 régule positivement l'expression d'APJ, les glucocorticoïdes provoquent son inhibition (O'Carroll et al., 2003, 2006). D'autre part, des stimuli tels qu'un stress aiguë ou chronique (« restraints stress » : immobilisation prolongée des animaux provoquant un stress physique et psychologique) mais également la diminution de l'osmolalité plasmatique induisent la surexpression de l'ARNm du récepteur au niveau du SNC (O'Carroll and Lolait, 2003; O'Carroll et al., 2003).

Au niveau du système vasculaire, le facteur angiogénique VEGF-A induit l'augmentation des transcrits ainsi que l'expression protéique du récepteur APJ dans les cellules endothéliales HUVECs (Hara et al., 2013; Kidoya et al., 2008).

De manière intéressante, Wang et coll. démontrent que l'expression d'APJ (au niveau ARNm et protéine) est diminuée dans le tractus gastro-intestinal des animaux invalidés pour l'apeline (KO-apeline) suggérant l'existence d'une boucle de régulation positive exercée par

l'apeline sur l'expression du récepteur (Wang et al., 2009). Enfin, l'insuline induit l'expression de l'ARNm du récepteur dans le muscle squelettique et le tissu adipeux chez l'Homme et la souris (Dray et al., 2010).

Chapitre II Les ligands du récepteur APJ :

II.A L'apeline :

A.1 Découverte :

Malgré sa forte homologie avec le récepteur de l'angiotensine AT1R, APJ ne lie pas l'angiotensine 2 (O'Dowd et al., 1993). Ainsi, le récepteur APJ restera « orphelin » jusqu'en 1998, année de la découverte de son premier ligand endogène nommé apeline pour **APJ endogenous ligand**. Ce peptide a été identifié par Tatemoto et coll. grâce à l'utilisation d'un microphysiomètre permettant de mesurer des variations de l'acidification du milieu extracellulaire suite à l'activation d'un récepteur par son ligand. Ainsi, la mise en présence de cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) surexprimant le récepteur APJ avec différents extraits tissulaires bovins a permis d'isoler l'apeline 36 à partir d'extraits d'estomacs (Tatemoto et al., 1998).

A.2 Structure et maturation :

Chez l'Homme, le gène de l'apeline (*Apln*) est situé sur le chromosome X et code pour un prépropeptide de 77 acides aminés dont la séquence est fortement conservée inter-espèces (Lee et al., 2000). Cette conservation concerne plus particulièrement les 13 derniers résidus de l'apeline. En effet, ceux-ci présentent 100% d'identité chez les mammifères suggérant l'importance de ce domaine pour l'activité biologique du peptide.

L'analyse de la séquence peptidique de la préproapeline met en évidence la présence d'un peptide signal au niveau N-terminal, qui après clivage génèrerait un propeptide de 55 acides aminés. Dans sa séquence, la proapeline possède trois doublets d'acides aminés basiques conservés qui constituent des sites potentiels de clivage par des endopeptidases. Ainsi, en plus de l'apeline 36 (Ape36) considérée comme la forme mature, ces clivages pourraient générer l'apeline 17 (Ape17) et l'apeline 13 (Ape13) (**Figure 14**). De plus, suite à la cyclisation spontanée de sa glutamine N-terminale, l'apeline 13 peut générer une forme plus stable et plus résistante à la dégradation par des exopeptidases qui se nomme pyroglutamate apeline 13 (pApe13) (Kleinz and Davenport, 2005).

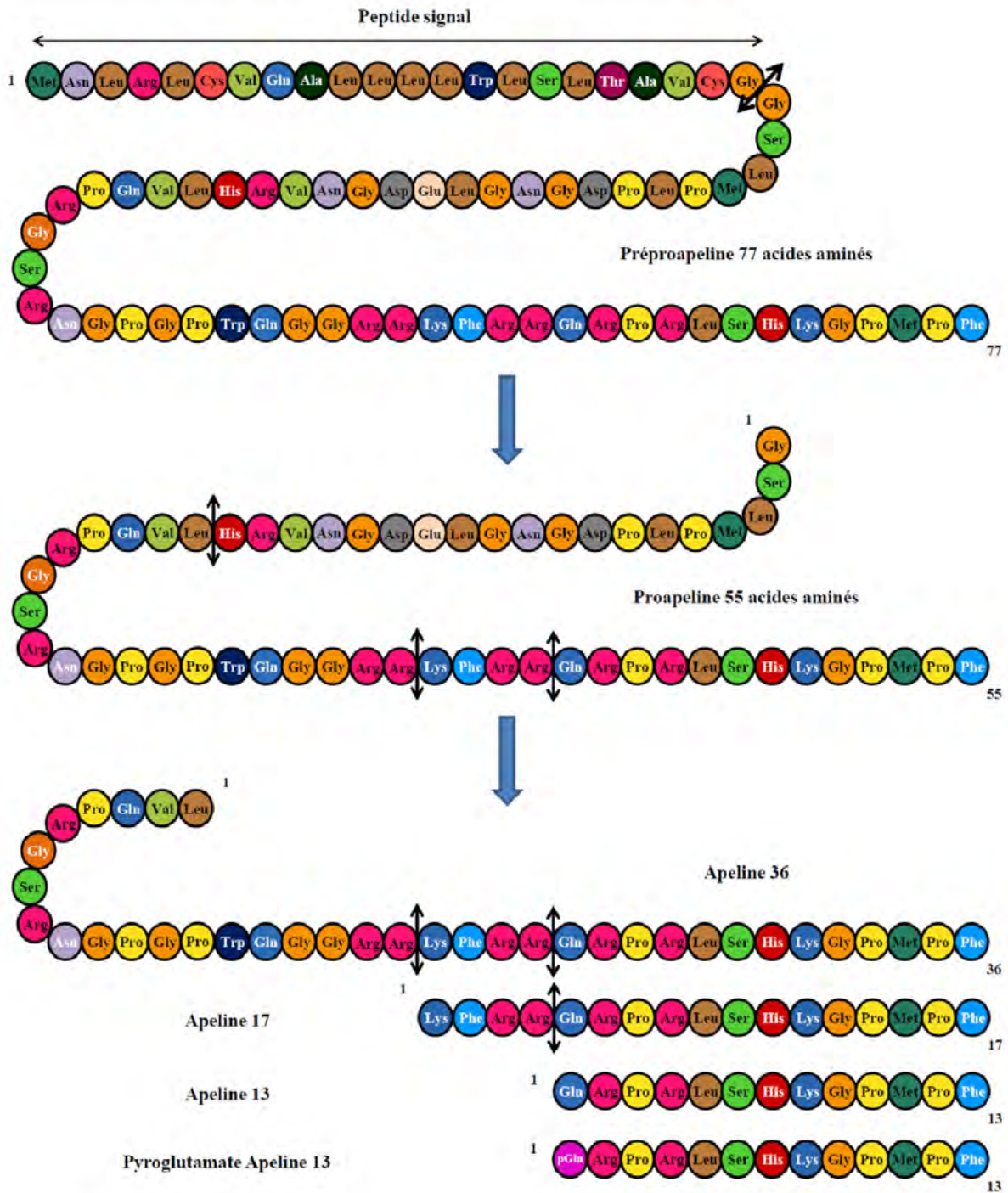


Figure 14 : Représentation schématique du processus de maturation de l'apeline.

Séquences d'acides aminés constituant la préproapeline et les différents fragments d'apeline potentiellement générés après clivage protéolytique : apeline 36, apeline 17, apeline 13 et la pyroglutamate apeline 13. Les doubles flèches noires indiquent les sites de clivage potentiels se situant après des doublets d'acides aminés basiques.

A l'heure actuelle, très peu de données sont disponibles concernant les processus de maturation de la proapeline. Très récemment une étude a mis en évidence que l'apeline

constitue un substrat pour la PCSK3 (Protein Convertase Subtilisin/Kexin 3), aussi appelée Furine, une endoprotéase catalysant le clivage de ses peptides cibles au niveau de doublets d'acides aminés basiques. Cette étude montre que la proapeline constituerait un substrat spécifique de la PCSK3 (mais pas des PCSK1 et 7) générant directement la formation de l'Ape13 sans former de fragments d'apeline intermédiaires comme l'apeline 36. Ces résultats suggèrent donc que le processus de maturation de la proapeline ne générerait pas forcément de manière séquentielle les différentes formes d'apeline (Proapeline, Apeline 36, Apeline 17 puis Apeline 13). Ainsi, on peut imaginer que selon son expression dans les différents tissus de l'organisme, la PCSK3 ainsi que d'autres endopeptidases potentielles ayant comme substrat l'apeline pourraient générer plus particulièrement une forme ou une autre du peptide (Shin et al., 2013).

Différentes études confirment l'existence endogène de différents fragments d'apeline. En effet, par des analyses de chromatographie d'exclusion visant à séparer les peptides en fonction de leur taille, Kawamata et coll. démontrent que les poumons exprimeraient principalement l'Ape36, alors que les glandes mammaires exprimeraient plutôt les formes Ape36 et Ape13 (Kawamata et al., 2001). Par cette même technique, l'apeline est détectée dans le colostrum bovin où seraient abondamment sécrétées les formes Ape36 et pApe13 (Habata et al., 1999; Hosoya et al., 2000). La présence de l'apeline est également détectée au niveau plasmatique, suggérant ainsi un mode d'action endocrine. Cependant, les taux d'apelinémie plasmatique décrits varient de manière considérable d'une étude à l'autre. En effet, comme le souligne le Dr Charles CJ. dans sa revue, on recense des concentrations plasmatiques d'apeline chez l'adulte sain allant de 100 à 4000 pg/ml (Charles, 2011).

Afin d'optimiser la détection et la quantification des différentes formes d'apeline, Mesmin et coll. ont utilisé une technique associant la chromatographie d'exclusion à de la spectrométrie de masse. De manière étonnante, alors qu'une immunoréactivité est détectée par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) avec des concentrations plasmatiques allant de 200 à 470 pg/ml, l'approche associant la spectrométrie de masse ne permet de détecter aucune forme d'apeline dans les plasmas des patients (Mesmin et al., 2010). En revanche, cette dernière approche révèle que le colostrum bovin contient pas moins de 46 fragments d'apeline différents en quantités variables. Les mêmes analyses réalisées sur du colostrum et du lait humain ne permettent de détecter aucun peptide (Mesmin et al., 2011).

Par la suite, Zhen et coll. ont travaillé à l'optimisation de la méthode de détection développée par Mesmin et coll. afin de préserver l'apeline de la dégradation et d'accroître la spécificité et la sensibilité de la technique. Ces derniers mettent en évidence que la pApe13

semble être la forme plasmatique majoritaire chez l'individu sain et sa concentration varierait entre 7.7 et 23.3 pg/ml (Zhen et al., 2013).

Ainsi, l'ensemble de ces données met en évidence que la fiabilité des techniques de dosage et de détection précédemment utilisées pourrait être remise en cause. A l'avenir il sera donc nécessaire d'améliorer ces approches afin de caractériser précisément la présence plasmatique et tissulaire des différents fragments d'apeline.

Lors de la découverte de l'apeline, l'utilisation du microphysiomètre en tant que test fonctionnel montre que les différents fragments du peptide sont capables d'activer le récepteur. En effet, alors que le traitement de cellules CHO surexprimant le récepteur avec les différentes apeline provoque l'acidification du milieu extracellulaire, celle-ci est perdue dans les cellules CHO contrôles n'exprimant pas APJ. Ces résultats montrent que les fragments d'apeline sont biologiquement actifs même si ils possèdent des efficacités variables sur l'acidification du milieu extracellulaire : pApe13 > Ape13 > Ape17 > Ape36 (Tatemoto et al., 1998). Cependant, des expériences de compétition réalisées avec de l'apeline 13 radioactive ($[^{125}\text{I}]$ apeline 13) sur des cellules HEK (Human Embryonic Kidney) surexprimant le récepteur APJ démontrent une affinité comparable des différentes apelines (de l'ordre du nM) pour le récepteur (Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003).

La partie carboxy-terminale de l'apeline est conservée inter-espèces et les 12 acides aminés C-terminaux représentent la plus petite entité physiologiquement active (Habata et al., 1999; Tatemoto et al., 1998). En ce sens, la délétion de différents acides aminés à l'extrémité N-terminale de l'apeline 13 met en évidence que l'apeline 12 conserve sa capacité à diminuer la pression artérielle alors que l'apeline 11 est inactive (Lee et al., 2005; Tatemoto et al., 2001). Ainsi, afin d'évaluer les résidus essentiels à la liaison et l'activation d'APJ par l'apeline, une approche par « alanine scanning » a été réalisée. Ces travaux révèlent que les résidus contenus dans les motifs RPRL (Arginine – Proline – Arginine - Leucine) et KGPM (Lysine – Glycine – Proline - Methionine) de l'apeline 13 sont particulièrement importants pour la liaison et l'internalisation du récepteur (Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003).

De plus, la phénylalanine présente en C-terminal représente un résidu essentiel pour son activité biologique. En effet, l'apeline 13 dépourvue de cette phénylalanine, ou substituée par une alanine générant ainsi l'apeline F13A ne possède plus d'effet hypotenseur *in vivo* (Lee et al., 2005; De Mota et al., 2000). De plus, l'injection simultanée d'apeline F13A bloque l'effet de l'apeline 13, agissant ainsi comme un antagoniste du système apelinergique (Lee et al., 2005). *In vitro*, cette substitution diminue la prolifération de cellules tumorales

humaines et la migration de cellules endothéliales lymphatiques induites par l'apeline (Berta et al., 2014; Picault et al., 2014). Cependant, ces résultats s'opposent aux données obtenues dans deux études où l'apeline F13A possède une activité comparable à celle de l'apeline 13 concernant l'activation de la protéine Gi (inhibition de la production d'AMPc) et l'internalisation du récepteur (Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003).

De manière intéressante, tout comme l'angiotensine 2 et la dynorphine A, l'apeline est le substrat de l'ACE2 (Angiotensin converting enzyme related carboxypeptidase), une carboxypeptidase catalysant l'hydrolyse du dernier acide aminé situé en position C-terminale du peptide (Vickers et al., 2002). Ainsi, compte tenu de l'importance fonctionnelle de la phénylalanine C-terminale de l'apeline, l'action de l'ACE2 pourrait avoir des conséquences directes sur l'activité biologique du peptide. Ainsi, deux études portant sur l'activité de l'apeline 17 (K17F) délétée de la phénylalanine C-terminale (K16P) montrent que ce peptide conserve une activité biologique mais affecte les voies de signalisation activées en aval d'APJ (Ceraudo et al., 2014; Iturrioz et al., 2007). Cette notion sera abordée en détail dans le chapitre IV.C « Internalisation du récepteur APJ ».

A.3 Sites d'expression de l'apeline :

L'apeline est exprimée dans de nombreux tissus de l'organisme, tant au niveau du système nerveux central qu'au niveau périphérique où elle exerce de nombreuses fonctions physiopathologiques qui seront abordées dans le chapitre V.

A l'instar du récepteur APJ, de nombreuses études montrent que l'apeline est fortement exprimée dans l'ensemble du système nerveux central. Chez l'Homme, les transcrits codant pour l'apeline sont retrouvés au niveau du noyau caudé, du thalamus, de l'hippocampe, du cortex frontal ainsi que dans les noyaux supraoptique (SON) et paraventriculaire (PVN) de l'hypothalamus, des structures impliquées dans le contrôle neuroendocrinien (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2001). De plus, l'étude des populations cellulaires exprimant l'apeline dans ces structures confirment sa présence protéique au niveau des neurones du SON et PVN (Reaux et al., 2001; Reaux-Le Gozigo et al., 2004).

Cependant, l'apeline est également exprimée (ARNm et protéine) au niveau périphérique dans de très nombreux tissus tels que la glande mammaire, le placenta, les poumons ou encore le tissu adipeux (Boucher et al., 2005; Kawamata et al., 2001; Medhurst et

al., 2003) (Figure 15).

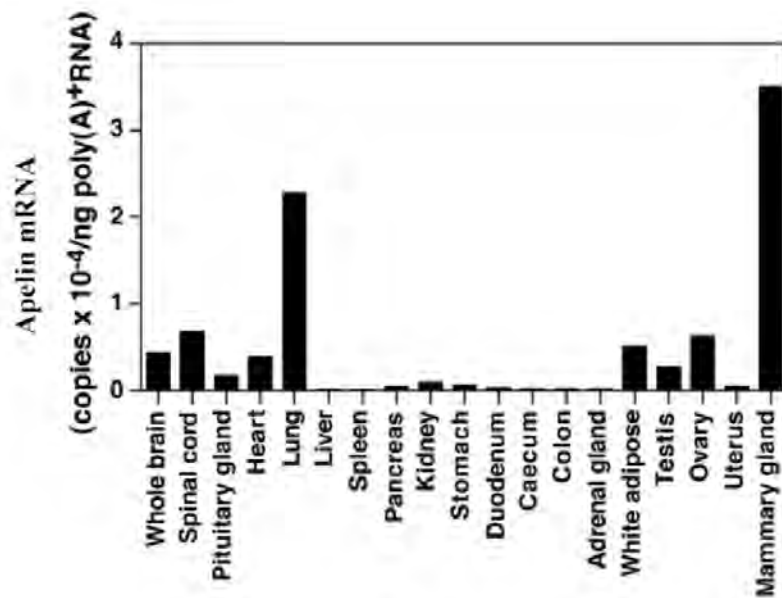


Figure 15 : Distribution tissulaire de l'ARNm de l'apeline chez le rat.

(Adapté de Kawamata et al., 2001)

L'apeline (transcrits et peptides) est retrouvée au niveau cardiaque ainsi que dans les cellules endothéliales bordant les vaisseaux (Földes et al., 2003; Kleinz and Davenport, 2004; Lee et al., 2000; Saint-Geniez et al., 2002; Tatemoto et al., 2001). D'autre part l'expression protéique de l'apeline est également identifiée au niveau du tractus gastro-intestinal et plus particulièrement au niveau de l'estomac, du colon et du pancréas (Ringström et al., 2010; Sörhede Winzell et al., 2005; Susaki et al., 2005; Tatemoto et al., 2001; Wang et al., 2004).

Comme décrit précédemment, la distribution des formes peptidiques d'apeline diffère selon les types de tissus. En effet, alors que la pApe13 est prédominante dans le tissu cardiaque, l'Ape36 est plus particulièrement présente dans les poumons ou les testicules tandis que les formes Ape36 et Ape13 sont toutes deux présentes dans les glandes mammaires (Kawamata et al., 2001; Maguire et al., 2009). Au cours de la grossesse et de l'allaitement, l'expression d'apeline est particulièrement élevée au niveau des glandes mammaires et celle-ci atteint un pic d'expression en périnatal. Cette localisation suggère une sécrétion exocrine de l'apeline, en accord avec la forte concentration de peptide détectée dans le colostrum et le lait de vache (Habata et al., 1999; Hosoya et al., 2000). Ces différences de distribution tissulaire laissent supposer que l'apeline pourrait subir une maturation différentielle selon les organes. Cette variabilité pourrait notamment être due à des différences d'expression tissulaire d'endopeptidases responsables de la maturation de l'apeline.

A.4 Régulations de l'expression du gène de l'apeline :

La caractérisation de la région promotrice du gène de l'apeline met en évidence de nombreux sites de liaison potentiels pour des facteurs de transcription tels que Sp1 ou encore les facteurs de transcription ubiquitaires USF1 et USF2 (Upstream Stimulatory Factor). Ainsi, Wang et coll. montrent que les facteurs USFs régulent positivement son expression. Ce rôle stimulateur a été mis en évidence *in vitro* sur une lignée cellulaire de sein humain (Hs578T) et la liaison de ces facteurs USFs au promoteur de l'apeline a été confirmée *in vivo* à partir d'extraits tissulaires de glandes mammaires murines (Wang et al., 2006). A l'inverse, l'aldostérone (minéralocorticoïde) et la dexaméthasone (glucocorticoïde), *via* les récepteurs aux glucocorticoïdes exercent un effet inhibiteur sur l'expression et la sécrétion d'apeline dans les adipocytes (Jiang et al., 2013; Wei et al., 2005).

L'insuline régule positivement l'expression d'apeline dans des adipocytes murins et humains (Boucher et al., 2005; Dray et al., 2010; Glassford et al., 2007; Wei et al., 2005). Ces résultats sont confirmés *in vivo* puisque qu'un traitement à la streptozotocine (agent toxique induisant la dégradation des cellules β des îlots de Langerhans produisant l'insuline) provoque la diminution de l'expression de l'apeline par les adipocytes de ces animaux (Boucher et al., 2005). De même, chez l'Homme, l'injection intraveineuse (iv.) d'insuline induit une augmentation de l'expression d'apeline par les adipocytes. De plus, l'analyse de plasma de patients sains et diabétiques révèle l'existence d'une corrélation positive entre l'apelinémie et l'insulinémie (Dray et al., 2010).

Le TNF- α représente un autre facteur régulant l'expression de l'apeline. Produit par les macrophages et les adipocytes, son expression dans le plasma est augmentée au cours de l'obésité. De manière intéressante, l'injection intra-péritonéale de TNF- α provoque l'augmentation de l'expression des ARNm de l'apeline dans les adipocytes ainsi que l'augmentation des taux d'apeline plasmatique (Daviaud et al., 2006).

Cependant, d'autres cytokines induites en situations inflammatoires régulent positivement l'expression d'apeline comme cela a été mis en évidence au niveau du tractus gastro-intestinal. En effet, l'analyse de coupes de tissus coliques provenant de patients atteints de colite ulcéreuse ou de la maladie de Crohn ainsi que d'un modèle murin de colite induite (traitement au DSS (Dextran Sodium Sulfate)) montrent une forte augmentation de l'expression de l'apeline par les cellules épithéliales coliques par rapport au tissu sain (Han et al., 2007). Chez l'Homme et l'animal, ces pathologies sont associées à une augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'INF- γ (INterFeron- γ).

Utilisant des animaux traités au LPS (LipoPolySaccharide) afin d'induire une inflammation systémique, Han et coll. démontrent que l'IL-6 et l'INF- γ sont responsables de l'augmentation de l'expression de l'apeline dans les cellules coliques et ce de manière dépendante du facteur de transcription STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription 3) (Han et al., 2008a).

L'apeline est également régulée par l'hypoxie. En effet, différents travaux réalisés sur des cardiomyocytes, des adipocytes ainsi que des cellules endothéliales, des cellules musculaires lisses vasculaires et des cellules tumorales mettent en évidence que des conditions pauvres en oxygène augmentent l'expression d'apeline (Cox et al., 2006; Eyries et al., 2008; Glassford et al., 2007; Kunduzova et al., 2008; Ronkainen et al., 2007; Sorli et al., 2007). L'analyse du gène de l'apeline met en évidence la présence de deux séquences HRE (Hypoxia Responsive Element) localisées au niveau du promoteur et du premier intron de son gène qui permettent la liaison du facteur de transcription HIF- α (Eyries et al., 2008; Han et al., 2008b). L'induction de l'expression du gène de l'apeline en condition hypoxique est dépendante du facteur de transcription HIF- α et de la conservation de ces séquences HRE. En effet, l'extinction de HIF- α (KO/siRNA), son inhibition (expression d'un dominant négatif de Hif-1 α) ou encore la mutation des séquences HRE sur le gène de l'apeline provoque la perte de l'effet inducteur de l'hypoxie (Eyries et al., 2008; Glassford et al., 2007; Han et al., 2008b; Ronkainen et al., 2007). A l'inverse, la stabilisation (Desferrioxamine) ou l'utilisation d'une forme constitutivement active de HIF- α augmente l'expression d'apeline même en normoxie (Ronkainen et al., 2007).

D'autre part, des travaux récents mettent en évidence que l'EPA (EicosaPentaenoïc Acid), un acide gras poly-insaturé de la famille des omega 3, le régulateur transcriptionnel PGC-1 α (Proliferator-activated receptor γ (PPAR- γ) co-activator 1- α) ainsi qu'une nouvelle adipokine nommée CTRP3 (C1q/TNF related protein 3) stimulent l'expression et la sécrétion d'apeline dans les adipocytes (Bertrand et al., 2013; Li et al., 2014; Lorente-Cebrián et al., 2010; Mazzucotelli et al., 2008). De plus, le facteur angiogénique VEGF-A induit également l'expression de l'apeline dans des cellules endothéliales (Hara et al., 2013; del Toro et al., 2010).

A l'inverse, d'autres régulateurs tels que les BMP (Bone Morphogenic Protein) 9 et 10, ou encore le facteur de transcription ATF4 activé en réponse au stress du réticulum inhibent l'expression d'apeline respectivement dans les cellules endothéliales et les hépatocytes (Jeong et al., 2014; Ricard et al., 2012).

II.B Apela, Toddler ou ELABELA :

B.1 Découverte :

Très récemment, deux études visant à découvrir de nouveaux signaux impliqués au cours du développement embryonnaire ont identifié un nouveau ligand du récepteur APJ. Ce ligand, tout d'abord nommé ELABELA ou ELA par le groupe de Chng et coll., et Toddler par Pauli et coll. est également appelé Apela pour « Apelin receptor early endogenous ligand » (Chng et al., 2013; Pauli et al., 2014; Reichman-Fried and Raz, 2014).

B.2 Structure :

Chez l'homme, ce gène est situé sur le chromosome 4 et constitué de 3 exons. Comme l'apeline, l'ARNm du gène *APELA* code pour un polypeptide de 54 acides aminés dont la séquence, et plus particulièrement les 13 derniers résidus sont fortement conservés inter-espèces (**Figure 16**). Au niveau de son extrémité amino-terminale, la protéine possède un peptide signal dirigeant Apela vers la voie sécrétoire. De plus, Apela contient également des doublets d'acides aminés basiques (RR) qui pourraient constituer des sites de clivages potentiels pour des endopeptidases et ainsi générer différents fragments de 32, 22 et 11 acides aminés (Pauli et al., 2014). Ces caractéristiques sont proches de celles de l'apeline et des travaux récents démontrent que le fragment d'Apela de 32 acides aminés (Apela 32) se fixe au récepteur APJ avec la même affinité que l'apeline 13 (0.4 nM pour l'apeline 13 et 0.51 nM pour Apela 32), inhibe la production d'AMPC, et active les ERKs de manière dépendante des protéines Gi dans des cellules CHO surexprimant APJ (Deng et al., 2015).

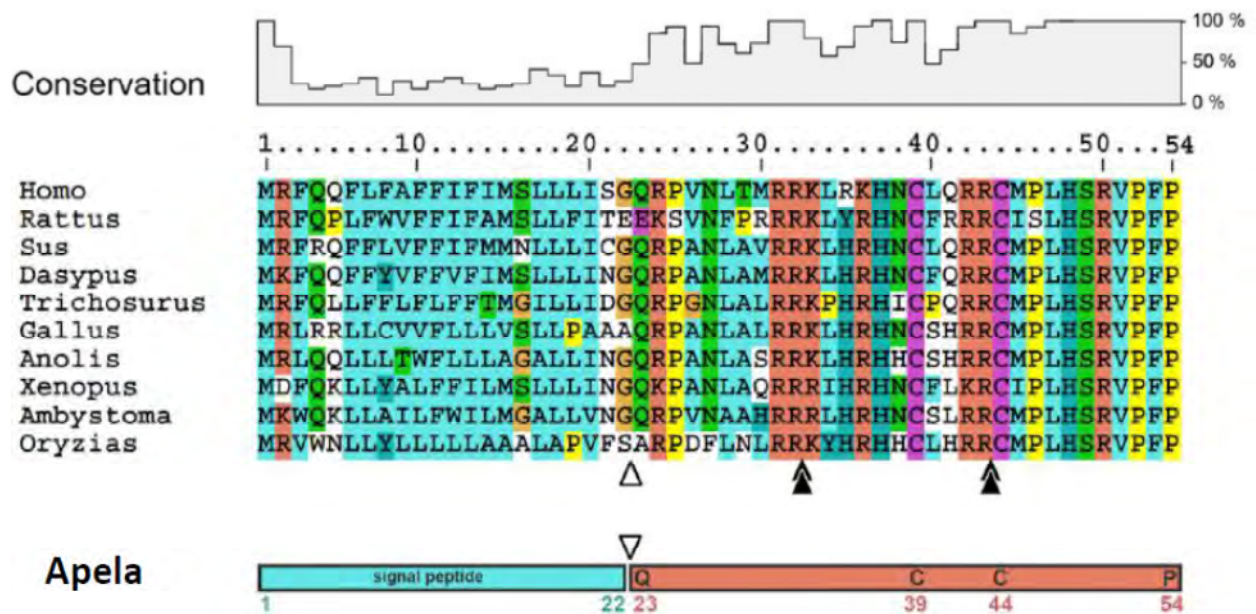


Figure 16 : Séquence peptidique d'Apela dans les différentes espèces.

Les flèches blanches représentent le site de clivage du peptide signal. Les flèches noires correspondent aux sites potentiels de clivage par des endopeptidases pouvant générer différents fragments d'Apela (Adapté de Chng et al., 2013).

B.3 Sites d'expression et fonctions :

A l'heure actuelle, la fonction d'Apela a été principalement caractérisée au cours du développement embryonnaire (Chng et al., 2013; Pauli et al., 2014). Plusieurs études, réalisées sur des cellules souches embryonnaires humaines (Miura et al., 2004; Wang et al., 2015) et sur le poisson zèbre (Chng et al., 2013; Pauli et al., 2014), mettent en évidence une forte expression d'Apela dans les stades précoces du développement embryonnaire diminuant rapidement au cours de la différenciation.

L'inactivation d'Apela chez le poisson zèbre révèle son importance dans la mise en place du système cardiovasculaire. En effet, ce peptide est impliqué dans la différenciation de l'endoderme, essentielle à la morphogenèse cardiaque. Les animaux *APELA*^{-/-} présentent de sévères problèmes cardiaques allant de malformations jusqu'à l'absence totale de cœur, une faible circulation sanguine ainsi que des défauts de développement du tronc et de la queue. De plus, la perte d'Apela induit une forte mortalité intra-utérine (mortalité importante entre 5 et 7 jours de développement). Étonnamment, les animaux survivants aux phases de développement embryonnaire ne présentent pas de défauts majeurs à l'état adulte signe de l'importance de ce ligand au cours des phases précoces du développement.

Il est intéressant de noter qu'en plus de son action au cours de l'embryogénèse, Apela pourrait exercer des fonctions chez l'adulte. En effet, la recherche des transcrits Apela dans différents tissus de l'organisme révèle une expression exclusivement rénale chez le rat adulte, où elle stimule la diurèse (Deng et al., 2015), tandis qu'elle est également exprimée dans le rein et la prostate chez l'Homme (Chng et al., 2013; Wang et al., 2015).

Chapitre III KO APJ et KO Apeline :

Afin de caractériser le rôle de la signalisation APJ dans l'organisme, différents groupes ont réalisé des modèles animaux transgéniques invalidés pour l'apeline ou son récepteur. Etrangement, ces études mettent en évidence une divergence de phénotype entre ces animaux.

Alors que les animaux *Apln*^{-/-} sont viables, fertiles et ne présentent pas de phénotype majeur excepté un retard de la mise en place de la vascularisation rétinienne et une altération de la contractilité cardiaque associée à l'âge, l'invalidation du récepteur a de fortes conséquences (Charo et al., 2009; Kasai et al., 2008; Kuba et al., 2007). En effet, la perte d'expression d'APJ induit une forte mortalité intra-utérine liée à des défauts de développement cardiaque et vasculaire. En conséquence, seule une faible proportion de ces embryons *APJ*^{-/-} est viable (Charo et al., 2009; Kang et al., 2013; Scott et al., 2007).

Le contraste observé entre les animaux invalidés pour le récepteur APJ et le phénotype mineur observé pour les animaux *Apln*^{-/-} peut s'expliquer par l'existence du second ligand d'APJ, Apela. La découverte d'Apela et du phénotype associé à son extinction, semblable à celui des animaux KO APJ met en évidence un rôle essentiel de cette voie de signalisation dans le développement cardiaque et la viabilité des embryons.

L'apeline et Apela étant exprimées précocement au cours de l'embryogenèse, on pourrait s'attendre à une compensation entre ces deux ligands. Cependant, l'absence de cette compensation s'explique par un profil d'expression spatio-temporel incompatible. En effet, alors que l'expression d'APJ et d'Apela sont concomitantes, l'expression de l'apeline est retardée de quelques heures au cours de la gastrulation (**Figure 17**).

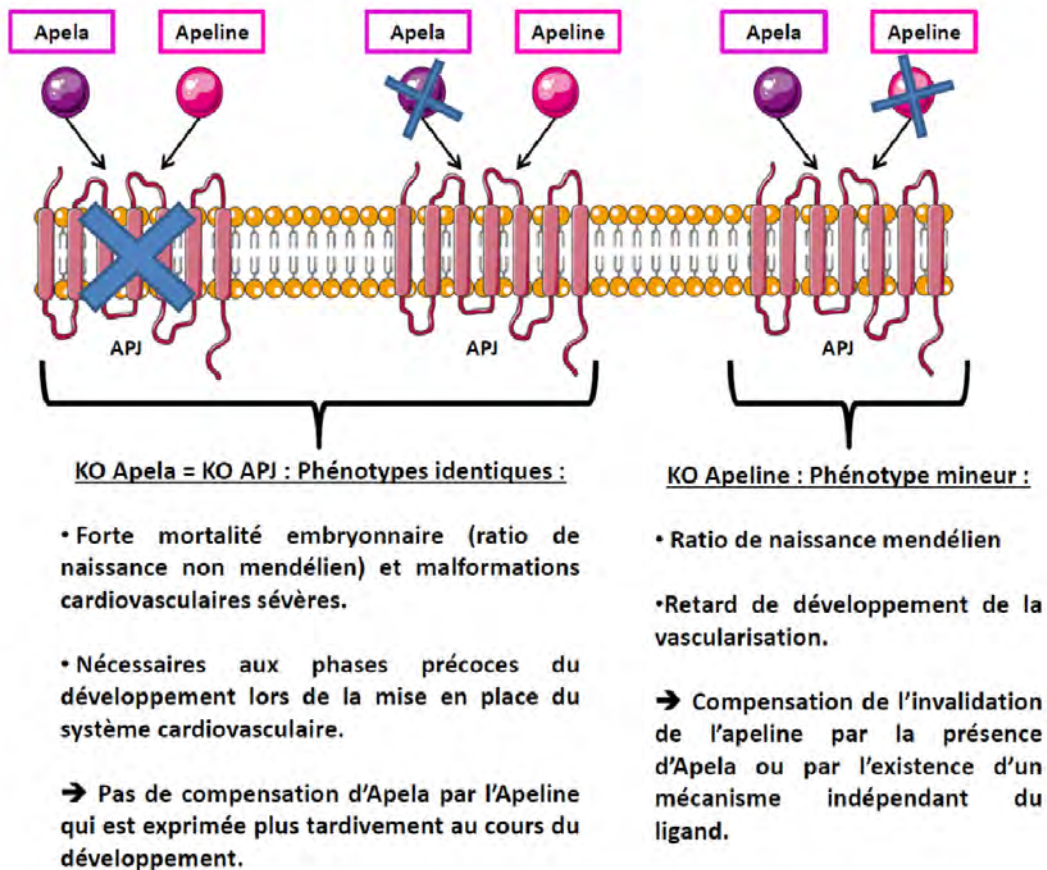


Figure 17 : L'interaction du récepteur APJ avec Apela mais pas l'apeline est essentielle à la mise en place du système cardiovasculaire au cours des phases précoces du développement embryonnaire.

Explication et représentation schématique des phénotypes divergents associés à l'inactivation des différents partenaires de la voie de signalisation APJ.

Chapitre IV Signalisation Apelinergique :

Compte tenu du peu de données disponibles dans la littérature concernant le ligand Apela, je me focaliserai sur les relations existant entre le ligand apeline et le récepteur APJ, constituant l'axe majeur de mes travaux de thèse.

IV.A Couplage aux protéines G :

Les premières études visant à caractériser le récepteur APJ démontrent que son activation provoque l'inhibition de la production d'AMPC (Adenosine MonoPhosphate cyclique) induite par la forskoline laissant supposer son couplage à une protéine de type Gi (Habata et al., 1999; Tatemoto et al., 1998). Par la suite, ceci a été confirmé par l'utilisation de la toxine pertussique (PTX), une toxine bloquant le couplage des protéines de type Gi à leur récepteur par ADP-ribosylation de la sous-unité α . En effet, de nombreuses études mettent en évidence que l'effet inhibiteur de l'apeline sur la production d'AMPC ainsi que l'activation d'effecteurs intracellulaires tels que ERKs, Akt et la P70S6K sont sensibles à la PTX (Hosoya et al., 2000; Masri et al., 2002). De plus, notre équipe a démontré que dans des cellules CHO surexprimant le récepteur murin msr/apj, celui-ci est préférentiellement couplé aux protéines G_{i1} et G_{i2} et les sous-unités $G_{\alpha i1}$ et $G_{\alpha i2}$ permettent l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt (Masri et al., 2006). En accord avec ces résultats, l'expression du récepteur humain hAPJ dans des cellules HEK293 induit l'activation de la sous-unité $G_{\alpha i2}$ (Bai et al., 2008; Chen et al., 2014). Ce couplage est également retrouvé dans des modèles cellulaires exprimant APJ de manière endogène telles que les cellules endothéliales HUVECs dans lesquelles l'activation des voies ERKs et PI3K/Akt par l'apeline engendre la prolifération des cellules endothéliales (Masri et al., 2004). APJ est également exprimé par les myocytes dans lesquels l'apeline active l'AMPK et la capture du glucose de manière Gi dépendante (Yue et al., 2010).

Cependant, suivant le type cellulaire, le récepteur APJ peut être couplé à d'autres protéines G. En effet, dans les cellules endothéliales HUVECs, APJ peut également être couplé à une protéine de type G_{i3} . Cette voie induit la relocalisation cytoplasmique des histones déacétylases (HDAC) 4 et 5 et l'activation de MEF2 (myocyte enhancer factor 2), un facteur de transcription impliqué au cours du développement cardiovasculaire (Kang et al., 2013). De plus, des études réalisées dans un système hétérologue (cellules HEK surexprimant

le récepteur humain APJ) ainsi que sur des adipocytes murins révèlent que le récepteur APJ (humain et murin) est couplé à des protéines de type G_i et $G_{q/11}$ (Chen et al., 2014; Yue et al., 2011). Ce double couplage est retrouvé au niveau cardiaque. En agissant sur les cardiomyocytes, l'apeline induit un effet inotrope positif de manière dépendante de l'activation de la PLC β (PhosphoLipase-C β) et de la PKC (Protéine Kinase C), connue pour être une voie G_q dépendante. En ce sens, l'effet inotrope de l'apeline sur des cœurs isolés n'est que partiellement perdu (30%) après un prétraitement à la PTX. Ainsi, l'effet de l'apeline serait due à la fois à une voie dépendante des protéines G_i et G_q (Szokodi et al., 2002).

IV.B Cascades de transduction : Effecteurs et effets cellulaires :

En aval de l'activation des protéines G, l'apeline stimule de nombreuses cascades de transduction qui participent à la régulation de différentes fonctions cellulaires clés (**Figure 18**) (Chaves-Almagro et al., 2015) (**Annexe 1**).

Ainsi, que ce soit dans des cellules endothéliales (Berta et al., 2014; Masri et al., 2006), des cellules musculaires lisses (Cui et al., 2010; Li et al., 2013; Liu et al., 2010), des neurones (Gu et al., 2013; O'Donnell et al., 2007), des adipocytes (Than et al., 2012), des myocytes (Dray et al., 2008), des cellules tumorales (Picault et al., 2014) ou encore des ostéoblastes (Tang et al., 2007; Xie et al., 2006a, 2007), l'apeline active principalement les voies de signalisation MAPK et/ou PI3K/Akt stimulant ainsi leur prolifération, leur survie, leur migration et/ou différentes fonctions métaboliques.

Ces voies de signalisation peuvent agir de manière indépendantes ou coordonnées. En effet, par exemple, l'effet prolifératif de l'apeline observé sur les cellules endothéliales HUVECs nécessite l'activation conjointe des voies MAPK et PI3K/Akt (Masri et al., 2004). En revanche, dans les ostéoblastes, seule la voie de signalisation PI3K/Akt induit leur prolifération et leur survie *via* l'activation de la voie JNK (c-Jun N-terminal kinase) et la régulation de l'expression de protéines anti- et pro-apoptotiques (augmentation Bcl-2 et inhibition de Bax et des caspases effectrices) (Tang et al., 2007; Xie et al., 2006a, 2007).

D'autre part, plusieurs études démontrent que l'apeline induit également l'activation de l'AMPK (AMP-activated protein Kinase) dans les cellules musculaires squelettiques, les adipocytes ou encore les entérocytes. Dans ces cellules, l'activation de l'AMPK régule différentes fonctions métaboliques telles que l'inhibition de la lipolyse, la capture du glucose,

l'oxydation des acides gras et stimule la fonction ainsi que la biogenèse mitochondriale (Attané et al., 2011, 2012; Dray et al., 2008, 2013; Than et al., 2012; Yue et al., 2010, 2011). Cependant, la capture du glucose induite par l'apeline dépend également de l'activation d'Akt et de la translocation membranaire du transporteur au glucose Glut4 ou Glut2 (Dray et al., 2008; Zhu et al., 2011).

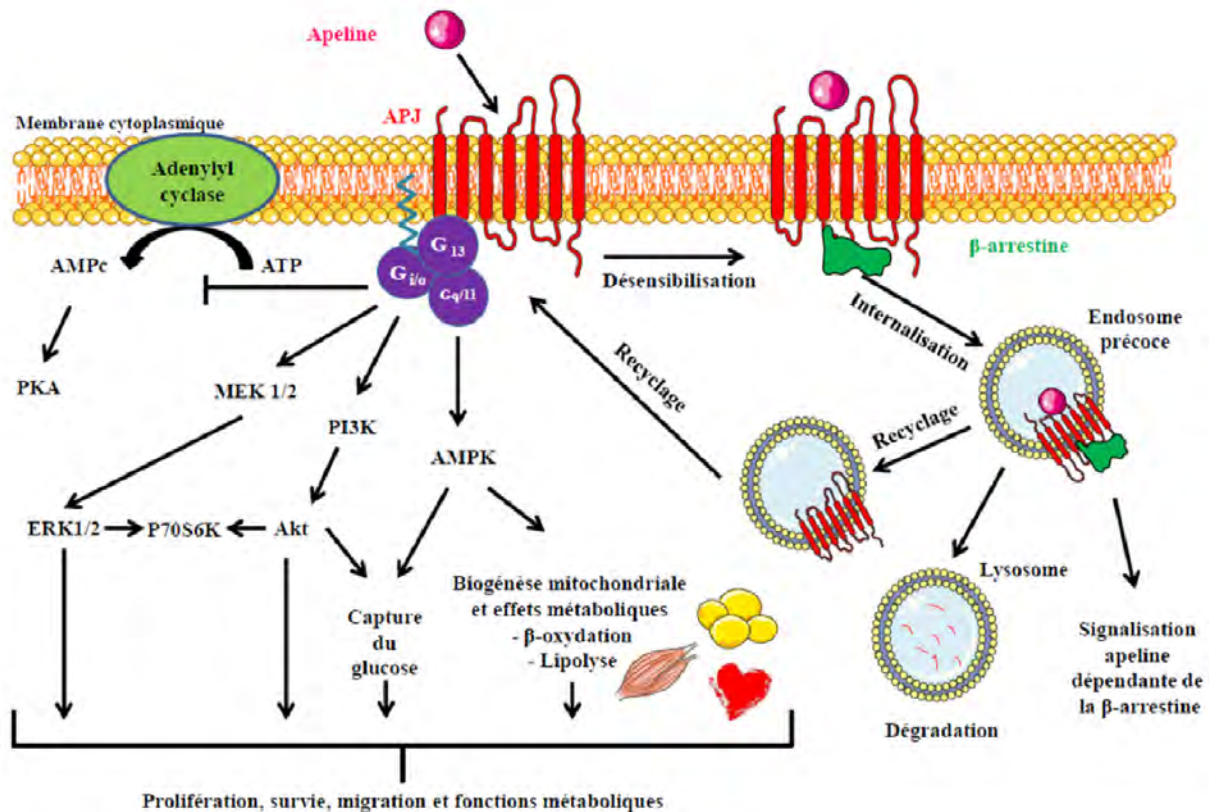


Figure 18 : Présentation des différentes voies de signalisation et effets cellulaires induits par l'apeline en aval du récepteur APJ.

(Adapté de Chaves-Almagro et al., 2015)

Suivant le type cellulaire, APJ peut être couplé à différents types de protéines G ($G_{i/o}$, $G_{q/11}$, G_{13}). En aval de l'activation des protéines G, l'apeline inhibe la production d'AMPc et stimule les voies MAPK, PI3K/Akt et l'AMPK stimulant la prolifération, la survie, la migration et/ou diverses fonctions métaboliques. D'autre part, l'activation d'APJ induit le recrutement des β -arrestines ayant pour conséquence la désensibilisation et l'internalisation du récepteur. Cependant, au cours de l'internalisation, la β -arrestine peut également engendrer une nouvelle cascade de transduction de manière indépendante des protéines G. Par la suite, le récepteur peut être rapidement recyclé à la membrane plasmique ou envoyé à la dégradation.

Flèches pleines : activation, Flèches coupées : inhibition.

Au niveau de la cellule endothéliale, via l'activation de la eNOS (endothelial Nitric Oxide Synthase) et la production de NO, l'apeline possède un potentiel vasodilatateur (Ishida et al., 2004; Jia et al., 2007). En effet, l'apeline induit une diminution transitoire de la pression artérielle, inhibée en présence de L-NAME (N^G -nitro-L-Arginine Methyl Ester), un inhibiteur de la NOS (Ishida et al., 2004; Tatemoto et al., 2001). Enfin, des travaux récemment réalisés

sur des adipocytes démontrent que l'apeline régule la production des espèces réactives de l'oxygène *via* l'activation des voies MAPK et AMPK. Dans ces cellules, l'apeline joue un rôle anti-oxydant en régulant positivement l'expression d'enzymes anti-oxydantes telles que la catalase ou la SOD (SuperOxide Dismutase) (Than et al., 2014).

IV.C Internalisation du récepteur APJ :

Parallèlement à l'activation des protéines G, la liaison des différents fragments d'apeline au récepteur APJ induit le recrutement des β -arrestines 1 et 2 et l'internalisation du récepteur au niveau des puits de clathrine (Evans et al., 2001; Lee et al., 2010; Messari et al., 2004; Reaux et al., 2001; Zhou et al., 2003b). Cependant, même si les différentes formes d'apeline ont une affinité pour APJ très proche (de l'ordre du nM) et activent les mêmes effecteurs intracellulaires, une fois internalisé, le devenir du récepteur diffère suivant le type d'apeline utilisé (**Figure 18**).

En effet, alors que l'apeline 13 induit l'internalisation du récepteur suivie de son recyclage rapide à la membrane plasmique, la liaison de l'apeline 36 induit la séquestration du récepteur au niveau des endosomes (Zhou et al., 2003b). D'autre part, le prétraitement de cellules CHO surexprimant le récepteur APJ par de l'apeline 36 diminue drastiquement la capacité de liaison de l'apeline 13 iodée au récepteur par rapport aux cellules prétraitées par de l'apeline 13 (Hosoya et al., 2000). Les différents fragments ayant des affinités équivalentes, cet effet s'explique par la faible dissociation de l'apeline 36 à son récepteur. En effet, des expériences de compétition montrent que l'apeline 13 est incapable de dissocier l'apeline 36 iodée de son récepteur (Kawamata et al., 2001).

Comme précédemment décrit dans le chapitre I « Le récepteur APJ », les fonctions des β -arrestines étaient premièrement restreintes à la désensibilisation et à l'internalisation des récepteurs. Cependant, depuis quelques années, différents travaux révèlent leur rôle de protéines adaptatrices pouvant recruter différents effecteurs intracellulaires et ainsi générer une seconde phase de signalisation. Concernant le récepteur APJ, le rôle des β -arrestines dans l'activation de voies de signalisation induites par l'apeline a déjà été mis en évidence par l'utilisation d'une apeline délétée pour sa phénylalanine C-terminale (apeline K16P) ou d'une forme mutante du récepteur APJ (récepteur muté dans sa partie C-terminale intracellulaire sur le résidu serine 348). En effet, sur des cellules CHO surexprimant le récepteur APJ, alors que

l'apeline K16P conserve son action inhibitrice sur la production d'AMPc, cette délétion affecte fortement l'internalisation du récepteur (Iturrioz et al., 2007). De plus, par une approche de BRET (Bioluminescence Resonance Energy Transfert), Ceraudo et coll. mettent en évidence que l'apeline K17F induit l'activation de la voie MAPK de manière dépendante des voies Gi et β -arrestine alors l'apeline K16P se comporte comme un agoniste biaisé. En effet, à la différence de l'apeline K17F, l'apeline K16P active les ERKs de manière dépendante de Gi mais n'engendre qu'un très faible recrutement des β -arrestines (Ceraudo et al., 2014). De manière intéressante, seule l'apeline K17F possède un effet hypotenseur laissant supposer que cet effet de l'apeline *in vivo* est dépendant de la voie β -arrestine. De plus, Chen et coll. montrent que suite à une stimulation par l'apeline, le récepteur APJ muté sur le résidu 348 ne permet plus le recrutement de la β -arrestine et ne conserve qu'une activation partielle des ERKs, dépendante de l'activation des protéines G (Chen et al., 2014) **(Figure 19)**.

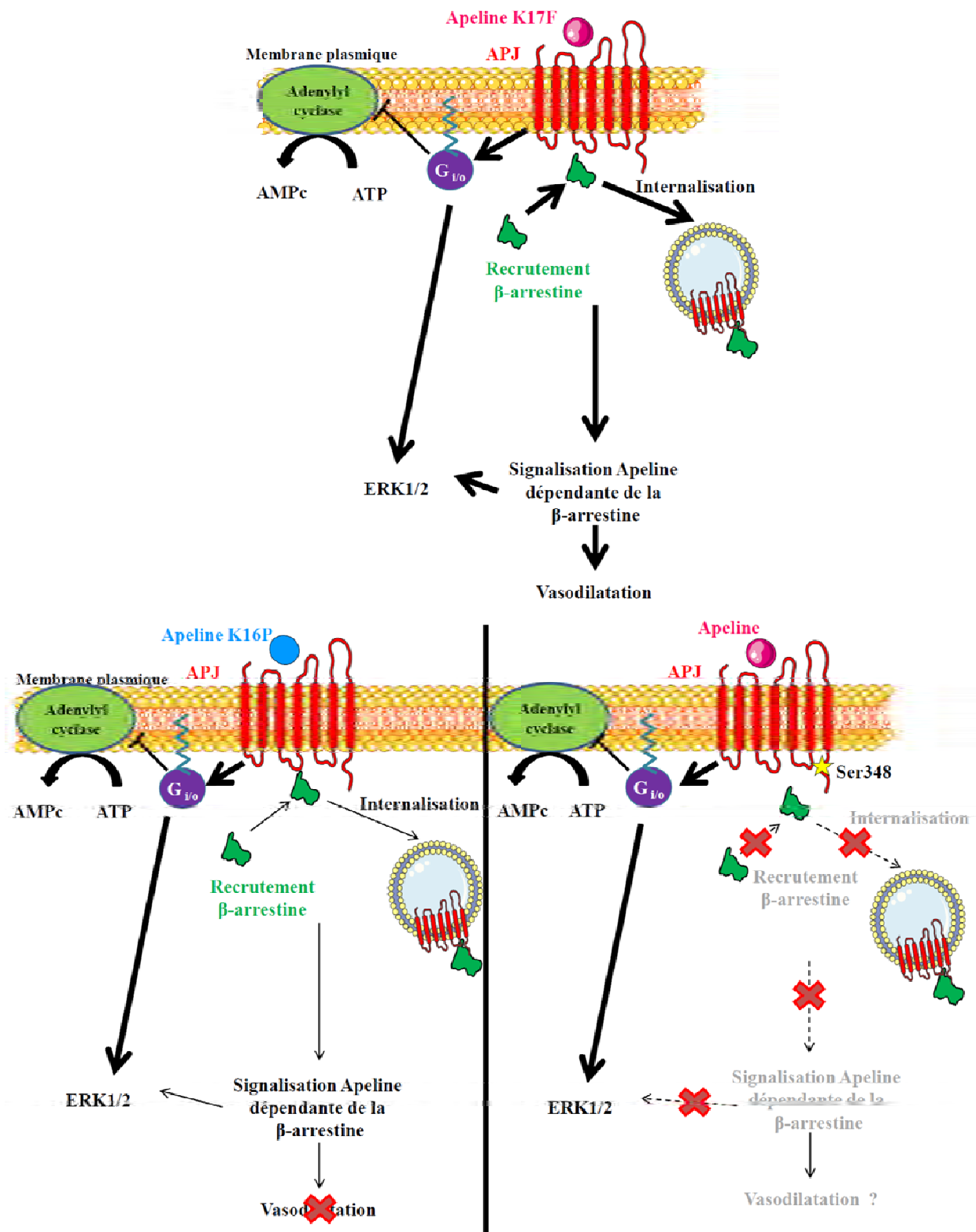


Figure 19 : L'apeline induit l'activation de voies de signalisation dépendantes des protéines G et/ou des β-arrestines.

Apeline K16P : apeline 17 sans phénylalanine C-terminale

Ser348 : Récepteur APJ muté pour le résidu 348 sur sa partie C-terminale intracellulaire et dont la phosphorylation induit le recrutement de la β-arrestine et l'internalisation du récepteur.

IV.D Hétérodimérisation :

Les RCPGs sont principalement présentés comme des entités monomériques. Cependant, les connaissances actuelles apportent un degré de complexité supérieur en mettant en évidence leurs capacités d'oligomérisation. Ces interactions peuvent ainsi réguler différemment les voies de signalisation impliquées en modifiant notamment la liaison des ligands au récepteur, le couplage aux protéines G, les effecteurs activés en aval ou encore le recyclage du récepteur.

Malgré leurs similitudes en termes de structure et de sites d'expression, de nombreuses études mettent en évidence que les récepteurs de l'apeline et de l'angiotensine 2 (AT1R) exercent des rôles biologiques opposés. En effet, alors que l'angiotensine 2 est vasoconstrictrice et favoriserait le développement de pathologies cardiovasculaires (hypertension, insuffisance cardiaque, athérosclérose), l'apeline exerce plutôt un rôle vasodilatateur et cardioprotecteur. De manière intéressante, trois travaux mettent en évidence que le récepteur APJ peut interagir avec le récepteur de l'angiotensine 2, AT1R. Bien que les études divergent sur l'origine de cette hétérodimérisation (constitutive, induite par l'apeline ou par l'angiotensine 2), elles s'accordent sur l'effet inhibiteur de l'apeline sur la signalisation angiotensine. En effet, l'apeline diminue l'affinité de l'angiotensine 2 pour son récepteur et inhibe sa capacité à activer la voie MAPK (Chun et al., 2008; Siddiquee et al., 2013; Sun et al., 2011).

De plus, des travaux récents révèlent que le récepteur APJ peut également former des hétérodimères avec les récepteurs κ -opioïde, bradykinine et neurotensine. De manière intéressante, la formation de ces dimères est favorisée par l'ajout des agonistes et ces interactions ont pour effet de potentialiser l'activation des voies de signalisation induites par les ligands (Bai et al., 2014a, 2014b; Li et al., 2012b). Au niveau fonctionnel, l'ajout d'apeline ou de dynorphine A augmente significativement la prolifération des cellules HEK293 co-transfectées avec les récepteurs APJ et κ -opioïde par rapport aux cellules n'exprimant qu'un des deux récepteurs (Li et al., 2012b).

Ainsi ces interactions permettent de générer un nouveau mécanisme de régulation des voies de signalisation du système apelinergique et pourrait ouvrir de nouvelles perspectives pharmacologiques et cliniques si l'existence de ces hétérodimères est confirmée *in vivo*.

IV.E Signalisation indépendante du ligand : étirement mécanique :

Comme décrit précédemment, le couple apeline/APJ est exprimé par les cardiomyocytes où cette signalisation induit un effet cardioprotecteur.

Etudiant les conséquences de la perte de la signalisation apelinergique dans un modèle murin d'hypertrophie cardiaque (animaux soumis à une constriction transaortique), Scimia et coll. observent une différence de phénotype entre les animaux KO APJ et KO Apeline. En effet, alors que les souris invalidées pour le récepteur APJ sont résistantes à l'hypertrophie cardiaque induite, les souris KO apeline y demeurent sensibles. Dans cette étude, les auteurs mettent en évidence un nouveau mode d'activation du récepteur APJ, indépendant de l'apeline mais induit par l'étirement mécanique de la cellule myocardique. Ainsi, expliquant la différence de phénotype observée entre les animaux, Scimia et coll. montrent qu'à la différence de l'apeline, l'étirement mécanique permet d'activer une signalisation dépendante de la β -arrestine en aval du récepteur APJ qui aboutit à l'hypertrophie cardiaque. De manière intéressante, l'injection d'apeline dans ce modèle murin permet de limiter l'hypertrophie induite par le stress mécanique et la voie β -arrestine en activant parallèlement une voie dépendante de la protéine Gi. Ainsi, ces deux voies semblent se contrebalancer. Alors que l'apeline induit un effet cardioprotecteur, l'étirement mécanique diminue l'activation de la voie Gi au profit d'une voie β -arrestine engendrant l'hypertrophie (Scimia et al., 2012) (**Figure 20**).

Ainsi, la voie de signalisation apeline représente une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement des pathologies cardiaques. Compte tenu de ces résultats, il serait intéressant de développer ou bien de tester dans ce modèle murin d'hypertrophie cardiaque l'effet d'agonistes biaisés du récepteur APJ comme par exemple l'apeline K16P. En effet, comme précédemment mentionné, l'apeline privée de sa phénylalanine terminale stimule préférentiellement la voie de signalisation dépendante des protéines G.

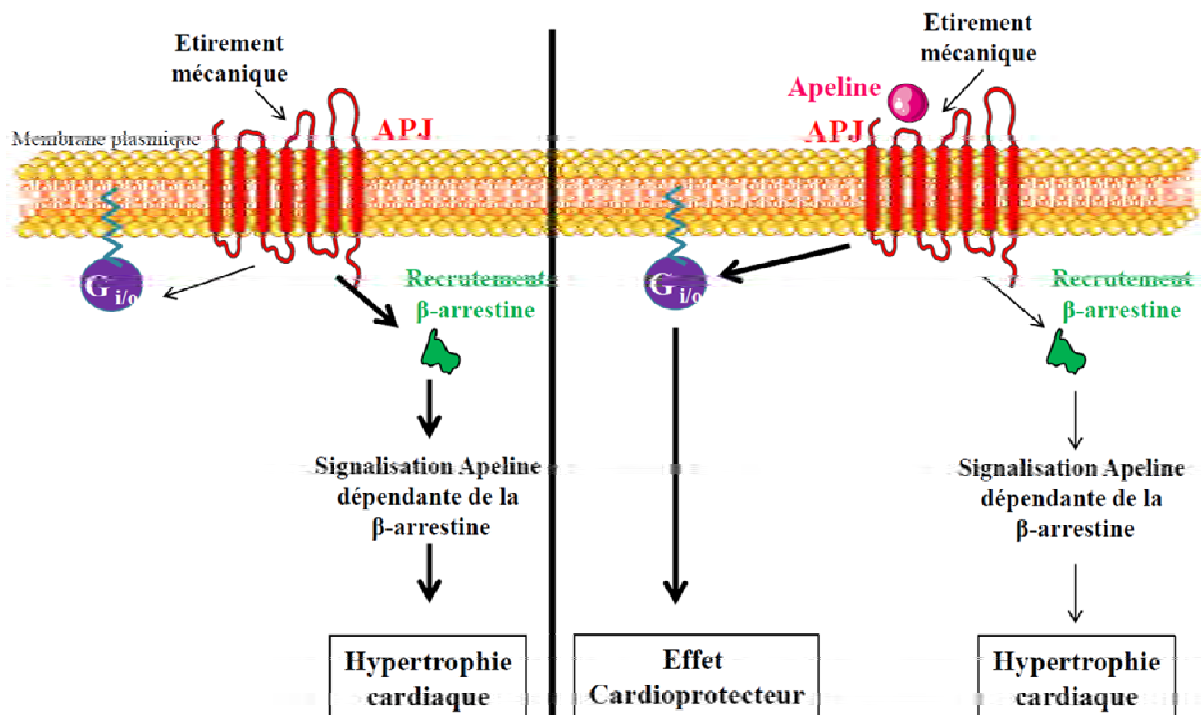


Figure 20 : L'activation du récepteur APJ par l'étirement mécanique sur des cardiomyocytes induit l'hypertrophie cardiaque par l'intermédiaire d'une voie de signalisation dépendante de la β -arrestine.

Panneau de gauche : L'étirement mécanique active le récepteur APJ indépendamment de son ligand et stimule ainsi une voie de signalisation dépendante de la β -arrestine qui engendre l'hypertrophie cardiaque.

Panneau de droite : Lors de l'étirement mécanique, l'apeline induit préférentiellement l'activation d'une voie de signalisation dépendante de la protéine G_i et joue un rôle cardioprotecteur contrebalançant l'effet de l'étirement mécanique.

IV.F Agonistes et antagonistes d'APJ :

Comme précédemment décrit, le couple apeline/APJ est exprimé dans de nombreux tissus de l'organisme. Ainsi, l'apeline participe à la régulation du métabolisme énergétique mais joue également un rôle important au niveau du système cardiovasculaire et lors de l'angiogenèse physiologique et tumorale. Compte tenu de ses multiples rôles, le système apelinergique représente donc une cible thérapeutique intéressante dans le traitement de certaines pathologies. Cependant, à ce jour, seules quelques molécules agissant comme des agonistes ou des antagonistes spécifiques du récepteur ont pu être identifiées et caractérisées.

En 2003, Zhou et coll. sont les premiers à décrire un antagoniste peptidique d'APJ composé de neuf résidus arginine et nommé ALX40-4C. Ce polypeptide est un antagoniste du récepteur de chimiokine CXCR4 pour lequel il possède une forte affinité (de l'ordre du nanomolaire). Mais le composé ALX40-4C se lie également au récepteur APJ (avec une

affinité de l'ordre du micromolaire) et bloque ainsi l'internalisation d'APJ induite par l'apeline (Zhou et al., 2003c).

Comme précédemment abordé, la phénylalanine C-terminale de l'apeline est un résidu important pour son activité et plusieurs études rapportent que l'apeline mutée pour cette phénylalanine, l'apeline F13A, se comporte comme un antagoniste. En effet, *in vivo*, l'apeline F13A inhibe l'effet hypotenseur induit par l'apeline 13 et cette même activité antagoniste est observée *in vitro* où elle diminue la prolifération de cellules tumorales humaines et la migration de cellules endothéliales lymphatiques induites par l'apeline (Berta et al., 2014; Lee et al., 2005; Picault et al., 2014). Cependant, l'activité antagoniste de l'apeline F13A sur le récepteur APJ est controversée et nécessite d'être caractérisée plus en détail. En effet, des essais réalisés *in vitro* révèlent que l'apeline F13A se comporte comme un agoniste du récepteur APJ, induisant l'inhibition de la production d'AMPC et l'internalisation du récepteur (Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003).

Une approche de ligand bivalent a permis l'identification d'un antagoniste cyclique d'APJ contenant un motif peptidique en doublet, retrouvé dans l'apeline (Arginine-Proline-Arginine-Leucine) et séparés par un « spacer » (Macaluso et al., 2011). Ainsi, ce composé contient les résidus nécessaires à sa liaison sur le récepteur APJ et possède une activité antagoniste observée *in vitro* et *in vivo* (Dray et al., 2013; Macaluso et al., 2011). De manière intéressante, ce peptide cyclique serait mieux protégé de la dégradation et aurait ainsi une demi-vie plus longue que l'apeline.

Enfin, par une approche de criblage haut débit, Maloney et coll. ont identifié le premier antagoniste non peptidique du récepteur APJ. Cette petite molécule nommée ML221 bloque de manière dose dépendante l'inhibition de la production d'AMPC ainsi que le recrutement de β -arrestine induit par l'apeline (Maloney et al., 2012).

D'autre part, le premier agoniste non peptidique a été identifié en 2009 et se nomme E339-3D6. Suivant la réponse cellulaire étudiée, ce composé se comporte différemment. En effet, alors que le E339-3D6 est un agoniste partiel concernant l'inhibition de l'adénylyl cyclase, il se comporte comme un agoniste plein concernant l'induction de l'internalisation du récepteur APJ (Iturrioz et al., 2010). De plus, *in vivo*, ce composé induit la vasorelaxation dans un modèle d'aorte de rat préalablement contractée par la noradrénaline et inhibe également la sécrétion plasmatique de vasopressine chez des rats déshydratés.

En 2015, Brame et coll. ont identifié un nouvel agoniste peptidique du récepteur APJ. Ce composé est nommé MM07 et se comporterait comme un agoniste biaisé activant

préférentiellement les protéines G et plus faiblement le recrutement des β -arrestines. De plus, l'injection intraveineuse de MM07 réalisée chez l'Homme et le rat montre que le peptide possède un potentiel inotrope supérieur à l'apeline (Brame et al., 2015). Ainsi, cet agoniste biaisé pourrait être utilisé avantageusement en clinique. En effet, l'utilisation du MM07 pourrait permettre de bénéficier des effets cardiovasculaires bénéfiques du peptide en diminuant les effets délétères dépendants du recrutement de la β -arrestine, comme cela a été décrit dans le cas de l'activation d'APJ par l'étirement mécanique (Scimia et al., 2014).

Chapitre V Fonctions physiopathologiques de l'apeline :

V.A L'apeline dans le SNC : contrôle de l'homéostasie des fluides, prise hydrique et prise alimentaire :

Comme abordé précédemment, les ARNm codants pour l'apeline et APJ sont exprimés dans l'ensemble du système nerveux central. Cependant, on retrouve plus particulièrement une expression du ligand et du récepteur dans les noyaux supra-optique et paraventriculaire de l'hypothalamus. De plus, l'apeline et son récepteur sont présents au niveau des neurones sécrétant la vasopressine, une hormone antidiurétique importante participant au contrôle de l'homéostasie des fluides. Cette localisation suggère donc un rôle de la signalisation apelinergique dans la régulation de l'homéostasie hydrique. En effet, l'injection intra-cérébro-ventriculaire (icv) d'apeline induit une inhibition de la sécrétion de vasopressine et diminue la prise hydrique chez des rats déshydratés (Reaux et al., 2001). Dans le même sens, De Mota et coll. montrent que l'injection icv d'apeline diminue la concentration plasmatique de vasopressine, inhibe l'activité électrique des neurones à vasopressine et augmente la diurèse. De plus, cette étude met en évidence qu'en situation de déshydratation, l'apeline et la vasopressine sont inversement régulés. En effet, une privation en eau entraîne l'accumulation hypothalamique de l'apeline associée à la diminution du taux plasmatique du peptide. Parallèlement, la sécrétion de vasopressine par les neurones hypothalamiques augmente, favorisant ainsi l'effet antidiurétique (De Mota et al., 2004). Confortant l'implication du système apelinergique dans la régulation de l'homéostasie hydrique, une étude réalisée chez l'Homme met en évidence que l'apelinémie suit les modifications d'osmolalité plasmatique. En effet, l'augmentation de l'osmolalité plasmatique est suivie de la diminution de la concentration plasmatique d'apeline et d'une augmentation de la concentration en vasopressine. Cette régulation a lieu de manière inverse dans le cas d'une diminution de l'osmolalité (Azizi et al., 2008).

Des travaux très récents mettent en évidence qu'en plus de son effet contre-régulateur central sur la sécrétion et l'activité des neurones vasopressinergiques, l'effet diurétique de l'apeline s'exercerait également en périphérie, directement sur les canaux collecteurs du rein exprimant le récepteur APJ. Alors que la vasopressine augmente l'expression apicale de l'aquaporine-2, des canaux permettant la réabsorption de l'eau contenue dans les urines, à l'inverse, l'injection intraveineuse d'apeline augmente la diurèse des animaux en affectant la translocation apicale de ces mêmes canaux (Hus-Citharel et al., 2008, 2014).

Cependant, d'autres études montrent des effets contradictoires de l'apeline sur la prise hydrique et la régulation du système vasopressinergique. En effet, plusieurs travaux révèlent que l'apeline pourrait induire l'augmentation, la diminution ou bien n'exercerait aucun effet sur la prise hydrique (Hus-Citharel et al., 2008; Mitra et al., 2006; Roberts et al., 2009; Taheri et al., 2002). Ainsi, les conclusions concernant l'influence de l'apeline sur la prise hydrique sont controversées. Cependant, certaines divergences peuvent être expliquées par l'utilisation de différentes formes d'apeline, de doses, de voies d'administration (intraveineuse, intra-cérébro-ventriculaire), de durée de traitement mais également de modèles (Homme, souris, rat, mouton).

La localisation de l'expression d'apeline et d'APJ laisse également supposer un rôle du système apelinergique dans la régulation de la prise alimentaire mais les résultats contradictoires de la littérature ne permettent pas de trancher. En effet, des études montrent que l'apeline peut exercer des effets négligeables, inhiber ou à l'inverse stimuler la prise alimentaire (O'Shea et al., 2003; Sunter et al., 2003; Valle et al., 2008; Volkoff and Wyatt, 2009). Cependant, comme précédemment, ces études utilisent des approches hétérogènes en termes de modèles animaux, de fragments d'apeline, de doses et de durées de traitement (aigue, chronique), de voies d'administration ou encore de protocole (animaux à jeun ou nourris) pouvant générer des différences non négligeables (Lv et al., 2013).

V.B Apeline et fonctions cardiovasculaires :

L'apeline et son récepteur sont exprimés au niveau du tissu cardiaque ainsi que dans les vaisseaux sanguins où leur expression est préférentiellement retrouvée dans les cellules endothéliales. En plus de son rôle prépondérant au cours du développement cardiaque, un nombre d'études grandissant montre l'implication du système apelinergique dans la régulation du système cardiovasculaire chez l'adulte.

B.1 Fonctions vasculaires :

i. Tonus vasculaire :

Le récepteur de l'apeline et de l'angiotensine 2 (AT1R) partagent une forte homologie de séquence et de localisation dans l'organisme (système nerveux central et système cardiovasculaire). Cependant, alors que l'angiotensine 2 possède un rôle hypertenseur et vasoconstricteur, à l'inverse, l'apeline se comporte comme un agent hypotenseur. En effet, l'injection intraveineuse d'apeline provoque la diminution transitoire de la pression artérielle (Cheng et al., 2003; Lee et al., 2000, 2005). L'apeline induit l'activation de la eNOS dans les cellules endothéliales et augmente la production et la concentration plasmatique de NO. De manière intéressante, *in vivo* et *ex vivo*, le prétraitement au L-NAME provoque la perte de l'effet hypotenseur induit par l'apeline (Ishida et al., 2004; Jia et al., 2007; Tatemoto et al., 2001). Cet effet est retrouvé chez l'Homme puisque l'injection d'apeline induit également un effet vasodilatateur dépendant du NO (Japp et al., 2008).

Afin d'étudier le rôle de la signalisation apeline dans l'homéostasie cardiovasculaire, Ishida et coll. ont utilisé un modèle murin invalidé pour le récepteur APJ (souris KO APJ). Alors qu'à l'état basal aucune modification de la pression artérielle n'est mesurable, ces animaux présentent une réponse vasoconstrictrice accrue en réponse à l'angiotensine 2 par rapport à des animaux sauvages. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'apeline joue un rôle antihypertenseur, via la contre-régulation du système rénine-angiotensine (Ishida et al., 2004).

A l'inverse, l'apeline peut également exercer une activité vasoconstrictrice. En effet, le récepteur de l'apeline est exprimé par les cellules endothéliales mais également par les cellules musculaires lisses vasculaires (VSMC). Ainsi, le traitement par l'apeline de vaisseaux désendothélialisés provoque la constriction des VSMCs via la phosphorylation de la chaîne légère de myosine (Hashimoto et al., 2006; Katugampola et al., 2001; Maguire et al., 2009).

B.2 Fonctions cardiaques :

i. *Effet inotrope :*

L'apeline est considérée comme le facteur inotrope positif le plus puissant connu à ce jour. En accord avec cette fonction cardiaque, les animaux invalidés pour le gène de l'apeline présentent une diminution des capacités contractiles et une défaillance cardiaque progressives avec l'âge (Kuba et al., 2007). Différentes études réalisées *ex vivo* et *in vivo* chez l'Homme et le rat mettent en évidence que l'apeline stimule fortement la contractilité et la fraction d'éjection cardiaque (Berry et al., 2004; Maguire et al., 2009). Sur des cœurs de rats isolés, Szokodi et coll. démontrent que l'effet contractile de l'apeline dépend de la voie PLC/PKC ainsi que des échangeurs Na^+/H^+ (NHE) et $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX) (Szokodi et al., 2002). De plus, une étude réalisée sur des cardiomyocytes isolés montre que l'apeline induit le raccourcissement des sarcomères augmentant ainsi la force de contraction (Farkasfalvi et al., 2007).

De manière intéressante, l'apeline augmente la contractilité cardiaque sans toutefois induire d'hypertrophie ventriculaire et cet effet inotrope observé sur le tissu sain est conservé dans un contexte de défaillance cardiaque (Ashley et al., 2005; Berry et al., 2004; Dai et al., 2006). De plus, dans un modèle murin d'hypertrophie cardiaque induite, l'injection chronique d'apeline permet de diminuer l'hypertrophie et le stress oxydatif associé (diminution des taux plasmatiques d' H_2O_2). En ce sens, les auteurs démontrent que l'apeline jouerait un rôle protecteur en induisant l'augmentation de l'expression et de l'activation de la catalase, une enzyme anti-oxydante, dans les cardiomyocytes (Foussal et al., 2010).

Ainsi, compte tenu de ses effets bénéfiques au niveau cardiaque et vasculaire, le système apelinergique pourrait représenter un agent thérapeutique d'intérêt dans le traitement de certaines pathologies.

B.3 Pathologies cardiovasculaires :

i. Pathologies vasculaires :

Des dérégulations de l'expression du système apelinergique ont été observées et associées à différentes pathologies cardiovasculaires telles que l'hypertension. Des études réalisées chez l'Homme ont permis de mettre en évidence une diminution des taux d'apeline plasmatique chez des patients hypertendus (Sonmez et al., 2010). De plus, l'utilisation de modèles animaux hypertendus révèlent que l'ajout d'apeline exogène permet de diminuer significativement la pression artérielle de ces animaux (Ishida et al., 2004; Lee et al., 2005).

D'autre part, le rôle de l'apeline a récemment été mis en évidence dans l'athérosclérose. Une étude réalisée chez l'Homme montre une forte expression d'apeline et d'APJ au niveau des plaques d'athérome, dans les VSMCs et les macrophages (Pitkin et al., 2010). Bien que l'apelinémie soit diminuée chez des patients atteints de sténoses de l'artère coronaire (dépôt d'une plaque d'athérome au niveau de ces artères), les taux d'apeline plasmatiques corrèlent positivement avec la stabilité des plaques athérosclérotiques (Zhou et al., 2014). Cependant, le rôle protecteur ou délétère de l'apeline reste encore à déterminer puisque deux études réalisées sur un modèle murin d'athérosclérose (souris invalidées pour l'apolipoprotéine E : KO Apo E) s'opposent. En effet, alors que Chun et coll. démontrent que l'invalidation du gène de l'apeline dans ces souris potentialise le développement de l'athérosclérose, Hashimoto et coll. mettent en évidence que l'invalidation du récepteur APJ diminue les lésions athérosclérotiques (Chun et al., 2008; Hashimoto et al., 2007).

Comme cela a précédemment été décrit dans l'hypertrophie cardiaque, on peut supposer que ces différences de phénotype entre les animaux KO apeline et KO APJ pourraient être liées à l'existence d'un mécanisme délétère dépendant de la présence du récepteur APJ mais pas de l'apeline.

ii. Pathologies cardiaques :

La recherche de polymorphismes sur le gène du récepteur APJ met en évidence que le système apelinergique joue un rôle dans la physiopathologie cardiaque. En effet, une étude

révèle que les patients atteints de cardiomyopathie dilatée idiopathique possédant le variant G212A (concernant la région 5' non traduite du gène APJ) voient leur pathologie moins rapidement évoluer vers une crise cardiaque par rapport aux malades ne présentant pas ce polymorphisme (Sarzani et al., 2007). De plus, l'utilisation de modèles murins d'insuffisance cardiaque induite par l'administration d'isoprotérénol (engendrant la nécrose du tissu myocardique) ou encore l'utilisation de rats Dahl sensibles au sel (modèle développant une hypertension lors d'un régime enrichi en sel) montrent que ces animaux présentent une diminution de l'expression d'apeline dans le cœur ainsi que de l'apelinémie (Iwanaga et al., 2006; Jia et al., 2006).

De manière intéressante, les patients présentant une insuffisance cardiaque voient leur apelinémie augmenter dans les stades précoces puis diminuer dans les stades avancés de la pathologie. De plus, ces taux varient en fonction de la gravité de l'insuffisance cardiaque et sont plus élevés dans les cas modérés par rapport aux cas d'insuffisances sévères (Chen et al., 2003). L'augmentation de l'apelinémie dans les stades précoces peut être interprétée comme un mécanisme de compensation de l'insuffisance cardiaque en cours de développement. En effet, l'apeline semble jouer un rôle bénéfique dans ce processus puisque son injection dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque induite par la ligature de l'artère coronaire descendante permet d'améliorer la capacité contractile cardiaque (Berry et al., 2004).

D'autre part, l'expression cardiaque de l'apeline est augmentée dans les cardiomyopathies ischémiques et serait induite par l'hypoxie générée lors de l'ischémie (Atluri et al., 2007; Ronkainen et al., 2007; Sheikh et al., 2008). Là encore, dans ce contexte pathologique, l'apeline jouerait un rôle protecteur au cours du processus d'ischémie/reperfusion puisque l'injection d'apeline permet de diminuer significativement la taille de l'infarctus (Kleinz and Baxter, 2008; Simpkin et al., 2007).

V.C Apeline et tractus gastro-intestinal :

L'apeline a été identifiée pour la première fois par Tatemoto et coll. à partir d'extraits d'estomacs suggérant ainsi un rôle du système apelinergique dans le tractus gastro-intestinal (Tatemoto et al., 1998).

L'analyse des sites d'expression du couple ligand/récepteur révèle que l'expression protéique de l'apeline dans le tractus gastro-intestinal est faible en périnatal et augmente progressivement au cours du temps (Wang et al., 2009). De plus, l'expression au niveau ARNm et protéique de l'apeline est particulièrement élevée au niveau de la muqueuse glandulaire gastrique chez l'Homme et le rat (Wang et al., 2004). Dans cette muqueuse, l'apeline est retrouvée exprimée à la fois par les cellules gastriques exocrines telles que les cellules à mucus, principales et pariétales ainsi que par les cellules entéroendocrines à chromogranine A (Susaki et al., 2005). En revanche, le récepteur est exprimé fortement au cours du développement embryonnaire puis diminue progressivement. Cependant, des immunohistochimies réalisées sur le rat révèlent que son expression protéique est conservée chez l'adulte au niveau gastrique, dans les cellules entero-chromaffin like (ECL) ainsi qu'au niveau intestinal, dans les cellules caliciformes et les cellules musculaires lisses (Wang et al., 2009).

Différents travaux ont par la suite étudié les fonctions du système apelinergique dans le tractus gastro-intestinal. Ainsi, Lambrecht et coll. ont mis en évidence l'existence d'un rétrocontrôle négatif entre les cellules pariétales exprimant l'apeline et les cellules ECL exprimant APJ. Les cellules ECL régulent positivement la sécrétion d'acide gastrique par les cellules pariétales via la libération d'histamine. De manière intéressante, dans un modèle de glande gastrique isolée de lapin, Lambrecht et coll. montrent que l'apeline sécrétée par les cellules pariétales agirait négativement sur la sécrétion d'histamine par les cellules ECL de manière à diminuer la sécrétion d'acide gastrique (Lambrecht et al., 2006). A l'inverse, une étude plus récente apporte des données contradictoires. En effet, utilisant des approches *in vivo* et *ex vivo* d'estomacs isolés, les auteurs démontrent que l'apeline augmente la production et la sécrétion d'histamine, stimulant ainsi la sécrétion d'acide gastrique (Ohno et al., 2012).

Enfin, l'apeline stimule la prolifération des cellules épithéliales gastriques et induit la sécrétion de cholecystokinine (CCK) par les cellules entéroendocrines, une hormone stimulant la sécrétion et la libération des enzymes digestives (Wang et al., 2004).

C.1 Pathologies gastro-intestinales :

Comme précédemment décrit, le couple ligand/récepteur est exprimé dans l'ensemble du tractus gastro-intestinal et notamment au niveau du colon (Wang et al., 2009).

Dans un contexte pathologique, l'expression de l'apeline est régulée positivement et jouerait un rôle protecteur sur la muqueuse colique. En effet, dans un modèle de colite induite chez le rat par un traitement au Dextran Sodium Sulfate (DSS) ainsi que chez des patients atteints de colite ulcéraire ou de la maladie de Crohn (ou syndrome de l'intestin irritable), l'expression colique de l'apeline est fortement induite au niveau ARNm et protéique. On retrouve notamment une augmentation de l'expression de l'apeline à la surface de l'épithélium ainsi qu'au niveau des cryptes, dans les zones correspondant aux cellules souches. De manière intéressante, les auteurs observent que la surexpression du peptide se maintient même après la fin du traitement au DSS. De plus, l'injection d'apeline exogène au cours de cette phase stimule la prolifération des cellules épithéliales coliques chez le rat. Ainsi, le maintien de l'expression d'apeline après l'épisode de colite pourrait participer à la réparation tissulaire et au maintien de l'intégrité de la muqueuse colique (Han et al., 2007).

Han et coll. montrent que la surexpression de l'apeline observée au niveau du tractus gastro-intestinal est la conséquence de l'inflammation et de l'hypoxie présentes au cours de la colite. En effet, les auteurs montrent que l'inflammation systémique induite par un traitement au LPS induit la surexpression de l'apeline dans l'ensemble du tractus gastro-intestinal de manière dépendante de la sécrétion d'IL-6 et du facteur de transcription STAT3 (Han et al., 2008a). De plus, le même groupe démontre que l'hypoxie stimule l'expression des ARNm de l'apeline et du récepteur APJ dans des cultures primaires de cellules coliques murines ainsi que dans la muqueuse colique d'animaux entiers placés en hypoxie. Ainsi, l'apeline induirait la prolifération des cellules coliques en conditions hypoxiques (Han et al., 2008b).

Le système apelinergique est également exprimé au niveau pancréatique. L'apeline et son récepteur sont notamment présents dans les îlots de Langerhans où l'apeline participe à la régulation de l'homéostasie glucidique *via* son action inhibitrice sur la sécrétion d'insuline (Ringström et al., 2010; Sörhede Winzell et al., 2005). Dans un modèle murin de pancréatite aiguë et chronique induites (traitements à la céruléine, analogue de la CCK), Han et coll. montrent que l'expression des ARNm de l'apeline et APJ sont augmentées dans le pancréas lors des épisodes de pancréatite et diminuent progressivement après l'arrêt du traitement. De

manière intéressante, dans cette étude les souris KO apeline présentent une augmentation de l'infiltration immunitaire (macrophages, neutrophiles) et de la fibrose (activation et prolifération des cellules pancréatiques étoilées responsables de la forte production de matrice extracellulaire) en réponse au traitement à la céruléine. Cependant, ce phénotype est réversé par l'ajout d'apeline qui jouerait donc un rôle anti-inflammatoire et anti-fibrotique lors de la pancréatite (Han et al., 2013).

Cependant, alors qu'un rôle anti-fibrotique de l'apeline est également observé dans un modèle murin d'hypertrophie cardiaque induite par constriction de l'aorte (Pchejetski et al., 2012), un effet pro-fibrotique de l'apeline est observé dans le foie cirrhoté. En effet, chez l'Homme ainsi que dans un modèle murin de cirrhose induite par inhalation de tétrachlorure de carbone, l'apelinémie est augmentée. De plus, on observe une surexpression hépatique de l'ARNm codant pour l'apeline (environ 4 fois) et pour le récepteur APJ (environ 300 fois). Alors que la cirrhose s'accompagne d'une forte réaction fibrotique, l'utilisation de l'apeline F13A considéré comme un antagoniste du récepteur APJ réduit significativement le développement de la cirrhose. Ceci suggère donc un rôle délétère de la signalisation apeline dans ce contexte (Principe et al., 2008). Ces résultats sont appuyés par l'étude de Reichenbach et coll. montrant que l'administration chronique d'apeline F13A chez des rats cirrhotés permet de réduire la fibrose, l'infiltration des macrophages et l'apoptose dans le tissu hépatique. De manière intéressante, l'inhibition de la signalisation apeline s'accompagne également de la diminution de l'expression de gènes associés à la fibrose ou impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire (α -SMA, collagène 1, MMP2) (Reichenbach et al., 2012).

Ainsi, alors que la signalisation apeline joue un rôle protecteur anti-fibrotique dans le pancréas au cours de la pancréatite et dans le cœur au cours de l'hypertrophie cardiaque, elle exerce une activité pro-fibrotique dans le foie au cours de la cirrhose. L'ensemble de ces résultats montre donc que le rôle anti- ou pro-fibrotique de la signalisation apeline n'est pas un mécanisme généralisable et laisse supposer que son rôle pourrait être dépendant du contexte et de l'organe considéré.

Une des origines probable de l'apeline plasmatique serait le tissu adipeux. En effet, l'apeline ainsi que son récepteur sont exprimés par les adipocytes humains et murins (Attané et al., 2011; Boucher et al., 2005; Dray et al., 2010). L'expression de l'ARNm de l'apeline ainsi que sa sécrétion augmentent au cours de la différenciation adipocytaire (Boucher et al., 2005; Wei et al., 2005; Zhu et al., 2015). Son expression par le tissu adipeux ainsi que sa régulation positive par l'insuline et des cytokines inflammatoires laissent supposer que cette adipokine pourrait être dérégulée et/ou impliquée dans certains désordres métaboliques.

En ce sens, Heinonen et coll. mettent en évidence l'existence d'une corrélation positive entre des individus en obésité morbide et le taux d'apeline plasmatique (Heinonen et al., 2005). De plus, des études cliniques menées sur des patients obèses-hyperinsulinémiques ainsi que sur des individus insulino-résistants montrent que leur apelinémie est augmentée (Boucher et al., 2005; Soriguer et al., 2009). De manière intéressante, l'utilisation de modèles murins d'obésité révèle que l'augmentation de l'apelinémie est positivement corrélée à l'obésité associée à un état d'hyperinsulinémie (Boucher et al., 2005). Par la suite, différentes approches ont pu mettre en évidence une relation étroite entre l'apeline et l'insuline. En effet, des animaux traités à la streptozotocine (un agent toxique pour les cellules β produisant l'insuline) présentent une diminution d'expression de l'ARNm de l'apeline dans les adipocytes (Boucher et al., 2005). On retrouve également un parallèle entre les taux d'insuline et d'apeline plasmatiques en fonction du statut nutritionnel. En effet, alors que leur concentration plasmatique est élevée après la prise alimentaire ou une injection intraveineuse de glucose, ces taux sont diminués chez les animaux à jeun (Boucher et al., 2005; Dray et al., 2010). Enfin, des expériences réalisées *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* chez l'Homme et la souris démontrent que l'injection ou le traitement d'explants de tissu adipeux par l'insuline induit directement l'expression d'apeline par les adipocytes de manière dépendante de l'activation de la PKC et des voies de signalisation PI3K et MAPK (Boucher et al., 2005; Dray et al., 2010).

Compte tenu de l'ensemble de ces données, on peut donc supposer que ce n'est pas l'obésité seule, mais plutôt l'hyperinsulinémie qui lui est associée qui serait responsable de l'augmentation de l'apelinémie plasmatique chez les patients obèses.

D.1 Apeline, sécrétion d'insuline et régulation du métabolisme glucidique :

L'insulino-résistance, que l'on rencontre dans le diabète de type 2 (T2DM) ou l'obésité a pour conséquence une perte des effets de l'insuline comme l'entrée et l'utilisation du glucose et des lipides dans ses tissus cibles. En réponse à l'augmentation du taux de glucose plasmatique, les cellules pancréatiques β sécrètent de plus grandes quantités d'insuline de manière à compenser cette perte d'efficacité et maintenir l'homéostasie glucidique. Cette hyperinsulinémie entraîne une désensibilisation de la voie insuline. De plus, à long terme la production intense d'insuline induit un stress du réticulum qui peut aboutir à l'apoptose des cellules β ainsi qu'à la mise en place du diabète. D'autres causes peuvent également participer à la perte des cellules à insuline et font intervenir le stress oxydatif ou l'inflammation (Halban et al., 2014). De manière intéressante, une étude publiée très récemment met en évidence que le système apelinergique joue un rôle important dans le maintien du tissu endocrine. En effet, par rapport aux souris sauvages, les animaux invalidés pour le récepteur APJ spécifiquement dans le pancréas présentent une importante diminution du nombre et de la taille des îlots de Langerhans, ainsi qu'une diminution de la densité de cellules β s'accompagnant d'une intolérance au glucose. La cause de cette diminution n'est pas encore élucidée mais elle ne semble pas être liée à un problème développemental. En effet, les souriceaux sauvages et KO APJ, spécifiquement dans le pancréas, ne présentent pas de différences au niveau de leur tissu endocrine à la naissance, tant sur le nombre d'îlots que sur leur taille (Han et al., 2015). De plus, une étude réalisée sur les souris Akita développant spontanément un diabète de type 1 (associé à une hyperglycémie et une diminution de la masse des cellules β), montre que l'apeline inhibe le stress du réticulum dans le pancréas et freine la perte des îlots de Langerhans induite au cours de l'évolution du diabète (Chen et al., 2011). Ces études montrent donc le rôle stimulateur de l'axe apeline/APJ dans la régulation de l'homéostasie des cellules à insuline. Ainsi, la voie de signalisation apeline pourrait donc constituer une voie thérapeutique prometteuse dans certaines pathologies comme le diabète qui est associé à une réduction de cette population cellulaire.

Comme décrit précédemment, l'insuline régule positivement l'expression de l'apeline. Cependant, à son tour, l'apeline peut également réguler l'insulinémie en agissant directement sur le compartiment endocrine du pancréas. En effet, des études réalisées *in vivo* et *ex vivo* sur îlots de Langerhans isolés montrent qu'en condition de fortes concentrations de glucose, l'apeline 36 inhibe la sécrétion d'insuline produite par les cellules β (Ringström et al., 2010;

Sörhede Winzell et al., 2005). L'utilisation de cellules β isolées révèle une action inhibitrice directe de l'apeline sur la sécrétion d'insuline et démontre de manière indirecte l'expression du récepteur sur ces cellules (Ringström et al., 2010). L'effet inhibiteur de l'apeline sur la sécrétion d'insuline est dépendant de l'activation d'une voie de signalisation PI3K/phosphodiesterase 3B (PDE-3B). La sécrétion de l'insuline est connue comme étant dépendante de la production d'AMPc. Ainsi, *via* l'activation de la PDE-3B, l'apeline induit l'hydrolyse de l'AMPc intracellulaire et par conséquent l'inhibition de la sécrétion d'insuline (Guo et al., 2009). Des immunofluorescences réalisées sur du tissu pancréatique humain mettent en évidence que l'apeline est exprimée par les cellules α (glucagon) et β (insuline) des îlots de Langerhans (Ringström et al., 2010). Ainsi, l'action inhibitrice de l'apeline sur la sécrétion d'insuline pourrait être due à une action autocrine ou juxtacrine de l'apeline produite par les cellules α et/ou β .

Parallèlement à son action inhibitrice sur la sécrétion d'insuline, l'apeline diminue directement la glycémie, l'intolérance au glucose et stimule l'entrée du glucose dans le muscle et le tissu adipeux (Attané et al., 2011; Dray et al., 2008). Des études réalisées sur des explants de tissu adipeux, de muscle soléaire ainsi que sur des myotubes en culture (cellules C2C12) démontrent que l'apeline stimule le transport du glucose *via* l'activation d'une voie AMPK/PI3K/Akt (Attané et al., 2011; Dray et al., 2008; Yue et al., 2010). De plus, sur des adipocytes isolés en culture, l'apeline induit la translocation membranaire du transporteur au glucose GLUT4. Ces travaux révèlent que l'apeline seule stimule la captation du glucose dans les adipocytes et son effet s'additionne à celui de l'insuline (Zhu et al., 2011). Cet effet additif est également observé dans le muscle (Dray et al., 2008). De plus, une étude récente démontre que le glucose peut lui-même amplifier sa propre absorption en stimulant la sécrétion d'apeline par les entérocytes. En effet, en réponse à l'administration de glucose par voie orale, l'apeline est sécrétée dans la lumière intestinale et stimule l'expression des transporteurs GLUT2 à la membrane apicale des entérocytes *via* l'activation de l'AMPK, favorisant ainsi l'absorption intestinale du glucose (Dray et al., 2013).

Ainsi, en inhibant d'une part, la sécrétion d'insuline par les cellules endocrines, et en stimulant d'autre part le transport du glucose au niveau périphérique, l'apeline permet d'améliorer la sensibilité des tissus à l'insuline. En ce sens, des études réalisées chez des animaux insulino-résistants mettent en évidence que suite à un gavage ou l'injection intrapéritonéale de glucose, un traitement par l'apeline entraîne une diminution de l'insuline plasmatique et de la glycémie. Ainsi, l'apeline améliore la tolérance au glucose et l'insulino-

résistance chez ces animaux (Attané et al., 2012; Dray et al., 2008; Higuchi et al., 2007). Confortant ce rôle bénéfique, les souris invalidées pour l'apeline sont intolérantes au glucose, hyper-insulinémiques et insulino-résistantes. Ce phénotype est rétabli après un traitement de 4 semaines par de l'apeline exogène. L'analyse du muscle soléaire de ces animaux montre l'effet insulino-sensibilisant de l'apeline. En effet, l'apeline augmente la phosphorylation d'Akt induite en réponse à l'insuline par rapport aux souris KO non traitées (Yue et al., 2010).

Parallèlement à ces résultats obtenus chez des animaux sauvages et insulino-résistants, l'étude du système apelinergique chez l'Homme révèle que l'apelinémie est augmentée chez des sujets intolérants au glucose, diabétiques ainsi que chez des individus obèses diabétiques (Cavallo et al., 2012; Dray et al., 2010; Habchi et al., 2014; Krist et al., 2013; Li et al., 2006; Soriguer et al., 2009). De plus, un polymorphisme génétique (Single Nucleotide Polymorphisms ou SNPs) sur le gène de l'apeline met en évidence que le variant rs2235306 dans une population chinoise masculine est associé à une glycémie à jeun plus élevée (Zhang et al., 2009). Une seule étude montre cependant une réduction des taux d'apeline plasmatique chez des patients nouvellement diagnostiqués diabétiques et n'ayant encore reçu aucun traitement (Erdem et al., 2008). Ces patients étant à un stade très précoce de leur pathologie, les dérégulations engendrées par le diabète sont peut être encore insuffisantes pour induire une augmentation de l'apelinémie comme mécanisme compensatoire. Ainsi, ces données laissent supposer que l'augmentation de l'apeline plasmatique chez des patients diabétiques serait plutôt un mécanisme compensatoire pour retarder l'évolution de la pathologie.

Comme décrit précédemment, le système apelinergique est exprimé au niveau hypothalamique. Une étude très récemment publiée par notre équipe met en évidence que l'apeline, présente au niveau du système nerveux central, peut également participer à la régulation de l'homéostasie du glucose. Cependant, les effets sont dépendants de la dose. En effet, l'injection intra-cérébro-ventriculaire d'une concentration d'apeline équivalente à celle retrouvée au niveau plasmatique chez les souris obèses ou diabétiques stimule la glycogénolyse ainsi que la néoglucogenèse hépatique. Ainsi, en agissant sur le foie, une forte concentration d'apeline présente au niveau central induit l'augmentation de la glycémie à jeun (Drougard et al., 2014) et pourrait contribuer à la mise en place du diabète.

D.2 Apeline et métabolisme lipidique :

Dans le cadre de l'obésité, l'insulino-résistance est également liée à la grande quantité d'acides gras libres circulants (AGL : Acides Gras Libres) (Xu et al., 2011). Ces acides gras forment des dépôts ectopiques délétères qui s'accumulent au niveau intracellulaire dans différents tissus. En conséquence, l'accumulation de métabolites issus des acides gras tels que les céramides ou le diacylglycérol inhibent la glycolyse, le transport de glucose et diminuent la réponse à l'insuline (diminution de la phosphorylation de IRS-1) (Kahn et al., 2006; Shulman, 2000).

Les animaux invalidés pour l'apeline présentent une augmentation de leur masse adipeuse et des AGL circulants, cet effet étant abrogé par l'ajout d'apeline exogène (Yue et al., 2011). *In vivo*, un traitement chronique par l'apeline permet de diminuer l'adiposité chez des animaux sauvages, obèses ou insulino-résistants (Attané et al., 2012; Higuchi et al., 2007) et augmente l'oxydation des acides gras dans les muscles (Attané et al., 2012). De plus, des souris transgéniques surexprimant l'apeline de manière ubiquitaire présentent une résistance à l'obésité induite par un régime riche en graisses (Yamamoto et al., 2011). Compte tenu de ces résultats, différents groupes ont étudié l'effet de l'apeline sur la lipolyse. Ainsi, sur des adipocytes murins isolés ainsi que sur la lignée cellulaire murine 3T3-L1 différenciée en adipocytes, l'apeline entraîne la diminution de la lipolyse. Cet effet inhibiteur est lié à l'activation de l'AMPK qui inhibe la lipase hormono-sensible, responsable de l'hydrolyse des triglycérides en AGL (Than et al., 2012; Yue et al., 2011). Cependant, l'utilisation d'explants de tissus adipeux humains révèle qu'un traitement à l'apeline reste sans effets sur la lipolyse (Attané et al., 2011). Ainsi, de plus amples recherches seront nécessaires afin de déterminer précisément le rôle de l'apeline sur la lipolyse et de savoir si cette fonction serait dépendante de l'espèce.

L'obésité est associée à un état d'hyperinsulinémie, d'insulino-résistance ainsi qu'un état d'inflammation chronique. De plus, l'expansion du tissu adipeux provoque le développement de zones hypoxiques qui participent à la dérégulation de l'expression de certaines adipokines telles que la leptine et l'adiponectine et favorise ainsi l'inflammation (Hosogai et al., 2007). L'insuline, l'hypoxie et des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α ou l'IL-6 régulent positivement l'expression de l'apeline (Daviaud et al., 2006; Geiger et al., 2011; Glassford et al., 2007; Han et al., 2008a). Ces acteurs impliqués lors de l'obésité

pourraient donc être à l'origine de l'augmentation de l'expression de l'apeline dans ce contexte. En effet, les patients obèses présentent une surexpression des ARNm d'apeline et APJ dans le tissu adipeux ainsi qu'une augmentation des taux d'apeline et d'insuline plasmatique. De plus, un entraînement physique, un régime hypocalorique ou une chirurgie bariatrique induisant la perte de poids ont pour effet de diminuer l'apelinémie en association avec une amélioration de l'insulinosensibilité (Castan-Laurell et al., 2008; Cavallo et al., 2012; Krist et al., 2013; Soriguer et al., 2009).

L'ensemble de ces données montre bien que l'apeline joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie du métabolisme énergétique. En effet, celle-ci participe au maintien du tissu endocrine pancréatique, à la régulation de la glycémie, de l'insulinémie et de la sensibilité des tissus périphériques à l'insuline. Ainsi, l'élévation de l'apelinémie rencontrée chez les patients obèses et/ou diabétiques pourrait constituer un mécanisme compensatoire, visant à freiner le développement de l'insulino-résistance. Le rôle bénéfique de l'apeline dans ce contexte a récemment été confirmé chez l'Homme au cours d'un essai clinique de phase 1 réalisé par notre équipe. En effet, les résultats de cette étude sont très encourageants et montrent que l'injection aigüe d'apeline chez des patients non diabétiques mais en surpoids au cours d'un clamp hyperinsulinémique-euglycémique induit un effet insulino-sensibilisateur (données non publiées). Ainsi, la signalisation apeline offre de nouvelles perspectives thérapeutiques concernant le traitement de pathologies associées à l'insulino-résistance telles que le diabète de type 2 ou l'obésité.

V.E Apeline, angiogenèse et lymphangiogenèse :

E.1 Apeline et angiogenèse physiologique :

L'expression du couple apeline/APJ fut d'abord découverte au niveau du système vasculaire lors du développement embryonnaire et plus particulièrement par les cellules endothéliales chez l'embryon de xénope et de souris (Cox et al., 2006; Devic et al., 1996, 1999a). *In vitro*, l'apeline induit la prolifération, la migration et la tubulogenèse de cellules endothéliales humaines de type HUVECs exprimant de manière endogène le récepteur (Eyries et al., 2008; Kunduzova et al., 2008; Masri et al., 2004; Sheikh et al., 2008). Ces

mêmes effets sont observés sur des cellules endothéliales microvasculaires myocardiques où l'apeline induit leur migration ainsi que la tubulogénèse de manière dépendante de l'activation des voies PI3K/Akt et AMPK (Yang et al., 2014). De plus, l'apeline induit également un effet anti-apoptotique mis en évidence sur des cellules endothéliales murines (bEnd.3) (Cox et al., 2006).

La signalisation apeline est essentielle au développement embryonnaire et à la mise en place du système cardiovasculaire. En effet, comme décrit précédemment, les modèles murins invalidés pour le gène de l'apeline présentent un retard de la vascularisation rétinienne tandis que les animaux KO APJ possèdent un phénotype plus marqué, associé à d'importants défauts de développement cardiovasculaire et une forte mortalité intra-utérine (Kang et al., 2013; Kasai et al., 2008; del Toro et al., 2010).

Chez l'embryon de souris, lors de la vasculogénèse qui consiste en la mise en place du réseau vasculaire primitif, l'expression du récepteur est retrouvée au front de migration des vaisseaux se développant vers les régions intersomitiques. D'autre part, l'apeline est localisée au niveau des somites et jouerait ainsi un rôle chimio-attractant sur les vaisseaux en cours de formation (Kälin et al., 2007). Démontrant l'importance du système apelinergique au cours du processus de vasculogénèse, des expériences réalisées *in vivo* chez le poisson zèbre montrent que l'extinction de l'apeline ou du récepteur provoque de sévères défauts de développement des vaisseaux intersegmentaires au niveau des régions intersomitiques. Des expériences gain de fonction par l'injection de billes poreuses contenant de l'apeline dans des embryons de xénope, ainsi que l'utilisation du modèle de membrane chorioallantoïdienne de poulet révèlent que l'apeline stimule la formation de néovaisseaux de manière équivalente au facteur angiogénique VEGF-A (Cox et al., 2006; Inui et al., 2006; Kälin et al., 2007). De manière intéressante, les souris invalidées pour le gène de l'apeline présentent une diminution importante de la réponse angiogénique au VEGF et FGF2 par rapport aux souris sauvages dans le modèle d'étude de l'angiogénèse utilisant la poche cornéenne. L'activité angiogénique du VEGF et FGF2 est restaurée par l'ajout d'apeline exogène (Kasai et al., 2008). Ces résultats mettent en évidence que dans cet essai, l'activité angiogénique du VEGF et du FGF2 requiert la présence d'apeline. Mais ces résultats s'opposent avec les essais réalisés en matrigel ou dans le modèle de membrane chorioallantoïdienne de poulet montrant que l'apeline agit de manière indépendante et possède une activité angiogénique additive aux facteurs VEGF et FGF2 (Cox et al., 2006; Kasai et al., 2004).

Différents travaux réalisés sur la rétine montrent que l'apeline et APJ est régulée spatio-temporellement. En effet, le couple ligand/récepteur est surexprimé lors du développement de la vascularisation rétinienne au niveau des vaisseaux en cours de formation. Cependant, leur expression est perdue dans le réseau vasculaire rétinien mature (Kasai et al., 2008; Saint-Geniez et al., 2002). Le récepteur APJ est exprimé par les « stalk cells » formant le corps du vaisseau et suit ainsi l'extension centrifuge du réseau vasculaire en cours de développement. Parallèlement, l'apeline est exprimée par les « tip cells » présentes au front de migration qui permettent de guider l'extension des vaisseaux. L'apeline ainsi sécrétée par ces cellules stimule la prolifération des « stalk cells » exprimant le récepteur (Saint-Geniez et al., 2002; Sorli et al., 2006; del Toro et al., 2010).

L'ensemble de ces résultats montre que l'apeline est un facteur angiogénique majeur. En effet, le système apelinergique est exprimé par les cellules endothéliales et l'apeline stimule la prolifération, la migration, la survie ainsi que la tubulogenèse de ces cellules. De plus, le gène de l'apeline est régulé positivement par l'hypoxie grâce à la présence de séquences HRE localisées au niveau du promoteur et du premier intron de son gène qui permettent la liaison du facteur de transcription HIF- α (Eyries et al., 2008; Han et al., 2008b; Sheikh et al., 2008). Compte tenu de son activité pro-angiogénique, des dérégulations de ce système APJ/apeline pourraient être impliquées dans un contexte d'angiogenèse pathologique.

E.2 Angiogenèse pathologique :

En dehors de son rôle physiologique au cours du développement vasculaire rétinien, un modèle murin de rétinopathie ischémique induite par l'oxygène (ROP ou Retinopathy Of Prematurity) met en évidence que le système apelinergique pourrait contribuer à cette situation pathologique. Les rétinopathies ischémiques sont associées à des hémorragies dans le corps vitré et un décollement de la rétine induit par une hypervascularisation rétinienne. Dans le modèle de ROP, sept jours après leur naissance, les souriceaux sont placés en condition hyperoxique (75% d'oxygène). Dans ce contexte riche en oxygène, le réseau vasculaire rétinien se résorbe. Après cinq jours, les animaux sont placés en situation normoxique. Cette baisse brutale de la concentration en oxygène a pour but de générer une hypoxie relative. Ainsi, cette hypoxie induit une forte expression d'apeline et le développement massif du réseau vasculaire, ce phénomène étant fortement réduit chez les

souris KO apeline (Kasai et al., 2010). Dans ce même modèle, Kasai et coll. montrent que l'apeline stimule la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse pathologique en inhibant le recrutement des péricytes qui participent à la stabilisation et à la quiescence des vaisseaux. En effet, l'extinction de l'apeline par ARN interférence dans des cellules endothéliales *in vitro* permet l'expression de MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1) *via* l'inhibition de la voie PI3K/Akt et l'activation et la nucléarisation de SMAD3. L'utilisation de milieux conditionnés de ces cellules endothéliales montre que la perte d'expression de l'apeline induit l'expression du facteur MCP-1 qui stimule la migration des péricytes *via* sa liaison à son récepteur CCR2 (C-C chemokine receptor 2) exprimé par les péricytes. De plus, *in vivo*, les auteurs démontrent que l'injection intra-vitréenne de siRNAs dirigés contre l'apeline favorise le recouvrement péricytaire des vaisseaux et inhibe l'hypermévascularisation pathologique induite dans ce modèle de rétinopathie (Kasai et al., 2013).

Un autre contexte de vascularisation pathologique concerne l'angiogenèse tumorale. Selon le modèle établi par Folkman et coll., au-delà de quelques mm³, l'hypoxie engendrée par la croissance tumorale génère la production de facteurs angiogéniques. Ces facteurs stimulent la néovascularisation et permettent l'apport en oxygène et en nutriments nécessaires à la progression tumorale (Folkman, 1971). L'apeline étant caractérisée comme un facteur angiogénique induit en condition hypoxique, plusieurs groupes se sont intéressés à son rôle dans le contexte de la néovascularisation tumorale.

Afin d'étudier ce rôle, notre équipe a utilisé les modèles cellulaires de carcinome mammaire (TS/A) et de mélanome (B16) murins modifiés pour surexprimer ou non l'apeline, mais n'exprimant pas APJ. Lors de leur greffe sous-cutanée, ces cellules tumorales surexprimant l'apeline voient leur croissance fortement accélérée par rapport aux cellules tumorales contrôles (**Figure 21A**). Les cellules TS/A et B16 n'exprimant pas le récepteur APJ, l'accélération de la croissance tumorale n'est pas due à un effet autocrine mais paracrine de l'apeline sur les vaisseaux de l'hôte. En effet, l'analyse des tumeurs révèle que la surexpression de l'apeline induit l'augmentation du nombre et du diamètre des vaisseaux irriguant la tumeur (Sorli et al., 2006, 2007) (**Figures 21 B, C et D**). Par la suite, ces mêmes résultats ont été reproduits par un autre groupe sur une lignée de cellules de cancer du poumon non à petites cellules (Berta et al., 2010).

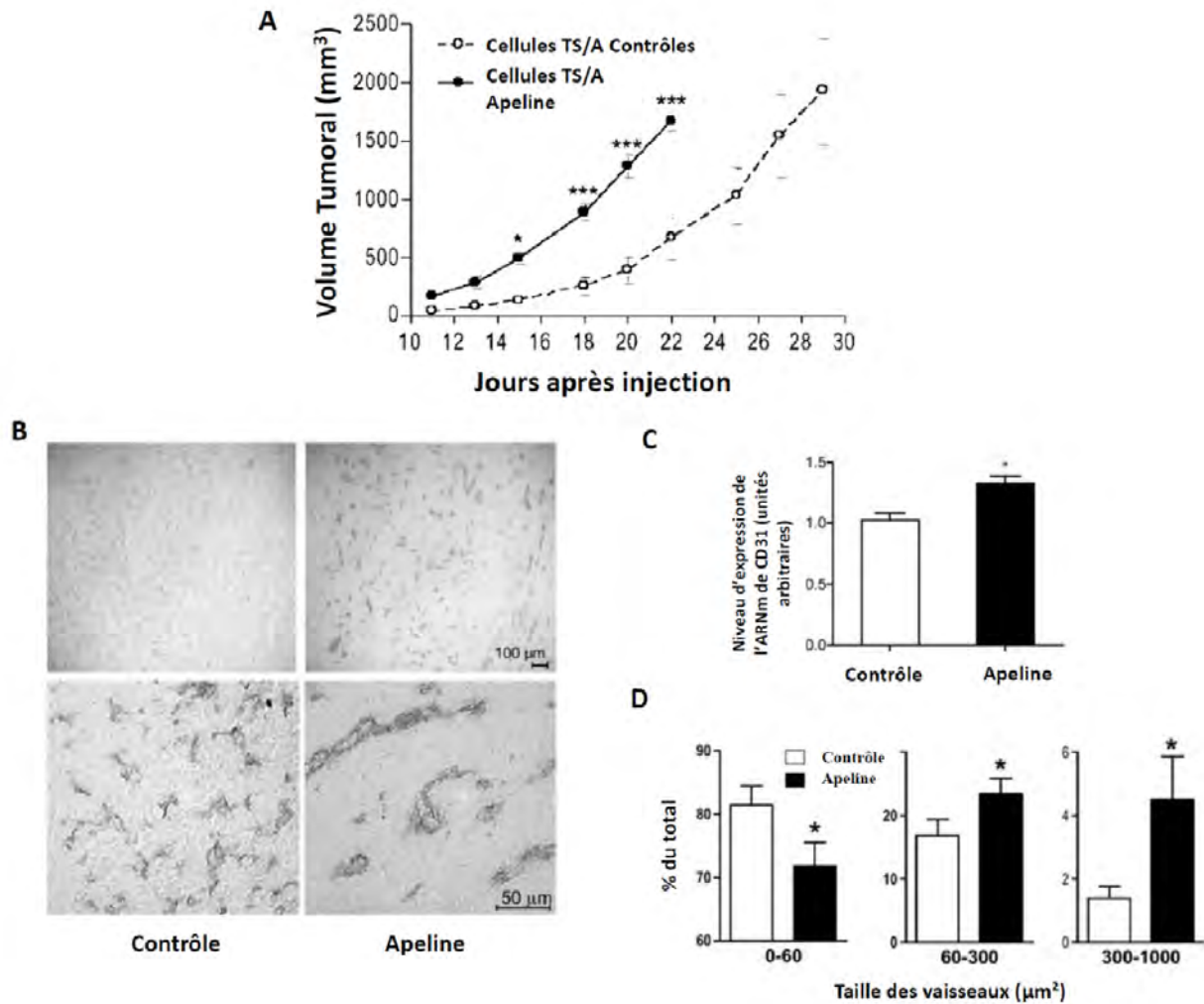


Figure 21 : L'apeline stimule la néovascularisation tumorale.

A : Courbe de croissance des cellules de carcinome mammaire murin TS/A contrôles (TS/A contrôles) ou surexprimant l'apeline (TS/A Apeline) injectées en sous-cutanée chez la souris.

B : Analyse immunohistochimique de la vascularisation des tumeurs contrôles (Contrôle) ou surexprimant l'apeline (Apeline) à l'aide d'un anticorps dirigé contre le marqueur de cellules endothéliales CD31.

C : Analyse par RT-qPCR du niveau d'expression du marqueur de cellules endothéliales CD31 dans les tumeurs contrôles (Contrôle) ou surexprimant l'apeline (Apeline).

D : Quantification de la taille des vaisseaux sanguins dans les tumeurs contrôles ou surexprimant l'apeline. (Adapté de Sorli et al. 2007).

Ces résultats amènent à s'interroger sur le rôle de la signalisation apeline dans le développement tumoral et ont donc conduit l'équipe à étudier l'expression du gène de l'apeline au sein de différents cancers. Ainsi, une approche de *cancer profiling array* a permis de mettre en évidence que le gène de l'apeline est surexprimé dans un tiers des carcinomes humains étudiés. De manière intéressante, cette surexpression est particulièrement fréquente et élevée dans les cancers du colon et du pancréas (Sorli et al., 2007) (**Figure 22**). Par la suite, ces deux types de cancers ont fait l'objet des travaux de recherche menés par l'équipe dont fait notamment partie mon travail de thèse.

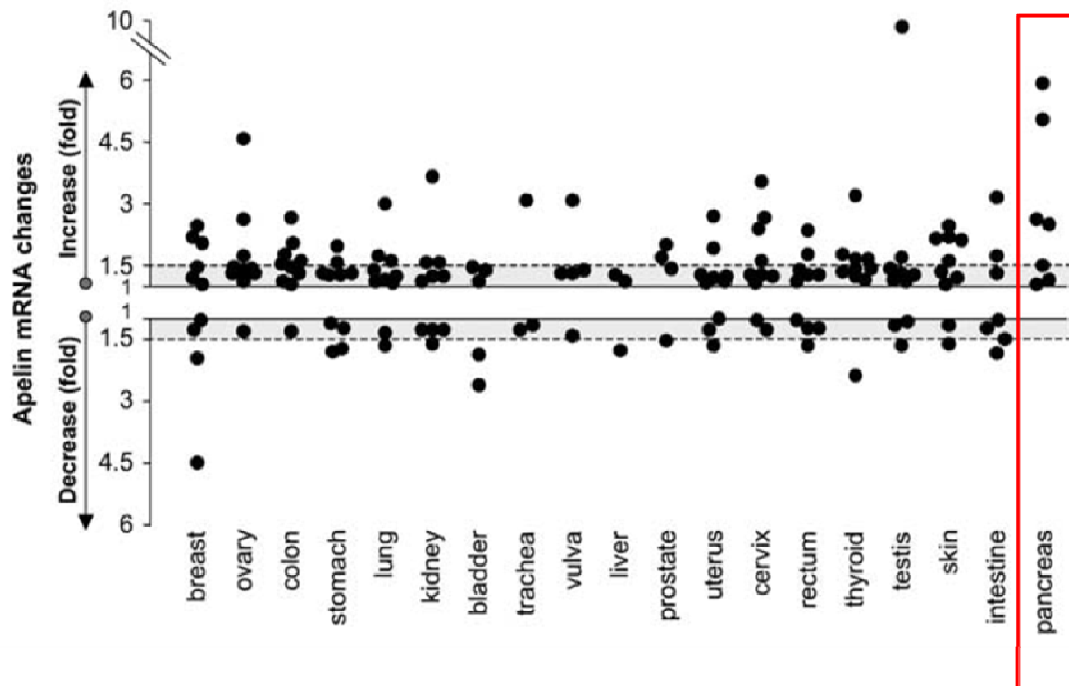


Figure 22 : Surexpression du gène de l'apeline dans les carcinomes humains.

(Adapté de Sorli et al. 2007)

Cette découverte est appuyée par des travaux plus récents réalisés chez l'Homme mettant en évidence la surexpression de l'apeline dans différents cancers. En effet, dans le glioblastome, l'apeline et APJ sont fortement exprimés au niveau des vaisseaux dans les régions tumorales en cours de vascularisation mais l'apeline est également détectée dans les cellules tumorales (Kälén et al., 2007). De plus, la surexpression protéique du ligand est mise en évidence dans le cancer du poumon ainsi que dans le cancer épidermoïde de la cavité buccale. Dans ces cancers, la forte expression d'apeline corrèle négativement avec la survie des patients (Berta et al., 2010; Heo et al., 2012). De manière intéressante, plusieurs études révèlent que le niveau d'apeline plasmatique est plus élevé chez les patients atteints de cancers (gastro-intestinaux, gynécologiques, pulmonaires, prostate, sein) par rapport aux individus sains (Altinkaya et al., 2015; Diakowska et al., 2014; Lacquaniti et al., 2015). De plus, Lacquaniti et coll. démontrent que les niveaux plasmatiques d'apeline augmentent parallèlement avec le stade tumoral et sont associés à la diminution de la survie des patients (Lacquaniti et al., 2015).

Cependant, en plus de son activité paracrine pouvant stimuler la néovascularisation tumorale, l'apeline peut également agir directement sur la cellule cancéreuse. En effet, des travaux réalisés par notre équipe sur le cancer du colon (cf. **Annexe 2**) ont permis de mettre en évidence que l'apeline et le récepteur APJ sont exprimés par la cellule tumorale colique

chez l'Homme. De plus, nos résultats révèlent l'existence d'une boucle de signalisation autocrine par laquelle l'apeline produite par la cellule tumorale colique stimule la prolifération de ces cellules (Picault et al., 2014).

E.3 Apeline et lymphangiogenèse :

Au cours du développement embryonnaire, les cellules endothéliales lymphatiques sont issues de la différenciation de certaines cellules endothéliales veineuses exprimant fortement le récepteur VEGFR-3. Ces cellules vont progressivement exprimer des marqueurs lymphatiques tels que Prox-1, Podoplanine ou Lyve-1 et s'organiser afin de former le réseau vasculaire lymphatique mature. Ce système vasculaire lymphatique hiérarchisé permet le drainage des liquides interstitiels et joue un rôle important dans la réponse immunitaire de l'organisme (Alitalo and Carmeliet, 2002; Yang and Oliver, 2014).

Depuis peu, la signalisation apelinergique a été identifiée comme étant impliquée dans la mise en place du système lymphatique au cours du développement embryonnaire. En effet, chez l'embryon de poisson zèbre et de souris, l'atténuation de l'expression de l'apeline ou de son récepteur par des morpholinos provoque une réduction drastique du réseau vasculaire lymphatique par rapport aux animaux contrôles (Kim et al., 2014). L'expression du récepteur APJ a été confirmée *in vivo* et *in vitro* sur les cellules endothéliales lymphatiques humaines et murines. Sur ces cellules, l'apeline 13 et 36 induisent la phosphorylation d'Akt, stimulent la migration et la formation des vaisseaux lymphatiques (Sawane et al., 2011). Confirmant l'importance du rôle de l'apeline, les souris KO apeline présentent des vaisseaux lymphatiques dilatés et hyperperméables. En revanche, des souris transgéniques surexprimant l'apeline dans le derme sont protégées de l'hyperperméabilité des vaisseaux lymphatiques induite par l'exposition aux UV-B (Sawane et al., 2011, 2013).

Cependant, en plus de son rôle physiologique, l'apeline est également impliquée dans la promotion de la lymphangiogenèse tumorale. En effet, la greffe sous-cutanée du même modèle cellulaire (cellules B16 surexprimant l'apeline) que celui utilisé par Sorli et coll. (Sorli et al., 2006) montre que la surexpression d'apeline accélère la croissance tumorale. Celle-ci est associée à l'augmentation du nombre de vaisseaux lymphatiques intratumoraux et a pour effet l'augmentation du nombre de métastases ganglionnaires par rapport aux cellules tumorales contrôles (Berta et al., 2014).

Le système lymphatique associé à la tumeur permet son drainage et la diminution de la pression interstitielle intratumorale. Ceci favoriserait une meilleure perfusion de la tumeur par les vaisseaux sanguins et participerait ainsi à la croissance tumorale. Cependant, dans de nombreux cancers, le système lymphatique est également considéré comme une voie de dissémination métastatique privilégiée, reflété par l'observation fréquente de l'envahissement des ganglions à proximité de la tumeur (Vittet and Feige, 2007). Ainsi, l'identification de facteurs impliqués dans le développement de vaisseaux lymphatiques péri-tumoraux tels que l'apeline, représentent des cibles thérapeutiques potentielles.

Pour conclure, l'ensemble de ces données met en évidence que l'apeline sécrétée par les cellules tumorales pourrait agir de manière paracrine en tant que facteur angiogénique et lymphangiogénique et pourrait ainsi stimuler à la fois la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Cependant, l'apeline peut également agir de manière autocrine sur la cellule tumorale, stimulant ainsi directement la progression tumorale. Ainsi, compte tenu de ses effets pro-tumoraux, la signalisation apeline pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique prometteuse dans le traitement des cancers. En effet, une stratégie visant à inhiber cette voie de signalisation (antagoniste du récepteur APJ, anticorps bloquant dirigé contre l'apeline) permettrait de cibler simultanément l'angiogenèse, la lymphangiogenèse ainsi que la cellule tumorale.

RESULTATS EXPERIMENTAUX :

Le système apelinergique est exprimé dans l'adénocarcinome pancréatique et l'apeline stimule la prolifération, la migration et le transport du glucose par les cellules tumorales pancréatiques.

INTRODUCTION :

Les travaux précédemment effectués par l'équipe nous ont permis de caractériser un nouveau récepteur couplé aux protéines G exprimé par les cellules endothéliales au cours de la mise en place de la vascularisation, le récepteur APJ (Devic et al., 1996). Le ligand endogène de ce récepteur resté orphelin jusqu'en 1998 a été identifié à partir d'extraits d'estomac bovin et nommé apeline (Tatemoto et al., 1998).

Ce couple ligand/récepteur, largement représenté dans l'organisme exerce de nombreuses fonctions notamment au niveau du métabolisme énergétique et du système cardiovasculaire (Kawamata et al., 2001). De manière intéressante, il est notamment exprimé au niveau du pancréas où l'apeline participe au contrôle et au maintien de l'homéostasie glucidique en régulant l'insulinémie (Ringström et al., 2010; Sörhede Winzell et al., 2005). D'autre part, l'apeline est considérée comme un facteur angiogénique du fait de l'induction de l'expression de son gène par l'hypoxie et de son activité migratoire et proliférative sur les cellules endothéliales jouant un rôle majeur au cours de l'angiogenèse physiologique (Eyries et al., 2008; Masri et al., 2004).

Ce potentiel angiogénique a donc conduit l'équipe à étudier le rôle de l'apeline dans le contexte de la néovascularisation tumorale. Ces travaux révèlent que le ligand surexprimé par une cellule tumorale n'exprimant pas APJ induit l'accélération de la croissance tumorale en augmentant sa vascularisation. Cette activité angiogénique a conduit l'équipe à caractériser l'expression de l'apeline dans le cancer. Ainsi, une approche de *cancer profiling array* sur de multiples carcinomes humains a permis de mettre en évidence une surexpression du gène de l'apeline dans 1/3 des tumeurs analysées (Sorli et al., 2007). Ces données sont confortées par différents travaux mettant en évidence une surexpression de l'apeline et du récepteur APJ au niveau protéique dans le glioblastome, le cancer oral et le cancer du poumon non à petites cellules (Berta et al., 2010; Heo et al., 2012; Kälin et al., 2007). De manière intéressante, le niveau d'apeline dans le sérum ainsi que dans les tumeurs corrèle positivement avec la progression tumorale et la diminution de la survie globale des patients (Berta et al., 2010; Heo et al., 2012; Lacquaniti et al., 2015). De plus, nos travaux récemment publiés sur l'adénocarcinome colique (**Annexe 2**) révèlent l'expression

d'apeline et APJ par la cellule tumorale colique et l'existence d'une boucle de signalisation autocrine favorisant ainsi sa prolifération (Picault et al., 2014).

Parmi l'ensemble des carcinomes étudiés par *cancer profiling array*, nous retrouvons une surexpression du gène de l'apeline avec une fréquence (2/3) et une intensité maximale dans l'adénocarcinome pancréatique (ADK). L'ADK est la forme la plus commune et la plus agressive des cancers du pancréas, possédant une médiane de survie inférieure à 6 mois post-diagnostic. Ce pronostic très sombre est lié à son évolution asymptomatique ainsi qu'à l'absence de biomarqueurs et de traitements curatifs, la plaçant au 4^{ème} rang mondial de mortalité par cancer.

Le cancer du pancréas résulte d'un processus multi-génique et multi-étapes débutant par des lésions de type préneoplasique nommées PanINs (Pancreatic Intraepithelial Neoplasia). Celles-ci évoluent par des stades d'atypie architecturale et génétique croissantes, aboutissant à un stade invasif et métastatique. Ces mutations induisent l'activation d'oncogènes tels que la protéine K-RAS (K-RAS^{G12D} : mutation activatrice, initiatrice et majeure dans le développement de l'ADK et retrouvée dans 90% des cas) mais aussi la perte ou l'inactivation de suppresseurs de tumeurs tels que p53, p16 ou encore SMAD4 (Hezel et al., 2006; Maitra and Hruban, 2008). De plus, ces modifications génétiques associées à l'environnement tumoral fortement hypoxique et pauvre en nutriments sélectionnent les cellules les plus agressives et ayant acquis une forte adaptabilité métabolique favorisant ainsi leur survie et leur prolifération (Guillaumond et al., 2014). Ces données ont mené au développement de modèles murins génétiquement modifiés dans le but de caractériser les mécanismes moléculaires régissant les différentes étapes de la carcinogenèse pancréatique. Cependant, l'absence de stratégies diagnostiques et/ou curatives justifie l'intérêt d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ainsi, la surexpression du gène de l'apeline dans l'ADK, associée à l'activité proliférative, migratoire ou encore anti-apoptotique de l'apeline observée dans différents modèles cellulaires suggère que l'apeline pourrait jouer un rôle pro-tumoral. Dans ce contexte, mon projet de thèse avait pour but de caractériser l'implication de la voie de signalisation apeline dans le développement de l'ADK. A ce titre, nous avons identifié les sites d'expression de l'apeline et de son récepteur sur le tissu pancréatique sain et mis en évidence une forte expression au niveau protéique du couple ligand/récepteur sur des coupes d'ADK humaines. Afin d'étudier la cinétique d'expression spatio-temporelle de l'apeline et d'APJ au cours de la carcinogenèse, nous avons utilisé les modèles murins génétiquement modifiés K-RAS (souris *Lox-Stop-Lox-K-RAS^{G12D/+}/Pdx1-Cre*) et KPC (souris *Lox-Stop-Lox-K-RAS^{G12D/+}; Lox-Stop-Lox-Trp53^{R172H/+}/Pdx1-Cre*) exprimant l'oncogène K-RAS muté constitutivement actif (souris K-RAS) et un mutant inactif de p53 (*p53^{R172H}*) (souris KPC) spécifiquement dans le pancréas. Ces modèles

nous ont ainsi permis de mettre évidence que l'apeline et APJ sont exprimés très précocement dès le stade PanIN 1 et ce, tout au long de la carcinogénèse. Enfin, de façon à étudier la fonction de la signalisation apeline sur la cellule tumorale pancréatique, nous avons recherché une lignée cellulaire exprimant l'apeline et le récepteur afin de caractériser les différentes cascades de transduction activées ainsi que les effets cellulaires induits par l'apeline. Sur les cellules tumorales pancréatiques humaines MiaPaCa, nos résultats montrent que l'apeline active les voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt et induit l'augmentation de la quantité protéique de c-myc, cycline D1 et de l'hexokinase 2. De plus, l'apeline accélère la prolifération et la migration de ces cellules tumorales et stimule également la capture du glucose. Ainsi, l'ensemble de nos résultats suggèrent que l'expression du couple apeline/APJ retrouvée chez l'Homme et dans les modèles murins génétiquement modifiés K-RAS et KPC pourrait participer à la progression tumorale. De ce fait, la voie de signalisation apeline pourrait représenter une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le traitement du cancer du pancréas.

MATERIEL ET METHODES :

Peptides et anticorps :

Les peptides pyroglutamate apeline 13 (pApe13), l'apeline 36 (Ape36) et l'apeline 13-TAMRA (Ape13-TAMRA) ont été synthétisés par Protéogenix (Oberhausbergen, France).

Les anticorps polyclonaux de lapin purifiés dirigés, contre la partie N-terminale (APJ N-ter) MEEGGDFDNYGADNQSEC du récepteur humain, et C-terminale (APJ C-ter) CKGGEQMHEKSIP d'APJ (séquence conservée entre le récepteur APJ humain et murin) ont été produits par Protéogenix (Oberhausbergen, France). L'anticorps monoclonal de souris Mab 856 dirigé contre un domaine extracellulaire du récepteur APJ humain a été produit par R&D Systems. De plus, le peptide immunogène dirigé contre la partie C-terminale d'APJ (CKGGEQMHEKSIP) a été utilisé afin d'épuiser l'anticorps anti-APJ C-ter qui sert de contrôle négatif dans nos expériences d'immunohistochimie.

L'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre la partie C-terminale de l'apeline (Ape C-ter) QRPRLSHKGMPF (séquence identique chez l'Homme et la souris) a été produit par Covalab. Cette séquence étant commune à l'ensemble des fragments d'apeline, l'anticorps

anti-apeline C-ter nous permet ainsi de détecter toutes les formes d'apeline exprimées par les cellules.

Les anticorps anti-ERK2, anti-c-myc et anti- β -Caténine proviennent de Santa Cruz Biotechnology (CA, United States of America (USA)). Les anticorps anti-phospho-p44/42 MAPK, anti-phospho-S473 Akt, anti-phospho-T308 Akt, anti-Akt, anti-phospho-T389 P70S6K, anti-P70S6K, anti-phospho S6, anti-phospho-Ser21/9 GSK3 α/β , anti-GSK3 α/β , anti-Hexokinase 2, anti-cycline D1 et anti- β -Tubuline sont commercialisés par Cell Signaling Technology (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Les anticorps secondaires conjugués à la horseradish peroxidase (HRP) proviennent également de Cell Signaling Technology.

Les anticorps secondaires chèvre anti-lapin alexa 546 et anti-souris alexa 488 sont commercialisés par InvitroGen tandis que l'anti-cobaye Cy2 est commercialisé par Jackson ImmunoResearch Laboratories.

Culture cellulaire :

Les lignées tumorales pancréatiques humaines Panc-1 et BxPC3 sont cultivées dans du milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium) 1640 tandis que les lignées Capan1, Capan2 et MiaPaCa sont cultivées dans du DMEM (Dulbelcco's MEdium Modified). Les cellules d'ostéosarcome humain U2OS sauvage (U2OS WT) sont cultivées dans du DMEM et les cellules U2OS surexprimant de manière stable le récepteur humain hAPJ ainsi que la β -arrestine 2 étiquetée GFP (U2OS hAPJ β -arr 2-GFP aussi nommées U2OS hAPJ) sont cultivées dans du DMEM en présence de geneticine à 400 μ g/ml et de zeocine à 100 μ g/ml. Les cellules ovariennes de hamster chinois CHO transfectées de manière stable avec le vecteur vide pREN (CHO pREN), ou surexprimant le récepteur humain hAPJ (CHO hAPJ) sont cultivées dans du EMEM. L'ensemble de ces milieux de culture est additionné de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et complété en pénicilline (100 U/ml) et streptomycine (100 μ g/ml).

ARN interférence :

- SiRNAs :

Deux siRNAs (small-interfering RNAs), dont un contrôle (siScr) et un ciblant le récepteur APJ (siAPJ) ont été synthétisés par InvitroGen. Les séquences du siScr AUGCUGCGAGCUAGAUCGGdTdT et du siAPJ GGUGCAGUGCUACAUGGACdTdT

qui ont été utilisées ont précédemment été publiées par Xie et coll. (Xie et al., 2006b). Afin de réaliser l'extinction de l'expression du récepteur, les cellules MiaPaCa sont préalablementensemencées ($1.5 \cdot 10^6$ cellules) dans des boîtes de culture cellulaire de 100 mm de diamètre. 12 h après l'ensemencement, les cellules sont transfectées avec 20 nM ou 50 nM de siRNA Scr ou siRNA APJ par diamètre 100 mm, en milieu sans antibiotique, avec le réactif Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen) selon les recommandations du fabricant. 48h après transfection, les cellules sont stimulées avec l'apeline 36 ($5 \cdot 10^{-7}$ M) pendant 3h. La perte d'expression d'APJ est validée par l'analyse des cascades de transduction activées par western blot sur les lysats cellulaires.

- ShRNAs : Transfection stable :

Afin d'inhiber l'expression d'APJ de manière stable dans nos lignées cellulaires U2OS hAPJ et MiaPaCa, nous avons réalisé une approche d'ARN interférence. Pour ce faire, nous avons testé l'efficacité de 5 shRNAs (short hairpin RNAs), commercialisés mais non validés par Sigma, ciblant différentes parties de la séquence de l'ARNm du récepteur APJ. Nous avons en parallèle utilisé un shRNA contrôle (shScr) validé par Sigma (SHC002). Ces shRNAs nommés sh1 (TRCN 0000356634), sh2 (TRCN 0000356636) et sh5 (TRCN 0000008097) sont dirigés contre la partie 3' non traduite (3'UTR) de la séquence codant pour APJ, tandis que les sh3 (TRCN 0000008099) et sh4 (TRCN 0000008001) ciblent la séquence codante.

La production des différents lentivecteurs contrôles et contenant les différents shAPJ a été réalisée avec le kit LENTI-Smart (InvivoGen) sur des cellules HEK 293T suivant les recommandations du fabricant. Le surnageant contenant les lentivecteurs est collecté 48h après transfection des cellules HEK 293T. Par la suite, les cellules U2OS hAPJ et les cellules tumorales MiaPaCa ont étéensemencées ($1,5 \cdot 10^6$ cellules) dans des boîtes de culture cellulaire de 100 mm de diamètre. 12h après l'ensemencement, les cellules ont été transduites avec 1 μ g de lentivecteur contenant les différents shRNAs en utilisant de la protamine sulfate (1 μ g/ml). Les cellules sont ensuite sélectionnées trois jours après la transduction et maintenues sous pression de sélection par un traitement à la puromycine (5 μ g/ml). La perte d'expression d'APJ est validée en immunofluorescence pour les cellules U2OS hAPJ, et par l'analyse des cascades de transduction activées par western blot sur les lysats cellulaires des

U2OS hAPJ et MiaPaCa après traitement avec l'apeline 36 ($5.10^{-7}M$) pendant 3h en milieu sans sérum.

Western Blot :

Des boîtes de culture cellulaire de 100 mm de diamètre sontensemencées avec $1,5.10^6$ cellules U2OS WT, U2OS hAPJ ou les différentes lignées tumorales pancréatiques humaines MiaPaCa, BxPC3, Panc-1, Capan-1, Capan-2. 24h après ensemencement, les cellules sont lavées puis incubées dans du milieu sans sérum pendant 12h. Les cellules sont ensuite stimulées avec $5.10^{-7}M$ d'apeline 36 ou de pyroApeline 13 pendant les temps indiqués puis lavées avec du PBS froid et lysées dans 150 μ L de tampon de lyse à pH 7,4 (HEPES 50 mM, chlorure de sodium (NaCl) 150 mM, fluorure de sodium (NaF) 100 mM, acide éthylène-diamine-tétracétique (EDTA) 10 mM, pyrophosphate de sodium ($Na_4P_2O_7$) 10 mM), additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (*Roche*), orthovanadate de sodium 2 mM (*Calbiochem*) et de 1 % de Triton X-100 (*Sigma Aldrich*). Après sonication et centrifugation à 4°C pendant 15 min à 13000 g, le surnageant est récupéré et dosé par le réactif Bradford (*Biorad*). Les protéines sont dénaturées 5 min à 95°C (ou 30 min à 37°C pour la détection du récepteur APJ) dans du tampon de dépôt (Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 2 %, glycérol 10 %, β -mercaptoéthanol 5%, bleu de bromophénol 0,001 %). Les protéines sont ensuite séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant avec gradient de 4-20% avant d'être transférées pendant 5 à 10 min (2,5A et 25V) sur une membrane de nitrocellulose (0,45 μ m, *Bio-Rad*) dans le système de transfert rapide Trans-Blot Turbo Transfer System (*Biorad*). Les membranes sont lavées dans du Tris Buffer Saline Tween (TBST) composé de 0,1 % de Tween 20 (*Euromedex*) et de TBS (Tris-HCl 5 mM, NaCl 15 mM). Les membranes sont ensuite saturées dans du TBST additionné de 5 % de lait pendant 1 h à température ambiante, puis incubées avec les anticorps primaires à 4°C pendant 12h. Par la suite, après plusieurs lavages en TBST, les membranes sont incubées 1h avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase puis lavées à nouveau avec du TBST. Les protéines d'intérêts sont révélées par chimioluminescence selon les conseils du fabricant (*GE Healthcare*) sur film photographique (Amersham hyperfilm ECL *GE Healthcare*) ou bien à l'aide de l'imageur de gels ChemiDoc (*Biorad*).

Immunohistochimie :

Les coupes d'adénocarcinome pancréatique murines sont issues des animaux génétiquement modifiés suivant :

Souris K-RAS (Lox-Stop-Lox-K-RAS^{G12D/+}/Pdx1-Cre) dont les coupes ont été obtenues en collaboration avec le Dr Marlène Dufresne, INSERM U1037. Ces animaux expriment l'oncogène K-RAS constitutivement actif à un niveau physiologique spécifiquement dans le pancréas grâce à l'expression d'une recombinaise Cre, sous la dépendance du promoteur *Pancreatic and duodenal homeobox 1* (Pdx 1).

Souris KPC (Lox-Stop-Lox- K-RAS^{G12D/+}; Lox-Stop-Lox-Trp53^{R172H/+}/Pdx1-Cre) dont les coupes ont été obtenues en collaboration avec le Dr Julie Guillermet-Guibert, INSERM U1037. Ces animaux expriment l'oncogène K-RAS constitutivement actif ainsi qu'un mutant inactif de p53 à un niveau physiologique spécifiquement dans le pancréas grâce à l'expression d'une recombinaise Cre, sous la dépendance du promoteur *Pancreatic and duodenal homeobox 1* (Pdx 1).

Les coupes d'adénocarcinome pancréatiques humaines ont été obtenues en collaboration avec le Centre de Ressources Biologiques (CRB) de l'hôpital de Rangueil et les échantillons biologiques des patients ont été obtenus après la signature du consentement éclairé.

Les coupes de pancréas sont déparaffinées dans des bains de xylène, puis réhydratées par des bains successifs d'alcool de concentrations décroissantes et enfin rincées dans de l'eau. Afin de démasquer les sites immunogènes, les coupes sont soumises à un bain de tampon citrate (pH6) porté à ébullition pendant 15min au micro-ondes, puis rincées en PBS avant d'être saturées 15min avec le réactif Protein block (Dako). Les coupes sont ensuite incubées en chambre humide, à 4°C pendant 12h, en présence des anticorps primaires polyclonaux APJ C-ter (1/200) et Ape C-ter (1/300) (cf. rubrique « peptides et anticorps ») dilués dans de l'Antibody Diluent (Dako). Les coupes sont ensuite rincées en PBS avant d'effectuer le blocage de la peroxydase endogène dans un bain de peroxyde d'hydrogène (3%)/méthanol(10%)/PBS. Après plusieurs lavages en PBS/BSA 1%, les coupes sont incubées 30 min à température ambiante avec du SignalStain Boost immunohistochemistry Detection Reagent (Cell Signaling Technology). Le marquage est révélé en présence du substrat de la peroxydase, l'AEC (3-amino-9-ethylcarbazole) (Dako). Les coupes sont contre-colorées à l'hématoxyline puis montées avec du Glycergel (Dako) avant d'être observées au

microscope optique Nikon E400 avec le logiciel d'acquisition Explora Nova Morpho Expert/Mosaic. La spécificité du marquage APJ a été testée par la co-incubation de l'anticorps anti-APJ C-ter avec le peptide immunogène. D'autre part, la spécificité du marquage apeline a été validée par l'utilisation du sérum pré-immun et de marquages réalisés sur des coupes de pancréas de souris invalidées pour l'apeline.

Immunofluorescence :

Sur tissus :

Les co-marquages sont réalisés selon le même protocole que celui utilisé pour l'immunohistochimie, hormis l'utilisation de bains de PBS sans BSA et l'emploi d'anticorps secondaires couplés à un fluorochrome :

Epitope reconnu	Primaire	Fournisseur	Secondaire	Fournisseur
Apeline C-terminal	Polyclonal de lapin (dilution 1/300)	Covalab	Chèvre anti-lapin alexa 546 (dilution 1/100)	Invitrogen
APJ C-terminal	Polyclonal de lapin (dilution 1/200)	Protéogénix	Chèvre anti-lapin alexa 546 (dilution 1/100)	Invitrogen
Insuline	Polyclonal de Cobaye (dilution 1/50)	BioGenex	Anti-cobaye Cy2 (dilution 1/100)	Jackson ImmunoResearch Laboratories
Glucagon	Monoclonal de souris (dilution 1/3000)	Sigma	Anti-souris Alexa 488 (dilution 1/100)	Invitrogen

Sur cellules :

2.10^5 cellules/puits (cellules U2OS WT, U2OS hAPJ, MiaPaCa, Capan-1, Capan-2, BxPC3 et Panc1) sontensemencées dans des plaques 12 puits sur des lamelles préalablement coatées à la poly-D-lysine. 12 heures plus tard, les cellules sont privées en sérum pendant 1 heure avant d'être stimulées ou non par l'Ape36 ou l'Ape13-TAMRA pendant 45 min aux doses indiquées à 37°C dans du milieu sans SVF. Après fixation à l'acétone (10 min à 4°C), les cellules sont perméabilisées (5 min dans Triton X100 0.25% dilué dans du PBS, puis 5 min dans du méthanol à -20°C) et mises à saturer (1h PBS/SVF 5%) avant l'incubation avec l'anticorps primaire dirigé contre le récepteur APJ (anticorps anti-APJ C-ter dilué au 1/400 dans du PBS/SVF 5%) pendant 1h à température ambiante. Après trois lavages en PBS, les cellules sont incubées 1h à température ambiante avec l'anticorps secondaire anti-lapin couplé alexa 546 (1/2000 dilué dans PBS/SVF 5%). Les lamelles sont lavées avec du PBS avant d'être montées sur lames avec du Fluo Mounting Medium (Dako).

Pour les expériences réalisées seulement avec l'Ape13-TAMRA et ne nécessitant pas d'anticorps pour la détection du signal, les cellules (cellules U2OS WT, U2OS hAPJ, U2OS hAPJ shScr, U2OS hAPJ shAPJ n°3, U2OS hAPJ shAPJ n°4, MiaPaCa, Capan-1, Capan-2, BxPC3 et Panc-1) sontensemencées dans des plaques 12 puits ($2 \cdot 10^5$ cellules/puits) sur des lamelles préalablement coatées à la poly-D-lysine. 12 heures plus tard, les cellules sont privées en sérum pendant 1 heure puis stimulées ou non par la pApe13 (pendant 5 min) avant d'être traitées par l'Ape13-TAMRA pendant 45 min aux doses indiquées à 37°C dans du milieu sans SVF. Les cellules sont ensuite fixées avec de la paraformaldehyde 4% (diluée dans du PBS) pendant 10 min à 4°C, puis lavées avec du PBS avant d'être montées sur lames avec du Fluo Mounting Medium (Dako).

L'observation des lames est réalisée au microscope confocal LSM 780 (Zeiss) avec un objectif 63X.

RT-qPCR :

Des boîtes de culture cellulaire de 100 mm de diamètre sontensemencées avec les différentes lignées cancéreuses pancréatiques (Capan-1, Capan-2, BxPC3, MiaPaca et Panc-1), les lignées cellulaires CHO pREN, CHO hAPJ ou les cellules HUVECs issues d'une culture primaire. A 70% de confluence, les cellules sont rincées avec du PBS et leurs ARNs extraits grâce au RNeasy Mini Kit (QIAGEN) selon les recommandations du fabricant. Après leur extraction, les ARNs sont dosés grâce au spectrophotomètre ND-1000 (Nanodrop). Lors de l'étape suivante, 1µg d'ARN est reverse transcrit en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide de la RevertAid H minus reverse transcriptase et l'utilisation d'hexamères aléatoires (Fermentas). 100ng d'ADNc pour le récepteur ou 50ng d'ADNc pour l'apeline humaine sont analysés par PCR quantitative à l'aide du kit SsoFast EvaGreen Supermix (Biorad) et du système STEP ONE + (Applied Biosystem). Les amorces utilisées pour étudier l'expression des gènes d'intérêt sont : 5'-tcacgtggtgctgggg et 5'-gccagcatgtacagcgtc pour le récepteur et 5'-gatgccgcttcccgatg et 5'-attccttgaccctctgggct pour l'apeline. Les résultats sont normalisés par rapport aux ADNc de l'ARN ribosomique 18S grâce aux amorces 5'-cgaacgtctgcctatcaactt et 5'-accctgggtcaccatggta et l'expression relative des gènes est déterminée grâce à la méthode du $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Essais de prolifération :

Les cellules tumorales pancréatiques MiaPaCa sont ensemencées en plaques 12 puits à une confluence de 20 000 cellules/puits. 24h après l'ensemencement, les cellules sont rincées avec du milieu sans SVF, maintenues dans ce milieu de culture dépourvu de facteurs de croissance, et traitées ou non quotidiennement avec de l'apeline 36 à 1 μM pendant les temps indiqués. Le comptage cellulaire est effectué quotidiennement. La quantification des cellules remises en suspension après traitement à la trypsine est réalisée par le compteur de particules Z1 Coulter (Beckman Coulter). La quantification tient compte du nombre total de cellules présentes dans chaque puits aux différents temps de traitements.

Essais de migration :

Les essais de migration sont réalisés en utilisant des inserts contenant des pores de 8 μm adaptés pour des plaques 12 puits (BD Falcon). Les cellules tumorales MiaPaCa sont ensemencées dans la chambre supérieure de l'insert à une confluence de 175 000 cellules et sont laissées le temps de l'adhésion pendant 4h avant d'effectuer la privation en sérum pour la nuit. Le lendemain, du milieu sans sérum est placé dans la chambre supérieure tandis que du milieu 5% sérum seul ou du milieu 5% sérum additionné d'apeline 36 à 1 μM est ajouté dans la chambre inférieure de l'insert. Les cellules tumorales MiaPaCa sont conservées pendant 18h à l'étuve à 37°C et avec 5% CO₂ le temps de la migration. A la fin de l'incubation, les cellules n'ayant pas migré se trouvant à la surface supérieure de la membrane poreuse de l'insert sont retirées à l'aide d'un coton-tige. Les cellules ayant migrées se trouvant à la surface inférieure de la membrane sont fixées avec 4 % paraformaldehyde, lavées avec du PBS et colorées avec une solution de cristal violet (0.2 % cristal violet et 20 % méthanol dilués dans de l'eau). Les cellules sont visualisées et photographiées en lumière blanche à l'objectif 4X sous un microscope à contraste de phase. La migration est analysée par quantification de la surface membranaire recouverte de cellules (Explora Nova Morpho Expert software).

Mesure de capture du glucose :

Les cellules MiaPaCa sont ensemencées en plaque 12 puits à une confluence de 200 000 cellules/puits pendant 24 h avant d'être lavées puis incubées en milieu DMEM sans SVF. Après 24 h de culture en milieu sans sérum, les cellules sont incubées pendant 24 h à 37°C avec de l'apeline 36 (1 µM), ou de l'insuline (1 µM) correspondant au contrôle positif. 30 min avant l'arrêt des 24 h de stimulation, les cellules sont incubées dans 450 µl de tampon contenant 20 mM d'HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂ et 0.2% de BSA. Afin d'évaluer le niveau de radioactivité non spécifique, 20 min avant la fin de la stimulation, un puits est traité avec 0.1 mM de cytochalasine B bloquant les transporteurs de glucose. Puis, 10 min avant la fin des 24 h de stimulation par l'apeline et l'insuline, le transport de glucose est initié par l'ajout de 2-Déoxyglucose (2-DG) (0.1 mM) contenant une dose traceuse de [³H]-2-DG (0.2 µM soit 0.2 µCi). Après ces 10 min d'incubation avec le glucose tritié à 37°C, le tampon est aspiré et la réaction est stoppée par l'ajout d'une solution de PBS/Glucose froid à 10 mM avant d'effectuer un rinçage avec du PBS froid. Les cellules sont ensuite lysées par l'ajout d'une solution de soude à 0.05 N. Le comptage de la radioactivité intracellulaire du 2-DG correspondant au 2-DG transporté est effectué à l'aide d'un compteur à scintillation (Packard Tribard Liquid Scintillation counter). Les résultats sont exprimés en nombre d'augmentation de 2-DG transporté par rapport au basal (condition non traitée) et les résultats sont normalisés par rapport au dosage de la quantité protéique de chaque puits.

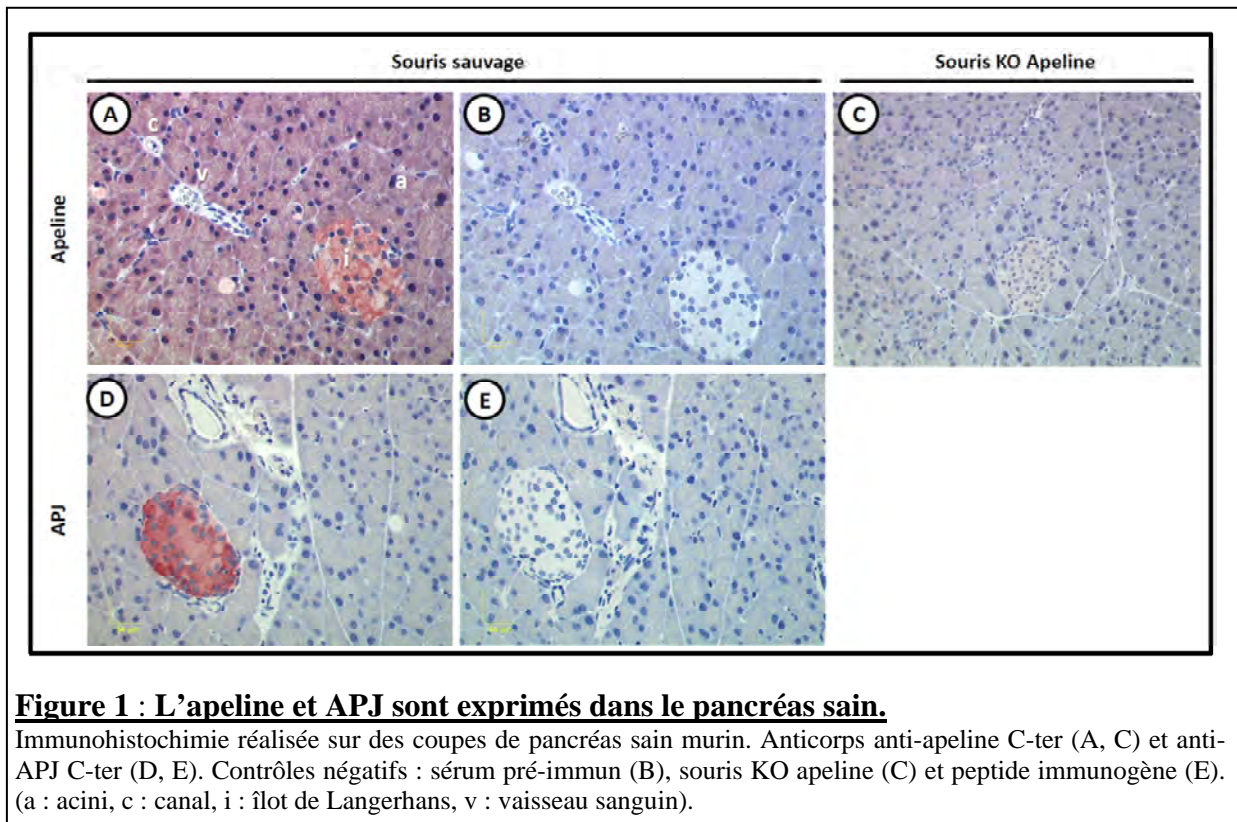
Tests statistiques :

Les résultats sont exprimés sous forme de moyennes +/- ESM (erreur standard à la moyenne). Les analyses statistiques sont réalisées grâce à l'utilisation du test de Student, ou en ANOVA à deux voies suivie d'un post-test de Bonferoni avec le logiciel d'analyse Prism. Les niveaux de significativité sont : P<0.05 (*), P<0.01 (**) et P<0.001 (***).

RESULTATS :

1) L'apeline et son récepteur sont exprimés dans le pancréas sain :

Les résultats précédemment obtenus par l'équipe montrent que par rapport au tissu sain adjacent, le gène de l'apeline est surexprimé dans 2/3 des ADKs (Sorli et al., 2007). Afin d'étudier le rôle de cette voie de signalisation dans la carcinogenèse pancréatique, nous nous sommes tout d'abord intéressés à caractériser l'expression protéique de l'apeline et d'APJ dans le tissu pancréatique sain par une approche immunohistochimique. Ainsi, sur des échantillons de tissu pancréatique murin, nos résultats montrent que l'apeline est exprimée à la fois par le tissu endocrine (îlots de Langerhans) et le tissu exocrine (acini) (**Figure 1A**) alors que le récepteur APJ est exclusivement exprimé au niveau des îlots de Langerhans (**Figure 1D**). Ce même profil d'expression est retrouvé sur des coupes de pancréas sain humain (données non montrées). La validation de l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale de l'apeline a été effectuée en réalisant des immunomarquages avec le sérum pré-immun (**Figure 1B**) ainsi que par l'utilisation de coupes de pancréas de souris invalidées pour l'apeline (**Figure 1C**). D'autre part, l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale du récepteur a été validé en pré-incubant l'anticorps avec le peptide immunogène correspondant (**Figure 1E**). De plus, sa spécificité est en cours de confirmation par la réalisation de marquages sur des coupes de pancréas de souris invalidées pour APJ. L'ensemble des contrôles négatifs réalisés ne révèle aucun marquage attestant ainsi de la spécificité des anticorps utilisés.



De manière intéressante, l'apeline et son récepteur présentent un marquage hétérogène au niveau des îlots de Langerhans suggérant une répartition dans des sous-populations cellulaires. En effet, le tissu endocrine est composé de cinq types cellulaires différents dont les populations majeures sont les cellules α , β et δ produisant respectivement le glucagon, l'insuline et la somatostatine. Afin d'identifier les populations cellulaires endocrines exprimant l'apeline et le récepteur, nous avons réalisé des doubles marquages en immunofluorescence sur des coupes de tissu pancréatique murin sain pour l'apeline, le récepteur APJ et les principales hormones endocrines. Confirmant les résultats obtenus par Ringström et coll. (Ringström et al., 2010), l'apeline est co-exprimée avec l'insuline dans les cellules β (**Figure 2A**) et avec le glucagon dans les cellules α (**Figure 2B**). D'autre part, le récepteur APJ possède le même profil d'expression que son ligand. En effet, APJ est co-exprimé avec l'insuline (**Figure 2C**) et le glucagon (**Figure 2D**). De plus, nous avons pu mettre en évidence que le même profil d'expression pour le couple ligand/récepteur est retrouvé chez l'Homme (données non montrées).

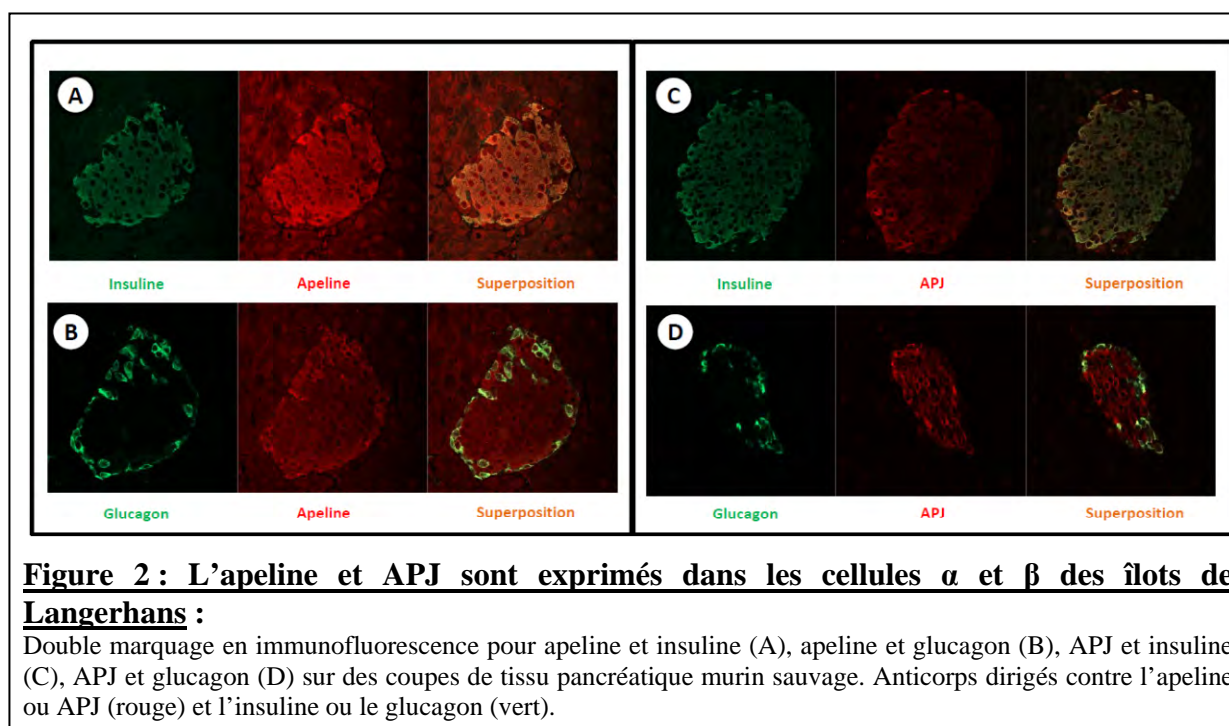


Figure 2 : L'apeline et APJ sont exprimés dans les cellules α et β des îlots de Langerhans :

Double marquage en immunofluorescence pour apeline et insuline (A), apeline et glucagon (B), APJ et insuline (C), APJ et glucagon (D) sur des coupes de tissu pancréatique murin sauvage. Anticorps dirigés contre l'apeline ou APJ (rouge) et l'insuline ou le glucagon (vert).

2) L'apeline et APJ sont exprimés dans le cancer du pancréas chez l'Homme :

En parallèle nous avons caractérisé les sites d'expression de l'apeline et APJ sur des coupes d'adénocarcinome pancréatique humain issues d'une cohorte de 49 patients. Les résultats obtenus et l'intensité des marquages suivant le grade et le stade des tumeurs sont présentés dans le **tableau 1**.

Caractéristiques		Nombre de patients	Marquage Apeline				Marquage APJ			
			Négatif	Faible	Moyen	Fort	Négatif	Faible	Moyen	Fort
Age	< 60	9 (18,37%)	0,0%	56,0%	44,0%	0,0%	22,2%	55,5%	11,1%	11,1%
	> 60	40 (81,63%)	2,5%	42,5%	25,0%	30,0%	17,5%	40,0%	40,0%	2,5%
Genre	Femme	27 (55,10%)	0,0%	44,4%	33,3%	22,2%	18,5%	48,2%	29,6%	3,7%
	Homme	22 (44,9%)	4,5%	45,5%	22,7%	27,3%	18,2%	40,9%	40,9%	4,5%
Adénocarcinome		49	2,0%	44,9%	28,6%	24,5%	18,4%	42,9%	34,7%	4,1%
Grade	Bien différencié	27 (55,10%)	3,7%	44,4%	29,6%	22,2%	22,2%	51,9%	22,2%	3,7%
	Moyennement différencié	14 (28,57%)	0,0%	42,9%	35,7%	21,4%	14,3%	35,7%	42,9%	7,1%
	Peu différencié	8 (16,32%)	0,0%	62,5%	12,5%	25,0%	12,5%	25,0%	62,5%	0,0%
Stade TNM	T1	0 (0%)	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%	0,0%
	T2	8 (16,32%)	0,0%	37,5%	25,0%	37,5%	25,0%	50,0%	25,0%	0,0%
	T3	40 (81,63%)	2,5%	47,5%	27,5%	22,5%	17,5%	40,0%	37,5%	5,0%
	T4	1 (2,04%)	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	100,0%	0,0%
	N0	13 (26,53%)	7,7%	46,2%	30,8%	15,4%	23,1%	53,8%	15,4%	7,7%
	N1	36 (73,47%)	0,0%	44,4%	27,8%	27,8%	16,7%	38,9%	41,7%	2,8%
PanINs	Non	7								
	PanIN 1	3	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	0,0%	50,0%	50,0%	0,0%
	PanIN 2	19	5,3%	26,3%	47,4%	21,1%	5,3%	57,9%	26,3%	10,5%
	PanIN 3	30	0,0%	43,8%	28,1%	28,1%	10,0%	60,0%	23,3%	6,7%

Tableau 1 : Analyse du statut d'expression d'apeline et APJ sur 49 patients atteints d'ADK.

Par cette approche immunohistochimique réalisée sur ces 49 patients, nous confirmons au niveau protéique la forte expression de l'apeline dans l'ADK qui avait précédemment été mise en évidence par l'équipe dans le *cancer profiling array* (Sorli et al., 2007). En effet, nous observons que l'apeline et le récepteur APJ sont respectivement exprimés chez 98% (44.9% faible, 28.6% moyenne et 24.5% de marquage de forte intensité) et 82% (42.9% faible, 34.7% moyenne et 4.1% de marquage de forte intensité) des patients analysés (**Tableau 1**).

Chez ces patients, comme précédemment observé dans le tissu sain, l'apeline (**Figure 3A**) et le récepteur APJ (**Figure 3D**) sont exprimés par les cellules endocrines des îlots de Langerhans. Cependant, l'analyse des coupes d'ADK humaines montre que l'apeline est également exprimée au niveau des lésions préneoplasiques (**Figure 3B**) ainsi que par les cellules tumorales pancréatiques (**Figure 3C**). D'autre part, on retrouve le même profil d'expression pour le récepteur APJ, lui aussi exprimé au niveau des PanINs (**Figure 3E**) et des cellules tumorales (**Figure 3G**). Ainsi, nos résultats révèlent que l'apeline et APJ sont co-exprimés par les cellules tumorales pancréatiques. De manière intéressante, à plus fort grossissement nous pouvons observer que le récepteur APJ présente principalement un marquage intracellulaire de type punctiforme ainsi qu'un très faible marquage membranaire (**Figure 3F et 3G**). Ceci pourrait s'expliquer par l'internalisation d'APJ du fait de la co-expression du couple ligand/récepteur par les cellules des PanINs ainsi que par les cellules tumorales.

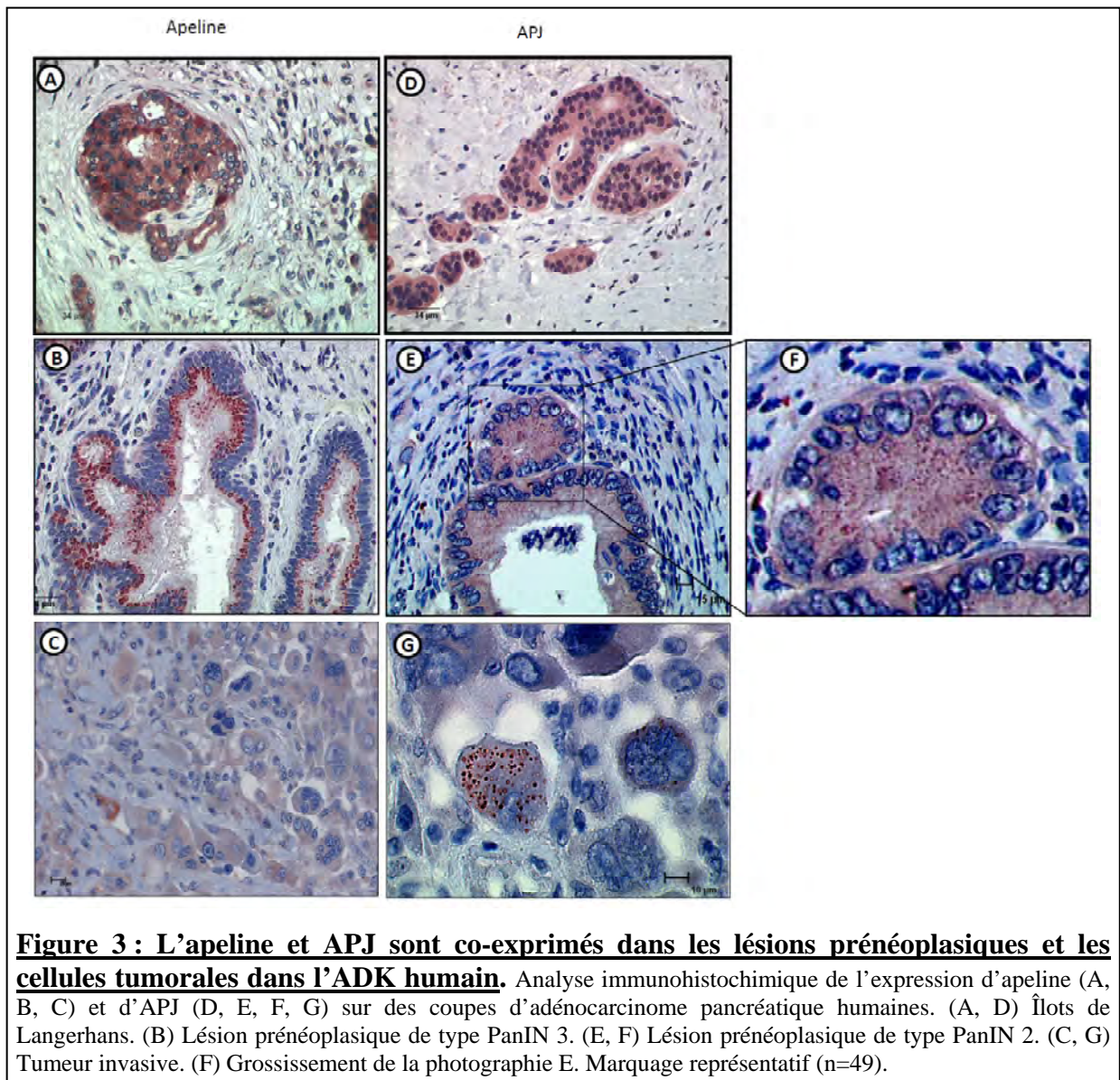


Figure 3 : L’apeline et APJ sont co-exprimés dans les lésions préneoplasiques et les cellules tumorales dans l’ADK humain. Analyse immunohistochimique de l’expression d’apeline (A, B, C) et d’APJ (D, E, F, G) sur des coupes d’adénocarcinome pancréatique humaines. (A, D) Îlots de Langerhans. (B) Lésion préneoplasique de type PanIN 3. (E, F) Lésion préneoplasique de type PanIN 2. (C, G) Tumeur invasive. (F) Grossissement de la photographie E. Marquage représentatif (n=49).

3) L’apeline et APJ sont exprimés précocement dès le stade PanIN 1 et tout au long de la carcinogenèse pancréatique :

L’ADK est une pathologie évoluant de manière asymptomatique. Ainsi, la plupart des patients sont diagnostiqués à des stades trop avancés, voire métastatiques. Afin d’accélérer leur prise en charge et leur traitement, il est essentiel d’identifier des marqueurs prédictifs et/ou de nouvelles cibles thérapeutiques exprimées précocement au cours de la carcinogenèse. Ainsi, nous nous sommes intéressés à caractériser l’expression spatio-temporelle de l’apeline et d’APJ au cours de la progression tumorale. Cependant, compte tenu de la détection tardive de l’ADK, l’obtention de stades préneoplasiques chez l’Homme est rare nous empêchant ainsi

d'analyser leur cinétique d'expression. Afin de réaliser cette étude nous avons donc choisi d'utiliser le modèle murin K-RAS (Lox-Stop-Lox-K-RAS^{G12D/+}/Pdx1-Cre). Ces souris expriment l'oncogène K-RAS (K-RAS^{G12D}) constitutivement actif spécifiquement dans le pancréas et représentent un bon modèle d'étude récapitulant les phases précoces de l'ADK (Hingorani et al., 2003). Les marquages réalisés sur ces coupes de pancréas murins mettent en évidence une expression précoce de l'apeline dès le stade préneoplasique PanIN 1 mais également tout au long du développement tumoral, aux stades PanINs 2 et PanINs 3 (**Figure 4A**). D'autre part, le récepteur APJ est très fortement exprimé dans certaines cellules isolées bordant les lésions préneoplasiques tout au long de la carcinogenèse (**Figure 4B**). Cependant, des immunomarquages réalisés sur des stades invasifs permettent de retrouver un profil d'expression similaire à celui obtenu chez l'Homme à savoir que le récepteur est localisé à la fois au niveau membranaire et cytoplasmique des cellules constituant les PanINs (**Figure 4B**). Cette double localisation d'APJ peut s'expliquer par la présence de son ligand induisant l'activation et l'internalisation permanentes du récepteur, comme précédemment visualisé chez l'Homme.

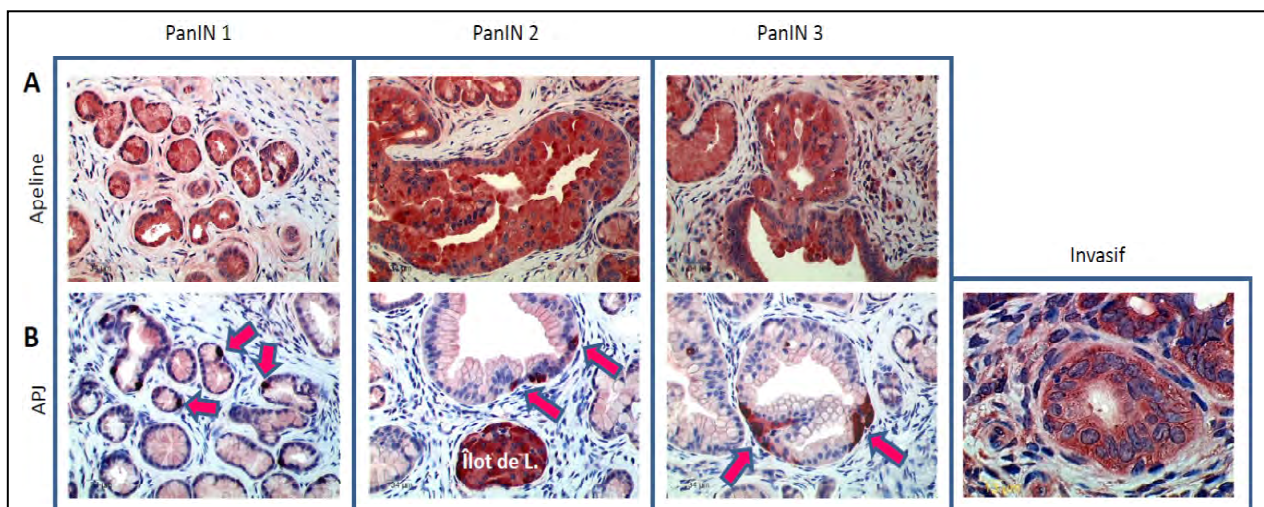


Figure 4 : Apeline et APJ sont exprimés dans les lésions préneoplasiques dès le stade PanIN1 et tout au long de la carcinogenèse dans le modèle murin K-RAS :

Analyse immunohistochimique de l'expression d'apeline (A) et d'APJ (B) sur des coupes d'adénocarcinome pancréatique murin (modèle K-RAS) au cours des différents stades de la carcinogenèse : PanIN 1, PanIN 2, PanIN 3 et invasif. Les flèches indiquent la localisation des cellules isolées positives pour le marquage APJ. Photos représentatives (n=20).

Afin de caractériser le phénotype des cellules isolées exprimant fortement le récepteur APJ en bordure des lésions préneoplasiques, nous avons réalisé des co-immunomarquages sur

les coupes de souris K-RAS. Ainsi, nous avons mis en évidence que ces cellules isolées, dont la fonction reste inconnue à ce jour, sont de phénotype endocrine et co-expriment APJ et l'insuline (**Figure 5A et 5B**) ou le glucagon (**Figure 5C et 5D**). Les figures 5B et 5D correspondent respectivement à la surexposition des immunomarquages APJ/insuline et APJ/glucagon de manière à pouvoir localiser les cellules isolées au niveau des structures des PanINs.

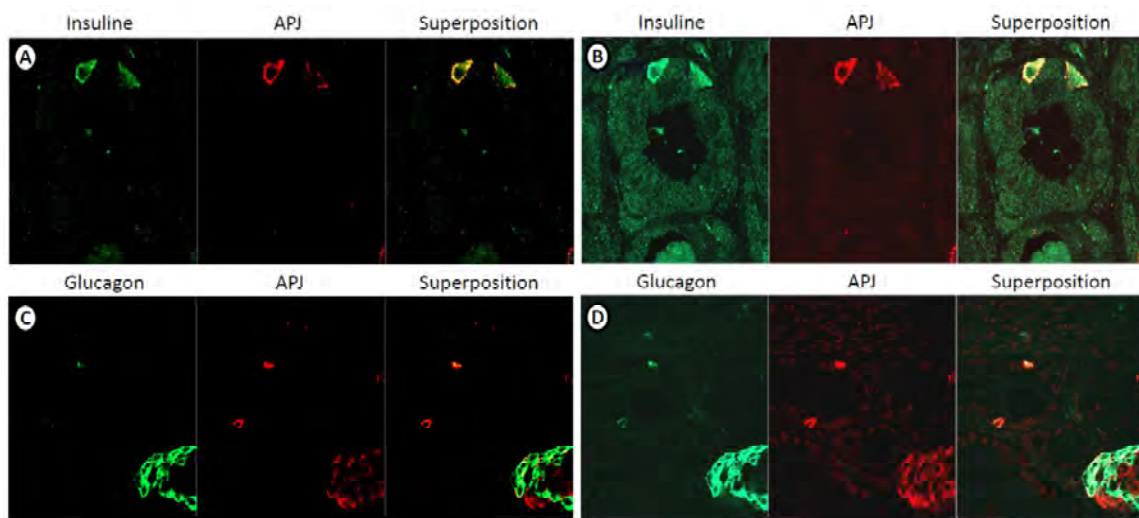


Figure 5 : APJ est fortement exprimé par une population cellulaire de phénotype endocrine dans les PanINs :

Double marquage pour APJ et insuline (A,B) et APJ et glucagon (C, D) sur des coupes de tissu pancréatique de souris K-RAS. Anticorps dirigés contre APJ (rouge) et l'insuline ou le glucagon (vert).

Afin de confirmer les résultats obtenus dans le modèle murin K-RAS, l'expression de l'apeline et d'APJ a également été analysée dans le modèle murin de carcinogénèse pancréatique KPC (Lox-Stop-Lox-K-RAS^{G12D/+}; Lox-Stop-Lox-Trp53^{R172H/+}/Pdx1-Cre). Ces animaux expriment l'oncogène K-RAS (K-RAS^{G12D}) constitutivement actif ainsi que le gène suppresseur de tumeur p53 muté inactif (Trp53^{R172H}) spécifiquement dans le pancréas (Hingorani et al., 2005). Dans ce modèle récapitulant tous les stades de la progression tumorale, le profil d'expression de l'apeline et du récepteur est identique à celui observé chez l'Homme et les souris K-RAS. En effet, l'apeline (**Figure 6A**) et son récepteur (**Figure 6B**) sont exprimés dans les PanINs. De plus, le récepteur est également très fortement exprimé au niveau de cellules isolées bordant les lésions préneoplasiques.

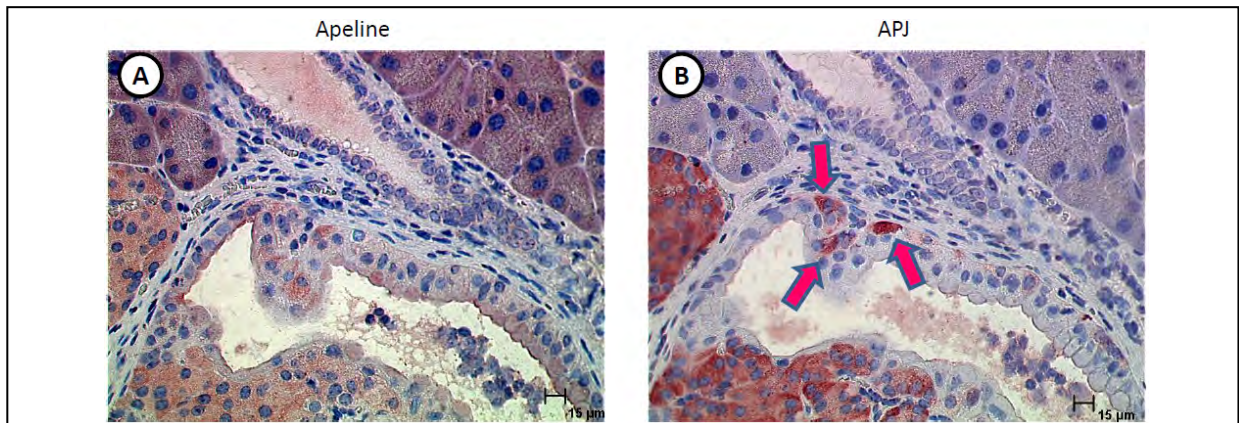


Figure 6 : Apeline et APJ sont également exprimés au niveau des lésions préneoplasiques dans le modèle murin de carcinogénèse pancréatique KPC.

Analyse immunohistochimique de l'expression d'apeline (A) et d'APJ (B) sur des coupes d'adénocarcinome pancréatique murin (modèle KPC) présentant des lésions préneoplasiques de type PanINs 2. Les flèches indiquent la localisation des cellules isolées positives pour le marquage APJ. Photos représentatives (n=6).

Dans les modèles murins K-RAS et KPC permettant l'analyse des différents stades préneoplasiques, nous avons ainsi pu observer que le couple ligand/récepteur est exprimé dès les premiers stades de la carcinogénèse par les cellules constituant les PanINs et pourrait donc jouer un rôle précoce dans la progression tumorale. De manière intéressante, à des stades avancés, cette co-expression de l'apeline et du récepteur par les cellules tumorales pancréatiques laisse supposer l'existence d'une potentielle boucle autocrine.

Cependant, il est à noter que les marquages réalisés sur ces modèles murins diffèrent partiellement de ceux observés chez l'Homme. En effet, sur la majorité des coupes humaines analysées, l'apeline (Figure 3B) et APJ (Figure 3E) présentent un marquage intracellulaire punctiforme dans les cellules constituant les PanINs. En revanche, dans les souris K-RAS et KPC l'apeline présente un marquage cytoplasmique majoritairement diffus tandis que le récepteur APJ n'est pas ou très faiblement détecté dans les stades préneoplasiques hormis dans les cellules isolées de phénotype endocrine. Cette différence de marquage peut s'expliquer par le fait que les stades analysés sont trop précoces par rapport aux tumeurs réévaluées à des stades avancés chez les patients. De plus, ces modèles murins ne possèdent que certaines des mutations observées dans l'ADK (seulement K-RAS et/ou P53) qui pourraient influencer sur l'expression du couple ligand/récepteur. Ainsi, il sera intéressant de réaliser ces mêmes marquages sur le modèle murin KPC à un stade invasif.

4) Le récepteur APJ est exprimé par les lignées cellulaires tumorales pancréatiques humaines :

Afin de caractériser la fonction de cette voie de signalisation dans la cellule tumorale pancréatique nous avons tout d'abord analysé les niveaux d'expression du ligand et du récepteur dans différentes lignées tumorales pancréatiques humaines. Par RT-qPCR nous montrons que l'ensemble des cellules tumorales pancréatiques humaines testées (MiaPaCa, BxPC3, Panc-1, Capan 1 et Capan 2) expriment le récepteur à des niveaux variables (**Figure 7A**). Cependant, ces niveaux d'expression sont équivalents à celui observé pour les cellules endothéliales humaines HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) connues comme exprimant de manière endogène le récepteur APJ et l'apeline, et servant ici de contrôle positif. Sur l'ensemble des lignées cellulaires testées, les cellules tumorales MiaPaCa présentent la plus forte expression d'APJ avec en moyenne 6,4 fois plus de transcrits par rapport à la lignée cellulaire Panc-1, alors que les cellules endothéliales HUVECs en expriment en moyenne seulement 3 fois plus. Parallèlement, les niveaux d'expression de l'apeline ont également été étudiés et ses transcrits sont principalement retrouvés dans les lignées tumorales pancréatiques MiaPaCa et BxPC3 qui expriment respectivement 5,7 et 2,2 fois plus d'apeline que les cellules Panc-1 (**Figure 7B**). En comparaison, les cellules endothéliales HUVECs expriment jusqu'à 1000 fois plus de transcrits apeline que l'ensemble des lignées cellulaires tumorales pancréatiques analysées.

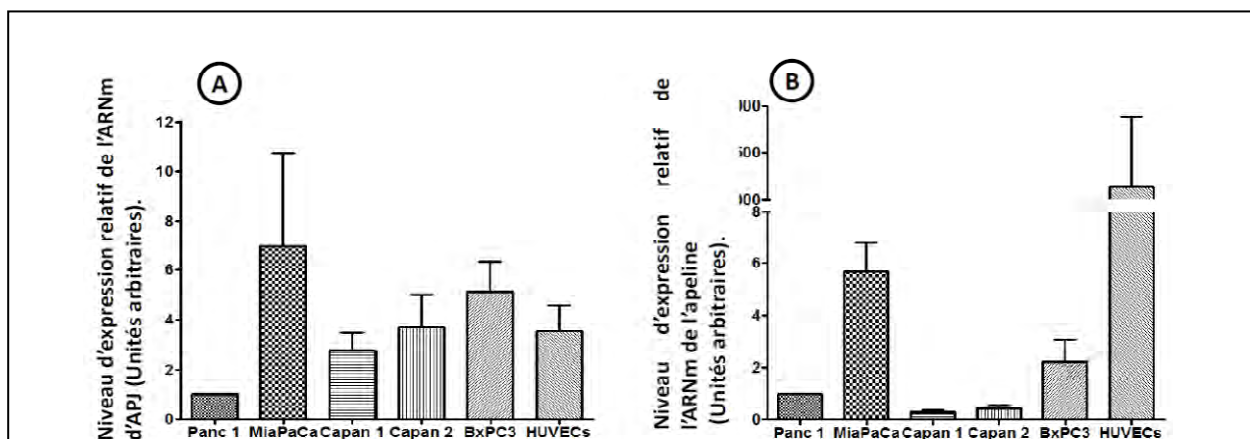


Figure 7 : Le récepteur APJ et l'apeline sont exprimés par les lignées cellulaires tumorales pancréatiques humaines :

Quantification du niveau d'expression relatif du récepteur APJ (A) et de l'apeline (B) dans les lignées tumorales pancréatiques humaines Panc-1, MiaPaCa, Capan 1, Capan 2 et BxPC3 ainsi que dans les cellules endothéliales HUVECs par RT-qPCR rapportée au niveau d'expression de la lignée cellulaire Panc-1. La quantité d'ARN est normalisée par rapport au gène de ménage 18S. Moyenne de n=8 expériences indépendantes.

Afin de valider l'expression du récepteur APJ au niveau protéique nous avons utilisé différentes approches à la fois sur les lignées tumorales ainsi que sur un modèle cellulaire préalablement utilisé par l'équipe, les cellules humaines d'ostéosarcome (cellules U2OS) qui surexpriment de manière stable le récepteur APJ humain ainsi que la β -arrestine 2 fusionnée à la GFP (U2OS hAPJ β -arr 2-GFP, aussi nommées U2OS hAPJ dans mon manuscrit).

Afin de détecter le récepteur, une première approche a consisté en la réalisation d'immunocytofluorescences sur les cellules contrôles et sur nos différentes lignées tumorales pancréatiques. Ces expériences ont été réalisées avec différents anticorps dirigés contre la partie N-terminale extracellulaire (N-ter), C-terminale intracellulaire (C-ter) ou une région extracellulaire (Mab 856) du récepteur. Ainsi, alors que l'utilisation de l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale (anti-APJ C-ter) du récepteur ne permet d'observer aucun marquage sur les cellules U2OS contrôles qui n'expriment pas le récepteur (U2OS WT) (**Figure 8A**), les cellules U2OS hAPJ présentent un marquage membranaire (**Figure 8B**). Ce marquage est perdu lorsque l'anticorps est co-incubé avec le peptide immunogène (**Figure 8C**). De même, l'utilisation de l'anticorps secondaire seul ne permet de révéler aucun signal (**Figure 8D**). La spécificité de l'anticorps est démontrée puisque la stimulation des cellules U2OS hAPJ par l'apeline engendre l'internalisation du récepteur et un marquage intracellulaire punctiforme qui colocalise avec la β -arrestine 2-GFP (**Figure 8E**). Cette même approche a été réalisée avec les différents anticorps dirigés contre le récepteur sur les lignées contrôles ainsi que sur les lignées tumorales pancréatiques humaines. Cependant, à la différence des cellules U2OS hAPJ, nous n'avons pas pu mettre en évidence l'expression protéique du récepteur dans les lignées tumorales (données non montrées).

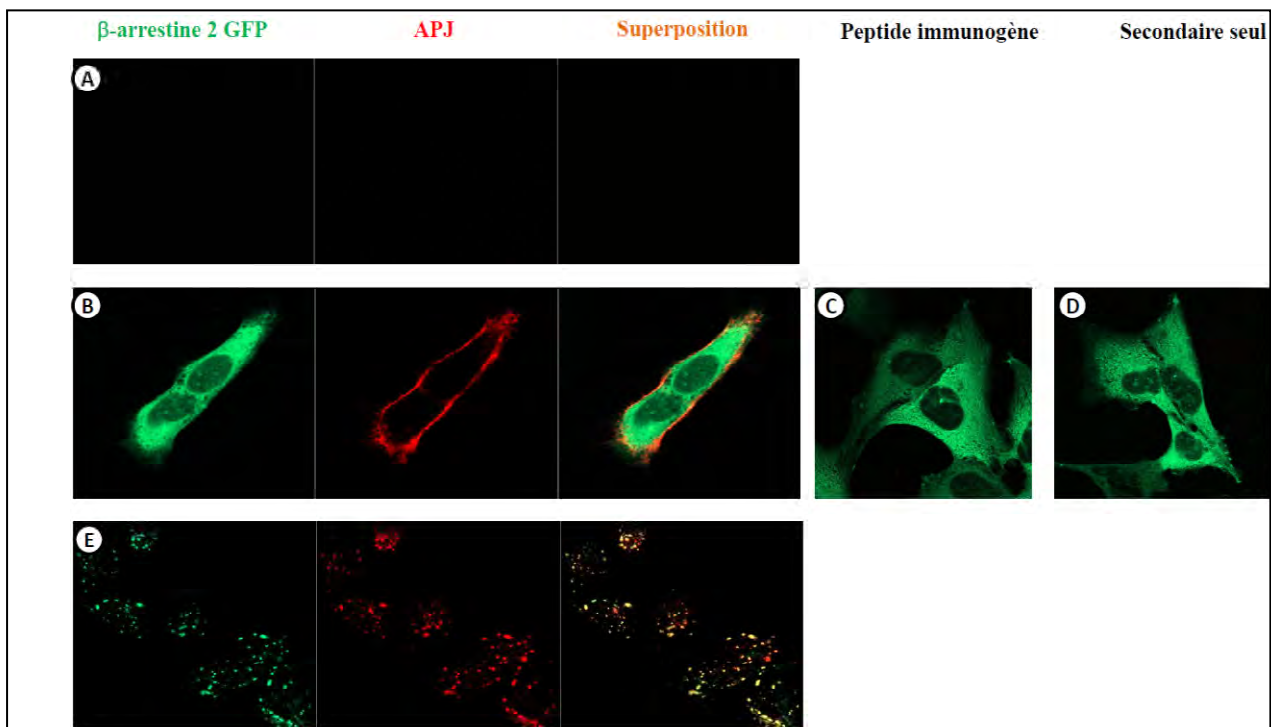


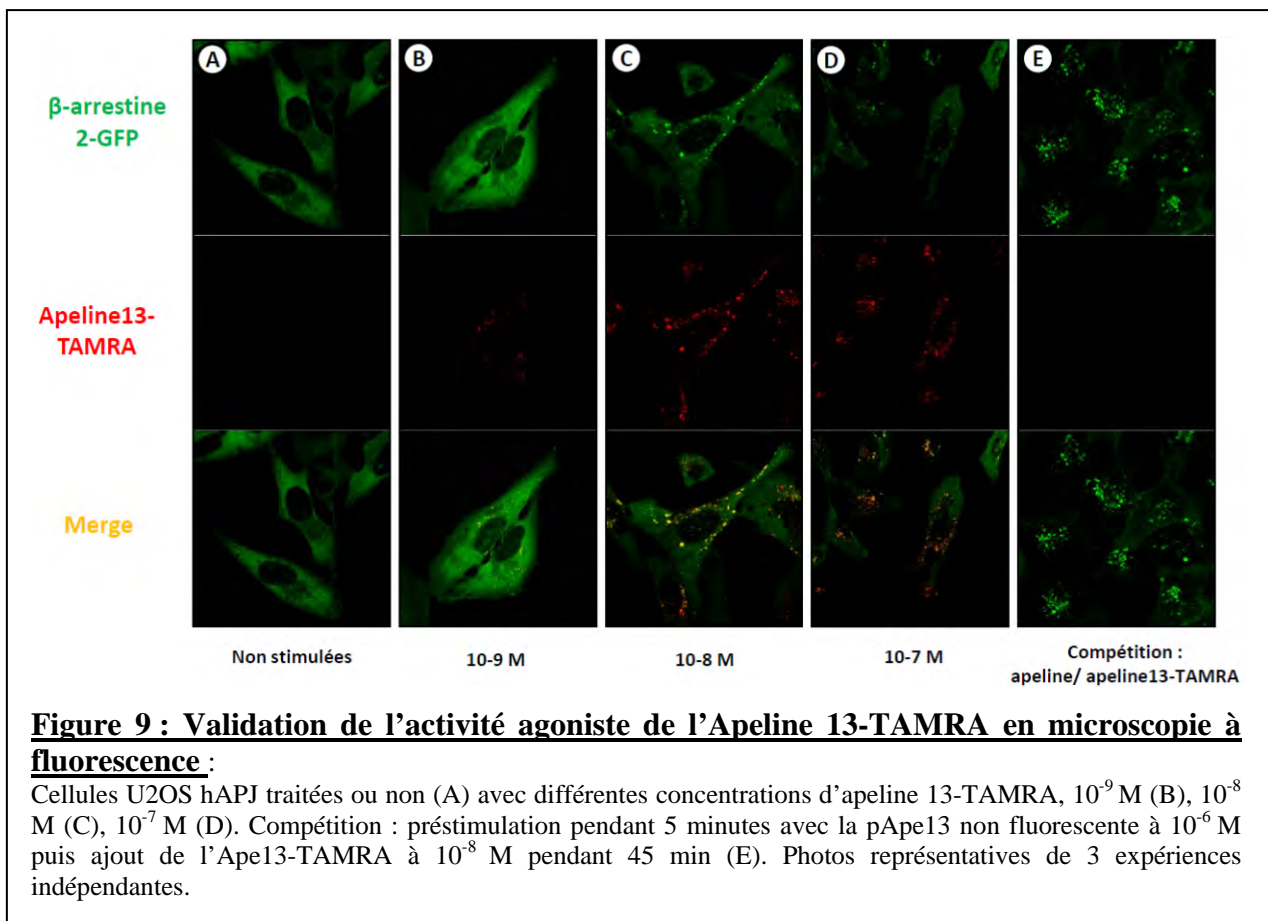
Figure 8 : Validation des anticorps dirigés contre le récepteur hAPJ en immunocytofluorescence :

Immunocytochimies réalisées avec un anticorps dirigé contre la partie C-terminale du récepteur APJ (C-ter). Cellules U2OS WT (A) ou exprimant de manière stable la β -arrestine 2 GFP et le récepteur APJ en absence (B) ou en présence (E) de stimulation par la pApe13 (1 μ M) pendant 45 min. Contrôles négatifs : incubation de l'anticorps anti-APJ C-ter avec le peptide immunogène (C) et utilisation de l'anticorps secondaire seul (D). Photos représentatives de 3 expériences indépendantes.

Pour pallier cette absence de détection, une autre approche a consisté en l'utilisation d'un ligand modifié du récepteur, l'apeline 13 couplée à un fluorophore et nommée Ape13-TAMRA. Basée sur les propriétés d'internalisation du récepteur APJ, nous avons utilisé cette méthode afin de concentrer en intracellulaire le récepteur et l'Ape13-TAMRA au niveau des vésicules d'endocytose de façon à intensifier le signal fluorescent. La fonctionnalité de l'Ape13-TAMRA a été testée et validée en stimulant les cellules U2OS WT et U2OS hAPJ avec des concentrations croissantes de peptide. Aucun marquage n'est visualisable lors de la stimulation des cellules U2OS WT (données non montrées). Alors que dans les cellules U2OS hAPJ non stimulées, la β -arrestine 2-GFP est diffuse dans le cytoplasme (**Figure 9A**), des concentrations croissantes d'Ape13-TAMRA (10^{-9} M à 10^{-7} M) entraînent une augmentation dose dépendante de l'internalisation du récepteur. Ceci est visualisable par la présence d'un co-marquage punctiforme entre l'Ape13-TAMRA (rouge) et la β -arrestine 2-GFP (verte) (**Figure 9B-D**). Afin de confirmer que l'Ape13-TAMRA se lie bien spécifiquement au récepteur de l'apeline, les cellules U2OS hAPJ sont pré-stimulées avec la pApe13 non

fluorescente (10^{-6} M) puis stimulées avec de l'Ape13-TAMRA (10^{-8} M). Dans ces conditions, nous observons uniquement un marquage vert intracellulaire punctiforme correspondant à l'internalisation du récepteur humain APJ induite par la pApe13 (**Figure 9E**). En effet, la stimulation préalable par la pApe13 non fluorescente induit l'internalisation d'APJ et empêche ainsi la liaison de l'Ape13-TAMRA au récepteur. Ainsi, ces résultats valident que les marquages observés lors de l'utilisation de l'Ape13-TAMRA sont bien dus à la fixation spécifique du ligand sur son récepteur APJ et à son activation.

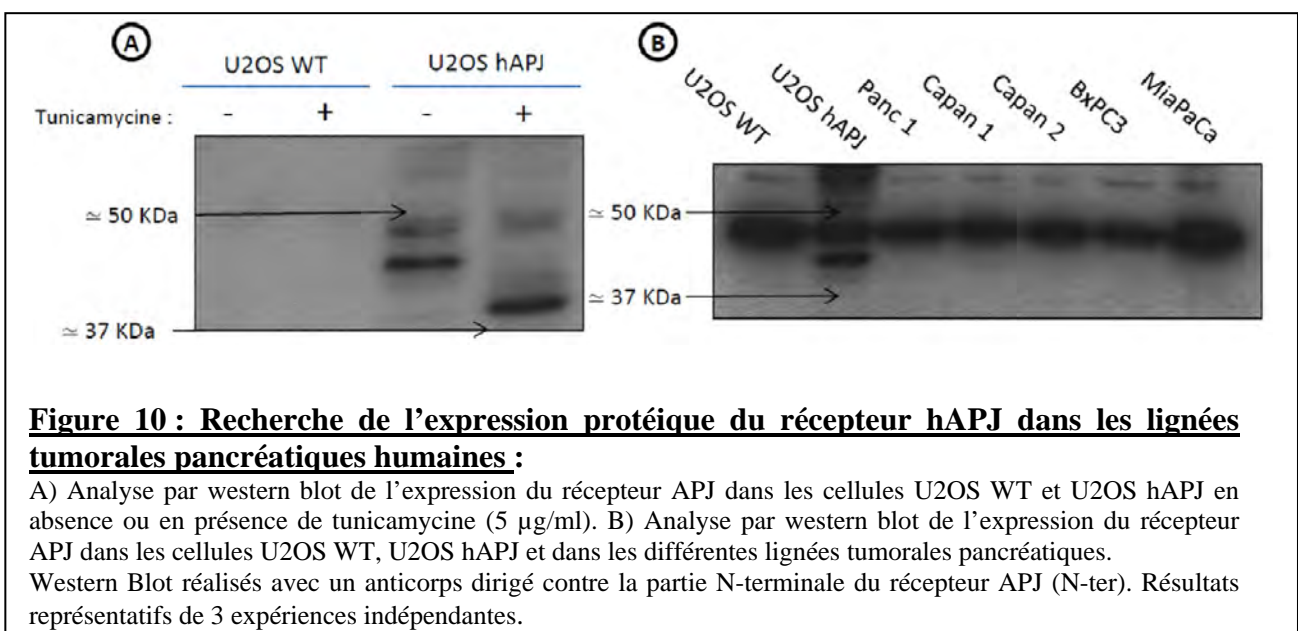
Cette technique a donc été testée sur nos différentes lignées tumorales pancréatiques humaines. Cependant, l'expression endogène du récepteur n'a pas pu être mise en évidence par cette approche (données non montrées).



Les méthodes de détection précédentes ayant échouées sur nos cellules d'intérêt, nous avons utilisé une approche par western blot afin de détecter le récepteur sur l'ensemble des cellules tumorales pancréatiques humaines ainsi que sur les cellules U2OS hAPJ. Alors que dans les cellules U2OS WT nous ne détectons aucun signal, nous révélons la présence d'une bande à environ 50 kDa dans la lignée U2OS hAPJ (**Figure 10A**). Comme cela a déjà été observé par Puffer et coll. dans un système hétérologue (cellules HEK surexprimant hAPJ),

cette bande correspond au récepteur glycosylé (Puffer et al., 2000). En effet, le récepteur possède deux sites de glycosylation au niveau de sa partie N-terminale extracellulaire. Ainsi, afin de valider notre anticorps anti-APJ N-ter en western blot, nous avons traité ou non les cellules à la tunicamycine, une drogue permettant d'inhiber les modifications post-traductionnelles de N-glycosylation (Puffer et al., 2000). Comme visualisé dans la figure 10A, alors qu'une bande de forte intensité est observée à environ 50 kDa dans la piste non traitée, le traitement à la tunicamycine révèle une bande de forte intensité à un poids moléculaire d'environ 42 kDa qui correspond au récepteur APJ dépourvu de ses motifs de glycosylation (**Figure 10A**).

Notre anticorps étant validé en western blot, nous avons recherché l'expression du récepteur dans les lignées tumorales pancréatiques. Cependant, nous ne sommes pas parvenus à détecter l'expression protéique du récepteur dans ces cellules (**Figure 10B**). Les mêmes résultats ont été obtenus avec l'anticorps dirigé contre la partie C-terminale du récepteur (anti-APJ C-ter) (données non montrées).

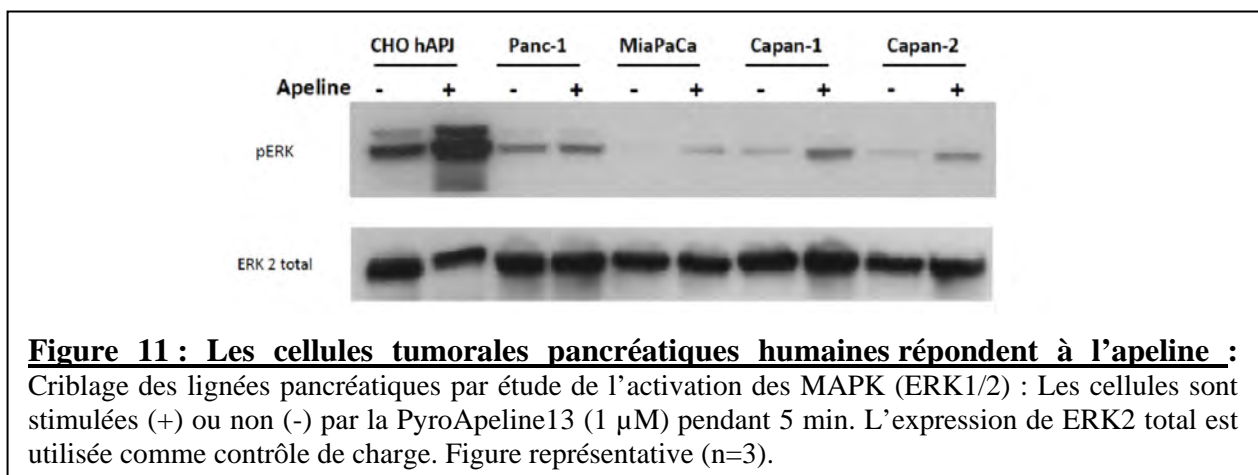


Il est à noter que l'approche par western blot a été réalisée sur du lysat cellulaire total et par conséquent, le récepteur étant faiblement exprimé, nous réduisons nos chances de le visualiser par cette approche. Par conséquent, nous avons réalisé des immunoprécipitations ainsi que des purifications de membranes cellulaires suivies d'un western blot. Comme précédemment, alors que nous détectons le récepteur dans les cellules U2OS hAPJ, aucun

signal n'est mis en évidence dans nos lignées tumorales pancréatiques (données non montrées).

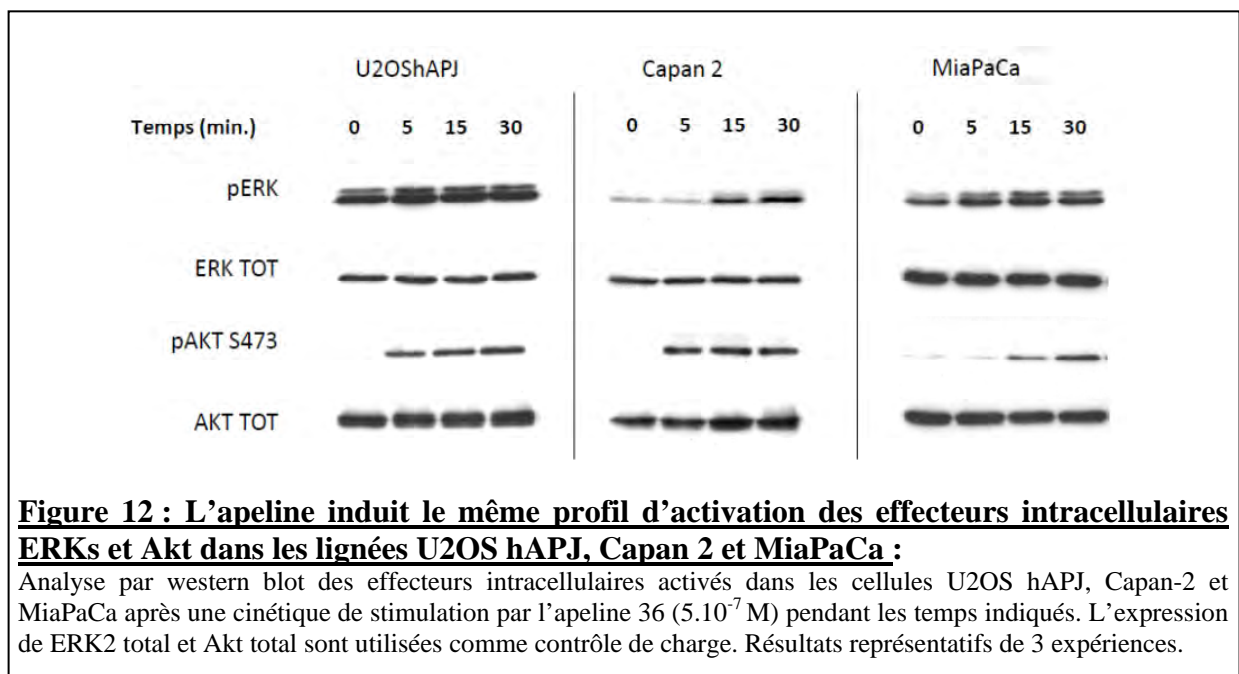
D'autres approches ont alors été testées. En effet, nous avons essayé de détecter le récepteur par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) et par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Encore une fois, contrairement aux résultats obtenus sur les cellules U2OS hAPJ surexprimant le récepteur, ces différentes méthodes se sont également révélées infructueuses sur les lignées tumorales pancréatiques (données non montrées). Ceci peut s'expliquer par l'expression endogène du récepteur APJ à un niveau très faible dans ces lignées, se situant en dessous du seuil de détection de ces différentes techniques.

Aucune des techniques précédemment abordées ne nous ayant permis de détecter le récepteur APJ, nous avons donc sélectionné les lignées tumorales de manière indirecte. En effet, dans un premier temps nous avons analysé par western blot la phosphorylation des ERKs suite à une stimulation par l'apeline, un des effecteurs intracellulaire démontré comme étant fréquemment activé en aval d'APJ dans différents types cellulaires (Cui et al., 2010; Masri et al., 2004). Par cette approche, nous avons ainsi pu mettre en évidence que les lignées tumorales pancréatiques humaines MiaPaCa, Capan 1 et Capan 2 activent les ERKs en réponse à une stimulation par la pApe13. En revanche, à ce temps de stimulation (5 min), l'apeline n'induit pas l'activation des ERKs dans les cellules Panc-1. Les cellules CHO APJ surexprimant le récepteur sont utilisées ici comme contrôle positif (**Figure 11**).



Afin de compléter cette caractérisation, nous avons parallèlement réalisé des cinétiques de stimulation par l'apeline et analysé l'activation des ERKs et Akt dans les différentes lignées cellulaires testées. Pour ce faire, nous avons choisi de nous focaliser sur les cellules MiaPaCa

qui expriment à la fois le ligand et le récepteur (au niveau ARNm), et les cellules Capan 2, une des lignées exprimant le plus hAPJ mais très peu l'apeline afin de s'affranchir de la présence d'une éventuelle boucle autocrine. En réponse à l'apeline 36, nous pouvons observer les mêmes profils d'activation des ERKs et Akt (pics de stimulation entre 5 et 15 minutes) dans ces trois lignées cellulaires. De manière intéressante, ces mêmes profils d'activation des cascades de transduction sont obtenus après une stimulation par la pApe13 (données non montrées). Ces résultats mettent en évidence d'une part, l'expression potentielle du récepteur sur ces cellules et montrent également que l'activation de ces cascades de transduction ne semble pas être dépendante du fragment d'apeline utilisé.



5) L'apeline active les différentes cascades de transduction de manière dépendante du récepteur APJ dans les cellules tumorales pancréatiques humaines MiaPaCa :

Les résultats observés sur l'activation des effecteurs intracellulaires en réponse à l'apeline sont obtenus sur des cellules exprimant de manière endogène le récepteur. Cependant, les différentes approches testées n'ont pas permis de mettre en évidence l'expression du récepteur hAPJ au niveau protéique sur ces cellules. Ainsi, afin de valider que les voies de signalisation activées par l'apeline sont bien dépendantes du récepteur de l'apeline, nous avons réalisé, dans un premier temps, des essais d'ARN interférence (siRNA)

afin d'inhiber l'expression du récepteur dans les cellules tumorales pancréatiques MiaPaCa. Les siRNAs que nous avons utilisés ont déjà été publiés (Xie et al., 2007). Contrairement aux cellules transfectées avec le siRNA contrôle (siScr à 20 ou 50 nM), nos résultats montrent que la transfection du siRNA dirigé contre le récepteur hAPJ (siAPJ 50 nM) engendre la perte d'activation d'Akt induite par l'apeline (**Figure 13**).

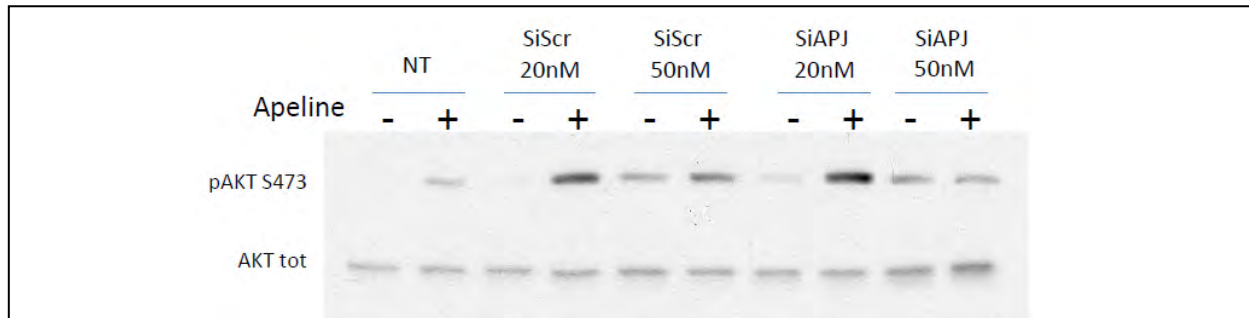


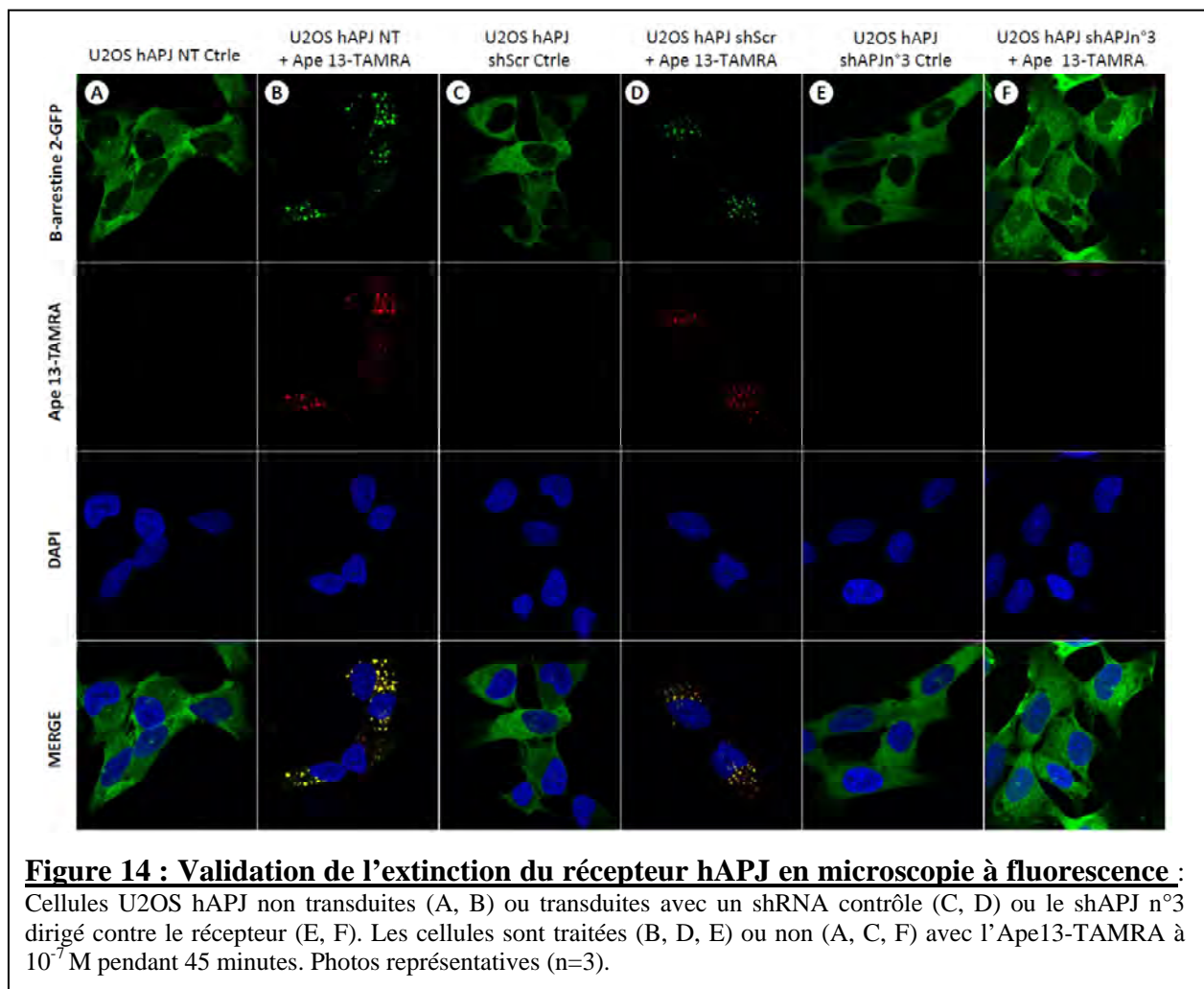
Figure 13 : L'inhibition de l'expression d'hAPJ bloque la stimulation d'Akt induite par l'apeline dans les cellules MiaPaCa :

Les cellules tumorales MiaPaCa sont transfectées ou non (NT) avec un siRNA contrôle (siRNA Scr) ou dirigé contre le récepteur hAPJ (siAPJ) (20 nM ou 50 nM). Ces cellules sont traitées 48 h après transfection avec de l'apeline 36 ($5 \cdot 10^{-7}$ M) pendant 3 h. Résultats représentatifs (n=2).

Les siRNAs ne permettant qu'une extinction transitoire de l'ARN cible, nous avons en parallèle généré des lignées cellulaires exprimant de manière stable un shRNA contrôle (shScr) ou des shRNAs dirigés contre différentes parties de la séquence du transcrite hAPJ. Alors que les shRNAs 1 (shAPJ n°1), 2 (shAPJ n°2) et 5 (shAPJ n°5) ciblent la région 3' non traduite de l'ARNm de hAPJ, les shRNAs 3 (shAPJ n°3) et 4 (shAPJ n°4) sont dirigés contre la séquence codante du transcrite. Ces shRNAs commercialisés par Sigma ne sont pas validés. Ainsi afin de valider les shRNAs dirigés contre la séquence codante de hAPJ, les shRNAs n°3 et n°4 ont été transduits dans les cellules U2OS hAPJ qui surexpriment de manière stable l'ADN complémentaire codant pour le récepteur.

Ainsi, les cellules U2OS hAPJ ont été transduites ou non (U2OS hAPJ NT) (**Figure 14 A, B**) avec un shRNA contrôle (U2OS hAPJ shScr) (**Figure 14 C, D**) ou le shRNA dirigé contre le récepteur hAPJ (U2OS hAPJ shAPJ n°3) (**Figure 14 E, F**) puis traitées (**Figure 14 B, D, F**) ou non (**Figure 14 A, C, E**) avec l'apeline 13 fluorescente (Ape13-TAMRA). L'Ape13-TAMRA engendre l'internalisation du récepteur dans les cellules U2OS hAPJ non transduites ou exprimant le shRNA contrôle. Ceci est visualisable par la co-localisation de l'Ape13-TAMRA (rouge) et de la β -arrestine 2-GFP (vert) qui présentent un marquage intracellulaire punctiforme (**Figure 14 B, D**). Cependant, l'internalisation induite par

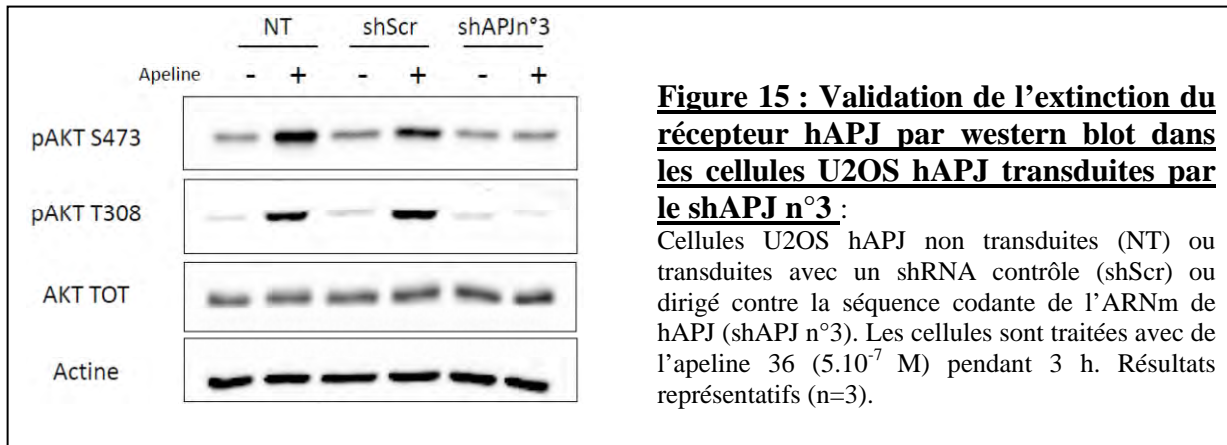
l'Ape13-TAMRA est perdue dans les cellules exprimant le shAPJ n°3. En effet, dans ces cellules nous n'observons plus de marquage lié à l'Ape13-TAMRA tandis que la β -arrestine 2-GFP reste diffuse dans l'ensemble du cytoplasme (**Figure 14 F**). Ainsi, ces résultats mettent en évidence que le shAPJ n°3 engendre l'extinction du récepteur dans ce modèle cellulaire surexprimant hAPJ. Les mêmes résultats sont obtenus avec le shAPJ n°4 (données non montrées).



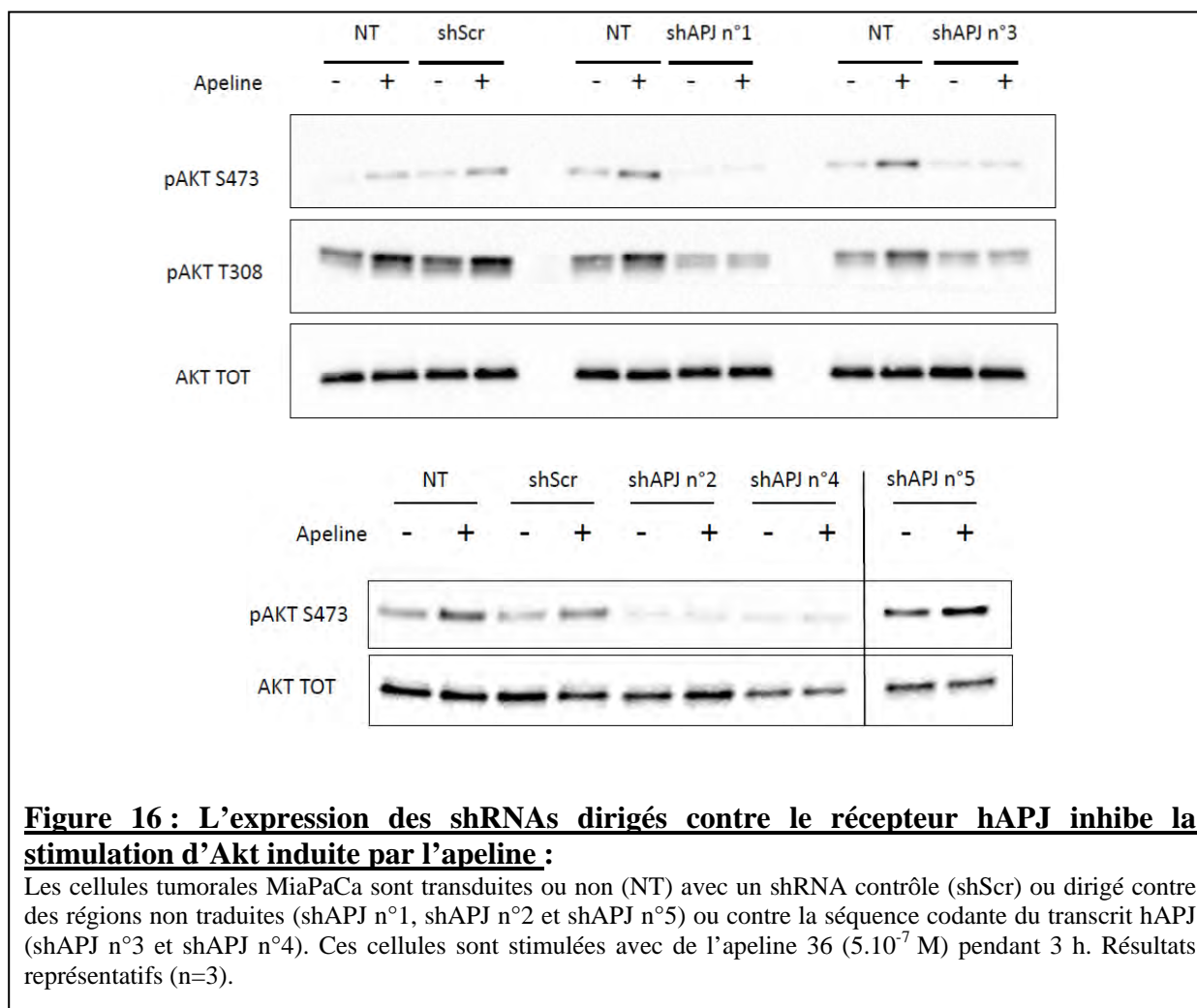
La perte d'expression du récepteur APJ dans les cellules transduites par le shAPJ n°3 a également été validée par l'analyse d'effecteurs intracellulaires clés activés en réponse à l'apeline. Pour cela, nous avons choisi d'étudier l'activation de la voie de signalisation PI3K/Akt qui est la plus soutenue. Ainsi, alors que l'apeline 36 induit la phosphorylation d'Akt dans les cellules non transduites (NT) et les cellules exprimant le shRNA contrôle (shScr), cette activation est perdue dans les cellules transduites avec le shAPJ n°3 (**Figure**

15). Les mêmes résultats sont obtenus avec les cellules transduites avec le shAPJ n°4 (données non montrées).

Ces deux approches valident que les shAPJ n°3 et shAPJ n°4 sont fonctionnels et inhibent l'expression de hAPJ.



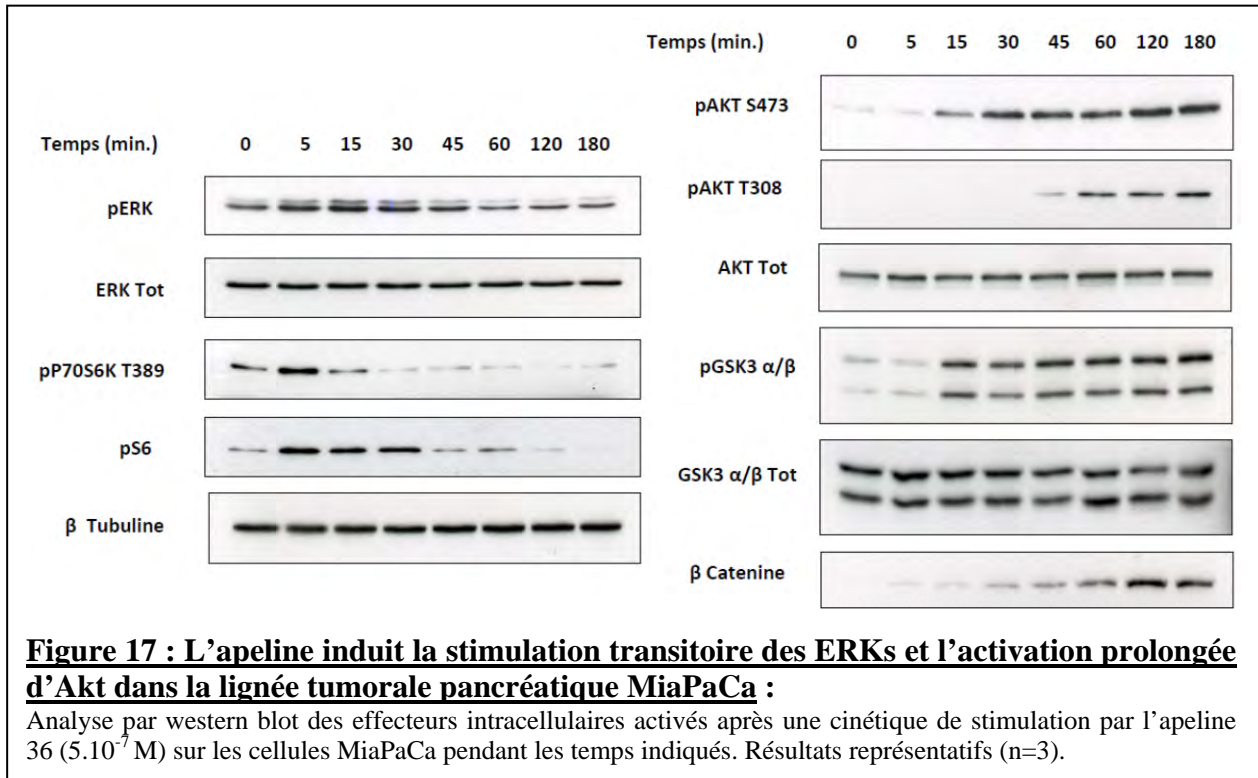
En parallèle, nous avons également transduit les 5 shRNAs ainsi que le shRNA contrôle dans les cellules tumorales MiaPaCa. Parmi les shRNAs n°1, n°2 et n°5 ciblant la région 3' non traduite, le shRNA n°1 a récemment été publié et engendre la perte d'expression d'APJ dans les cellules endothéliales HUVECs (Bai et al., 2014a). Nos résultats montrent que l'apeline active Akt dans les cellules MiaPaCa non transduites (NT) ou transduites avec le shRNA contrôle (shScr). En revanche, cette activation est perdue dans les cellules tumorales transduites avec les shAPJ n°1, n°2, n°3 et n°4 mais pas avec le shAPJ n°5 (**Figure 16**). Ces données valident donc que les cellules MiaPaCa expriment bien hAPJ et que les effets que nous observons sur ces cellules en réponse à l'apeline sont bien spécifiques et dépendants de hAPJ.



6) L'apeline active différentes cascades de transduction dans les cellules tumorales pancréatiques humaines MiaPaCa :

Afin de caractériser la fonction de la signalisation apeline dans les cellules tumorales pancréatiques, nous avons étudié les différents effecteurs activés par l'apeline dans les cellules MiaPaCa. En effet, cette lignée cellulaire exprime à la fois le ligand et le récepteur (cf figure 7) comme nous pouvons l'observer sur les coupes d'ADK chez l'Homme. Comme précédemment démontré par notre équipe sur des cellules CHO surexprimant le récepteur hAPJ, ainsi que sur des cellules endothéliales HUVECs exprimant APJ de manière endogène (Masri et al., 2004), l'apeline induit la stimulation transitoire des ERKs et de la P70S6K dans les cellules MiaPaCa. L'apeline induit également la phosphorylation de la protéine ribosomale S6, une cible directe de la P70S6K. De manière surprenante, l'apeline engendre l'activation

prolongée d'Akt, la phosphorylation inhibitrice d'une de ces cibles directe, la protéine GSK3, et elle permet également d'augmenter la quantité protéique de β -Caténine (**Figure 17**).



7) Caractérisation des voies de signalisation activées par l'apeline dans les cellules tumorales pancréatiques MiaPaCa :

Afin de caractériser l'implication de MEK et de la PI3K sur l'activation des effecteurs ERKs et Akt induite par l'apeline dans les cellules MiaPaCa, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de chacune de ces enzymes. Ainsi, l'inhibition de MEK avec le PD098059 et de la PI3K avec la wortmannine ou le LY294002 abrogent respectivement l'activation des ERKs (**Figure 18A**) et d'Akt induites par l'apeline (**Figure 18B**) impliquant MEK en amont des ERKs et la PI3K en amont d'Akt. De plus, nous avons également étudié l'effet de l'inhibiteur de MEK sur l'activation d'Akt, ainsi que l'effet des inhibiteurs de la PI3K sur l'activation des ERKs (données non montrées). Dans les deux cas, l'apeline active ces deux voies de signalisation de façon indépendantes l'une de l'autre dans les cellules tumorales MiaPaCa.

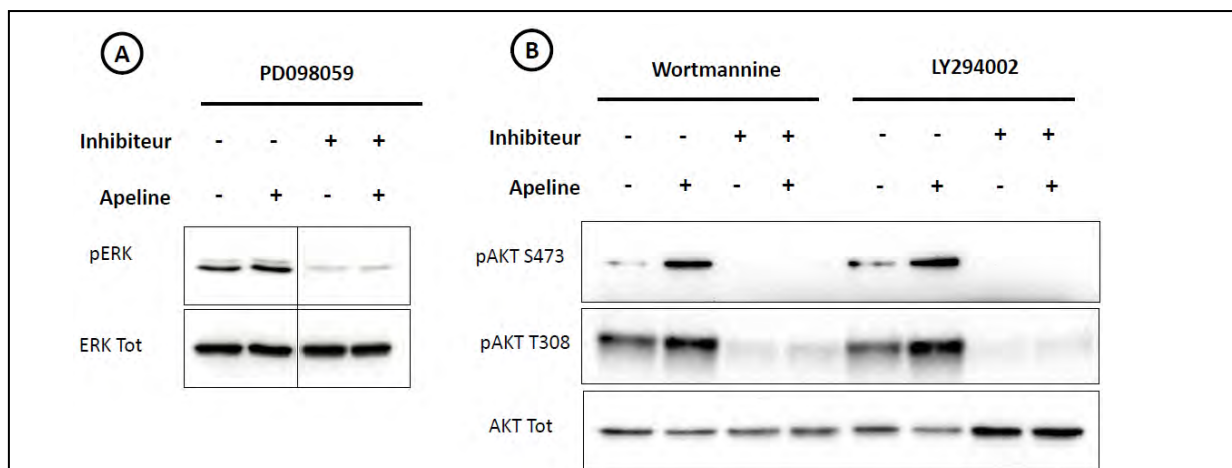


Figure 18 : Effets des inhibiteurs PD098059, wortmannine et LY294002 sur les effecteurs intracellulaires ERKs et Akt activés par l'apeline dans les cellules tumorales pancréatiques MiaPaCa :

A) Les cellules sont traitées avec l'inhibiteur de MEK (PD098059) à 20 μ M pendant 1 h puis stimulées par l'apeline 36 (5.10^{-7} M) pendant 15 min. B) Les cellules sont traitées avec la wortmannine (100 nM) ou le LY294002 (10 μ M) pendant 1 h puis stimulées par l'apeline 36 (5.10^{-7} M) pendant 3 h. Résultats représentatifs (n=2).

Suivant leur structure et leur substrat de préférence, les PI3K sont divisées en trois classes distinctes que sont la classe I, la classe II et la classe III. La classe I des PI3K est la mieux caractérisée à ce jour et comporte les isoformes α , β , δ (classe IA) et l'isoforme γ (classe IB). A l'origine, cette subdivision tenait en partie compte de la capacité de ces différentes isoformes à être activées par un récepteur à activité tyrosine kinase (classe IA) ou bien un RCPG (classe IB) (Vanhaesebroeck et al., 2010). Malgré leurs similarités de séquences et d'activité, le rôle de ces différentes isoformes n'est pas redondant (Vanhaesebroeck et al., 2005). Ce rôle isoforme-spécifique est retrouvé dans le cancer du pancréas. En effet, des travaux récents effectués sur un modèle murin récapitulant l'ADK (souris K-RAS et KPC) montrent que l'inactivation spécifique de l'isoforme α , mais pas de l'isoforme β , est suffisante pour bloquer l'initiation et la progression tumorale (Baer et al., 2014). D'autre part, une autre étude montre que l'isoforme γ participerait également à la progression de l'ADK. En effet, cette isoforme est surexprimée dans la tumeur par rapport au tissu sain adjacent et son inhibition spécifique *in vitro* entraîne une diminution de la prolifération des cellules tumorales (Edling et al., 2010).

Compte tenu de ces rôles différentiels, nous avons caractérisé plus précisément les isoformes de PI3K activées par l'apeline dans les cellules tumorales pancréatiques. Pour ce faire, nous avons utilisé des inhibiteurs spécifiques de chaque isoforme nommés A66S pour

l'isoforme α , TGX-221 pour l'isoforme β , IC-87114 pour l'isoforme δ et AS-252424 pour l'isoforme γ . Le prétraitement de nos cellules avec ces inhibiteurs montre que seuls les inhibiteurs A66S et AS-252424 bloquent l'activation d'Akt induite par l'apeline. Ainsi, l'apeline active Akt de manière dépendante des isoformes α et γ des PI3K dans les cellules tumorales MiaPaCa (**Figure 19**). Par rapport au dogme établi concernant la classification des différentes isoformes de PI3K, l'implication de l'isoforme α en aval d'un RCPG pourrait être étonnante. Cependant, les connaissances actuelles montrent que certaines isoformes de la classe IA (α , β et δ) peuvent également être activées en aval d'un RCPG (Vanhaesebroeck et al., 2010). En ce sens, les travaux de Wang et De Fea mettent en évidence que *via* son interaction avec la β -arrestine, la PI3K α peut être recrutée et directement régulée par le récepteur couplé aux protéines G, PAR-2 (Protease-Activated Receptor-2) (Wang and DeFea, 2006).

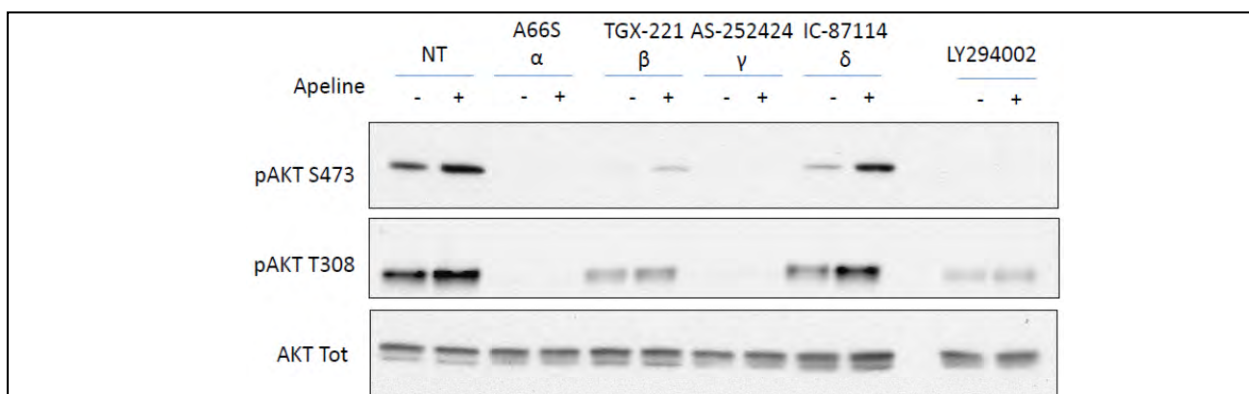


Figure 19 : L'apeline induit l'activation d'Akt de manière dépendante des isoformes α et γ des PI3K :

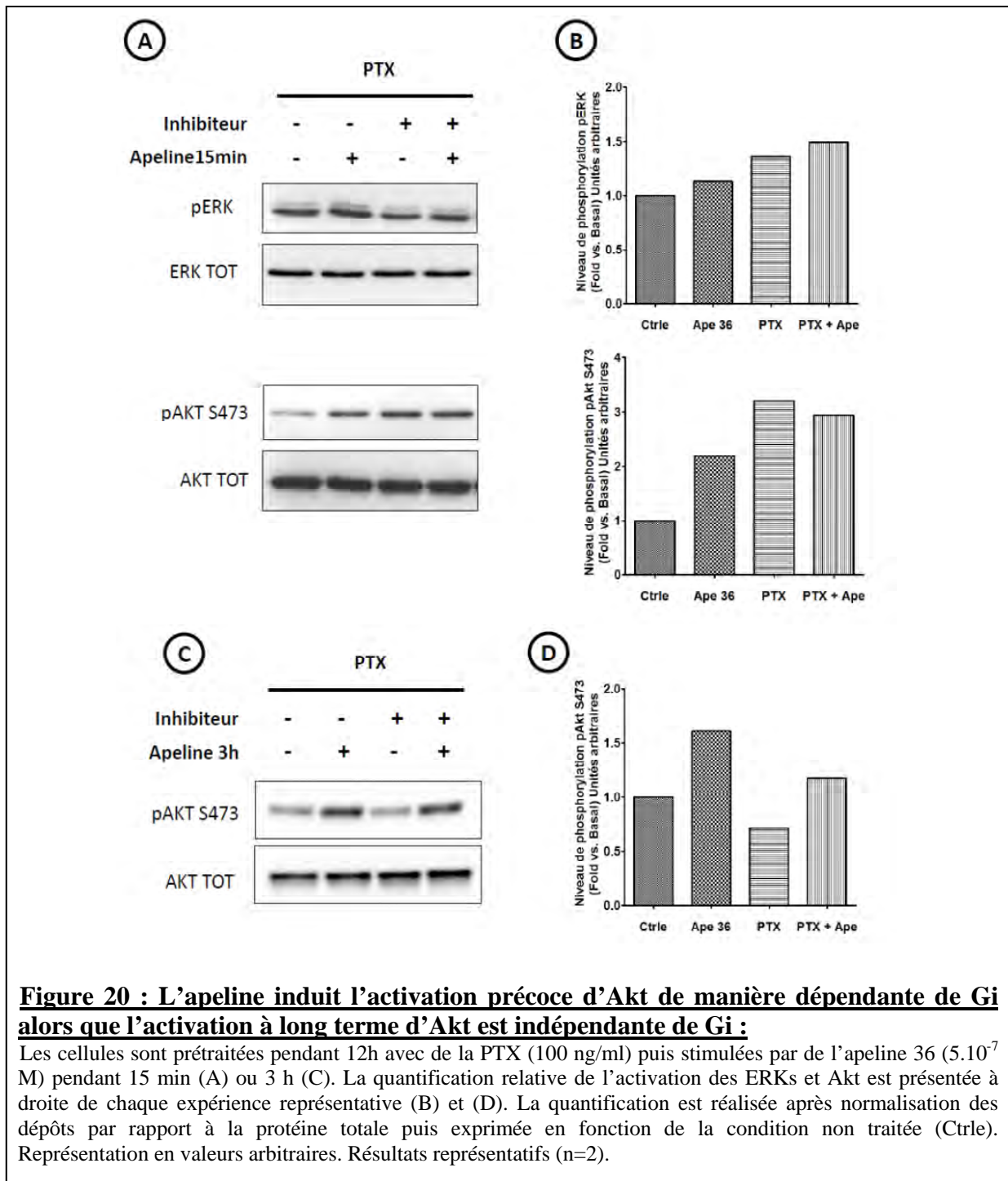
Les cellules sont traitées pendant 1 h avec 700 nM de A66S, 500 nM de TGX-221, 100 nM de AS-252424, 5 μ M de IC-87114 ou 10 μ M de LY294002 puis stimulées par l'apeline 36 (5.10^{-7} M) pendant 3 h. Résultats représentatifs (n=3).

8) L'apeline induit l'activation précoce des ERKs et d'Akt de manière préférentiellement dépendante de la protéine Gi alors que l'activation à long terme d'Akt est indépendante de Gi mais dépendante de l'internalisation du récepteur :

Le récepteur APJ appartient à la famille des RCPGs et la plupart des voies de signalisation activées par l'apeline (MAPK, PI3K/Akt, P70S6K, AMPK) ont été décrites comme étant dépendantes de l'activation de la protéine Gi dans différents types cellulaires (Masri et al., 2004; Yue et al., 2010). Cependant, des travaux récents montrent que certains

effets fonctionnels de l'apeline, tel que son effet vasodilatateur, sont indépendants des protéines G mais seraient dépendants de l'internalisation du récepteur (Ceraudo et al., 2014).

Nous avons précédemment observé que l'apeline induit l'activation précoce et transitoire des ERKs et stimule de manière durable Akt dans les cellules tumorales MiaPaCa. Ainsi, afin d'étudier la contribution des protéines G dans l'activation de ces effecteurs dans les cellules tumorales pancréatiques, nous avons réalisé des essais de stimulation par l'apeline en présence ou non de *pertussis toxin* (PTX). La PTX permet d'inhiber spécifiquement l'interaction des protéines $G_{i/o}$ avec leur récepteur en ADP ribosylant les sous-unités $G\alpha_i$ et $G\alpha_o$. Ainsi, nos résultats montrent que le prétraitement des cellules par la PTX, abrogerait l'activation précoce (15 minutes) d'Akt (perte de 100% de l'effet) et inhiberait partiellement la stimulation des ERKs (perte de 30% de l'effet) induite par l'apeline (**Figure 20A et B**). En revanche, l'activation à long terme (3 heures) d'Akt ne semble pas affectée par ce traitement (**Figure 20C et D**). Ainsi, nos résultats préliminaires révèlent que l'apeline induirait l'activation précoce des ERKs et Akt en partie de manière dépendante des protéines G_i alors que l'activation plus tardive d'Akt serait liée à un mécanisme insensible à la PTX et serait donc indépendante des protéines G. Ces expériences devront cependant être reproduites afin de confirmer cette dichotomie de signalisation.



Compte tenu de l'activation d'Akt à long terme, de son indépendance vis-à-vis de la protéine $G_{i/o}$ et de l'internalisation rapide du récepteur APJ, nous avons émis l'hypothèse d'une activation dépendante du processus d'internalisation et de la β -arrestine. En effet, suite à sa stimulation par l'apeline, le récepteur APJ interagit avec les β -arrestines 1 et 2 qui régulent son internalisation (Chen et al., 2014; Evans et al., 2001; Lee et al., 2010; Messari et al., 2004; Zhou et al., 2003b). En plus de leur rôle dans la désensibilisation et l'internalisation

des récepteurs, les β -arrestines fonctionnent comme des protéines d'échafaudage. En effet, au cours du processus d'internalisation du récepteur, les β -arrestines peuvent également recruter différents effecteurs tels que la PI3K (Wang and DeFea, 2006) ou encore des acteurs de la voie MAPK (MEK, ERK) (Luttrell et al., 2001) permettant ainsi de maintenir ou de générer une nouvelle transduction du signal au niveau intracellulaire. Ces arguments pourraient expliquer l'activation à long terme d'Akt et son indépendance vis-à-vis des protéines Gi. Aussi, afin d'évaluer la contribution du processus d'internalisation dans l'activation d'Akt, nous avons stimulé les cellules tumorales pancréatiques avec de l'apeline en présence ou non de concanavaline A, de sucrose ou de cyclodextrine. La concanavaline A, une lectine ayant une forte affinité pour les sucres présents sur les protéines membranaires, ainsi que l'utilisation de sucrose, induisant l'hypertonie du milieu, bloquent l'internalisation dépendante des puits de clathrine. La 2 hydroxypropyl- β -cyclodextrine (cyclodextrine) quant à elle agit via l'extraction du cholestérol membranaire et inhibe plus spécifiquement l'internalisation dépendante des microdomaines (cavéoles, rafts) (Benmerah and Lamaze, 2002; Rodal et al., 1999). Alors que la cyclodextrine n'a pas d'impact sur l'activation d'Akt, le prétraitement des cellules tumorales avec la concanavaline A ou le sucrose provoque l'inhibition de la phosphorylation d'Akt induite par l'apeline (**Figure 21**). Ainsi, ces résultats mettent en évidence que l'activation à long terme d'Akt induite par l'apeline dans les cellules MiaPaCa nécessite l'internalisation du récepteur APJ.

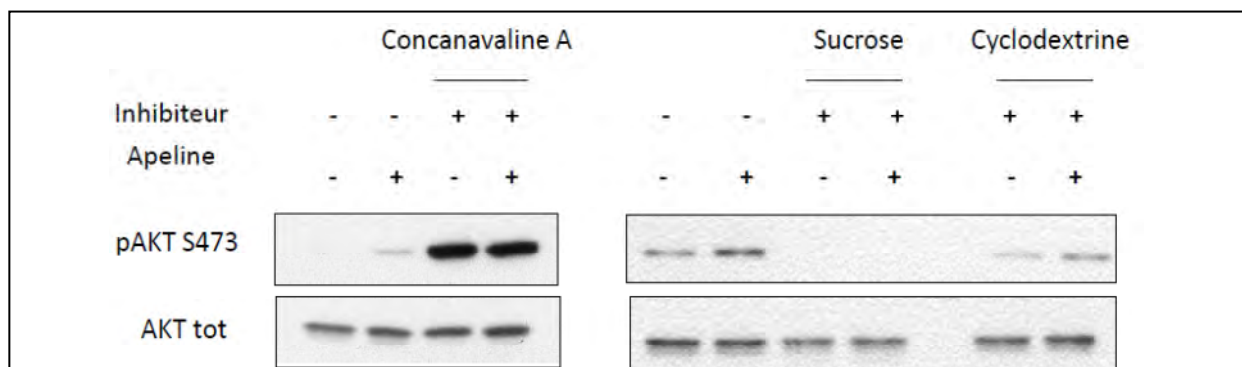


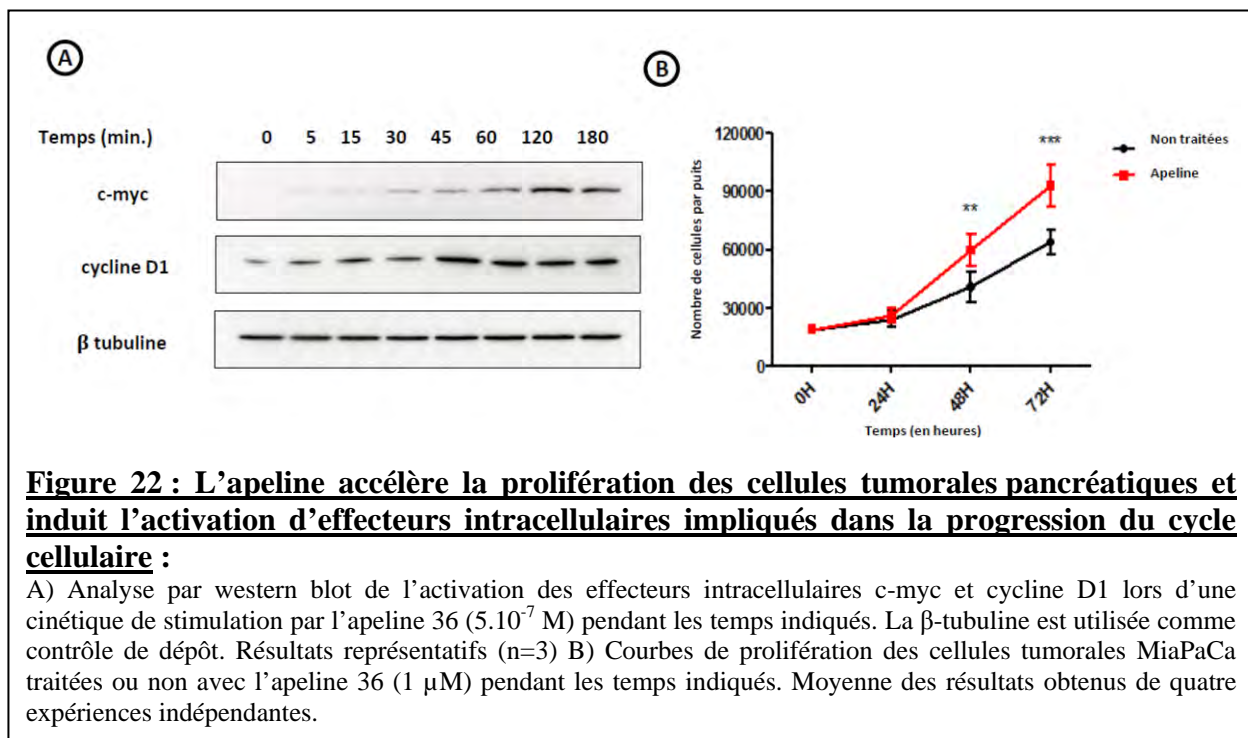
Figure 21 : L'activation soutenue d'Akt est dépendante de l'internalisation clathrine dépendante du récepteur hAPJ dans les cellules tumorales MiaPaCa :

Les cellules sont prétraitées 1 h avec la concanavaline A (100 μ g/ml), le sucrose (0.4 M) ou la cyclodextrine (20 mg/ml) puis stimulées avec de l'apeline 36 (5.10^{-7} M) pendant 3 h. Résultats représentatifs (n=3).

9) L'apeline accélère la prolifération des cellules tumorales pancréatiques MiaPaCa :

De nombreux travaux mettent en évidence que l'apeline exerce une activité mitogène dans différents types cellulaires via l'activation des voies MAPK et/ou PI3K/Akt (Masri et al., 2004; Qin et al., 2013; Tang et al., 2007; Wang et al., 2004). Compte tenu de ces données de la littérature et de nos résultats montrant l'activation des effecteurs intracellulaires ERKs et Akt dans les cellules tumorales pancréatiques, nous avons caractérisé le potentiel prolifératif de l'apeline sur ces cellules.

Dans les cellules MiaPaCa, l'apeline stimule au cours du temps l'expression d'effecteurs impliqués dans le cycle cellulaire. En effet, on observe l'augmentation progressive de la quantité protéique de c-myc (dès 5 minutes de stimulation) dont la surexpression est associée à la progression dans le cycle cellulaire, et de cycline D1 (dès 45 minutes) régulant positivement la transition G1/S (**Figure 22A**). En accord avec ces résultats, nous mettons en évidence que la prolifération des cellules tumorales MiaPaCa est significativement accélérée dès 48h de stimulation par l'apeline (**Figure 22B**).



10) L'apeline induit la migration et la capture du glucose dans les cellules tumorales pancréatiques :

Parmi les nombreuses fonctions cellulaires exercées par l'apeline, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à ses capacités migratoires et de capture du glucose, des propriétés importantes participant à la progression tumorale. A cette fin, nous avons réalisé des essais en chambre de Boyden où la migration des cellules tumorales est quantifiée après leur passage au travers d'une membrane poreuse. Nos résultats mettent en évidence que l'apeline stimule la migration des cellules tumorales MiaPaCa (1.6 fois plus) par rapport à la condition non traitée (**Figure 23**).

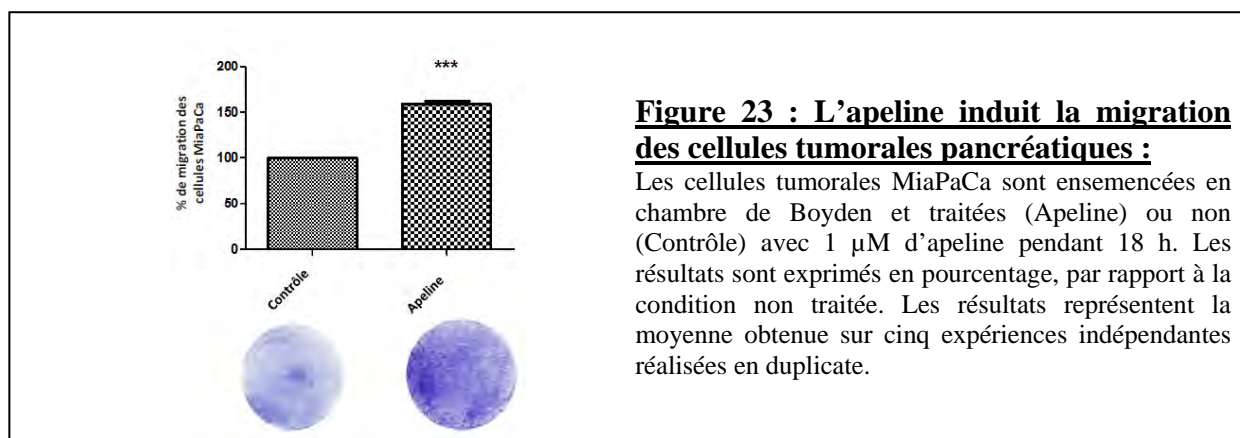


Figure 23 : L'apeline induit la migration des cellules tumorales pancréatiques :

Les cellules tumorales MiaPaCa sont ensemencées en chambre de Boyden et traitées (Apeline) ou non (Contrôle) avec 1 μ M d'apeline pendant 18 h. Les résultats sont exprimés en pourcentage, par rapport à la condition non traitée. Les résultats représentent la moyenne obtenue sur cinq expériences indépendantes réalisées en duplicate.

D'autre part, une des fonctions physiologique majeure de l'apeline porte sur son rôle régulateur du métabolisme énergétique. En effet, l'apeline stimule notamment le transport du glucose par les adipocytes, les entérocytes ou encore les myocytes (Attané et al., 2011; Dray et al., 2008, 2013). Compte tenu de la forte dépendance des cellules tumorales à l'apport énergétique fourni par la glycolyse, nous avons caractérisé l'effet de l'apeline sur le transport du glucose dans les cellules tumorales MiaPaCa. Ainsi, après 24 heures de traitement, l'apeline augmente significativement la capture du glucose dans ces cellules (1.12 fois) par rapport à la condition non traitée. Comme contrôle positif, nous avons utilisé l'insuline qui a précédemment été décrite comme induisant la capture du glucose dans cette même lignée tumorale pancréatique (Ding et al., 2000). L'insuline permet de doubler la capacité de capture du glucose par les cellules tumorales pancréatiques (**Figure 24A**). De manière intéressante, l'induction de la capture du glucose dans les cellules MiaPaCa en réponse à l'apeline corrèle avec nos résultats révélant que l'apeline induit également l'augmentation protéique de l'Hexokinase 2. En effet, le traitement des cellules tumorales par l'apeline provoque

l'accumulation de cette enzyme qui catalyse la transformation du glucose en glucose-6-phosphate et permet d'assurer le maintien d'un fort flux glycolytique intracellulaire (**Figure 24B**). Le faible effet de l'apeline sur la capture du glucose comparé à l'effet de l'insuline pourrait être dû à l'expression conjointe de l'apeline et de son récepteur par les cellules MiaPaCa et l'activation constante de cette voie de signalisation (boucle autocrine). Il sera donc intéressant de regarder l'effet de la perte d'expression d'APJ dans nos cellules sur la capture de glucose au niveau basal, par l'utilisation des cellules exprimant les shRNA APJ, ainsi que sur des cellules MiaPaCa non transduites traitées avec un antagoniste d'APJ. De même, l'effet de l'apeline exogène pourrait être amplifié dans des cellules MiaPaCa n'exprimant plus l'apeline de manière endogène (MiaPaCa exprimant un shRNA dirigé contre l'apeline).

De manière intéressante, l'apeline possède un rôle insulinosensibilisant (Attané et al., 2012; Dray et al., 2008; Higuchi et al., 2007; Yue et al., 2010) et permet d'obtenir un effet additif au transport du glucose induit par l'insuline dans le muscle et le tissu adipeux (Dray et al., 2008; Zhu et al., 2011). Ainsi, compte tenu de la proximité des îlots de Langerhans et des cellules isolées de phénotype endocrine pouvant sécréter de l'insuline à proximité des cellules tumorales, il sera intéressant de réaliser la co-stimulation des cellules tumorales avec de l'apeline et de l'insuline afin d'en évaluer les conséquences sur le transport du glucose.

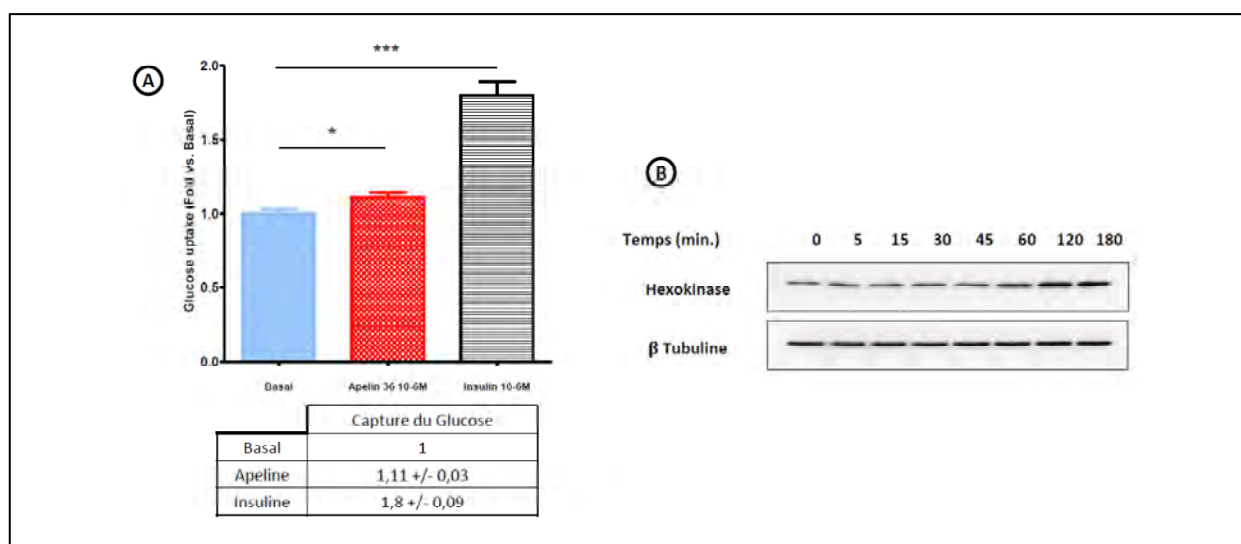


Figure 24 : L'apeline stimule la captation du glucose et augmente l'expression protéique de l'Hexokinase 2 dans les cellules tumorales pancréatiques MiaPaCa :

A) L'effet de l'apeline sur la capture du glucose est mesuré en utilisant du 2-deoxy-D glucose tritié. Les cellules sont traitées avec de l'apeline (1 μ M) ou de l'insuline (1 μ M) pendant 24 h. Les données sont présentées par rapport à la condition non traitée. B) Analyse par western blot de la quantité protéique d'Hexokinase 2 lors d'une cinétique de stimulation par l'apeline 36 ($5 \cdot 10^{-7}$ M) pendant les temps indiqués. Résultats représentatifs de 3 expériences indépendantes.

CONCLUSION :

Au cours de mes travaux de thèse nous avons pour la première fois pu mettre en évidence l'expression protéique du récepteur APJ au niveau des cellules endocrines α et β des îlots de Langerhans dans le tissu pancréatique sain. D'autre part, l'étude de l'expression du couple apeline/APJ sur une cohorte de 49 patients atteints d'ADK révèle que leur expression est très fréquemment retrouvée au niveau des cellules tumorales (apeline dans 98% des cas et APJ dans 82% des cas). De plus, l'étude de leur localisation spatio-temporelle *via* l'utilisation des modèles murins K-RAS et KPC montre que le couple ligand/récepteur est exprimé très précocement dès le stade PanIN 1 et ce tout au long de la carcinogenèse. Ainsi, l'apeline et APJ sont co-exprimés par les cellules tumorales et ceci laisse supposer l'existence d'une boucle autocrine. La caractérisation de la fonction de la signalisation apeline dans ce contexte a été réalisée sur les cellules tumorales pancréatiques MiaPaCa. L'étude des cascades de transduction activées par l'apeline dans ces cellules montre la stimulation transitoire des ERKs, l'activation à long terme d'Akt ainsi que la phosphorylation inhibitrice de GSK3 stabilisant ainsi la β -Caténine. L'activation précoce des ERKs et d'Akt serait préférentiellement dépendante de la protéine Gi. D'autre part, l'activation à long terme d'Akt est insensible à la PTX et donc indépendante de la protéine Gi, mais dépendante de l'internalisation du récepteur et de l'activation des isoformes α et γ des PI3K. De plus, l'apeline régule positivement la quantité protéique de c-myc et cycline D1 en accord avec l'effet prolifératif que nous observons sur les cellules tumorales. Par une approche en chambre de Boyden nous avons également pu mettre en évidence que l'apeline stimule la migration des cellules tumorales. Dans ces cellules, l'apeline stimule le transport du glucose et ce en accord avec nos résultats révélant l'augmentation protéique d'une enzyme clé de la glycolyse, l'Hexokinase 2. Celle-ci joue un rôle majeur dans le maintien d'un fort flux glycolytique, essentiel pour subvenir aux besoins énergétiques de la cellule tumorale. Ainsi, l'ensemble de ces résultats démontre que la signalisation apeline possède un rôle pro-tumoral dans les cellules tumorales pancréatiques et pourrait ainsi contribuer à la progression tumorale dans le contexte de l'ADK.

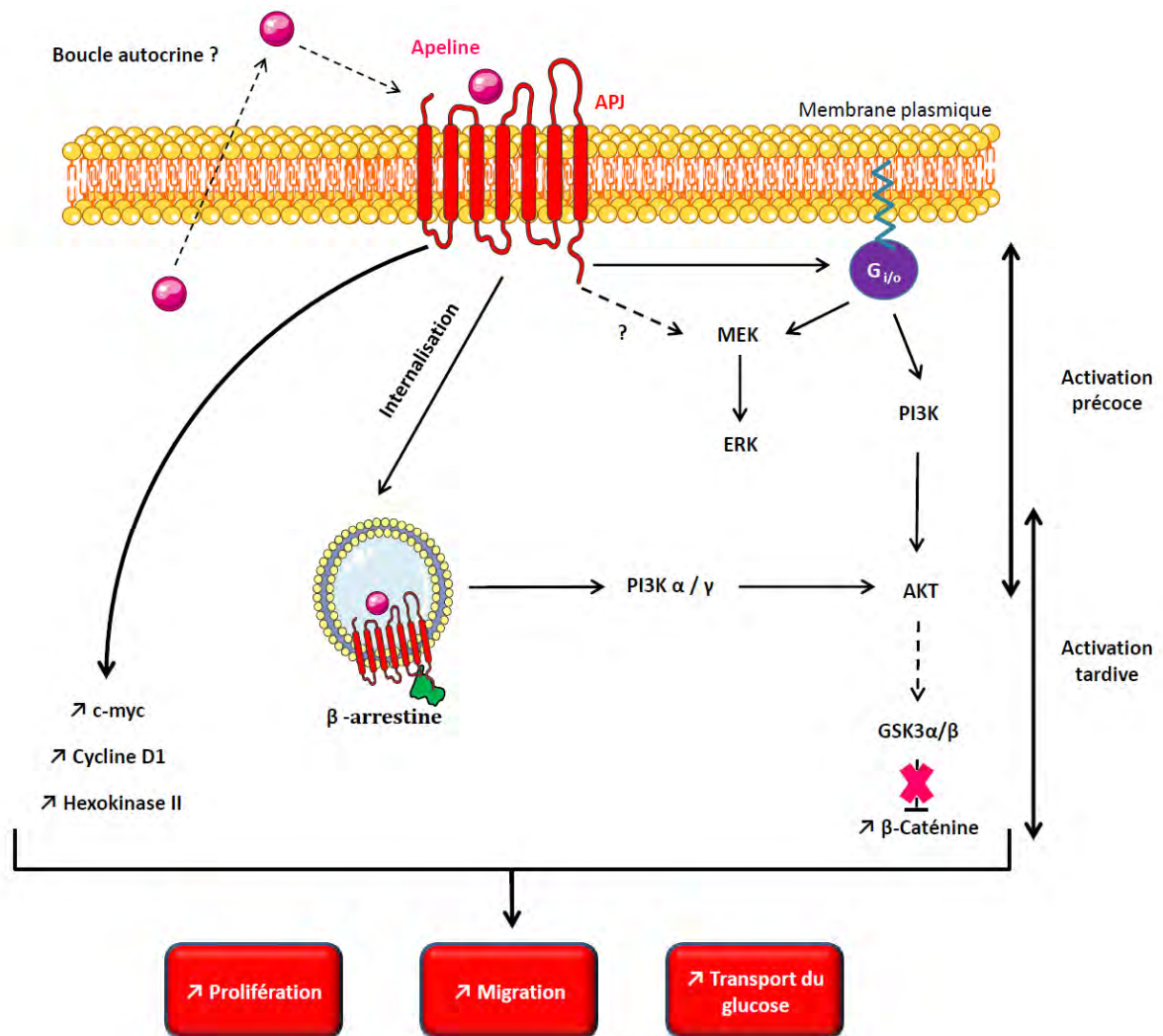


Schéma bilan de la caractérisation de la signalisation apeline dans les cellules tumorales pancréatiques humaines MiaPaCa.

- - - : Interactions supposées mais non démontrées

DISCUSSION ET PERSPECTIVES :

L'observation de la surexpression du gène de l'apeline dans 2/3 des ADK (Sorli et al., 2007) a constitué le point de départ de mon projet de thèse et nous a amené à étudier l'expression spatio-temporelle de l'apeline et de son récepteur dans le pancréas au cours de la carcinogenèse pancréatique. Cette étude a donc été réalisée afin de caractériser le rôle de la signalisation apeline et la nature des régulations mises en place au cours de l'ADK.

Dans un premier temps, nous nous sommes tout d'abord intéressés à caractériser l'expression de l'apeline et d'APJ dans le tissu pancréatique sain. Comme précédemment démontré par Ringström et coll., nos données immunohistochimiques confirment l'expression de l'apeline dans les sous-populations cellulaires α et β des îlots de Langerhans (Ringström et al., 2010). De plus, nous démontrons pour la première fois la présence protéique du récepteur APJ spécifiquement dans ces mêmes cellules α et β . Ainsi, grâce aux co-marquages réalisés nous mettons en évidence une co-localisation à la fois du ligand et du récepteur dans ces cellules endocrines produisant l'insuline et le glucagon. Les connaissances actuelles montrent que la signalisation apeline participe à la régulation de l'homéostasie glucidique en stimulant la capture du glucose dans les tissus périphériques (muscles, tissu adipeux) mais également en inhibant la sécrétion d'insuline par les cellules β (Boucher et al., 2005; Dray et al., 2008; Ringström et al., 2010; Sörhede Winzell et al., 2005). Ces études réalisées sur des îlots de Langerhans isolés ou sur la lignée cellulaire d'insulinome de rat INS-1 se sont concentrées sur l'effet inhibiteur direct de l'apeline sur la sécrétion d'insuline au niveau de la cellule β . Cependant, nos observations montrent la présence du ligand et du récepteur APJ sur les cellules α et β . Compte tenu de la proximité de ces deux types cellulaires, nous pourrions envisager l'existence d'une régulation de type auto- et/ou paracrine induite par l'apeline qui pourrait contrôler l'homéostasie glucidique en agissant directement à la fois sur la sécrétion d'insuline et/ou du glucagon. Une telle communication intercellulaire paracrine a déjà été mise en évidence dans les îlots de Langerhans entre cellules α et β . En effet, l'insuline en agissant directement sur les cellules α voisines provoque l'inhibition de la sécrétion de glucagon (Jain and Lammert, 2009). De plus, parallèlement à cet effet auto- et/ou paracrine de l'apeline produite par les îlots, l'apeline produite et sécrétée par différents tissus de l'organisme (tissu adipeux, muscles) pourrait agir de manière endocrine et participer également à la régulation de l'homéostasie glucidique. Ainsi, il serait intéressant de caractériser la fonction de l'apeline sur les cellules α . Nous avons déjà pu observer que

l'apeline active les voies MAPK et PI3K/Akt dans des cellules de glucagonome de hamster (cellules INR1G9) (données préliminaires non montrées). A l'avenir, il sera donc intéressant de caractériser plus en détail les voies de signalisation activées par l'apeline mais également d'étudier ses effets sur la sécrétion de glucagon dans ces cellules. D'autre part, la signalisation apelinergique est également importante pour l'homéostasie du tissu endocrine puisqu'elle participe au maintien du nombre de cellules β dans le pancréas. En ce sens, la perte d'expression d'APJ spécifiquement dans le pancréas provoque la réduction du nombre et de la taille des îlots de Langerhans associée à une diminution de la densité de cellules β (Han et al., 2015). Confortant ce rôle bénéfique, des souris Akita, un modèle murin développant spontanément un diabète de type 1, présentent un ralentissement de la perte du tissu endocrine pancréatique après traitement par l'apeline (Chen et al., 2011). Ainsi, associé à son effet hypoglycémiant et insulinosensibilisant, ces données font de la signalisation apeline une cible thérapeutique attractive pour le diabète.

Suite à l'étude du tissu pancréatique sain, nous avons caractérisé l'expression du couple apeline/APJ sur une cohorte de 49 patients atteints d'ADK. Chez ces patients présentant des stades avancés, notre étude révèle l'expression très fréquente de l'apeline (98% des cas) et du récepteur APJ (82% des cas) par les cellules tumorales pancréatiques. Ceci laisse supposer que l'expression du couple ligand/récepteur pourrait constituer un évènement généralisable lors du développement de l'ADK. Afin d'étudier leur cinétique d'expression au cours de la progression tumorale, nous avons utilisé deux modèles murins (souris K-RAS et KPC) récapitulant les différents stades de la carcinogenèse pancréatique. La caractérisation du profil d'expression de l'apeline dans ces modèles révèle qu'elle est exprimée par les cellules constituant les PanINs dès le premier stade préneoplasique (PanIN1) et tout au long de la carcinogenèse. D'autre part, alors que le récepteur est exprimé par l'ensemble des cellules tumorales dans les stades avancés, son expression est particulièrement intense au niveau de cellules isolées bordant les lésions préneoplasiques. Ces cellules de phénotype endocrine isolées ont déjà été décrites dans le tissu sain, la pancréatite et l'ADK chez l'Homme. Cependant leur origine et leur fonction restent encore inconnues à ce jour (Schmied et al., 2001). Les auteurs suggèrent que ces cellules pourraient participer de manière paracrine à la prolifération des cellules tumorales adjacentes par la sécrétion de facteurs mitogènes tels que l'insuline. L'insuline ainsi que d'autres facteurs sécrétés par ces cellules isolées pourraient réguler positivement l'expression d'apeline par les cellules des PanINs comme cela a été mis en évidence dans les adipocytes. En plus du rôle prolifératif de l'apeline observé sur les

cellules tumorales pancréatiques, on peut supposer que l'apeline sécrétée par les cellules des PanINs pourrait également contribuer de manière paracrine à la prolifération et/ou au maintien de cette population cellulaire de phénotype endocrine. Nous pouvons ainsi imaginer que la signalisation apeline participerait à un dialogue entre les cellules tumorales et ces cellules isolées. D'autre part, compte tenu du phénotype de ces cellules isolées, nous pouvons suggérer qu'elles pourraient résulter d'un îlot de Langerhans pris dans une lésion. Cette dernière hypothèse doit cependant être nuancée. En effet, les îlots de Langerhans présents dans le tissu sain et dans l'ADK co-expriment APJ et l'insuline ou le glucagon. Cependant, dans la tumeur nous observons que les cellules isolées co-expriment APJ et l'insuline ou le glucagon ou également la somatostatine (données préliminaires non montrées). Ainsi, malgré leur phénotype endocrine commun, ces cellules pourraient potentiellement avoir une origine différente.

Nos travaux réalisés par IHC chez l'Homme ne permettent pas de mettre en évidence l'existence d'une corrélation entre l'expression de l'apeline ou d'APJ avec le grade ou le stade des tumeurs. Cependant, Lacquaniti et coll. montrent que l'apelinémie corrèle positivement avec la progression tumorale et la diminution de la survie des patients dans différents types de cancers (Lacquaniti et al., 2015). Ainsi, afin d'établir l'existence d'une corrélation potentielle, il sera intéressant d'augmenter la taille de la cohorte considérée et de doser l'apelinémie d'une part, chez des patients atteints d'ADK ainsi que sur les animaux K-RAS et KPC au cours des différentes étapes de la carcinogenèse. Il faudra dans ce cas prendre en considération que de grandes variabilités sont observées avec les kits de dosage commerciaux disponibles et également que ceux-ci ne permettent pas de différencier les formes d'apeline présentes. De plus, la sélection des patients devra tenir compte du fait que de nombreux paramètres physiopathologiques (diabète, obésité) peuvent réguler l'apelinémie, ce qui pourrait induire une surestimation du taux d'apeline plasmatique. Il serait également intéressant d'étudier le profil d'expression de l'apeline dans d'autres pathologies, tumorales (autres carcinomes pancréatiques, tumeurs neuroendocrines) ou non (pancréatite aigue ou chronique, héréditaire ou non) affectant le tissu pancréatique. Han et coll. montrent notamment que l'expression de l'apeline et du récepteur est augmentée au niveau ARNm dans la pancréatite aigue et chronique. Dans ce contexte, la signalisation apeline jouerait un rôle protecteur, anti-fibrotique en diminuant la prolifération des stellate cells et leur production de matrice extracellulaire. De plus, elle aurait également une action anti-inflammatoire *via* la diminution de l'infiltration de cellules immunitaires et de l'activation de la voie NF- κ B (Han et al., 2013). Alors que l'augmentation du système apelinergique représenterait un mécanisme

compensatoire visant à freiner l'évolution de la pancréatite, à l'inverse nos résultats montrent que l'apeline pourrait promouvoir la progression tumorale dans l'ADK. Ainsi, le rôle de l'apeline semble dépendant du contexte cellulaire et pourrait être dérégulé par l'accumulation de mutations (activation d'oncogènes et perte de suppresseurs de tumeur) ou par le microenvironnement tumoral de l'ADK. Ce contexte pourrait donc influencer sur le niveau d'expression, le type d'apeline produite et sécrétée et par conséquent modifier les réponses cellulaires induites par l'apeline.

L'apeline et son récepteur sont exprimés au cours de la carcinogenèse pancréatique. Cependant, les facteurs régulant leur expression restent encore à déterminer. En ce sens, les informations recueillies dans la littérature laissent supposer que le maintien de conditions inflammatoires et hypoxiques, comme dans le cas de l'ADK, pourrait influencer positivement sur leur expression. En effet, l'expression de l'apeline est positivement régulée par des cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- α (Daviaud et al., 2006) ou encore l'IL-6 (Han et al., 2008a) qui sont impliquées dans la progression tumorale pancréatique (Li et al., 2012a). Mais l'expression d'apeline et d'APJ est également positivement régulée directement et/ou indirectement par l'hypoxie (Cox et al., 2006; Eyries et al., 2008; Han et al., 2008b; Ronkainen et al., 2007), une composante importante de l'environnement tumoral pancréatique (Diaz and Yuen, 2014), et par les facteurs angiogéniques VEGF et FGF2 (Kidoya et al., 2008; del Toro et al., 2010), surexprimés dans l'ADK (Coleman et al., 2014; Itakura et al., 1997). D'autre part, l'insuline stimule également l'expression du couple ligand/récepteur (Boucher et al., 2005; Dray et al., 2010). De ce fait, nous pouvons supposer que la proximité des îlots de Langerhans ainsi que la présence de cellules de phénotype endocrine en bordure de PanINs pourraient également induire leur expression dans les cellules tumorales. L'ensemble de ces facteurs, ainsi que l'activation d'oncogènes ou la perte de suppresseurs de tumeurs pourraient agir de manière directe et/ou indirecte sur l'expression d'apeline et d'APJ. Cependant, la comparaison du génotype des lignées tumorales MiaPaCa et BxPC3 qui expriment le plus de transcrits apeline et APJ suggère que l'oncogène K-RAS ne serait pas impliqué. En effet, à la différence des cellules MiaPaCa, les cellules BxPC3 expriment la protéine K-RAS sauvage (Deer et al., 2010). De manière plus générale, nous n'avons pas pu observer de lien entre la perte d'un suppresseur de tumeur et l'expression d'apeline et d'APJ dans les différentes lignées tumorales testées. Ainsi, l'identification de l'origine de l'expression d'apeline et d'APJ dans l'ADK nécessite de plus amples investigations.

Nos travaux ne permettent pas d'identifier si l'expression du système apelinergique est une cause ou bien une conséquence du développement de l'ADK. Afin de répondre à cette

question il serait intéressant de croiser des souris K-RAS avec des souris invalidées pour le récepteur APJ (KO APJ) spécifiquement dans le pancréas. Ainsi, nous pourrions étudier les conséquences de la perte de la signalisation apeline sur l'initiation et/ou la progression tumorale pancréatique.

Les cellules tumorales exprimant l'apeline et APJ, ceci laisse supposer la possibilité d'une signalisation de type auto- et/ou paracrine pouvant avoir des conséquences sur le développement tumoral lui-même. L'effet paracrine de l'apeline a déjà été mis en évidence dans un contexte physiologique, au niveau des cellules gastriques (Lambrecht et al., 2006) ainsi que dans un contexte pathologique par l'utilisation de cellules tumorales n'exprimant pas APJ mais surexprimant l'apeline (Berta et al., 2010, 2014; Sorli et al., 2006, 2007). Ainsi, dans des modèles murins de greffes et xéno greffes sous-cutanées, l'apeline agit sur le compartiment vasculaire de l'hôte en tant que facteur angiogénique et lymphangiogénique et favorise la croissance tumorale. De plus, notre équipe a également mis en évidence l'existence d'une boucle autocrine dans le contexte du cancer du colon où l'apeline participe à la prolifération des cellules tumorales coliques (Picault et al., 2014).

Afin de tester l'existence et les effets cellulaires induits par une signalisation auto et/ou paracrine, nous avons recherché des lignées tumorales pancréatiques exprimant de manière endogène le récepteur APJ. Ces investigations, menées au niveau ARNm ont permis de mettre en évidence la présence du récepteur à des niveaux très faibles et variables dans l'ensemble des lignées tumorales testées. Ceci est en accord avec les marquages obtenus en IHC sur les coupes de pancréas où nous pouvons observer un faible marquage du récepteur au niveau des cellules tumorales. Nous avons analysé l'expression du ligand dans ces lignées et celles-ci expriment également le gène de l'apeline à des niveaux variables. Cependant, la validation au niveau protéique du récepteur exprimé de manière endogène dans ces lignées demeure un problème technique. Le niveau d'expression étant très faible, nous nous heurtons probablement aux limites de détection des différentes méthodes utilisées. Comme mentionné précédemment, l'hypoxie est une composante importante de l'ADK et celle-ci possède une action stimulatrice sur l'expression du couple ligand/récepteur dans différents modèles cellulaires (Cox et al., 2006; Eyries et al., 2008; Han et al., 2008b; Ronkainen et al., 2007). Ainsi, afin de se rapprocher des conditions présentes dans l'ADK, il serait intéressant d'étudier l'effet de l'hypoxie sur les cellules tumorales pancréatiques et d'en caractériser les conséquences, sur la quantité (transcrits et protéines) d'apeline et APJ, et sur les effets cellulaires induits par cette signalisation dans ces conditions.

La présence du récepteur dans les lignées cellulaires a été caractérisée de manière indirecte par l'étude des cascades de transduction MAPK et PI3K/Akt décrites comme étant fréquemment activées en aval d'APJ par l'apeline. Nous avons ainsi pu mettre en évidence qu'une stimulation par l'apeline 36 induit l'activation précoce et transitoire des ERKs ainsi qu'une stimulation durable d'Akt dans l'ensemble des lignées testées. N'ayant pu mettre en évidence de manière directe l'expression protéique du récepteur dans ces cellules, nous avons généré des lignées tumorales exprimant de manière stable différents shRNAs dirigés contre le récepteur. Ainsi, nous avons pu valider que les effets observés après une stimulation par l'apeline sont bien dépendants de la présence du récepteur APJ et ne sont pas dus à la présence d'un autre récepteur qui pourrait être exprimé par ces lignées cellulaires et serait stimulé par l'apeline. Afin de poursuivre notre étude, nous avons choisi de nous focaliser sur la lignée tumorale MiaPaCa. En effet, cette lignée cellulaire représente un bon modèle d'étude car elle reflète les conditions retrouvées dans les cellules tumorales chez l'Homme et dans les modèles murins d'ADK qui co-expriment le ligand et le récepteur. Cependant, nous aurions pu utiliser une lignée n'exprimant potentiellement que le récepteur APJ de façon à s'affranchir du risque de désensibilisation du récepteur due à la présence de son ligand. En effet l'activation basale d'APJ par l'apeline endogène pourrait nous faire sous-estimer les effets que nous observons en réponse à un traitement par de l'apeline exogène. Ainsi, nous aurions pu réaliser notre étude sur les lignées cellulaires Capan-1 ou Capan-2. Cependant, malgré cette co-expression d'APJ et apeline (en ARNm), les cellules MiaPaCa présentent le même profil d'activation des cascades de transduction que les cellules U2OS surexprimant APJ et les cellules Capan-2 qui expriment APJ mais peu ou pas l'apeline.

Afin de comprendre la fonction de la signalisation apeline sur la cellule tumorale, notre approche a consisté à caractériser plus en détail les cascades de transduction activées ainsi que les effets cellulaires induits par l'apeline. Dans les cellules MiaPaCa, nous avons ainsi mis en évidence que l'apeline active les effecteurs ERKs, Akt et P70S6 kinase impliqués dans la prolifération cellulaire et la synthèse protéique. De plus, l'apeline induit l'augmentation rapide de la quantité protéique de cycline D1 qui régule la transition G1/S au cours du cycle cellulaire, et du proto-oncogène c-myc. C-myc induit la prolifération cellulaire *via* la stimulation de l'initiation de la traduction et la répression de la transcription des protéines kinase dépendantes des cyclines, P21 et P27 (Gordan et al., 2007). En accord avec l'activation de ces effecteurs, et comme cela a déjà été mis en évidence dans d'autres types cellulaires tels que les cellules endothéliales ou les ostéoblastes (Masri et al., 2004; Tang et

al., 2007), nous observons que l'apeline accélère la prolifération des cellules tumorales pancréatiques.

De plus, l'apeline induit la phosphorylation inhibitrice de la protéine GSK3, une cible directe d'Akt, et augmente la quantité protéique de β -Caténine. De manière plus générale, l'inhibition de la protéine GSK3 est associée à l'augmentation de la synthèse protéique, de la synthèse de glycogène et du transport de glucose suite à la translocation membranaire des transporteurs GLUT4 dans le muscle (Rayasam et al., 2009). En l'absence de sa phosphorylation par la protéine GSK3, la β -Caténine n'est pas dégradée par le protéasome et va se relocaliser au noyau où elle stimule l'expression d'effecteurs notamment impliqués dans l'invasion telles que les MMPs, ou encore dans la Transition Epithélio-Mésenchymateuse (TEM) tels que Twist et Slug, des facteurs de transcription inhibant l'expression de la E-cadhérine (Fu et al., 2011). Ainsi, ces données sont en accord avec les effets migratoires que nous observons sur les cellules tumorales MiaPaCa en réponse à l'apeline. De plus, des résultats préliminaires révèlent que l'apeline augmenterait la quantité protéique du facteur de transcription SNAIL également impliqué dans la TEM (données non montrées). De manière intéressante, le facteur de transcription SNAIL est exprimé dans 78% des ADKs et son expression est notamment négativement régulée par la protéine GSK3 (Hotz et al., 2007). En effet, GSK3 induit la phosphorylation de SNAIL et provoque son export nucléaire et sa dégradation au protéasome. Suite à l'activation d'Akt, l'inhibition de la protéine GSK3 permet ainsi de stabiliser SNAIL qui inhibe l'expression de la E-cadhérine et stimule l'expression de la N-cadhérine ainsi que de différentes MMPs (Lamouille et al., 2014). Les processus de migration, invasion et de TEM étant impliqués dans la progression tumorale et la formation de métastases, il serait intéressant de caractériser si la signalisation apeline module l'expression des cadhérines et des MMPs et pourrait ainsi jouer un rôle dans la dissémination métastatique dans l'ADK. En ce sens, Berta et coll. ont récemment mis en évidence que la greffe de cellules tumorales (cellules B16) surexprimant l'apeline mais n'exprimant pas le récepteur est suffisante pour augmenter le nombre de métastases au niveau des ganglions lymphatiques chez ces animaux. L'augmentation de la dissémination métastatique serait en partie liée à l'action pro-lymphangiogénique de l'apeline qui stimule la formation de vaisseaux lymphatiques au niveau intratumoral (Berta et al., 2014).

D'autre part, alors que les cellules tumorales pancréatiques possèdent un métabolisme glycolytique déjà élevé (Guillaumond et al., 2013), nous avons pu observer que l'apeline est capable d'augmenter le transport du glucose dans les cellules tumorales MiaPaCa et induit l'augmentation de la quantité protéique d'Hexokinase 2 (HK2). De manière intéressante, alors

que l'expression de l'HK2 est restreinte au tissu adipeux et aux muscles chez l'adulte, son expression est observée dans les cellules tumorales dans le cas du cancer du sein et du poumon où elle participe à l'initiation et au maintien de la tumeur (Patra et al., 2013). De plus, notamment *via* l'augmentation de la quantité protéique de c-myc, l'apeline pourrait participer au maintien du métabolisme énergétique intense de la cellule tumorale en stimulant l'entrée et l'utilisation du glucose et de la glutamine. En effet, c-myc possède un rôle stimulateur sur l'expression de différents transporteurs de glucose (GLUT1, GLUT2 et GLUT4) (Gordan et al., 2007) retrouvés exprimés dans l'ADK (Higashi et al., 1997). D'autre part, cet oncogène induit également l'expression de nombreuses enzymes de la glycolyse (HK2, phosphofructokinase (PFKM) et lactate dehydrogenase A (LDHA)) ainsi que d'enzymes impliquées dans le métabolisme de la glutamine telle que la glutaminase (GLS) (Dang et al., 2009). Ainsi, il sera intéressant d'étudier plus en détail l'effet de l'apeline sur le niveau d'expression protéique et l'activité de ces différents effecteurs (transporteurs de glucose et de la glutamine, enzymes de la glycolyse et de la glutaminolyse) et de caractériser la contribution de ces voies métaboliques à la prolifération ou la survie des cellules tumorales *in vitro* et à la progression tumorale *in vivo*.

La caractérisation des cascades de transduction et des effets cellulaires induits par l'apeline a été réalisée sur les cellules tumorales MiaPaCa exprimant à la fois l'apeline et APJ (au niveau ARNm). Les cellules MiaPaCa transduites avec les shRNAs APJ nous permettront d'évaluer l'existence et la contribution de la boucle autocrine sur l'activation des voies de signalisation MAPK et PI3K/Akt ainsi que sur la prolifération et le transport de glucose au niveau basal dans ces cellules.

Sur la cellule tumorale, l'apeline engendre l'augmentation de la quantité protéique de β -Caténine, de c-myc, de cycline D1 et de l'HK2. Cet effet pourrait être dû à l'augmentation de la transcription et/ou de la traduction ou encore de la stabilité de ces protéines. Compte tenu de la rapidité de ces augmentations protéiques, on peut supposer que l'apeline agirait plutôt *via* un effet traductionnel et/ou *via* la stabilisation de ces protéines (inhibition de la dégradation). Dans le contexte d'un environnement stressant faisant intervenir privation en nutriments et hypoxie comme dans le cancer, alors que la traduction dépendante de la coiffe (traduction cap-dépendante) est globalement freinée, un mécanisme de traduction alternatif dépendant des IRES (Internal Ribosome Entry Site) est mis en place (Faye and Holcik, 2015). En ce sens, il est intéressant de constater que l'apeline augmente la quantité protéique de β -Caténine, c-myc et cycline-D1 dont les ARNm comportent des IRES (Fu et al., 2015;

Sommer et al., 2011; Stoneley et al., 2000). Compte tenu des avantages prolifératifs et anti-apoptotiques conférés par la mise en place d'une traduction IRES-dépendante en condition de stress cellulaire, il serait intéressant de caractériser l'effet de l'apeline sur l'induction de la traduction cap-dépendante et IRES-dépendante. D'autre part, les protéines β -Caténine, c-myc et cycline D1 peuvent également être ubiquitinylées et donc être envoyées à la dégradation au protéasome (Becker, 2012). Comme précédemment décrit, ces effecteurs participent au maintien et/ou à la progression tumorale. Ainsi, parallèlement à l'étude du rôle de l'apeline sur la transcription et la traduction, il serait intéressant de caractériser son effet sur la demi-vie des protéines concernées.

Au cours de ce travail de thèse nous avons pu mettre en évidence qu'il existe une dichotomie entre l'activation précoce des ERKs et Akt, qui semble préférentiellement dépendante des protéines Gi, et l'activation soutenue d'Akt qui est majoritairement dépendante de l'internalisation du récepteur. Bien que le rôle des β -arrestines dans cette activation soutenue reste encore à démontrer, leurs fonctions au cours de l'internalisation du récepteur en font de bons candidats. En effet, plus que des protéines impliquées dans la désensibilisation et l'internalisation des RCPGs, les β -arrestines représentent également des protéines adaptatrices participant à la mise en place et au maintien d'une signalisation intracellulaire au cours de l'internalisation du récepteur par le recrutement de différents effecteurs (Luttrell et al., 2001; Shenoy and Lefkowitz, 2011). Ainsi, il sera intéressant de caractériser les conséquences de l'inactivation des β -arrestines (par une approche siRNA ou dominant négatif des β -arrestines) sur la signalisation et les effets cellulaires induits par l'apeline dans les cellules tumorales. De plus, nous pourrions analyser au niveau fonctionnel l'effet d'une stimulation par une apeline dépourvue de sa phénylalanine C-terminale. En effet, Ceraudo et coll. ont récemment montré que l'apeline K16P (apeline 17 sans la phénylalanine C-terminale) agit comme un agoniste biaisé activant préférentiellement la voie Gi et très minoritairement le recrutement des β -arrestines (Ceraudo et al., 2014).

L'ensemble des essais que nous avons réalisés afin de caractériser les cascades de transduction activées et les effets cellulaires induits par l'apeline sur les cellules tumorales ont été effectués en présence d'apeline 36 ou de pyroglutamate Ape13 (données non montrées). Ces deux fragments d'apeline activent les mêmes effecteurs intracellulaires et induisent les mêmes profils de stimulation sur l'ensemble des lignées cellulaires testées. Cependant, en termes d'effets cellulaires, alors que l'apeline 36 engendre la prolifération, la migration et le transport du glucose dans les cellules tumorales pancréatiques, la pyroglutamate Ape13 a peu

ou pas d'effets. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que le devenir intracellulaire du récepteur varie selon le fragment d'apeline utilisé. En effet, alors que l'apeline 13 induit l'internalisation et le recyclage membranaire rapide du récepteur, l'apeline 36 provoque l'internalisation et la séquestration d'APJ au niveau intracellulaire (Zhou et al., 2003b). Ainsi, compte tenu de cette différence de trafic intracellulaire du récepteur nous pouvons supposer que les effets cellulaires pro-tumoraux induits par l'apeline 36 pourraient être potentiellement dépendants de l'internalisation prolongée du récepteur engendrant l'activation soutenue de voies de signalisation dépendantes de la β -arrestine. De manière intéressante, en accord avec l'internalisation du récepteur induite par l'apeline, et l'existence d'une potentielle boucle autocrine dans l'ADK, les IHC réalisées sur les 49 patients permettent d'observer que le récepteur APJ présente un marquage intracellulaire de type punctiforme dans les cellules des PanINs ainsi que dans les cellules tumorales (Figure 3).

Etonnamment, il est à noter que l'expression de l'ACE-2, une enzyme catalysant l'hydrolyse de la phénylalanine C-terminale de l'apeline (Vickers et al., 2002) est diminuée dans l'ADK (Zhou et al., 2009). Ainsi, bien que nous ne connaissions ni les processus de maturation du peptide, ni le type d'apeline sécrété dans l'ADK, cette diminution d'expression de l'ACE-2 pourrait potentiellement favoriser une signalisation dépendante des β -arrestines par la conservation de la phénylalanine C-terminale. De plus, la proconvertase PCSK3 a déjà été mise en évidence dans le clivage direct de la proapeline en apeline 13 dans les adipocytes (Shin et al., 2013). Ainsi, il sera intéressant d'étudier son expression dans l'ADK et dans nos lignées tumorales pancréatiques, de rechercher d'autres endopeptidases potentielles ayant comme substrat l'apeline et d'évaluer leur spécificité d'expression par rapport au tissu pancréatique sain. En effet, si de telles enzymes sont spécifiquement exprimées ou dérégulées dans l'ADK, elles pourraient générer une forme ou une autre du peptide plus spécifique à l'ADK. Nous pourrions ainsi envisager une stratégie thérapeutique plus ciblée *via* le développement d'un anticorps bloquant de cette forme.

D'autre part, Elabela, un nouveau ligand du récepteur APJ a récemment été découvert (Chng et al., 2013; Lesage et al., 2015; Pauli et al., 2014). Les travaux publiés récemment semblent montrer son expression quasi exclusive dans le rein chez l'individu sain mais rien n'est connu de son expression dans les tissus et organes en condition pathologique. Ainsi, à l'avenir, il sera important de caractériser son expression protéique chez des patients atteints d'ADK et dans les modèles murins K-RAS et KPC afin d'étudier les populations cellulaires qui pourraient exprimer ce peptide et sa cinétique d'expression au cours de la carcinogénèse. Si Elabela est exprimée dans les tumeurs, il sera alors intéressant de caractériser sa fonction

dans les cellules tumorales pancréatiques. Des résultats préliminaires obtenus sur les cellules tumorales pancréatiques MiaPaCa montrent qu'Elabela induit l'activation des mêmes effecteurs ainsi que le même profil de stimulation que l'apeline (données non montrées).

Les stratégies thérapeutiques envisageables concernant la signalisation apeline dans l'ADK se basent donc sur l'inhibition du ligand et/ou le blocage du récepteur. Ceci peut être réalisé par l'utilisation d'anticorps bloquants dirigés contre l'apeline ou APJ, ou d'antagonistes du récepteur. A ce titre, des anticorps monoclonaux dirigés contre l'apeline ainsi qu'un antagoniste d'APJ ont d'ores et déjà été identifiés et sont actuellement en cours de développement dans l'équipe (manuscrit en cours de préparation). Ces stratégies pourront être testées *in vitro* sur les lignées tumorales pancréatiques, et *in vivo* dans un modèle murin récapitulant l'ADK (souris K-RAS ou KPC) afin d'en évaluer l'efficacité anti-tumorale.

De manière plus générale, l'apeline est un facteur angiogénique majeur qui représente une cible thérapeutique intéressante dans certaines pathologies associées à un excès de vascularisation. En effet, une approche anti-angiogénique, et donc anti-apeline pourrait être envisagée dans le cadre du traitement des rétinopathies diabétiques, la DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age) ou de cancers très vascularisés tels que le glioblastome, le cancer du colon ou les tumeurs neuroendocrines.

Dans l'ADK, le ciblage de la signalisation apeline ne se base pas sur cette approche puisque cette tumeur est très peu vascularisée. Cependant, la voie apelinergique demeure une cible particulièrement attractive puisque son ciblage permettrait d'inhiber simultanément l'effet de l'apeline sur la cellule tumorale elle-même et sur les cellules endothéliales lymphatiques exprimant toutes deux le récepteur. Ceci permettrait donc potentiellement d'obtenir d'une part, un effet anti-tumoral direct et d'autre part de diminuer et/ou ralentir la dissémination tumorale puisque la lymphe constitue la principale voie métastatique. Cependant, l'ADK est considéré comme un des cancers les plus chimiorésistant. Ceci est en partie dû à l'intense réaction desmoplastique qui lui est associée et qui limite l'accessibilité des drogues à la tumeur. Ainsi, afin d'optimiser l'efficacité de notre stratégie, il sera intéressant de combiner cette approche anti-apeline et/ou anti-APJ à l'utilisation d'un composé tel que l'inhibiteur de la voie Shh, le IPI-926 (Olive et al., 2009), qui diminue la réaction stromale et permet ainsi d'augmenter la perfusion tumorale.

ANNEXES :



Apelin receptors: From signaling to antidiabetic strategy



C. Chaves-Almagro, I. Castan-Laurell, C. Dray, C. Knauf, P. Valet, B. Masri*

Institute of Cardiovascular and Metabolic Diseases (I2MC) – INSERM U1048, University Paul Sabatier, Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 January 2015

Received in revised form

9 March 2015

Accepted 11 May 2015

Available online 22 May 2015

Keywords:

Apelin

APJ

Elabela

Toddler

G protein-coupled receptor

Adipokine

Signaling

Metabolism

Obesity

Diabetes

ABSTRACT

The G protein-coupled receptor APJ and its cognate ligand, apelin, are widely expressed throughout human body. They are implicated in different key physiological processes such as angiogenesis, cardiovascular functions, fluid homeostasis and energy metabolism regulation. On the other hand, this couple ligand–receptor is also involved in the development and progression of different pathologies including diabetes, obesity, cardiovascular disease and cancer. Recently, a new endogenous peptidic ligand of APJ, named Elabela/Toddler, has been identified and shown to play a crucial role in embryonic development. Whereas nothing is yet known regarding Elabela/Toddler functions in adulthood, apelin has been extensively described as a beneficial adipokine regarding to glucose and lipid metabolism and is endowed with anti-diabetic and anti-obesity properties. Indeed, there is a growing body of evidence supporting apelin signaling as a novel promising therapeutic target for metabolic disorders (obesity, type 2 diabetes). In this review, we provide an overview of the pharmacological properties of APJ and its endogenous ligands. We also report the activity of peptidic and non-peptidic agonists and antagonists targeting APJ described in the literature. Finally, we highlight the important role of this signaling pathway in the control of energy metabolism at the peripheral level and in the central nervous system in both physiological conditions and during obesity or diabetes.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The apelin receptor, also called APJ or angiotensin receptor-like 1 was first cloned in 1993 due to its strong sequence homology with the angiotensin II receptor (AT₁) (54% in transmembrane domains and 31% for the entire sequence). Nevertheless, APJ does not bind angiotensin II (O'Dowd et al., 1993).

Human apelin receptor gene encodes for a protein of 380 amino acids which belongs to the class A (rhodopsin-like receptor) G protein-coupled receptor (GPCR) family. Examining APJ protein sequence, Glu²⁰ and Asp²³ in the extracellular N-terminal tail were first identified as crucial residues for binding of its endogenous ligand called apelin (Langelaan et al., 2013; Zhou et al., 2003b). In addition, combining three-dimensional molecular modeling with site-directed mutagenesis, Gerbier et al. (2015) recently established that Asp⁹⁴, Glu¹⁷⁴ and Asp²⁸⁴ are also involved in apelin binding.

Apelin and APJ are both widely expressed in human organism and can be detected in the central nervous system and in the periphery (heart, lung, kidney, adipose tissue, muscle...). Indeed, apelinergic system is notably expressed in hypothalamus where it participates to the regulation of fluid homeostasis, food intake and

glucose metabolism (De Mota et al., 2004; Drougard et al., 2014; Duparc et al., 2011; Lv et al., 2013). APJ stimulation or inhibition in the brain may have consequences on behavior (memory, food and water intake) and physiology (neuroprotection, pain, metabolism). Moreover, it is well established that apelin signaling participates to the peripheral regulation of cardiovascular function playing an essential role in physiological (Cox et al., 2006; Kalin et al., 2007; Kang et al., 2013; Kasai et al., 2010, 2008; Saint-Geniez et al., 2002) and pathological (Berta et al., 2014, 2010; Kalin et al., 2007; Liu et al., 2015; Sorli et al., 2007, 2006) angiogenesis (for reviews, see Audigier et al., 2014).

Furthermore, the apelin–APJ system has been extensively described as a major factor involved in energy metabolism. Consequently, dysregulation of apelin signaling is associated with pathological states such as cardiac hypertrophy, type 2 diabetes (T2D) and obesity (Castan-Laurell et al., 2011, 2012). Given the broad range of pathophysiological actions of apelin, APJ represents a promising target for pharmacological agent design.

2. APJ signaling

2.1. The endogenous agonists of APJ

2.1.1. Apelin

APJ was an orphan receptor until 1998 when its first

* Corresponding author.

E-mail address: bernard.masri@inserm.fr (B. Masri).

endogenous ligand named apelin for APJ endogenous ligand was identified from bovine stomach extracts (Tatemoto et al., 1998). Apelin gene encodes for a 77 preproprotein containing a signal peptide in its amino-terminal (N-terminal) sequence thus directing apelin in the secretory pathway. Interestingly, apelin propeptide contains several basic amino acids doublets implicating potential proteolytic cleavage sites for endopeptidases which would give rise to several bioactive carboxy-terminal (C-terminal) fragments including apelin-36, apelin-17 and apelin-13 (Fig. 1A) (Masri et al., 2005). Moreover, the N-terminal glutamate of apelin-13 can be post-translationally modified thus creating the pyroglutamate apelin-13 ([pyr-1]-apelin-13) which is more protected from exopeptidase degradation (Habata et al., 1999).

Actually, [pyr-1]-apelin-13 represents the most common fragment in heart and brain whereas apelin-36 predominates in lung, testis and uterus while both fragments are prevalent in mammary gland as demonstrated by chromatography (Kawamata et al., 2001; Maguire et al., 2009). Moreover, apelin fragments have also been found in plasma where apelin-17 and [pyr-1]-apelin-13 may represent the predominant forms (Azizi et al., 2008; De Mota et al., 2004). Even if apelin maturation process is yet poorly understood, Shin et al. recently described direct cleavage of proapelin in bioactive apelin-13. This process is specific of proprotein convertase subtilisin/kexin type 3 but does not require proprotein convertase subtilisin/kexin type 7 (Shin et al., 2013). Thus, it will be of great interest to search for the existence and expression sites of proprotein convertase subtilisin/kexin type 3 and other unknown endoproteases potentially involved in apelin cleavage. Supporting tissues-specific cleavage hypothesis, proprotein convertase subtilisin/kexin type 3 and apelin are both expressed in the heart where apelin-13 represents the predominant form of apelin (Beaubien et al., 1995). Moreover, they are co-expressed in adipose tissue and their expression level is upregulated with obesity (Shin et al., 2013). Accordingly, tissue specific expression of endopeptidases involved in apelin maturation process could explain why the various apelin forms are differentially represented in organism.

Alignment of apelin sequences from different species revealed a full conservation of the C-terminal amino acids. Moreover, the 13 carboxy-terminal residues represent the smallest physiological entity with maximal activity (Habata et al., 1999; Tatemoto et al., 1998). Deletion of the different amino acids from the N-terminal side of apelin-13 revealed that apelin-12 reduced blood pressure whereas apelin-11 was inactive (Lee et al., 2005; Tatemoto et al., 2001). Accordingly, these data suggest that the 12 carboxy-terminal residues correspond to the minimal active structure. Crucial residues for apelin biological function were characterized using an alanine scanning approach. In this way, different studies have highlighted that residues within the Arginine–Proline–Arginine–Leucine motif and the Lysine–Glycine–Proline–Methionine motif of apelin-13 are important for binding activity, inhibition of adenylyl cyclase or internalization of APJ receptor (Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003).

Another important residue for apelin biological activity *in vitro* and *in vivo*, is the C-terminal phenylalanine. As well as angiotensin II, dynorphin A and des-Arg⁹-bradykinin, apelin fragments are also targeted by Angiotensin-Converting Enzyme 2 which catalyses the cleavage of the C-terminus phenylalanine (Vickers et al., 2002). Apelin-17 lacking this phenylalanine (apelin-K16P) can no longer induce APJ internalization or lower blood pressure while it retains binding and signaling properties (inhibition of forskolin-induced cAMP production) (El Messari et al., 2004). Attesting these results, Ceraudo et al. recently demonstrated that apelin-K16P was still a bioactive peptide (Ceraudo et al., 2014). This point will be discussed later in the review.

2.1.2. Toddler/Elabela

Different observations in the literature suggested the possible existence of another ligand for APJ or another receptor for apelin. Firstly, apelin knock-out (apelin KO) mice are viable with a Mendelian inheritance pattern, which is not found for APJ knock-out (APJ KO) mice (Kang et al., 2013). Secondly, the animal phenotype after functional deletion of apelin and APJ genes should be similar, if not identical. In fact, APJ KO mice present developmental defects mainly at the cardiovascular level and this prominent phenotype is not found in apelin KO animals. The same observations were also made in developmental studies in zebrafish where knockdown of apelin protein expression using antisense morpholinos oligonucleotides does not phenocopy loss of APJ (Scott et al., 2007; Zeng et al., 2007). Third, APJ is expressed early during gastrulation and throughout the subsequent development stages (Devic et al., 1996, 1999) whereas apelin expression starts only at the end of gastrulation (Zeng et al., 2007) suggesting the possible existence of another unknown ligand for APJ or ligand-independent functions of APJ.

Recently, two different studies aiming at discovering novel signals involved in embryonic development regulation identified a new endogenous peptide ligand for APJ, named Elabela or Toddler (Chng et al., 2013; Pauli et al., 2014). Elabela/Toddler is highly expressed during gastrulation and its knockdown in zebrafish mirrors the phenotype of loss of APJ expression. Like apelin, Elabela/Toddler encodes a conserved vertebrate protein of 54 amino acids consisting of an N-terminal signal-peptide addressing the protein to the secretory pathway and a mature 32 amino acids peptide. Elabela/Toddler may generate several fragments due to the presence of doublets of basic residues predicting cleavage sites in its peptide sequence (Fig. 1B). This new APJ ligand plays a crucial role in heart morphogenesis inducing mesendodermal cells movement and endoderm differentiation.

As far as Elabela/Toddler is concerned, nothing is yet known regarding its functions in adults. Since Elabela/Toddler is a critical ligand for APJ regarding development, it will be important in the future to define if this new endogenous ligand is also expressed in adulthood but also to characterize its expression profile and its cellular and tissular functions.

2.2. Signal transduction pathways activated by APJ

The canonical signaling pathway stimulated by apelin involves activation of the pertussis toxin (PTX) sensitive G proteins, G_{i/o}. The first report of this G_i protein coupling has been established in assays measuring extracellular acidification rates with apelin-13 and apelin-36 (Hosoya et al., 2000). These results were then confirmed by numerous studies demonstrating a PTX sensitive activation of intracellular effectors such as Extracellular signal-Regulated Kinases (ERKs), protein kinase B (PKB or Akt) and p70S6 kinase induced by apelin but also the inhibitory action of apelin on forskolin-induced cAMP production (D'Aniello et al., 2009; Masri et al., 2002, 2004). The murine apelin receptor is preferentially coupled to G_{αi1}, G_{αi2} but not G_{αi3} in Chinese Hamster Ovary cells through which apelin induces ERKs and Akt activation and inhibits adenylyl cyclase (Masri et al., 2006). Likewise, the same results were obtained in HEK293 cells expressing the human APJ receptor which activates G_{αi2} (Bai et al., 2008; Chen et al., 2014). However, depending on the cell type studied, apelin receptor can be associated with other G proteins. Indeed, in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs), APJ has been shown to activate G_{α13} resulting in histone deacetylases type 4 and type 5 phosphorylation and cytoplasmic translocation (Kang et al., 2013) whereas in adipocytes APJ is coupled to G_i and G_{q/11} proteins (Yue et al., 2011). This latter double coupling of APJ was confirmed *in vivo* where PTX, protein kinase C or phospholipase C inhibitors pretreatment

partially reduced the apelin-induced positive inotropic response (Szokodi et al., 2002).

Accordingly, apelin receptor activates different G proteins depending on the cell type and thus stimulates different intracellular signaling pathways, which may explain the potential for such receptor to mediate so many cellular effects (Fig. 2).

Downstream the G proteins stimulated by APJ, apelin activates several key intracellular effectors such as ERKs, phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt, p70S6 kinase and this topic has been discussed at length in many recent reviews (Chapman et al., 2014; O'Carroll et al., 2013). Nevertheless, in heterologous system (Bai et al., 2008; Masri et al., 2002, 2004, 2006), endothelial cells (Berta et al., 2014; Masri et al., 2006), smooth muscle cells (Cui et al., 2010; Liu et al., 2010), neurons (O'Donnell et al., 2007; Yang et al., 2014; Zeng et al., 2010), adipocytes (Than et al., 2012), myocytes (Dray et al., 2008), tumor cells (Picault et al., 2014) and osteoblasts (Tang et al., 2007; Xie et al., 2006, 2007), apelin stimulates the PI3K/Akt and/or the Mitogen-Activated Protein Kinases pathways promoting cell proliferation, survival, migration and metabolic functions.

Another key intracellular effector recently described to be activated by apelin signaling in skeletal muscle cells, adipocytes and enterocytes is the AMP-activated protein kinase (AMPK). In these cells, apelin-induced AMPK activation mediates different effects such as lipolysis inhibition, glucose uptake, fatty acid oxidation and promotes mitochondrial biogenesis and function (Attane et al., 2011, 2012; Dray et al., 2008, 2013; Than et al., 2012; Yue et al., 2010, 2011). However, glucose uptake relies also on membrane relocation of glucose transporters type 4 (GLUT4) or type 2 (GLUT2) (Dray et al., 2013; Zhu et al., 2011). Consequently, apelin represents a beneficial cytokine involved in energy metabolism regulation.

Other major intracellular signaling molecules involved in apelin effects are the reactive nitrogen species such as nitric oxide (Duparc et al., 2011) and reactive oxygen species including hydrogen peroxide (Drougard et al., 2014). Depending on the dose and the animal model, apelin is able to decrease (Zeng et al., 2010) or increase (Drougard et al., 2014) reactive oxygen species release by neuronal cells or hypothalamic explants, respectively.

Besides G protein coupling, APJ activation by apelin induces cytoplasmic β -arrestin recruitment to APJ leading to desensitization and clathrin-dependent internalization of apelin receptor (El Messari et al., 2004; Iturrioz et al., 2010; Pauli et al., 2014; Zhou et al., 2003b) (Fig. 2). Interestingly, whereas both apelin-13 and apelin-36 promote APJ internalization, only apelin-13 internalized receptors are rapidly recycled to the cell surface (Zhou et al., 2003b). Conversely, apelin receptors internalized with apelin-36 are targeted for degradation in lysosomes (Lee et al., 2010).

Firstly restricted to their GPCR desensitization and internalization functions, β -arrestins associated to GPCRs have been then extensively described as adaptator proteins initiating a second round of signaling with comparable biological importance than G proteins. Indeed, they can bind various intracellular partners under different pathophysiological conditions, thus organizing multi-protein signaling complexes and localizing them to distinct subcellular compartments (Gurevich and Gurevich, 2014; Kang et al., 2014).

Regarding apelin signaling, two recent studies demonstrated that both apelin-13 and apelin-17 can stimulate ERKs phosphorylation in a G-protein and β -arrestin dependent manner (Ceraudo et al., 2014; Chen et al., 2014). However, despite the activation of ERK as a common intracellular effector, these two signaling pathways would not be involved in the same physiological effects. Such a dichotomy has been demonstrated with apelin-K16P. Indeed, while apelin-K16P retained Gi-dependent signaling activation, it could no longer induce β -arrestin recruitment to APJ or its

internalization revealing a biased agonist character of apelin-K16P. Interestingly, *in vivo* in rats, apelin-K16P was not able to decrease arterial blood pressure as observed with apelin-17 (Ceraudo et al., 2014). Accordingly, it is tempting to speculate that the apelin-induced blood pressure decrease could result from a G independent but β -arrestin dependent pathway mediated by the C-terminal phenylalanine of apelin. Thus, functional selectivity of apelin K16P could be due to a distinct APJ conformation allowing selective coupling.

Furthermore, another study published the same year identified the residue in the carboxy-tail of APJ involved in β -arrestin recruitment (Chen et al., 2014). Indeed, Chen et al. (2014) clearly demonstrated that the phosphorylation of Ser³⁴⁸ on APJ was not necessary for G protein activation induced by apelin-13 but instead was crucial for G protein-coupled receptor kinases and β -arrestin recruitment, APJ internalization and ERKs activation.

2.3. Mechanical stretch induced APJ activation

On top of being activated by apelin and Elabela/Toddler, Scimia et al. (2012) demonstrated a ligand-independent but mechanical stretch-dependent stimulation of APJ in cultured cardiomyocytes and in mouse heart. Unlike intracellular signaling cascades activated by apelin, APJ activation by mechanical stretch induces a β -arrestin-dependent and G protein-independent response conducting to heart hypertrophy in a mouse model of chronic pressure overload by transaortic constriction. Thus, APJ KO animals are resistant to the pathological hypertrophic response to transaortic constriction whereas apelin KO mice remain sensitive. On the other hand, apelin infusion presents cardioprotective effect preventing cardiac hypertrophy in wild type mice with transaortic constriction. Accordingly, identification of a biased agonist for APJ that would activate G_i protein and inhibit β -arrestin pathway would represent a pharmacological tool for the treatment of cardiac hypertrophy.

2.4. APJ oligomerization with other GPCRs

For many years, GPCRs were considered to function as monomeric structural units. However, in the last decade, an increasing number of studies using different approaches on cultured cells, tissues and animals clearly shed light on GPCR capacity to form homo- and/or hetero-dimers (Rivero-Muller et al., 2013; Salahpour and Masri, 2007). Thus, GPCRs oligomerization can modify properties of each protomer in term of ligand binding, downstream intracellular signaling but also desensitization and internalization (Ferre et al., 2014).

To date, apelin receptor can heterodimerize with different GPCRs such as angiotensin receptor AT₁ in cultured cells. These oligomers have been observed using different approaches like co-immunoprecipitation as well as resonance energy transfer. APJ was first reported to dimerize with AT₁ but the various studies differ on the heterodimerization origin which may be constitutive or induced by apelin or angiotensin II. However, the published data show that APJ decreases angiotensin II affinity for its receptor and modify intracellular signaling pathways normally activated by angiotensin II (Chun et al., 2008; Siddiquee et al., 2013; Sun et al., 2011). If the relevance of this heterodimerization is confirmed *in vivo*, it will be interesting in a pharmacological and clinical perspective to search for molecules targeting specifically APJ or AT₁ when they form heterodimers.

On the other hand, apelin receptor can also heterodimerize with kappa opioid receptor (Li et al., 2012), neurotensin receptor 1 (Bai et al., 2014a) and bradykinin 1 receptor (Bai et al., 2014b). Co-treatment of cells expressing those different heterodimers with their respective ligands and apelin enhance the phosphorylation

and activity of different intracellular effectors such as endothelial nitric oxide synthase or ERK compared to cells expressing only one of the two protomers thus resulting in a significant increase in cell proliferation.

2.5. Peptidic and non-peptidic agonists and antagonists of APJ

As discussed above, apelin signaling plays an important role in cardiovascular system, energetic metabolism as well as in physiological and tumor angiogenesis. However, so far, very few molecules have been identified yet acting as agonists or antagonists of APJ and being specific for this GPCR. Search for such molecules is of special interest in order to explore APJ function. Moreover, these compounds could represent a therapeutic approach to treat apelin signaling associated diseases. The first antagonist described in the literature for APJ is ALX40-4C, a polypeptide composed of nine arginine residues (Zhou et al., 2003a). This compound, known for its high affinity for C-X-C chemokine receptor type 4 (in the nanomolar range) and its antagonist activity at this receptor, is also able to inhibit apelin binding to APJ with a lower affinity (micromolar range) and to block ligand-induced APJ internalization and intracellular calcium mobilization.

As previously described, the C-terminal phenylalanine of apelin peptides has been of particular interest since this residue is important for apelin activity. Thus, apelin-13 with the C-terminal phenylalanine mutated to alanine, apelin F13A, antagonizes, *in vivo*, apelin-13-induced decrease in blood pressure and splanchnic neovascularization (Lee et al., 2005; Tiani et al., 2008). The same antagonism activity has been observed *in vitro* where apelin F13A diminishes cellular proliferation of human tumor cells and migration of human lymphatic endothelial cells induced by apelin (Berta et al., 2014; Picault et al., 2014). Nevertheless, this antagonist activity of apelin F13A on APJ is controversial. Indeed, apelin F13A has been shown, *in vitro*, to behave as an APJ agonist on different functional assays such as intracellular calcium mobilization, adenylyl cyclase inhibition and induction of receptor internalization (Fan et al., 2003; Medhurst et al., 2003). Understanding the mechanism by which apelin F13A can induce cellular opposite effects will require more investigations. Nevertheless, we can hypothesize that this difference may be due to APJ protein expression level in cells or tissues used in the different studies. Indeed, APJ protomer has the propensity to form homo- and hetero-dimers with other GPCRs as described earlier. Since GPCR heterodimerization can modify receptor function by modulating ligand binding and receptor activation, one may argue that the relative cell surface density of APJ homodimers versus heterodimers could explain the opposite effects of apelin F13A observed in the different studies.

Using a bivalent ligand approach, Macaluso et al. designed a cyclic peptide incorporating two Arginine-Proline-Arginine-Leucine motifs of apelin linked through a spacer (Macaluso et al., 2011). This compound which contains critical apelin residues for binding to APJ displays antagonist activity both *in vitro* (Macaluso et al., 2011) and *in vivo* (Dray et al., 2013). Moreover, this cyclic peptide should be more protected from proteolytic degradation and should possess a longer half-life.

By high throughput screening, ML221, a kojic acid-based small molecule was identified as the first non-peptidic antagonist for APJ. This compound dose dependently inhibits apelin-13 mediated adenylyl cyclase inhibition and arrestin recruitment to APJ (Maloney et al., 2012). In 2009 was reported the first non-peptidic agonist identified: E339-3D6. This molecule is a partial agonist regarding adenylyl cyclase inhibition and a full agonist for APJ internalization (Iturrioz et al., 2009). *In vivo*, E339-3D6 induces vasorelaxation of rat aorta and inhibits systemic vasopressin release in water-deprived mice.

3. Metabolic effects of apelin/APJ system

The presence of APJ in pancreatic islets allowed to hypothesize a putative role of apelin on insulin production and more broadly on metabolism regulation (Ringstrom et al., 2010; Sorhede Winzell et al., 2005). Since 2005, different studies demonstrated dose depending effects of apelin on pancreas insulin production: a high dose (1 μ M) of apelin-36 causes a moderate increase in glucose-stimulated insulin secretion (30%), while lower concentrations (10–100 nM) of apelin robustly reduce insulin secretion by 50% (Ringstrom et al., 2010; Sorhede Winzell et al., 2005). More recently, the presence of APJ on metabolic active tissues such as striated skeletal muscle cells and adipocytes led our group to investigate new potential roles of apelin on glucose and lipid metabolism. Thus, intravenously-injected physiological low doses of apelin-13 induced plasma glucose decrease in steady state conditions in mouse (Dray et al., 2008). Furthermore, apelin single intravenous injection performed 30 minutes before an oral carbohydrate load in mouse was able to significantly improve glucose tolerance without modifying insulin production. To better characterize the effect of apelin on glucose homeostasis, intravenous infusion of the peptide was performed during hyperinsulinemic euglycemic clamps. These experiments showed that in spite of hyperinsulinemic conditions, apelin potentialized glucose uptake specifically in adipose tissues and skeletal muscle (Dray et al., 2008). This additive effect has also been confirmed both in isolated mouse skeletal muscle and in the 3T3-L1 adipocyte cell line (Dray et al., 2008; Zhu et al., 2011). In fact, apelin signaling is partially independent from the one stimulated by insulin. Involvement of apelin in glucose homeostasis has been further confirmed by studying the phenotype of apelin KO mice which displayed an amplified insulin-resistance during high fat and carbohydrate feeding (Yue et al., 2010). Moreover, these mice had an increase in visceral fat mass associated with a rise of plasma lipids such as triglycerides suggesting a role of apelin in lipids handling. Indeed, rescue of apelin KO mice by two weeks exogenous apelin supplementation demonstrated a potential role of the peptide in the inhibition of lipolysis since plasma glycerol amounts were decreased in apelin-treated knock-out mice. The interplay between apelin and lipolysis has further been confirmed in isolated and cultured adipocytes (Than et al., 2012; Yue et al., 2011). Metabolic effects of the apelin/APJ system led different teams to investigate new targets for apelin regarding glucose homeostasis. Apelin, *in vivo*, has been shown to increase myocardial glucose uptake and GLUT4 membrane translocation in C57BL/6J mice (Xu et al., 2012). Apelin also increases glucose transport *in vitro*, in cardiomyoblasts cell line H9C2 (Xu et al., 2012). In gut, a cycle between apelin and glucose has been described (Dray et al., 2013). After glucose ingestion, apelin is produced by enterocytes and seems to act in an autocrine loop on APJ to induce an increase of net glucose flux across the intestinal barrier (Dray et al., 2013). This physiological loop results in an increase of glucose in the portal vein and can be prevented by APJ antagonists given by oral gavage. Furthermore, this study demonstrates that apelin can induce AMPK phosphorylation that in turn increases glucose transporters amount such as GLUT2 and sodium/glucose cotransporter-1 on apical membrane of enterocytes (Dray et al., 2013). Taken together, these data show that apelin is a regulator of glucose homeostasis by acting first on glucose absorption in gut and then enhancing the glucose uptake/utilization in muscle or adipose tissues.

4. Metabolic effects of apelin in obesity and type 2 diabetes

Mice fed a high fat diet (HFD) for several weeks become obese, hyperglycemic, hyperinsulinemic and insulin resistant. Acute

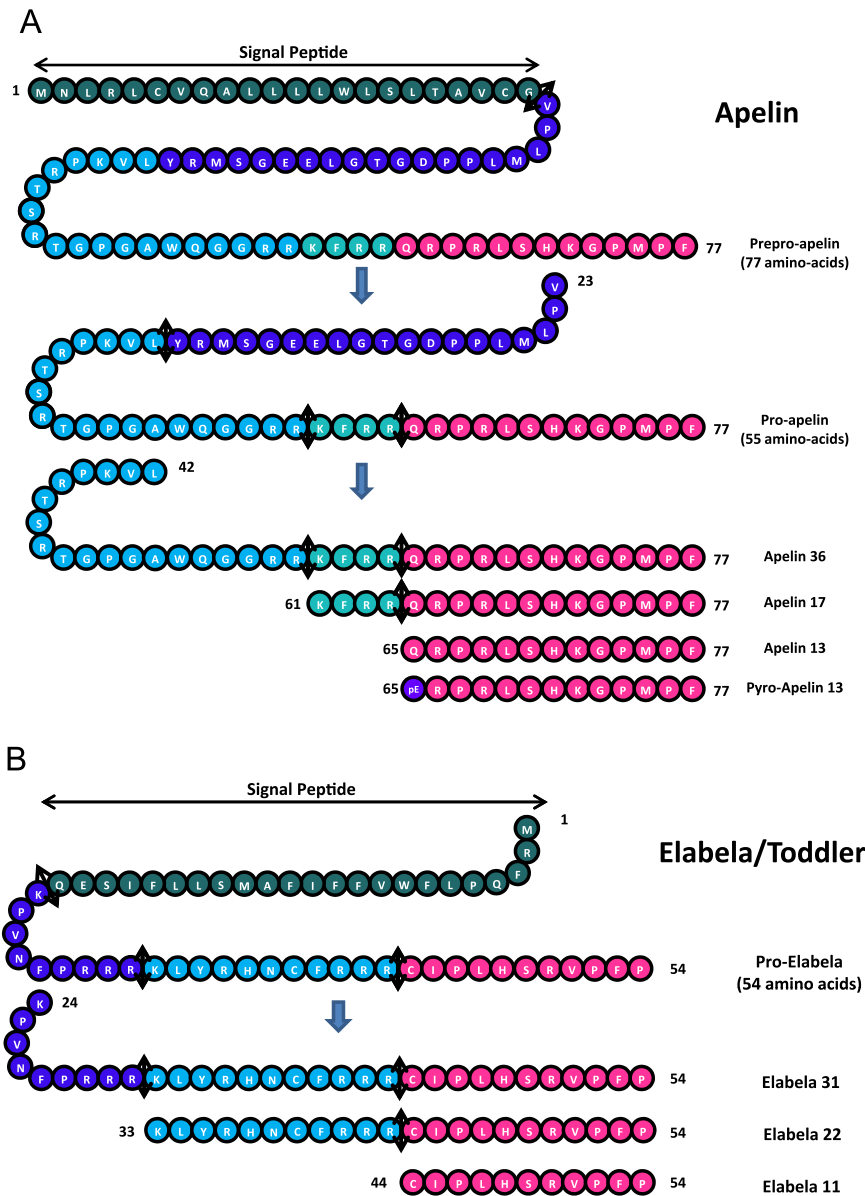


Fig. 1. Apelin receptor ligands. (A) Apelin. Amino acid sequences of preproapelin and the different predicted bioactive apelin fragments generated after proteolytic cleavage: apelin-36, apelin-17, apelin-13 and [Pyr 1]-apelin-13. Black arrows indicate potential cleavage sites after doublets of basic amino acids. (B) Elabela also called Toddler. As well as apelin, Elabela would contain proteolytic cleavage sites that could potentially generate the different Elabela fragments: Elabela 31, Elabela 22 and Elabela 11. Black arrows indicate potential cleavage sites after doublets of basic amino acids. The amino acid sequences presented correspond to mouse apelin and Elabela.

apelin treatment by intravenous injection or by infusion during a hyperinsulinemic–euglycemic clamp in obese and insulin resistant mice improves glucose tolerance and insulin sensitivity respectively (Dray et al., 2008). Thus, despite elevated plasma apelin concentrations in obese and insulin resistant mice, exogenous apelin is still efficient. During chronic apelin treatment (28 days), a marked improvement in insulin sensitivity has also been observed in obese and insulin resistant mice as well as a decrease in body fat mass gain (Attane et al., 2012). This improved insulin sensitivity throughout the body seems to be due to a better muscle metabolic function. Indeed, the complete oxidation of fatty acids was increased in the soleus muscle of obese and insulin resistant mice treated with apelin. In addition, the rate of long chain acylcarnitines generated during incomplete oxidation known to be associated with insulin resistance (Koves et al., 2008; Mihalik et al., 2010) was reduced. This could explain the fact that the insulin-stimulated glucose transport was significantly increased in muscle

of apelin-treated mice (Attane et al., 2012). This better use of lipids in the muscle was coupled with an increase in mitochondrial oxidative capacity and mitochondrial biogenesis (Attane et al., 2012). This last effect was associated with an increase in the expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ co-activator 1 α (PGC-1 α), nuclear respiratory factor-1 and mitochondrial transcription factor A, factors that act in concert to increase mitochondrial oxidative phosphorylation and mitochondrial biogenesis (Scarpulla, 2008). In addition, apelin treatment reduces the adverse alterations of the ultra-structure of muscle mitochondria, usually seen in T2D (Bonnard et al., 2008).

Similar results on mitochondrial biogenesis have also been obtained in transgenic mice over-expressing apelin (Tg-apelin). Tg-apelin mice fed a HFD had similar food intake than wild type mice without gaining weight and display higher oxygen consumption and increased mitochondrial biogenesis in skeletal muscle (Yamamoto et al., 2011). However, the increased mitochondrial DNA

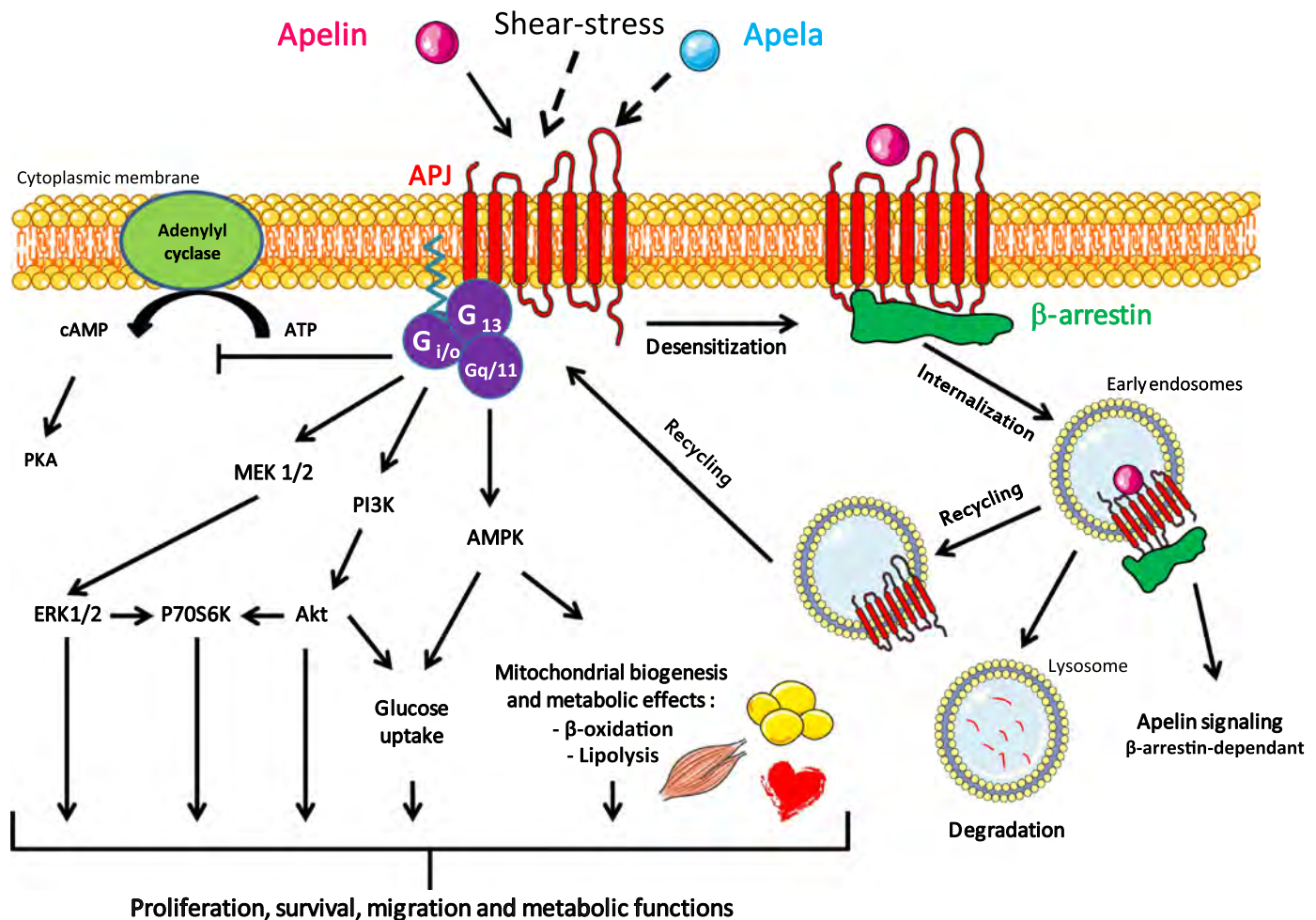


Fig. 2. APJ is activated by different ways and stimulates numerous intracellular effectors. Overview of apelin-induced signaling pathways. Depending on the cell type, APJ can be coupled to different G protein subtypes ($G_{i/o}$, $G_{q/11}$, G_{13}). Downstream G proteins activation, apelin can inhibit cAMP production and stimulate MAPK, PI3K/Akt and AMPK signal transduction pathways thus promoting major cellular effects such as proliferation, survival, migration and/or metabolic functions. On the other hand, APJ activation induces β -arrestin recruitment to the membrane leading to desensitization and internalization of the receptor. However, β -arrestin can also initiate a second round of signaling G protein-independent. Subsequently, APJ receptor can be rapidly recycled to the membrane or send for degradation. Black arrows indicate activation pathways, black blunted arrow indicates inhibition and dashed arrows indicate other activation ways for APJ (Elabela, mechanical stretch).

content in skeletal muscles was not due to changes in PGC-1 α expression (Yamamoto et al., 2011). Interestingly, the resistance to obesity of Tg-apelin mice was correlated with an increase in vessel formation in skeletal muscle due to increased gene expression of angiopoietin-1 and its receptor (Yamamoto et al., 2011). The importance of vessels integrity in both blood and lymph vasculature has more recently been demonstrated in apelin deficient mice (apelin KO mice) (Sawane et al., 2013). Indeed, besides the fact that apelin KO mice fed a HFD present an obese phenotype, they have abnormal lymphatic and blood vessel enlargement. In addition, HFD fed apelin KO mice, treated with an inhibitor of cyclooxygenase-2, have improved vascular function and decreased fat mass (Sawane et al., 2013). These data led the authors to hypothesize that this increased vascular permeability would allow greater fatty acids uptake by adipose tissue. Thus, this study highlights the importance of apelin in the maintenance of vascular integrity that would prevent the development of obesity.

The role of apelin in energy metabolism has also been recently shown in obesity-related decline of cardiac function (Alfarano et al., 2014). HFD-fed mice subjected to aortic banding exhibit impaired cardiac contractile function. Chronic apelin treatment (28 days) not only reversed cardiac hypertrophy but also prevented aortic banding-induced reduction of fatty acid and glucose oxidation. It has also been shown that in isolated cardiomyocytes

from HFD-fed mice, apelin increased fatty acid oxidation depending of the sirtuin 3 activation. Moreover, PGC-1 α , nuclear respiratory factor-1 and mitochondrial transcription factor A genes expression was also increased in apelin-treated cardiomyocytes in accordance with the effect of apelin on mitochondrial biogenesis described in skeletal muscles. Thus apelin exerts also beneficial cardiac and metabolic effects in a model of obesity-associated heart failure.

5. Consequences of central apelin/APJ modulation

Apelin/APJ system is also implicated in the control of whole-body physiological processes and behavior by acting directly in the brain. Apelin is now considered as a neuropeptide which exerts pleiotropic actions in the brain, but the hypothalamus seems to be a privileged target.

Regarding extra-hypothalamic actions, recent data demonstrate that the central apelin/APJ system could be a potential new target for the regulation of memory (Han et al., 2014). Then, intracerebroventricular (icv) apelin administration in mice impairs both short- and long-term memory. Using the same model of icv injection, Lv et al. showed that apelin injection generates depression-like behavior in mice mediated through APJ and opioid

receptors, without any effect on motor behavior (Lv et al., 2012a). Central apelin exerts antinociceptive effect that is reversed by naloxone treatment (Lv et al., 2012b) and anxiolytic action (Telegy and Jaszberenyi, 2014).

Concerning apelin effects in the hypothalamus, food and water intakes are the most studied behavioral effects of apelin/APJ system described in the literature. Major reviews from the group of Dr. Llorens-Cortes clearly describe its effects on body fluid homeostasis (Galanth et al., 2012; Llorens-Cortes and Moos, 2008). To summarize, central apelin is able to inhibit the electrical activity of vasopressin neurons and then, the secretion of vasopressin that leads to water diuresis (De Mota et al., 2004). Regarding the role of apelin in the control of food intake, its precise function remains to be established. Studies demonstrate a stimulatory effect on food intake (Lin et al., 2014; Valle et al., 2008), an inhibitory effect (Sunter et al., 2003) or neutral action (Taheri et al., 2002). Such discrepancies could be justified by the injected quantity of apelin into the brain, the route of injection and animal species. To unravel the role of hypothalamic apelin, we have generated a mouse model invalidated for apelin gene specifically in the forebrain. These mice present increased food intake demonstrating the definitive anorexigenic effect of apelin (unpublished data).

In addition to its behavioral functions, central apelin controls peripheral activities of various tissues. Thus, it is difficult to make a precise mapping of all the peripheral effects modulated by apelin/APJ system in the brain, but we are able to reference the main target tissues. First, the intestine is a target of brain apelin since icv administration of apelin inhibits gastric emptying and gastrointestinal transit in mice via APJ (Lv et al., 2011). Second, arterial blood pressure and heart rate are increased in response to icv apelin (Kagiyama et al., 2005). Recently, we have demonstrated that hypothalamic apelin/APJ system was involved in the control of glucose metabolism. Then, low-dose of icv apelin was able to decrease fed glycemia and improved glucose tolerance via a nitric oxide pathway (Duparc et al., 2011). These data suggest that, in addition to the rise of plasma apelin observed during the night period (corresponding to the fed period in mice) (Duparc et al., 2011), a physiological rise of apelin in the hypothalamus could participate to the maintenance of glucose homeostasis, and then improves glucose utilization. Similarly to plasma concentration, the level of hypothalamic apelin is also increased during metabolic disorders, (Cudnoch-jedrzejska et al., 2015; Reaux-Le Gozizgo et al., 2011). At the opposite, icv apelin injection in obese/diabetic mice did not improve the diabetic state, but generated a significant increase in fasted glycemia (Duparc et al., 2011). This study demonstrated that (1) central apelin is implicated in the establishment of T2D, and (2) there is an absence of apelin resistance in the brain during metabolic disorders in contrast to the effect of leptin. This deleterious effect of central apelin on glucose homeostasis is reinforced by the fact that icv acute and chronic injections of apelin (at a high-dose, similar to that observed in the hypothalamus of obese/diabetic mice) in normal lean mice generate fasted hyperglycemia, one characteristic of a type 2 diabetes phenotype (Duparc et al., 2011). Indeed, high-dose of icv apelin in normal mice generates an over-activation of sympathetic nervous system leading to an increase of hepatic glucose production (Drougard et al., 2014). Then, fasted hyperglycemia observed in this experiment was clearly linked to the stimulation of liver glycogenolysis and gluconeogenesis measured by a decrease in hepatic glycogen content and an elevated glycemia in response to a pyruvate tolerance test respectively (Drougard et al., 2014). Moreover, these mice presented a significant rise of the activity of glucose 6-phosphatase in the liver, an enzyme implicated in the positive control of glycogenolysis and gluconeogenesis. In conclusion, the liver appears to be a major target of central apelin action on

glucose metabolism. Whether central apelin could modulate the activity of other tissues remains to be determined.

Future therapeutic strategies that imply apelin as a possible molecular target to treat insulin resistance have to take into account the part played by central apelin in the control of glucose homeostasis.

6. APJ expression in metabolic diseases

Under physiological conditions, APJ is present in humans as well as in mouse tissues with high metabolic activity such as muscle and adipose tissue but not in the liver. Moreover, the presence and regulation of APJ in established adipocyte or muscle cell lines is less clear. With obesity, expression of APJ, like apelin, was increased in adipose tissue and this increase was closely related to plasma insulin concentrations (Boucher et al., 2005). However, this regulation by insulin was different according to the severity of insulin resistance. During the fasting/refeeding transition or in the fed state, the gene expression of APJ was significantly increased in adipose tissue of HFD mice but not in db/db mice (an obese mouse model of T2D due to a mutation in the leptin receptor). In muscle, APJ gene expression was not changed during this transition and decreased dramatically in db/db muscle (Dray et al., 2010). Thus the regulation of APJ expression was different in adipose tissue and muscle. This difference was also found in mice that received fat diet supplemented (or not) with a polyunsaturated fatty acid, the eicosapentaenoic acid. Indeed, eicosapentaenoic acid associated with HFD protects mice from obesity and prevents the development of metabolic alterations in muscle compared to mice fed only with HFD (Bertrand et al., 2013). These beneficial effects are accompanied by an increased APJ gene expression in muscle but not in adipose tissue (Bertrand et al., 2013).

In humans, APJ gene expression regulation in adipose tissue and muscle were similar to those described in mice. APJ expression increased in adipose tissue of obese women and decreased following weight loss induced by a low calorie diet (Castan-Laurell et al., 2008). In adipose tissue of healthy and type 2 diabetic patients, no significant difference was found in the basal state (Dray et al., 2010). However in biopsies taken before and after an hyperinsulinemic–euglycemic clamp, APJ expression increased only in adipose tissue of the control subjects. In muscle, although there was no difference in APJ expression between control and diabetic subjects, insulin infusion during the clamp caused an increase of APJ mRNA in both groups (Dray et al., 2010). By contrast, in a study in which obese subjects (but not diabetics) performed a physical training program of eight weeks, the expression of APJ remained unchanged in muscle biopsies taken before and after training whereas the expression of apelin was increased (Besse-Patin et al., 2014).

7. Plasma apelin concentrations and its forms in healthy humans

Since the discovery of apelin, several studies reported the plasma concentrations of apelin in human health and disease. Methods used for apelin quantification include enzyme immunoassays and radioimmunoassays. Nevertheless, using these approaches, the reported circulating levels in healthy persons varies greatly from one study to another oscillating between few picograms per milliliter (pg/ml) to several nanograms per milliliter (ng/ml) (for review: (Charles, 2008)). Moreover, to determine the specific forms of apelin present in the plasma but also in different tissues, gel filtration or high-performance liquid chromatography (HPLC) separation coupled with apelin-like immunoreactivity

detection were employed. Using these approaches, contradicting results were reported in the literature regarding the different forms identified in the plasma of healthy subjects. Indeed, in rat plasma, immunoreactive apelin was determined to be [Pyr-1]-apelin-13 and apelin-17 (De Mota et al., 2004) whereas in human plasma, those two forms of apelin were identified with apelin-36 (Azizi et al., 2008). However, an initial report identified apelin fragments, in human plasma, with molecular weight significantly higher than that of apelin-36 (Foldes et al., 2003). Conversely, Miettinen et al. described an immunoreactive apelin with a retention time comparable with apelin-13 (Miettinen et al., 2007).

Since immunoassays cannot specifically quantify each apelin peptide, a more reliable approach, mass spectrometry (MS) has been used recently to quantify and characterize apelin fragments in plasma. Using this technology, Zhen et al. showed that [Pyr-1]-apelin-13 was the major apelin form present in plasma of healthy subjects at concentrations ranging from 7.7 to 23.3 pg/ml (Zhen et al., 2013). However, it is noteworthy that a previous study using HPLC-MS did not detect any apelin fragments in the plasma of healthy persons (Mesmin et al., 2010) whereas this approach successfully identified 46 different apelin peptides in bovine colostrum (Mesmin et al., 2011).

Altogether, these conflicting data denote a lack in our current knowledge and emphasize the need to improve our approaches in order to better define the various apelin fragments that can be processed, their distribution and their particular functions.

8. Plasma apelin concentrations in diabetes

Numerous studies have reported plasma apelin concentrations in obese and/or diabetic subjects (for review see (Castan-Laurell et al., 2011)) and their number is still increasing. Most of the studies have shown higher apelin concentrations in type 2 diabetic patients compared to controls. Only two studies found low concentrations in newly diagnosed type 2 diabetic patients (Erdem et al., 2008; Zhang et al., 2009). Very recently it has been shown that there was a negative correlation between apelin levels and glycosylated hemoglobin in type 2 diabetic patients (Habchi et al., 2014). These results underline the role played by apelin in glycaemic balance and insulin sensitivity. Few studies have however reported the concentrations in type 1 diabetic patients and did the comparison with type 2 diabetic patients. In a first report, Alexiadou et al. (2012) showed that fasting plasma apelin concentrations were higher in type 1 diabetic patients compared to healthy subjects. However, apelin levels in diabetic subjects were not modified during an oral glucose tolerance test suggesting that they were not affected by high blood glucose. Recently plasma apelin concentrations were measured in both type 1 and type 2 diabetic subjects. Habchi et al. also showed that apelin concentrations were significantly higher in type 1 diabetic patients than in controls and even higher than in type 2 diabetic patients. Cavallo et al. reported different results: Type 2, but not type 1 diabetic patients, had increased serum apelin concentrations compared to non-diabetic subjects. (Cavallo et al., 2012). These discrepancies for type 1 diabetes could be explained by the differences in the population studied (age, body mass index and diabetes duration). The two studies showing increased concentrations of apelin in type 1 diabetes lead to interesting remarks. First, these results pointed out that obesity is probably not a main determinant of plasma apelin levels as previously reported (Castan-Laurell et al., 2011) and confirmed recently (Krist et al., 2013; Ma et al., 2014). Moreover, the higher concentrations of apelin found in type 1 diabetic subjects could be an attempt to compensate for the lack of insulin and to overcome insulin resistance. However patients were also treated with insulin that could as well explain this rise since insulin up

regulates apelin gene expression. Further studies are needed to explore this relationship between apelin and type 1 diabetes.

Interestingly, plasma apelin has been shown to be a novel biomarker for predicting diabetes (Ma et al., 2014). More than four hundred subjects (Han Chinese) were enrolled in this study performed at the National Taiwan University. Plasma apelin concentrations were higher in women than in men but they were associated with a risk of diabetes only in men. However, these data need to be confirmed and extended to other ethnic groups.

Acknowledgments

This work was supported by Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM). Original work realized in our team have received financial support from the SFD (Francophone Diabetes Society) and the SFN (French Nutrition Society).

References

- Alexiadou, K., Kokkinos, A., Liatis, S., Perrea, D., Katsilambros, N., Tentolouris, N., 2012. Differences in plasma apelin and visfatin levels between patients with type 1 diabetes mellitus and healthy subjects and response after acute hyperglycemia and insulin administration. *Hormones (Athens)* 11, 444–450.
- Alfarano, C., Foussal, C., Lairez, O., Calise, D., Attane, C., Anesia, R., Daviaud, D., Wanecq, E., Parini, A., Valet, P., Kunduzova, O., 2014. Transition from metabolic adaptation to maladaptation of the heart in obesity: role of apelin. *Int. J. Obes. (Lond.)*.
- Attane, C., Daviaud, D., Dray, C., Dusauly, R., Masseboeuf, M., Prevot, D., Carpenne, C., Castan-Laurell, I., Valet, P., 2011. Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo. *J. Mol. Endocrinol.* 46, 21–28.
- Attane, C., Foussal, C., Le Gonidec, S., Benani, A., Daviaud, D., Wanecq, E., Guzman-Ruiz, R., Dray, C., Bezair, V., Rancoule, C., Kuba, K., Ruiz-Gayo, M., Levade, T., Penninger, J., Burcelin, R., Penicaud, L., Valet, P., Castan-Laurell, I., 2012. Apelin treatment increases complete fatty acid oxidation, mitochondrial oxidative capacity, and biogenesis in muscle of insulin-resistant mice. *Diabetes* 61, 310–320.
- Audigier, Y., Van den Berghe, L., Masri, B., 2014. Apelin signaling in retinal angiogenesis. In: Feige, J.-J., Pagès, G., Soncin, F. (Eds.), *Molecular Mechanisms of Angiogenesis – From Ontogenesis to Oncogenesis*. Springer, Paris, pp. 121–148.
- Azizi, M., Iturriz, X., Blanchard, A., Peyrard, S., De Mota, N., Chartrel, N., Vaudry, H., Corvol, P., Llorens-Cortes, C., 2008. Reciprocal regulation of plasma apelin and vasopressin by osmotic stimuli. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 1015–1024.
- Bai, B., Cai, X., Jiang, Y., Karteris, E., Chen, J., 2014a. Heterodimerization of apelin receptor and neurotensin receptor 1 induces phosphorylation of ERK(1/2) and cell proliferation via Galphq-mediated mechanism. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 2071–2081.
- Bai, B., Liu, L., Zhang, N., Wang, C., Jiang, Y., Chen, J., 2014b. Heterodimerization of human apelin and bradykinin 1 receptors: novel signal transduction characteristics. *Cell Signal.* 26, 1549–1559.
- Bai, B., Tang, J., Liu, H., Chen, J., Li, Y., Song, W., 2008. Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activation through coupling of the human apelin receptor to the Gi2 pathway. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 40, 311–318.
- Beaubien, G., Schafer, M.K., Weihe, E., Dong, W., Chretien, M., Seidah, N.G., Day, R., 1995. The distinct gene expression of the pro-hormone convertases in the rat heart suggests potential substrates. *Cell Tissue Res.* 279, 539–549.
- Berta, J., Hoda, M.A., Laszlo, V., Rozsas, A., Garay, T., Torok, S., Grusch, M., Berger, W., Paku, S., Renyi-Vamos, F., Masri, G., Klepetko, W., Hegedus, B., Dome, B., 2014. Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget* 5, 4426–4437.
- Berta, J., Kenessey, I., Dobos, J., Tovari, J., Klepetko, W., Jan Ankersmit, H., Hegedus, B., Renyi-Vamos, F., Varga, J., Lorincz, Z., Paku, S., Ostoros, G., Rozsas, A., Timar, J., Dome, B., 2010. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J. Thorac. Oncol.* 5, 1120–1129.
- Bertrand, C., Pignalosa, A., Wanecq, E., Rancoule, C., Batut, A., Deleruyelle, S., Lionetti, L., Valet, P., Castan-Laurell, I., 2013. Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle. *PLoS One* 8, e78874.
- Besse-Patin, A., Montastier, E., Vinel, C., Castan-Laurell, I., Louche, K., Dray, C., Daviaud, D., Mir, L., Marques, M.A., Thalamas, C., Valet, P., Langin, D., Moro, C., Viguerie, N., 2014. Effect of endurance training on skeletal muscle myokine expression in obese men: identification of apelin as a novel myokine. *Int. J. Obes. (Lond.)* 38, 707–713.
- Bonnard, C., Durand, A., Peyrol, S., Chanseaux, E., Chauvin, M.A., Morio, B., Vidal, H., Rieusset, J., 2008. Mitochondrial dysfunction results from oxidative stress in the skeletal muscle of diet-induced insulin-resistant mice. *J. Clin. Investig.* 118, 789–800.
- Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigne, C., Mazzucotelli, A., Castan-

- Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpena, C., Audigier, Y., Saulnier-Blache, J.S., Valet, P., 2005. Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146, 1764–1771.
- Castan-Laurell, I., Dray, C., Attane, C., Duparc, T., Knauf, C., Valet, P., 2011. Apelin, diabetes, and obesity. *Endocrine* 40, 1–9.
- Castan-Laurell, I., Dray, C., Knauf, C., Kunduzova, O., Valet, P., 2012. Apelin, a promising target for type 2 diabetes treatment? *Trends Endocrinol. Metab.* 23, 234–241.
- Castan-Laurell, I., Vitkova, M., Daviaud, D., Dray, C., Kovacicova, M., Kovacova, Z., Hejnova, J., Stich, V., Valet, P., 2008. Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *Eur. J. Endocrinol.* 158, 905–910.
- Cavallo, M.G., Sentinelli, F., Barchetta, I., Costantino, C., Incani, M., Perra, L., Capoccia, D., Romeo, S., Cossu, E., Leonetti, F., Agati, L., Baroni, M.G., 2012. Altered glucose homeostasis is associated with increased serum apelin levels in type 2 diabetes mellitus. *PLoS One* 7, e51236.
- Ceraudo, E., Galanthe, C., Carpentier, E., Banegas-Font, I., Schonegge, A.M., Alvear-Perez, R., Iturrioz, X., Bouvier, M., Llorens-Cortes, C., 2014. Biased signaling favoring G_i over beta-arrestin promoted by an apelin fragment lacking the C-terminal phenylalanine. *J. Biol. Chem.* 289, 24599–24610.
- Chapman, N.A., Dupre, D.J., Rainey, J.K., 2014. The apelin receptor: physiology, pathology, cell signalling, and ligand modulation of a peptide-activated class A GPCR. *Biochem. Cell. Biol.* 92, 431–440.
- Charles, C., 2008. The apelin peptides as putative targets in cardiovascular drug discovery and development. *Expert Opin. Drug Discov.* 3, 51–64.
- Chen, X., Bai, B., Tian, Y., Du, H., Chen, J., 2014. Identification of serine 348 on the apelin receptor as a novel regulatory phosphorylation site in apelin-13-induced G protein-independent biased signaling. *J. Biol. Chem.* 289, 31173–31187.
- Chng, S.C., Ho, L., Tian, J., Reversade, B., 2013. ELABELA: a hormone essential for heart development signals via the apelin receptor. *Dev. Cell* 27, 672–680.
- Chun, H.J., Ali, Z.A., Kojima, Y., Kundu, R.K., Sheikh, A.Y., Agrawal, R., Zheng, L., Leeper, N.J., Pearl, N.E., Patterson, A.J., Anderson, J.P., Tsao, P.S., Lenardo, M.J., Ashley, E.A., Quertermous, T., 2008. Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J. Clin. Investig.* 118, 3343–3354.
- Cox, C.M., D'Agostino, S.L., Miller, M.K., Heimark, R.L., Krieg, P.A., 2006. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev. Biol.* 296, 177–189.
- Cudnoch-Jedrzejewska, A., Gomolka, R., Szczepanska-Sadowska, E., Czarzasta, K., Wrzesien, R., Koperski, L., Puchalska, L., Wsol, A., 2015. High-fat diet and chronic stress reduce central pressor and tachycardic effects of apelin in Sprague–Dawley rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 42, 52–62.
- Cui, R.R., Mao, D.A., Yi, L., Wang, C., Zhang, X.X., Xie, H., Wu, X.P., Liao, X.B., Zhou, H., Meng, J.C., Yuan, L.Q., Liao, E.Y., 2010. Apelin suppresses apoptosis of human vascular smooth muscle cells via APJ/PI3-K/Akt signaling pathways. *Amino Acids* 39, 1193–1200.
- D'Aniello, C., Lonardo, E., Iaconis, S., Guardiola, O., Liguoro, A.M., Liguori, G.L., Autiero, M., Carmeliet, P., Minchiotti, G., 2009. G protein-coupled receptor APJ and its ligand apelin act downstream of Cripto to specify embryonic stem cells toward the cardiac lineage through extracellular signal-regulated kinase/p70S6 kinase signaling pathway. *Circ. Res.* 105, 231–238.
- De Mota, N., Reaux-Le Goazigo, A., El Messari, S., Chartrel, N., Roesch, D., Dujardin, C., Kordon, C., Vaudry, H., Moos, F., Llorens-Cortes, C., 2004. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 10464–10469.
- Devic, E., Paquereau, L., Vernier, P., Knibiehler, B., Audigier, Y., 1996. Expression of a new G protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* 59, 129–140.
- Devic, E., Rizzotti, K., Bodin, S., Knibiehler, B., Audigier, Y., 1999. Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of *Xenopus* X-msr and human APJ. *Mech. Dev.* 84, 199–203.
- Dray, C., Debard, C., Jager, J., Disse, E., Daviaud, D., Martin, P., Attane, C., Wanecq, E., Guigne, C., Bost, F., Tanti, J.F., Laville, M., Vidal, H., Valet, P., Castan-Laurell, I., 2010. Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E1161–E1169.
- Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buleon, M., Cani, P.D., Attane, C., Guigne, C., Carpena, C., Burcelin, R., Castan-Laurell, I., Valet, P., 2008. Apelin stimulates glucose utilization in normal and obese insulin-resistant mice. *Cell Metab.* 8, 437–445.
- Dray, C., Sakar, Y., Vinel, C., Daviaud, D., Masri, B., Garrigues, L., Wanecq, E., Galvani, S., Negre-Salvayre, A., Barak, L.S., Monsarrat, B., Burlet-Schiltz, O., Valet, P., Castan-Laurell, I., Ducroc, R., 2013. The intestinal glucose–apelin cycle controls carbohydrate absorption in mice. *Gastroenterology* 144, 771–780.
- Drougard, A., Duparc, T., Brenachot, X., Carneiro, L., Gouaze, A., Fournel, A., Geurts, L., Cadoudal, T., Prats, A.C., Penicaud, L., Vieau, D., Lesage, J., Leloup, C., Benani, A., Cani, P.D., Valet, P., Knauf, C., 2014. Hypothalamic apelin/reactive oxygen species signaling controls hepatic glucose metabolism in the onset of diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 557–573.
- Duparc, T., Colom, A., Cani, P.D., Massaly, N., Rastrelli, S., Drougard, A., Le Gonidec, S., Mouldedous, L., Frances, B., Leclercq, I., Llorens-Cortes, C., Pospisilik, J.A., Delzenne, N.M., Valet, P., Castan-Laurell, I., Knauf, C., 2011. Central apelin controls glucose homeostasis via a nitric oxide-dependent pathway in mice. *Antioxid. Redox Signal.* 15, 1477–1496.
- El Messari, S., Iturrioz, X., Fassot, C., De Mota, N., Roesch, D., Llorens-Cortes, C., 2004. Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J. Neurochem.* 90, 1290–1301.
- Erdem, G., Dogru, T., Tasci, I., Sonmez, A., Tapan, S., 2008. Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 116, 289–292.
- Fan, X., Zhou, N., Zhang, X., Mukhtar, M., Lu, Z., Fang, J., DuBois, G.C., Pomerantz, R.J., 2003. Structural and functional study of the apelin-13 peptide, an endogenous ligand of the HIV-1 coreceptor, APJ. *Biochemistry* 42, 10163–10168.
- Ferre, S., Casado, V., Devi, L.A., Filizola, M., Jockers, R., Lohse, M.J., Milligan, G., Pin, J. P., Guitart, X., 2014. G protein-coupled receptor oligomerization revisited: functional and pharmacological perspectives. *Pharmacol. Rev.* 66, 413–434.
- Foldes, G., Horkay, F., Szokodi, I., Vuolteenaho, O., Ilves, M., Lindstedt, K.A., Mayr-anpaa, M., Sarman, B., Seres, L., Skoumal, R., Lako-Futo, Z., deChatel, R., Ruskoaho, H., Toth, M., 2003. Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 480–485.
- Galanthe, C., Hus-Citharel, A., Li, B., Llorens-Cortes, C., 2012. Apelin in the control of body fluid homeostasis and cardiovascular functions. *Curr. Pharm. Des.* 18, 789–798.
- Gerbier, R., Leroux, V., Couvineau, P., Alvear-Perez, R., Maigret, B., Llorens-Cortes, C., Iturrioz, X., 2015. New structural insights into the apelin receptor: identification of key residues for apelin binding. *FASEB J.* 29, 314–322.
- Gurevich, V.V., Gurevich, E.V., 2014. Extensive shape shifting underlies functional versatility of arrestins. *Curr. Opin. Cell Biol.* 27, 1–9.
- Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Murosaki, S., Kurokawa, T., Onda, H., Tatemoto, K., Fujino, M., 1999. Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim. Biophys. Acta* 1452, 25–35.
- Habchi, M., Duvillard, L., Cottet, V., Brindisi, M.C., Bouillet, B., Beacco, M., Crevisy, E., Buffier, P., Baillot-Rudoni, S., Verges, B., Petit, J.M., 2014. Circulating apelin is increased in patients with type 1 or type 2 diabetes and is associated with better glycaemic control. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 81, 696–701.
- Han, R.W., Xu, H.J., Zhang, R.S., Wang, R., 2014. The role of apelin-13 in novel object recognition memory. *Peptides* 62, 155–158.
- Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 2000. Molecular and functional characteristics of APJ. Tissue distribution of mRNA and interaction with the endogenous ligand apelin. *J. Biol. Chem.* 275, 21061–21067.
- Iturrioz, X., Alvear-Perez, R., De Mota, N., Franchet, C., Guillier, F., Leroux, V., Dabire, H., Le Jouan, M., Chabane, H., Gerbier, R., Bonnet, D., Berdeaux, A., Maigret, B., Galzi, J.L., Hibert, M., Llorens-Cortes, C., 2009. Identification and pharmacological properties of E339–3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist. *FASEB J.*
- Iturrioz, X., Gerbier, R., Leroux, V., Alvear-Perez, R., Maigret, B., Llorens-Cortes, C., 2010. By interacting with the C-terminal Phe of apelin, Phe255 and Trp259 in helix VI of the apelin receptor are critical for internalization. *J. Biol. Chem.* 285, 32627–32637.
- Kagiyama, S., Fukuhara, M., Matsumura, K., Lin, Y., Fujii, K., Iida, M., 2005. Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rats. *Regul. Pept.* 125, 55–59.
- Kalin, R.E., Kretz, M.P., Meyer, A.M., Kispert, A., Heppner, F.L., Brandli, A.W., 2007. Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev. Biol.* 305, 599–614.
- Kang, D.S., Tian, X., Benovic, J.L., 2014. Role of beta-arrestins and arrestin domain-containing proteins in G protein-coupled receptor trafficking. *Curr. Opin. Cell Biol.* 27, 63–71.
- Kang, Y., Kim, J., Anderson, J.P., Wu, J., Gleim, S.R., Kundu, R.K., McLean, D.L., Kim, J. D., Park, H., Jin, S.W., Hwa, J., Quertermous, T., Chun, H.J., 2013. Apelin-APJ signaling is a critical regulator of endothelial MEF2 activation in cardiovascular development. *Circ. Res.* 113, 22–31.
- Kasai, A., Ishimaru, Y., Kinjo, T., Satooka, T., Matsumoto, N., Yoshioka, Y., Yamamuro, A., Gomi, F., Shintani, N., Baba, A., Maeda, S., 2010. Apelin is a crucial factor for hypoxia-induced retinal angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2182–2187.
- Kasai, A., Shintani, N., Kato, H., Matsuda, S., Gomi, F., Haba, R., Hashimoto, H., Kakuda, M., Tano, Y., Baba, A., 2008. Retardation of retinal vascular development in apelin-deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1717–1722.
- Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., Fujino, M., 2001. Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta* 1538, 162–171.
- Koves, T.R., Ussher, J.R., Noland, R.C., Slentz, D., Mosedale, M., Ilkayeva, O., Bain, J., Stevens, R., Dyck, J.R., Newgard, C.B., Lopaschuk, G.D., Muoio, D.M., 2008. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab.* 7, 45–56.
- Krist, J., Wieder, K., Kloting, N., Oberbach, A., Kralisch, S., Wiesner, T., Schon, M.R., Gartner, D., Dietrich, A., Shang, E., Lohmann, T., Dressler, M., Fasshauer, M., Stumvoll, M., Bluher, M., 2013. Effects of weight loss and exercise on apelin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Obes. Facts* 6, 57–69.
- Langelang, D.N., Reddy, T., Banks, A.W., Dellaire, G., Dupre, D.J., Rainey, J.K., 2013. Structural features of the apelin receptor N-terminal tail and first transmembrane segment implicated in ligand binding and receptor trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 1471–1483.
- Lee, D.K., Ferguson, S.S., George, S.R., O'Dowd, B.F., 2010. The fate of the internalized

- apelin receptor is determined by different isoforms of apelin mediating differential interaction with beta-arrestin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395, 185–189.
- Lee, D.K., Saldivia, V.R., Nguyen, T., Cheng, R., George, S.R., O'Dowd, B.F., 2005. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 146, 231–236.
- Li, Y., Chen, J., Bai, B., Du, H., Liu, Y., Liu, H., 2012. Heterodimerization of human apelin and kappa opioid receptors: roles in signal transduction. *Cell Signal.* 24, 991–1001.
- Lin, F., Wu, H., Chen, H., Xin, Z., Yuan, D., Wang, T., Liu, J., Gao, Y., Zhang, X., Zhou, C., Wei, R., Chen, D., Yang, S., Wang, Y., Pu, Y., Li, Z., 2014. Molecular and physiological evidences for the role in appetite regulation of apelin and its receptor APJ in Ya-fish (*Schizothorax prenanti*). *Mol. Cell. Endocrinol.* 396, 46–57.
- Liu, C., Su, T., Li, F., Li, L., Qin, X., Pan, W., Feng, F., Chen, F., Liao, D., Chen, L., 2010. PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 42, 396–402.
- Liu, Q., Hu, T., He, L., Huang, X., Tian, X., Zhang, H., Pu, W., Zhang, L., Sun, H., Fang, J., Yu, Y., Duan, S., Hu, C., Hui, L., Quertermous, T., Xu, Q., Red-Horse, K., Wythe, J.D., Zhou, B., 2015. Genetic targeting of sprouting angiogenesis using Apln-CreER. *Nat. Commun.* 6, 6020.
- Llorens-Cortes, C., Moos, F., 2008. Opposite potentialities of hypothalamic coexpressed neuropeptides, apelin and vasopressin in maintaining body-fluid homeostasis. *Prog. Brain Res.* 170, 559–570.
- Lv, S.Y., Qin, Y.J., Wang, H.T., Xu, N., Yang, Y.J., Chen, Q., 2012a. Centrally administered apelin-13 induces depression-like behavior in mice. *Brain Res. Bull.* 88, 574–580.
- Lv, S.Y., Qin, Y.J., Wang, N.B., Yang, Y.J., Chen, Q., 2012b. Supraspinal antinociceptive effect of apelin-13 in a mouse visceral pain model. *Peptides* 37, 165–170.
- Lv, S.Y., Yang, Y.J., Chen, Q., 2013. Regulation of feeding behavior, gastrointestinal function and fluid homeostasis by apelin. *Peptides* 44, 87–92.
- Lv, S.Y., Yang, Y.J., Qin, Y.J., Xiong, W., Chen, Q., 2011. Effect of centrally administered apelin-13 on gastric emptying and gastrointestinal transit in mice. *Peptides* 32, 978–982.
- Ma, W.Y., Yu, T.Y., Wei, J.N., Hung, C.S., Lin, M.S., Liao, Y.J., Pei, D., Su, C.C., Lu, K.C., Liu, P.H., Lin, C.H., Chuang, L.M., Kao, H.L., Lin, J.W., Chuang, Y.J., Li, H.Y., 2014. Plasma apelin: a novel biomarker for predicting diabetes. *Clin. Chim. Acta* 435, 18–23.
- Macaluso, N.J., Pitkin, S.L., Maguire, J.J., Davenport, A.P., Glen, R.C., 2011. Discovery of a competitive apelin receptor (APJ) antagonist. *ChemMedChem* 6, 1017–1023.
- Maguire, J.J., Klein, M.J., Pitkin, S.L., Davenport, A.P., 2009. [Pyr1]apelin-13 identified as the predominant apelin isoform in the human heart: vasoactive mechanisms and inotropic action in disease. *Hypertension* 54, 598–604.
- Maloney, P.R., Khan, P., Hedrick, M., Gosalia, P., Milewski, M., Li, L., Roth, G.P., Sergienko, E., Suyama, E., Sugarman, E., Nguyen, K., Mehta, A., Vasile, S., Su, Y., Stonich, D., Nguyen, H., Zeng, F.Y., Novo, A.M., Vicchiarelli, M., Diwan, J., Chung, T.D., Smith, L.H., Pinkerton, A.B., 2012. Discovery of 4-oxo-6-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-pyran-3-yl 4-nitrobenzoate (ML221) as a functional antagonist of the apelin (APJ) receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22, 6656–6660.
- Masri, B., Knibiehler, B., Audigier, Y., 2005. Apelin signalling: a promising pathway from cloning to pharmacology. *Cell Signal.* 17, 415–426.
- Masri, B., Lahlou, H., Mazarguil, H., Knibiehler, B., Audigier, Y., 2002. Apelin (65-77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 539–545.
- Masri, B., Morin, N., Cornu, M., Knibiehler, B., Audigier, Y., 2004. Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J.* 18, 1909–1911.
- Masri, B., Morin, N., Pedebemad, L., Knibiehler, B., Audigier, Y., 2006. The apelin receptor is coupled to G11 or G12 protein and is differentially desensitized by apelin fragments. *J. Biol. Chem.* 281, 18317–18326.
- Medhurst, A.D., Jennings, C.A., Robbins, M.J., Davis, R.P., Ellis, C., Winborn, K.Y., Lawrie, K.W., Hervieu, G., Riley, G., Bolaky, J.E., Herrity, N.C., Murdock, P., Darker, J.G., 2003. Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J. Neurochem.* 84, 1162–1172.
- Mesmin, C., Dubois, M., Becher, F., Fenaille, F., Ezan, E., 2010. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the absolute quantification of the expected circulating apelin peptides in human plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24, 2875–2884.
- Mesmin, C., Fenaille, F., Becher, F., Tabet, J.C., Ezan, E., 2011. Identification and characterization of apelin peptides in bovine colostrum and milk by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 10, 5222–5231.
- Miettinen, K.H., Magga, J., Vuolteenaho, O., Vanninen, E.J., Punnonen, K.R., Ylitalo, K., Tuomainen, P., Peuhkurinen, K.J., 2007. Utility of plasma apelin and other indices of cardiac dysfunction in the clinical assessment of patients with dilated cardiomyopathy. *Regul. Pept.* 140, 178–184.
- Mihalik, S.J., Goodpaster, B.H., Kelley, D.E., Chace, D.H., Vockley, J., Toledo, F.G., DeLany, J.P., 2010. Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipotoxicity. *Obesity (Silver Spring)* 18, 1695–1700.
- O'Carroll, A.M., Lolaït, S.J., Harris, L.E., Pope, G.R., 2013. The apelin receptor APJ: journey from an orphan to a multifaceted regulator of homeostasis. *J. Endocrinol.* 219, R13–R35.
- O'Donnell, L.A., Agrawal, A., Sabnekar, P., Dichter, M.A., Lynch, D.R., Kolson, D.L., 2007. Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury. *J. Neurochem.* 102, 1905–1917.
- O'Dowd, B.F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H.H., Tsui, L.C., Kennedy, J.L., Shi, X., Petronis, A., George, S.R., Nguyen, T., 1993. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136, 355–360.
- Pauli, A., Norris, M.L., Valen, E., Chew, G.L., Gagnon, J.A., Zimmerman, S., Mitchell, A., Ma, J., Duddle, J., Reyon, D., Tsai, S.Q., Jung, J.K., Saghatelian, A., Schier, A.F., 2014. Tdr1: an embryonic signal that promotes cell movement via Apelin receptors. *Science* 343, 1248636.
- Picault, F.X., Chaves-Almagro, C., Progetti, F., Prats, H., Masri, B., Audigier, Y., 2014. Tumour co-expression of apelin and its receptors is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas. *Eur. J. Cancer* 50, 663–674.
- Reaux-Le Goazigo, A., Bodineau, L., De Mota, N., Jeandel, L., Chartrel, N., Knauf, C., Raad, C., Valet, P., Llorens-Cortes, C., 2011. Apelin and the proopiomelanocortin system: a new regulatory pathway of hypothalamic alpha-MSH release. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 301, E955–E966.
- Ringstrom, C., Nitert, M.D., Bennet, H., Fex, M., Valet, P., Rehfeld, J.F., Friis-Hansen, L., Wierup, N., 2010. Apelin is a novel islet peptide. *Regul. Pept.* 162, 44–51.
- Rivero-Muller, A., Jonas, K.C., Hanyaloglu, A.C., Huhtaniemi, I., 2013. Di/oligomerization of GPCRs – mechanisms and functional significance. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* 117, 163–185.
- Saint-Geniez, M., Masri, B., Malecaze, F., Knibiehler, B., Audigier, Y., 2002. Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mech. Dev.* 110, 183–186.
- Salahpour, A., Masri, B., 2007. Experimental challenge to a “rigorous” BRET analysis of GPCR oligomerization. *Nat. Methods* 4, 599–600 (author reply 601).
- Sawane, M., Kajiya, K., Kidoya, H., Takagi, M., Muramatsu, F., Takakura, N., 2013. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes* 62, 1970–1980.
- Scarpulla, R.C., 2008. Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiol. Rev.* 88, 611–638.
- Scimia, M.C., Hurtado, C., Ray, S., Metzler, S., Wei, K., Wang, J., Woods, C.E., Purcell, N.H., Lataluch, D., Akasaka, T., Bueno, O.F., Vlasuk, G.P., Kaliman, P., Bodmer, R., Smith, L.H., Ashley, E., Mercola, M., Brown, J.H., Ruiz-Lozano, P., 2012. APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. *Nature* 488, 394–398.
- Scott, I.C., Masri, B., D'Amico, L.A., Jin, S.W., Jungblut, B., Wehman, A.M., Baier, H., Audigier, Y., Stainier, D.Y., 2007. The G protein-coupled receptor agr11b regulates early development of myocardial progenitors. *Dev. Cell* 12, 403–413.
- Shin, K., Pandey, A., Liu, X.Q., Anini, Y., Rainey, J.K., 2013. Preferential apelin-13 production by the proprotein convertase PCSK3 is implicated in obesity. *FEBS Open Bio.* 3, 328–333.
- Siddiquee, K., Hampton, J., McAnally, D., May, L., Smith, L., 2013. The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *Br. J. Pharmacol.* 168, 1104–1117.
- Sorhede Winzell, M., Magnusson, C., Ahren, B., 2005. The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul. Pept.* 131, 12–17.
- Sorli, S.C., Le Gonidec, S., Knibiehler, B., Audigier, Y., 2007. Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene* 26, 7692–7699.
- Sorli, S.C., van den Berghe, L., Masri, B., Knibiehler, B., Audigier, Y., 2006. Therapeutic potential of interfering with apelin signalling. *Drug Discov. Today* 11, 1100–1106.
- Sun, X., Iida, S., Yoshikawa, A., Senbonmatsu, R., Imanaka, K., Maruyama, K., Nishimura, S., Inagami, T., Senbonmatsu, T., 2011. Non-activated APJ suppresses the angiotensin II type 1 receptor, whereas apelin-activated APJ acts conversely. *Hypertens. Res.* 34, 701–706.
- Sunter, D., Hewson, A.K., Dickson, S.L., 2003. Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci. Lett.* 353, 1–4.
- Szokodi, I., Tavi, P., Foldes, G., Voutilainen-Myllylä, S., Ilves, M., Tokola, H., Pikkarainen, S., Piihola, J., Rysa, J., Toth, M., Ruskoaho, H., 2002. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ. Res.* 91, 434–440.
- Taheri, S., Murphy, K., Cohen, M., Sujkovic, E., Kennedy, A., Dhillon, W., Dakin, C., Sajedi, A., Ghatel, M., Bloom, S., 2002. The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 1208–1212.
- Tang, S.Y., Xie, H., Yuan, L.Q., Luo, X.H., Huang, J., Cui, R.R., Zhou, H.D., Wu, X.P., Liao, E.Y., 2007. Apelin stimulates proliferation and suppresses apoptosis of mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 via JNK and PI3-K/Akt signaling pathways. *Peptides* 28, 708–718.
- Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., Kurokawa, T., Onda, H., Fujino, M., 1998. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 471–476.
- Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M.X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., Fujimiya, M., 2001. The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul. Pept.* 99, 87–92.
- Telegdy, G., Jaszberenyi, M., 2014. Transmitter mediation of the anxiolytic action of apelin-13 in male mice. *Behav. Brain Res.* 263, 198–202.
- Than, A., Cheng, Y., Foh, L.C., Leow, M.K., Lim, S.C., Chuah, Y.J., Kang, Y., Chen, P., 2012. Apelin inhibits adipogenesis and lipolysis through distinct molecular pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 362, 227–241.
- Tiani, C., Garcia-Pras, E., MejiasM., deGottardi, A., Berzigotti, A., Bosch, J., Fernandez, M., 2008. Apelin signaling modulates splanchnic angiogenesis and portosystemic collateral vessel formation in rats with portal hypertension. *J. Hepatol.* 50, 296–305.
- Valle, A., Hoggard, N., Adams, A.C., Roca, P., Speakman, J.R., 2008. Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight,

- locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice. *J. Neuroendocrinol.* 20, 79–84.
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., Acton, S., Patane, M., Nichols, A., Tummino, P., 2002. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 277, 14838–14843.
- Xie, H., Tang, S.Y., Cui, R.R., Huang, J., Ren, X.H., Yuan, L.Q., Lu, Y., Yang, M., Zhou, H. D., Wu, X.P., Luo, X.H., Liao, E.Y., 2006. Apelin and its receptor are expressed in human osteoblasts. *Regul. Pept.* 134, 118–125.
- Xie, H., Yuan, L.Q., Luo, X.H., Huang, J., Cui, R.R., Guo, L.J., Zhou, H.D., Wu, X.P., Liao, E. Y., 2007. Apelin suppresses apoptosis of human osteoblasts. *Apoptosis* 12, 247–254.
- Xu, S., Han, P., Huang, M., Wu, J.C., Chang, C., Tsao, P.S., Yue, P., 2012. In vivo, ex vivo, and in vitro studies on apelin's effect on myocardial glucose uptake. *Peptides* 37, 320–326.
- Yamamoto, T., Habata, Y., Matsumoto, Y., Yasuhara, Y., Hashimoto, T., Hamajyo, H., Anayama, H., Fujii, R., Fuse, H., Shintani, Y., Mori, M., 2011. Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta* 1810, 853–862.
- Yang, Y., Zhang, X., Cui, H., Zhang, C., Zhu, C., Li, L., 2014. Apelin-13 protects the brain against ischemia/reperfusion injury through activating PI3K/Akt and ERK1/2 signaling pathways. *Neurosci. Lett.* 568, 44–49.
- Yue, P., Jin, H., Aillaud, M., Deng, A.C., Azuma, J., Asagami, T., Kundu, R.K., Reaven, G. M., Quertermous, T., Tsao, P.S., 2010. Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 298, E59–E67.
- Yue, P., Jin, H., Xu, S., Aillaud, M., Deng, A.C., Azuma, J., Kundu, R.K., Reaven, G.M., Quertermous, T., Tsao, P.S., 2011. Apelin decreases lipolysis via G(q), G(i), and AMPK-dependent mechanisms. *Endocrinology* 152, 59–68.
- Zeng, X.J., Yu, S.P., Zhang, L., Wei, L., 2010. Neuroprotective effect of the endogenous neural peptide apelin in cultured mouse cortical neurons. *Exp. Cell Res.* 316, 1773–1783.
- Zeng, X.X., Wilm, T.P., Sepich, D.S., Solnica-Krezel, L., 2007. Apelin and its receptor control heart field formation during zebrafish gastrulation. *Dev. Cell* 12, 391–402.
- Zhang, Y., Shen, C., Li, X., Ren, G., Fan, X., Ren, F., Zhang, N., Sun, J., Yang, J., 2009. Low plasma apelin in newly diagnosed type 2 diabetes in Chinese people. *Diabetes Care* 32, e150.
- Zhen, E.Y., Higgs, R.E., Gutierrez, J.A., 2013. Pyroglutamyl apelin-13 identified as the major apelin isoform in human plasma. *Anal. Biochem.* 442, 1–9.
- Zhou, N., Fang, J., Acheampong, E., Mukhtar, M., Pomerantz, R.J., 2003a. Binding of ALX40-4C to APJ, a CNS-based receptor, inhibits its utilization as a co-receptor by HIV-1. *Virology* 312, 196–203.
- Zhou, N., Zhang, X., Fan, X., Argyris, E., Fang, J., Acheampong, E., DuBois, G.C., Pomerantz, R.J., 2003b. The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity. *Virology* 317, 84–94.
- Zhu, S., Sun, F., Li, W., Cao, Y., Wang, C., Wang, Y., Liang, D., Zhang, R., Zhang, S., Wang, H., Cao, F., 2011. Apelin stimulates glucose uptake through the PI3K/Akt pathway and improves insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 353, 305–313.



Tumour co-expression of apelin and its receptor is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas



François-Xavier Picault^a, Carline Chaves-Almagro^a, Fabrice Projetti^b, Hervé Prats^a, Bernard Masri^{a,1}, Yves Audigier^{a,*,1}

^a *Cancer Research Center of Toulouse, UMR 1037 INSERM – Université Toulouse III, CHU Rangueil, Bât L3, 1, Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse, France*

^b *Center of Biological Resources, CHU Rangueil, Bât L2, 1, Avenue Jean Poulhès, BP 84225, 31432 Toulouse, France*

Available online 5 December 2013

KEYWORDS

Colon cancer
Tumour growth
Apoptosis
G protein-coupled receptors
Signalisation

Abstract Using a cancer profiling array, our laboratory has shown that apelin gene is up-regulated in half of colon adenocarcinomas. We have therefore postulated that apelin signalling might play a prominent role in the growth of colon tumours. We first confirmed by immunohistochemistry that apelin peptide is overexpressed in human colon adenomas and adenocarcinomas. We also observed a significant overexpression of apelin receptor (APJ) in adjacent sections. We then demonstrated that several colorectal cancer cell lines also expressed apelin and its receptor, the highest gene and peptide expression being detected in LoVo cells. In this cell line, the expression and functionality of apelin receptor were revealed by apelin-induced adenylyl cyclase inhibition and Akt phosphorylation. In addition, apelin clearly protected LoVo cells from apoptosis by inactivating a caspase-dependent pathway and decreasing the degradation of poly ADP ribose polymerase protein (PARP). Finally, treatment of these tumour cells by the (F13A)apelin13 receptor antagonist significantly reduced their proliferation rate. Altogether, these data suggest the existence of an autocrine loop by which constitutive activation of apelin signalling should participate in the growth of colon adenocarcinomas. Accordingly, apelin signalling is a promising pharmacological target for the treatment of human colon adenomas and adenocarcinomas.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

* *Corresponding author:* Tel.: +33 5 31 22 41 13; fax: +33 5 61 32 21 41.

E-mail address: yves.audigier@inserm.fr (Y. Audigier).

¹ B. Masri and Y. Audigier are co-last authors.

1. Introduction

Apelin signalling is an emerging pathway which participates in various physiological functions [1]. Apelin receptor (APJ) is a member of the G protein-coupled receptor family that was first cloned from human genomic DNA [2] and later from mRNAs extracted from *Xenopus* or mouse embryos [3,4]. Apelin receptor remained orphan until the discovery of its endogenous ligand that was named apelin [5]. The translation product of the apelin gene corresponds to a prepropeptide of 77 amino acids that a signal peptide targets to the endoplasmic reticulum. In the secretory pathway, the propeptide may undergo a proteolytic maturation at the level of three basic doublets, which would generate fragments of different sizes: apelin(42–77) (A36), apelin(61–77) (A17) and apelin(65–77) (A13). The smallest fragment may also be modified in a pyroglutaminated form (pA13). Apelin receptor is coupled to Gi proteins [6] and all apelin fragments induce the inhibition of adenylyl cyclase and phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases (ERKs), Akt and P70 S6 kinase [7,8].

The best established roles of apelin signalling are related to the expression of apelin receptors in hypothalamus, vessels, heart and endocrine pancreas. In the brain, the highest amount of receptor transcripts was detected in some hypothalamic nuclei [2,9,10]. In these nuclei, the receptors are located on vasopressinergic neurons where their stimulation inhibits vasopressin release [11]. Accordingly, apelin can be considered as a diuretic peptide. During formation of the blood vessels, endothelial cells express high levels of receptor mRNA [4,12]. This endothelial expression is associated with the mitogenic action of apelin on these cells [8], which is a prerequisite to extension of the vascular network [13]. Altogether, it clearly establishes that apelin displays the essential properties required for an angiogenic peptide. Expression of apelin receptors by cardiomyocytes is linked to apelin regulation of heart contractility where it acts as a very potent inotropic agent [14]. Finally, apelin expression by fat cells [15] and receptor expression by beta cells of endocrine pancreas [16] strongly suggest that apelin belongs to the adipokine family of peptides which regulate adipoinular axis.

As far as the gastrointestinal tract is concerned, apelin was primarily isolated from stomach extracts [5] and later shown to be expressed in several gastric cell types [17,18]. In addition, a transcriptome analysis together with immunohistochemical and functional studies provided evidence for an inhibitory feedback loop between apelin secreting parietal cells and receptor expressing enterochromaffin-like cells [19]. In the different intestinal segments, mRNA distribution studies revealed very low expression levels of apelin and its receptor in duodenum, jejunum, ileum, caecum, colon and rectum [20]. However,

experimental colitis in rodents as well as ulcerative colitis in human patients are associated with increased apelin mRNA levels and peptide expression [21]. Finally, as expected from the strong link between inflammation and hypoxia, intestinal inflammation increases the amount of hypoxia-inducible factor (HIF) and elevates apelin gene expression [22].

Hypoxia also represents a frequent hallmark of tumours and is the driving force leading to the pathological adjustment of the vascular network in response to decreased oxygen supply. Indeed, hypoxia up-regulates genes encoding angiogenic factors in tumour cells, notably that of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) [23]. Interestingly, apelin gene expression is also up-regulated by hypoxia in tumour cells [24]. But overexpression of the apelin gene can be independent of hypoxia and result from the gene alterations occurring in the transformed cells. Indeed, stable overexpression of apelin gene in tumoural cells leads to an earlier onset of tumour development in a mouse model of tumourigenesis [24]. Interestingly, the levels of apelin expression also have a clinical relevance as a correlation has been found in oral and lung cancers between apelin expression and clinical behaviour [25,26].

Using a cancer profiling array, a comparative analysis of apelin gene expression in normal and tumour tissues revealed an overall up-regulation of apelin gene in one third of human tumours [24]. Interestingly, this upregulation was observed in half of colon adenocarcinomas, suggesting that apelin signalling might play a significant role in angiogenesis and growth of human colon tumours. Indeed, apelin secreted by tumour cells would act in a paracrine manner on endothelial cells, thereby initiating the angiogenic response which promotes tumour neovascularisation.

In addition to this paracrine action, we hypothesised that apelin and its receptor might be co-expressed in the tumour compartment where this co-expression would underlie a constitutive activation of apelin signalling and create a functional autocrine loop. We report here for the first time that apelin peptide is highly expressed in human colon adenomas and tumours. In addition, a concomitant expression of apelin receptor was detected in the same samples. This co-expression was also observed in several colorectal cancer cell lines. In the LoVo cell line, quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) experiments and apelin-induced Akt phosphorylation confirmed the concomitant expression of both ligand and receptor. In addition, apelin behaved as an anti-apoptotic peptide by reversing caspase activation and poly ADP ribose polymerase protein (PARP) degradation induced by the MG132 proteasome inhibitor. Finally, the (F13A)apelin13 antagonist was able to significantly reduce the proliferation rate of LoVo cells. Altogether, these findings suggest the

existence of an autocrine loop by which apelin signalling would participate in the growth of colon tumours through activation of anti-apoptotic pathways.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Antibodies to apelin (FL-77) and anti-ERK2 were from Santa Cruz Biotechnology (CA, United States of America (USA)). Antibodies to anti-phospho-p44/42 MAPK, anti-phospho-S473 Akt, anti-Akt, cleaved Caspase 3 and anti-PARP were from Cell Signaling Technology (Ozyme, Montigny-le-Bretonneux, France). Antibody raised against the C-terminal peptide CKGGEQMHEKSIP of APJ receptor was from Proteogenix (Oberhausbergen, France). Antibody to A13 was kindly donated by Pr. Valet. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibodies were from Cell Signaling Technology and the secondary antibodies Alexafluor 546 goat anti-rabbit immunoglobulin G (IgG) were from Invitrogen (Saint Aubin, France). Monensin was from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, USA) and A13, pA13 or A36 were from Bachem (Bubendorf, Switzerland).

2.2. Cell culture

The LoVo, HT-29, HCT-116 and DLD-1 human colorectal cancer cell lines were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA). LoVo, HT-29, HCT-116 cells were cultured in Dubelcco's Modified Eagle Medium (DMEM) medium containing 4.5 g glucose (Lonza, Verviers, Belgium) and DLD-1 cell line was cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI 1640) (Lonza) in a 5% CO₂ humidified incubator at 37 °C. Each medium was supplemented with 10% foetal calf serum (Gibco, Saint Aubin, France), 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco).

2.3. Immunohistochemistry

5 µm paraffin sections of human colon tissues were kindly provided by the Center of Biological Resources (CRB) directed by Pr. A. Gomez-Brouchet at Rangueil Hospital (Toulouse, France). Patient samples were obtained after informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and stored at the 'CRB Cancer des Hôpitaux de Toulouse' collection. According to the French law, CRB Cancer collection has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC-2008-463) and obtained a transfer agreement (AC-2008-820) after approbation by ethics committees. Clinical and biological annotations of the samples have been declared to the CNIL (Comité

National Informatique et Libertés). Sections were deparaffinised in xylene and rehydrated, and antigen retrieval was performed with microwave treatment in a solution containing 0.01 M sodium citrate (pH 6). Sections were incubated for 10 min with protein block serum-free reagent (Dako, Carpinteria, CA, USA) and then incubated overnight at 4 °C with anti-A13 antibody (kindly donated by Pr. Valet) or anti-APJ antibody raised against the C-terminal peptide CKGGEQMHEKSIP (Proteogenix). Endogenous peroxidase activity was blocked by 3% H₂O₂ in 10% methanol/phosphate buffered solution (PBS) (vol/vol). Labelling was amplified with SignalStain Boost immunohistochemistry (IHC) Detection Reagent (HRP, Rabbit) (Cell Signaling Technology) and revealed with AEC Substrate-Chromogen (Dako). Sections were counterstained with Mayer's haematoxylin solution (Sigma–Aldrich). Images were taken using an Eclipse E400 microscope (Nikon Corporation, Japan) and Explora Nova Morpho Expert/Mosaic Software (Explora Nova, France).

2.4. Real-time reverse transcription-polymerase reaction

Total RNA was extracted with RNEasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and 1 µg was reverse-transcribed using Superscript II (Invitrogen). Real-time PCR was carried out using 50 ng of cDNA with Syber Green I kit (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) and a STEP ONE + detection system (Applied Biosystems). Primers used for PCR were 5'-gatgcccgtctcccgatg and 5'-attccttgaccctctgggct for human apelin and 5'-tcacgtgtgtgctggtgg and 5'-gccacagatgtacacgctc for apelin receptor. 18S cDNA was amplified with the primers 5'-cgaacgtctgcctatcaact and 5'-accctggtcaccatgta and used as a house keeping gene for normalisation. The relative gene expression was analysed using the 2^{-ΔΔCt} method [27].

2.5. Western immunoblot analysis

LoVo cells were seeded onto 6 cm culture dishes (6 × 10⁵ cells/dish). Twenty-four hours later, cells were serum starved for 24 h with the indicated treatment and then lysed as described [6,8]. Twenty µg of soluble proteins were fractionated on 10% sodium dodecyl sulphate (SDS)–polyacrylamide gels, except for caspases which were analysed with fifty µg of proteins fractionated on 18% SDS–polyacrylamide gels. The gels were then transferred to Protran nitrocellulose membranes (Schleider and Schuell, Germany) and immunoblotted with the appropriate primary and HRP-conjugated secondary antibodies as described before [6]. Bands were visualised using an ECL RevelBlot Plus kit (Ozyme) and Amersham hyperfilm ECL (GE Healthcare, Wauwatosa, WI, USA). The

amount of apelin on cancer cell lines was quantified by densitometry using Image J software.

2.6. Immunocytochemistry

LoVo cells were cultured on glass slides in 12-well dishes for 18 h (2.5×10^5 cells/dish) and then treated with 50 mM monensin (Sigma–Aldrich) for 6 h. Cells were fixed for 15 min in 4% paraformaldehyde in PBS and then treated for 10 min with 50 mM NH_4Cl at room temperature. Cells were permeabilised with methanol for 20 min at -20°C and blocked in protein block serum-free reagent (Dako) for 1 h at room temperature. Cells were incubated overnight at 4°C with primary antibodies in background reducing antibody diluent (Dako).

The secondary antibody Alexafluor 546 goat anti-rabbit IgG (Invitrogen) was then added for 1 h at room temperature. Slides were mounted in fluorescent mounting medium (Dako) and images were taken using a Zeiss Laser Scanning Microscope LSM-510 and LSM image browser software (Zeiss, Thornwood, NY, USA).

2.7. Adenylyl cyclase assay

LoVo cells were seeded onto 24-well plates (25×10^3 cells/well). Forty-eight hours later, the cells were washed twice with PBS and then incubated for 15 min at 37°C in 300 μl PBS medium containing 1 mM Mg acetate and 20 μM forskolin (Sigma–Aldrich) in the absence or presence of 100 nM A13, pA13 or A36 (Bachem). After removal of the medium, the reaction was stopped by the addition of 500 μl of a mixture of 95% methanol and 5% formic acid. The amount of cAMP was determined on cell lysates by a radioimmunoassay performed in monoclonal antibody-coated tubes and in the presence of ^{125}I -labelled tracer (Immunotech, Thornwood, NY, USA) as described [6,8].

2.8. Proliferation assay

LoVo cells were seeded onto 12-well plates (5×10^4 cells/well). Forty-eight hours later, cells were washed twice with PBS and then cultured in DMEM medium supplemented with 0.5% foetal calf serum. Every day, cells were treated with 1 μM pA13 (Bachem) or 100 nM (F13A)apelin13 (Millegen, Toulouse, France) and counted (Beckman Coulter, Danvers, MA, USA).

2.9. Cell death assay

LoVo cells were seeded onto 24-well plates (4×10^4 cells/well). Forty-eight hours later, the cells were washed twice with PBS, serum starved and cultured for 24 h with the indicated treatment. Detached cells and adherent cells were counted separately with a Z1 Coulter particle counter (Beckman Coulter). The ratio between the

number of detached cells and the total number of cells (detached cells + adherent cells) was calculated and expressed as a percentage of the ratio obtained with tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) or MG132-treated cells.

2.10. Caspase 3 and 7 activity assay

LoVo cells were seeded onto 96-well plates (5×10^3 cells/well). Forty-eight hours later, cells were washed with PBS, serum starved and cultured for 24 h with the indicated treatment. Caspase 3 and 7 activity was

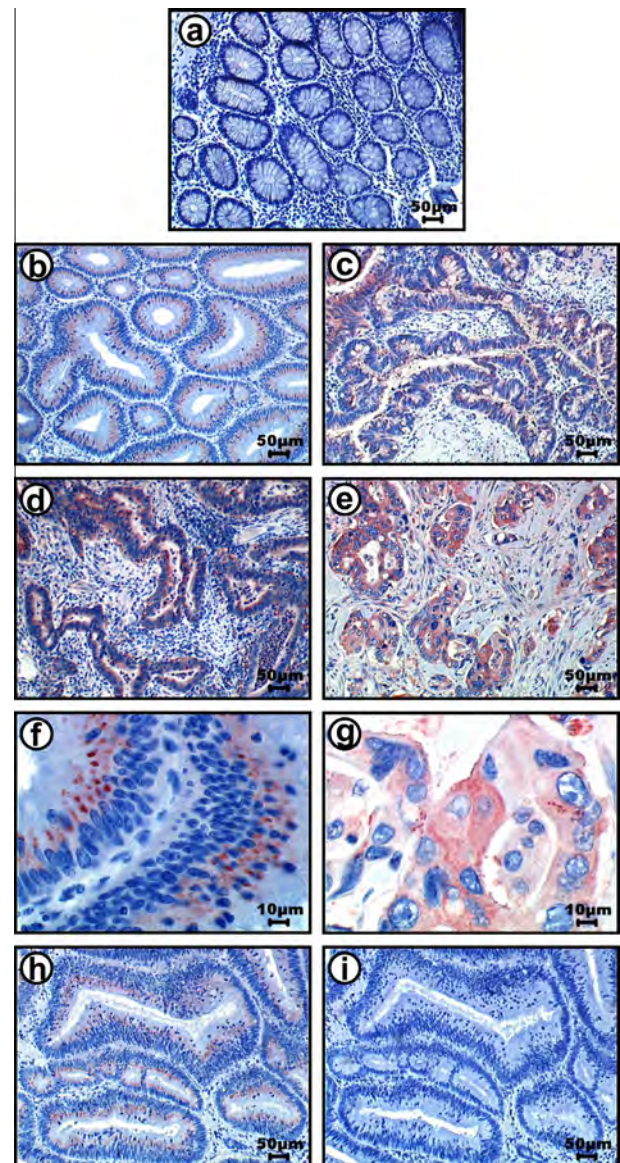


Fig. 1. Apelin is overexpressed in human colon adenomas and adenocarcinomas. (a) Normal colon. (b) Adenoma with low grade dysplasia. (c) Adenoma with high grade dysplasia. (d) Well differentiated adenocarcinoma. (e) Poorly differentiated adenocarcinoma. (f) Higher magnification of panel b. (g) Higher magnification of panel e. In serial sectioning of adenomas, the staining obtained with immune serum (h) is not observed with pre-immune serum (i).

examined using the Caspase-Glo 3/7 kit (Promega, Lyon, France) per the manufacturer's instructions.

2.11. Statistical analyses

Experiments were performed at least three times and each time in triplicate, at minimum. Data are expressed as the mean \pm the standard error of the mean (s.e.m.). Statistical analyses were performed using the *t*-test or two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test with GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software). *p*-Values less than 0.05 (*) or 0.01 (**) were taken as statistically significant.

3. Results

3.1. Apelin is overexpressed in human colon adenomas and adenocarcinomas

In order to extend the results obtained at the mRNA level in the cancer profiling array [24], we determined by immunohistochemistry the expression of apelin peptide in human colon sections from 11 adenomas and 18 adenocarcinomas. As previously reported [20], immunostaining was not detected in normal colon tissues (Fig. 1a). On the other hand, high expression of apelin peptide was present in low grade dysplasia adenomas (Fig. 1b) where staining was organised as granular patches and mostly localised at the apical side of epithelial cells (Fig. 1f). However, labelling became more diffuse in high grade dysplasia adenomas (Fig. 1c). At the adenocarcinoma stage, a similar intensity of staining was observed, but the localisation of apelin expression varied with the degree of tumour differentiation. When the adenocarcinoma was well differentiated, peptide expression was not only granular but also diffuse in the cytoplasm (Fig. 1d). On the other hand, labelling was mostly diffuse in poorly differentiated carcinomas (Fig. 1e and g). On serially sectioned adenomas, no staining was obtained with pre-immune serum (Fig. 1i) when compared to the staining observed with immune serum (Fig. 1h).

3.2. Apelin receptor is co-expressed in human colon adenomas and adenocarcinomas

In agreement with immunohistochemical experiments performed in the colon of adult rat [20], we did not detect any expression of apelin receptor in normal human colon (Fig. 2a). Qualitatively, the results were similar to those observed with apelin antibodies: an increased expression of apelin receptor in adenomas with low (Fig. 2b) or high (Fig. 2c) grade dysplasia and in well (Fig. 2d) or poorly (Fig. 2e) differentiated adenocarcinomas. However, the quantitative variations of expression were lower than those of apelin and staining was not patchy. Interestingly,

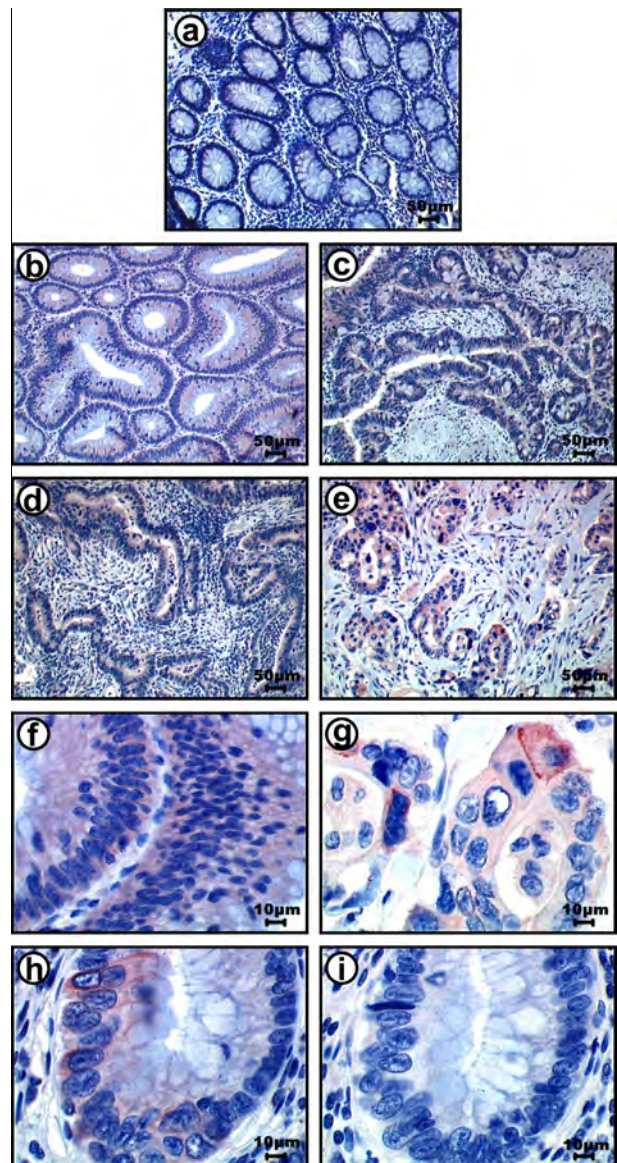


Fig. 2. Apelin receptor is co-expressed in human colon adenomas and adenocarcinomas. (a) Normal colon. (b) Adenoma with low grade dysplasia. (c) Adenoma with high grade dysplasia. (d) Well differentiated adenocarcinoma. (e) Poorly differentiated adenocarcinoma. (f) Higher magnification of panel b. (g) Higher magnification of panel e. In serially sectioning of adenomas, the staining obtained with immune serum (h) is abolished in the presence of immunogenic peptide (i).

high magnification revealed an intracellular and a membrane localisation of the staining (Fig. 2f and g). On serially sectioned adenomas, the staining observed with immune serum (Fig. 2h) was abolished by addition of immunogenic peptide (Fig. 2i).

3.3. Apelin is expressed in colorectal cancer cell lines

To *in vitro* characterise the cell function of apelin signalling, we first investigated whether apelin gene was expressed in several colorectal cancer cell lines, such as HCT-116, DLD-1, HT-29 and LoVo cells. Using real-time PCR, we obtained the highest expression level in

LoVo cells ($Ct = 27.6 \pm 0.5$) which represents an 11-fold higher expression when compared to that of HCT-116 cells ($Ct = 31.1 \pm 0.2$) (Fig. 3a). We then determined apelin expression at the peptide level in the aforementioned cell lines. By western blotting, we confirmed that lysates from LoVo cells contained the highest amount of immunoreactive apelin (Fig. 3b). However, immunocytochemical experiments performed on LoVo cells failed to detect any apelin expression (Fig. 3c). As apelin is a secreted peptide, we decided to increase local peptide concentration by blocking the intracellular protein transport with 50 mM monensin [28]. In these conditions, a punctiform immunofluorescence was observed, and its localisation was suggestive of secreted proteins stacked in the early compartments of the secretory pathway (Fig. 3c).

3.4. Apelin receptor is co-expressed in colorectal cancer cell lines and its activation leads to adenylyl cyclase inhibition and Akt phosphorylation

We also analysed expression of apelin receptor gene in these colorectal cancer cell lines. Real-time PCR showed the presence of receptor transcripts in all cell lines, albeit at low mRNA levels. Again, the highest expression was found in LoVo cell line

($Ct = 30.3 \pm 0.4$) and it was more than four times that of HCT-116 cells ($Ct = 32.6 \pm 0.4$) (Fig. 4a). Then we decided to characterise receptor expression at the protein level by western blotting and immunocytochemistry. Using three different antibodies, we were unable to detect any immunoreactive band at the expected molecular weight nor any staining on LoVo cells.

Another way to visualise the presence of the protein is to demonstrate that exogenous apelin can activate the transduction cascades already characterised for apelin signalling. As a member of the G protein-coupled receptor family [2,3] which is preferentially coupled to Gi1 or Gi2 protein [6], activation of apelin receptor inhibits adenylyl cyclase activity. As shown in Fig. 4b, 100 nM of each apelin fragment (pA13, A13 and A36) inhibited forskolin-stimulated cAMP levels in LoVo cells. Phosphorylation of some proteins, such as ERKs, Akt and P70 S6 kinase has been also described [7,8]. By western blotting, we showed that pA13 promoted Akt phosphorylation in a time-dependent manner, with a peak at 3 min (Fig. 4c).

3.5. pApelin(65–77) is not mitogenic for LoVo cells

Depending on the cell type, apelin behaves either as an anti-apoptotic [29–32] and/or a mitogenic peptide

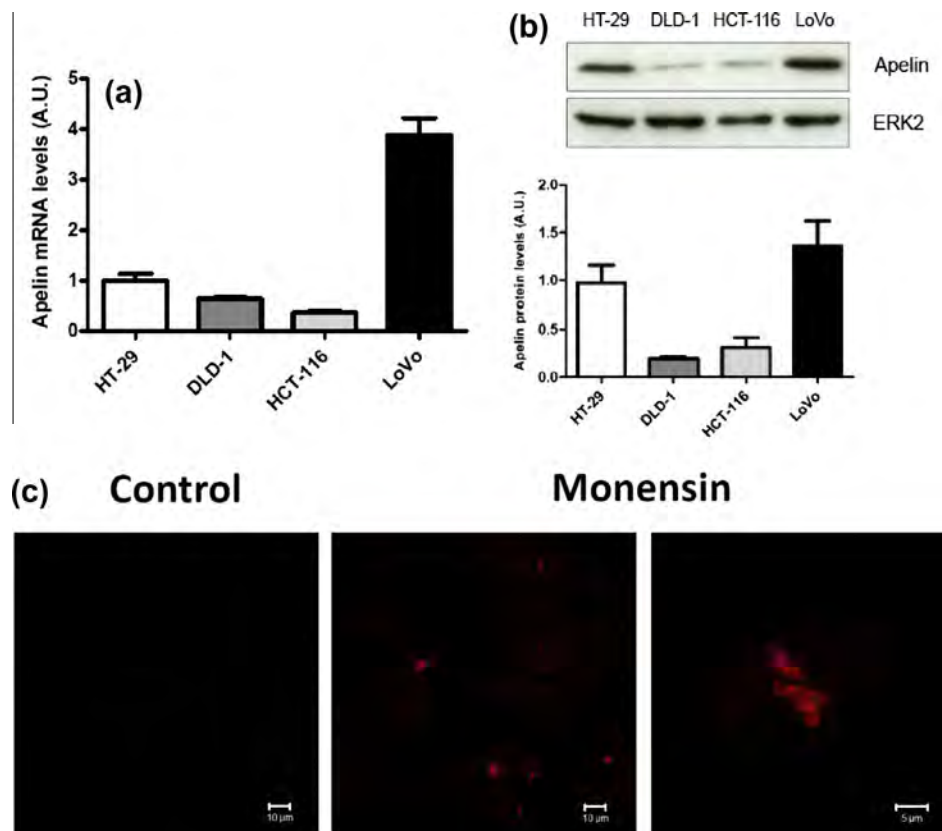


Fig. 3. Apelin is expressed in colorectal cancer cell lines. (a) Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of apelin gene with quantification relative to HT-29 cells. (b) Western blot of whole cell lysates of colorectal cell lines. Quantification relative to HT-29 cells is shown below each representative band. (c) Immunofluorescent localisation of apelin in control (left panel) and monensin-treated LoVo cells (middle panel). Right panel corresponds to a higher magnification.

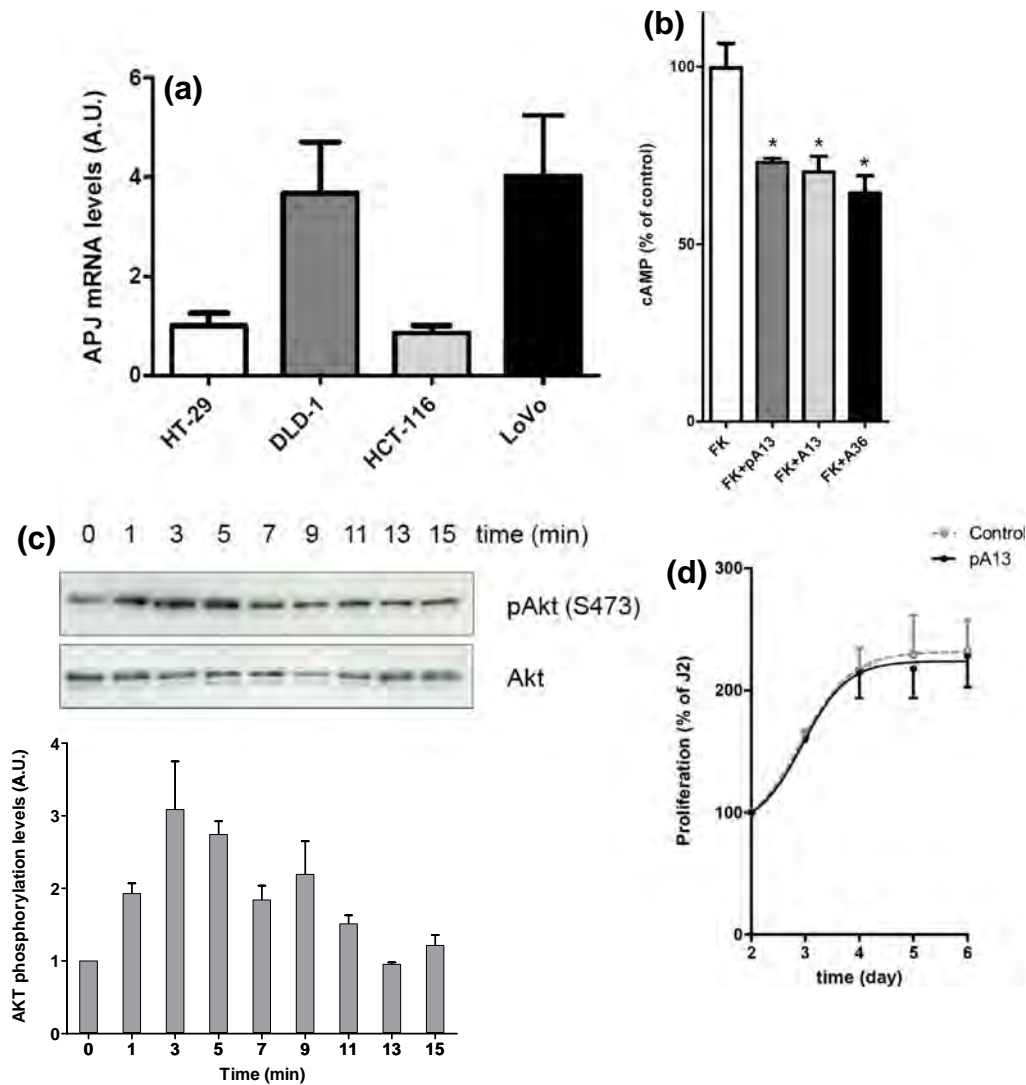


Fig. 4. Apelin receptor is expressed in colorectal cancer cell lines and its stimulation activates transduction cascades in LoVo cells. (a) Quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) analysis of apelin receptor gene with quantification relative to HT-29 cells. (b) Apelin-induced inhibition of adenylyl cyclase in forskolin-treated LoVo cells. Statistical analysis using the *t*-test revealed a significant effect of apelin fragments. *p*-Values were less than 0.05 (*). (c) Time-course of Akt phosphorylation induced by pA13 in LoVo cells. Quantification relative to control is shown below. (d) Proliferation curves of control or pA13-treated LoVo cells. The number of cells is expressed as a percentage of the cells counted at J2 before serum deprivation.

[8,18,33]. Accordingly, we determined whether apelin could also be a mitogen for LoVo cells. With the cell lysates analysed in Fig. 4c, pA13 did not induce ERK phosphorylation during the same time-course (data not shown). Furthermore, comparison of the proliferation curves obtained in the absence or presence of 1 μ M pA13 did not reveal any difference (Fig. 4d).

3.6. Apelin fragments protect LoVo cells from apoptosis induced by TRAIL or MG132

Apelin-induced Akt phosphorylation suggested that apelin could display anti-apoptotic properties. In order to demonstrate such an activity on LoVo cells, we first determined the apoptotic activity of two agents, the

tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) acting by the extrinsic pathway, and the MG132 proteasome inhibitor acting by the intrinsic pathway. Both TRAIL and MG132 treatments increased cell death, albeit with a different efficacy. When compared with serum deprivation, 100 ng/ml TRAIL only doubled cell death whereas 0.25 μ M MG132-induced a 5-fold increase (Fig. 5a). Furthermore, addition of apelin fragments clearly protected LoVo cells from the apoptotic effects of TRAIL or MG132 (Fig. 5b). Interestingly, even though MG132-induced apoptosis was high, each apelin fragment was able to antagonise its action with an efficacy near 100% (Fig. 5b). We therefore chose these conditions for studying the concentration dependency of apelin

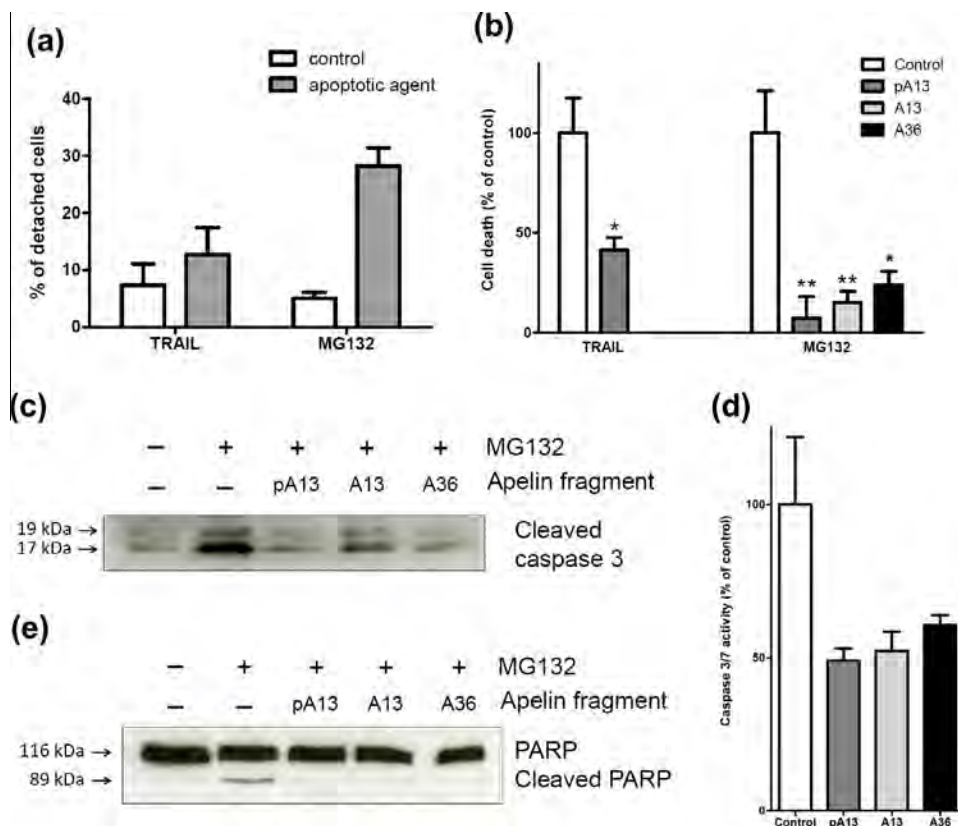


Fig. 5. Apelin fragments protect LoVo cells from apoptosis by decreasing caspase activity and cleavage and by inhibiting poly ADP ribose polymerase protein (PARP) degradation. (a) Number of detached cells in tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) or MG132-treated cells. (b) Apelin fragments decrease the number of detached cells induced by TRAIL or MG132. Statistical analysis using the *t*-test revealed a significant effect of apelin fragments. *p*-Values were less than 0.01 (**) for pA13 and A13 and less than 0.05 (*) for A36. (c) Western blot of cleaved caspase 3. (d) Caspase 3 and 7 activity. (e) Western blot of full length and cleaved PARP.

protecting effect. The EC₅₀ value of pA13 was below the nanomolar range, which is in agreement with the concentrations expected for a receptor-mediated process (data not shown).

3.7. Apelin fragments decrease caspase 3 activity and PARP proteolysis induced by MG132 on LoVo cells

Caspase activation is an important step in the apoptotic process. Caspases exist as inactive proenzymes that undergo proteolytic cleavage leading to enzyme activation. As shown by western blotting in Fig. 5c, we observed the appearance of cleaved fragments in MG132-treated cells. Incubation with each apelin fragment strongly decreased the amount of these cleavage products. In order to confirm that caspase cleavage was associated with increased enzymatic activity, we measured by a luminescent assay the activity of caspase 3 and caspase 7 in lysates from LoVo cells. MG132 clearly increased caspase activity when compared with that of serum deprived cells. Furthermore, addition of apelin fragments inhibited by 50% the MG132-stimulated caspase activity (Fig. 5d). These results are very similar to those of caspase 3 cleavage in the same

experimental conditions (see Fig. 5c). A key caspase substrate which links caspase activation to DNA fragmentation is the poly ADP ribose polymerase PARP. This 116 kDa protein is inactivated by caspase-mediated proteolysis, which generates 24 and 89 kDa fragments. As an index of PARP proteolysis, we determined by western blotting the amount of 89 kDa cleaved fragment. As shown in Fig. 5e, MG132 treatment induced appearance of the 89 kDa cleaved fragment. Furthermore, each apelin fragment was able to significantly diminish the amount of 89 kDa fragment.

3.8. (F13A)apelin13 receptor antagonist reduces the proliferation rate of LoVo cells

The previous findings tended to suggest that a basal secretion of apelin might lead to constitutive activation of apelin receptor expressed at the cell surface of tumour cells, thereby altering proliferation of LoVo cells. To check this hypothesis, we analysed the effects of (F13A)apelin13 receptor antagonist [34] on the proliferation rate of LoVo cells. As shown in Fig. 6, the proliferation rate was significantly reduced in the presence of

100 nM antagonist when compared to that obtained in the absence of antagonist.

4. Discussion

A sequence of genetic alterations occurring during transition from normal colonic epithelium to colorectal carcinoma has been proposed [35]. Adenomatous Polypoid Coli (APC) mutations would represent the first molecular lesion leading to aberrant crypt foci. The next step, i.e. the transition to adenoma might result from an activating mutation of the protooncogene K-Ras. Then, inactivation of tumour suppressors would be the basis of the transformation from adenoma to carcinoma. As already shown by qRT-PCR experiments and immunohistochemical studies [20], we did not detect apelin peptide in any cell type of the normal colon. On the other hand, a strong immunostaining was observed in adenomas and adenocarcinomas. The strong overexpression of apelin peptide extends our previous results obtained at the mRNA level in human colon adenocarcinomas [24]. In addition, we showed that apelin peptide was also expressed in several colorectal cancer cell lines. The temporal pattern of apelin expression which begins early at the adenoma stage and continues at the adenocarcinoma stage suggests that apelin overexpression may result from the oncogenic mutation of K-Ras which precedes the formation of human colon adenomas.

A main consequence of K-Ras oncogenic mutations is activation of Raf–mitogen-activated protein kinase kinase (MEK)–ERK and phosphoinositide 3-kinase

(PI3K)/Akt signal transduction cascades. As K-Ras is mutated in LoVo cells [36], these tumour cells have a constitutive activation of the ERK pathway, thereby leading to a high basal proliferation rate. Consequently, the mitogenic effects of growth factors would be masked and this would explain why exogenous apelin did not promote ERK phosphorylation nor increase proliferation of LoVo cells. Interestingly, a similar result was reported on the duodenal enteroendocrine tumour cell line STC-1 where apelin(42–77) was inactive and apelin(65–77) had a very low mitogenic activity [18]. Indeed, most of the mitogenic effects of apelin have been described on non-tumour cells, such as human umbilical venous endothelial cells [8], the choroids-retina endothelial cell line RF/6A [33], osteoblasts [30] or retinal Müller cells [37]. As far as tumour cells are concerned, the high basal activation of ERKs would constitutively increase the basal activation of their substrates, such as Elk1 and HIF [38,39]. The presence of a perfectly conserved Elk1 binding site [40] and a HIF responsive element [24,41] in the promoter of apelin gene may therefore represent a molecular link between K-Ras oncogenic mutation and apelin overexpression. It has also been demonstrated that Sp1 transcription factor can be directly phosphorylated by ERKs [42]. Interestingly, the promoter of apelin gene also contains a Sp1 binding site [40], suggesting another potential link between oncogenic K-Ras, ERK activation and increased expression of apelin gene.

The PI3K/Akt signalling pathway is also activated in tumour cells as a direct consequence of K-Ras oncogenic mutations [43]. Moreover, the prostate-specific expression of constitutively active Akt1 leads to prostate intra-epithelial neoplasia [44]. Similarly, decreased amounts of Phosphatase and Tensin homologue (PTEN), the negative regulator of Akt, in *PTEN*^{+/-} mice induce aberrant Akt activation and the development of multiple tumours [45]. In epithelial cells, PI3K/Akt pathway is mainly involved in VEGF overexpression through phosphorylation of Sp1 [46]. Similarly, Sp1 phosphorylation could participate in apelin overexpression, thereby amplifying the activity of the apelin autocrine loop and the constitutive activation of the PI3K/Akt cascade in tumour cells. In addition, apelin-induced inhibition of adenylyl cyclase should reinforce Akt activation by blocking the inhibitory effects of cAMP on membrane localisation of Phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1) [47] and Rap1 inhibition [48].

As far as the colorectal cancer cell lines are concerned, there is no strict correlation between apelin gene overexpression and K-Ras mutation. Indeed, apelin gene expression is much lower in DLD-1 cells whereas they express the same mutated form of K-Ras. However, the two other cell lines have an oncogenic mutation of B-Raf gene which activates ERKs downstream of K-Ras. Consequently, the differences may result from

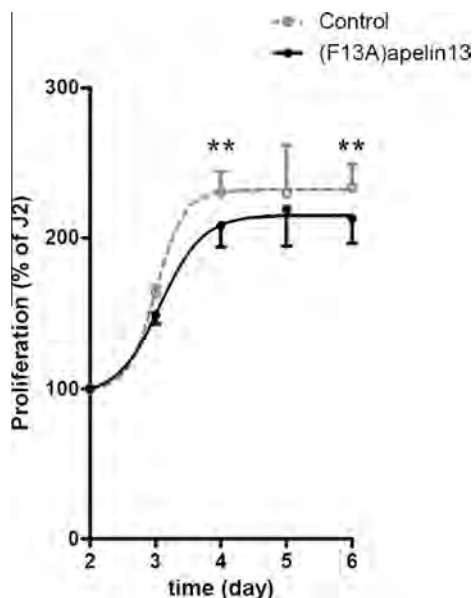


Fig. 6. The (F13A)apelin13 receptor antagonist decreases LoVo cell proliferation. Proliferation curves of control and (F13A)apelin13-treated cells. Statistical analysis using the two-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test revealed significant differences between the two proliferation curves at J4 and J6 for which *p*-values were less than 0.01 (**).

additional factors. Notably, it is difficult to rule out the impact of the deletion and inactivation of suppressor tumour genes as well as other cell line-specific gene alterations. Consequently, as these tumour cell lines correspond to the adenocarcinoma stage, apelin overexpression observed in human samples at adenoma stage is more relevant in colon carcinogenesis.

Interestingly, the molecular lesions involved in colorectal carcinogenesis lead to inactivation of apoptotic pathways which are related to the ubiquitin–proteasome system [49]. Indeed, proteasomal inhibitors activate a cell death programme and this apoptotic effect would result from decreased degradation of tumour suppressors, such as p53, mothers against decapentaplegic homologue 4 (Smad4) and PTEN. Notably, accumulation of PTEN is induced by proteasome inhibition [50], thereby counteracting constitutive activation of the PI3K/Akt pathway. Consequently, it was not surprising that proteasome inhibitors, such as MG132 or bortezomib induced apoptosis in multiple tumour cell lines *via* decreased Akt phosphorylation, increased caspase 3 cleavage and PARP degradation [51]. Indeed, MG132 promoted selective apoptosis in glioblastoma cells through inhibition of PI3K/Akt and downregulation of pAkt represents the major effect of bortezomib in hepatocellular carcinoma cell lines [52]. As activation of apelin receptor induces Akt phosphorylation and inhibits a caspase-dependent pathway, it was likely that apelin signalling antagonised the MG132 apoptotic effects. Indeed, the anti-apoptotic properties of apelin signalling on various cell types are well documented [29–32].

In agreement with a previous report [20], we were unable to detect protein expression of the apelin receptor in normal epithelial tissue. On the other hand, apelin receptor became also expressed albeit at low expression levels at the adenoma and adenocarcinoma stages. When compared with apelin expression, this concomitant stage-dependent expression is also associated with a similar tumour localisation. Quantitatively, these low levels of protein expression correlate with the low expression of receptor gene in colorectal cancer cell lines. However, presence of the protein at cell surface as well as its functionality were clearly confirmed by apelin-induced activation of transduction cascades in LoVo cells. Accordingly, spatio-temporal co-expression of the ligand and its receptor in sections of colon adenomas/adenocarcinomas and in LoVo cells fulfilled the first criterion necessary for the existence of an autocrine loop. The functionality of such an autocrine loop was further validated by the decrease of LoVo cell proliferation in the presence of (F13A)apelin13 receptor antagonist. As it was not possible to study LoVo cell proliferation in the absence of serum for a long period of time, this effect is likely to be underestimated due to the potential contribution of other growth factors.

Altogether, high frequency of apelin gene and peptide overexpression [24], co-expression of apelin receptor by tumour cells, apelin-induced Akt phosphorylation and caspase inhibition as well as decreased proliferation in presence of the receptor antagonist suggest that apelin signalling participates in the growth of colon adenocarcinomas *via* activation of an autocrine loop. In addition to the established paracrine role of apelin signalling in tumour neoangiogenesis [24,53], this study reveals another role of this pathway directly on the tumour compartment. In view of the early overexpression of apelin and its receptor at the adenoma stage, apelin signalling becomes an interesting and specific target for the prevention and/or treatment of human colon adenocarcinomas. Interestingly, pharmacological blockade by apelin receptor antagonists would induce a dual inhibition of tumour growth by increasing apoptosis of tumour cells as well as decreasing formation of tumour vessels. Proteasomal inhibitors are already used in clinics and their combination with cytotoxic drugs is more efficient in the treatment of solid tumours. Similarly, a proteasomal inhibitor plus an apelin receptor antagonist should represent a new clinical therapy of colon cancers.

Conflict of interest statement

None declared.

Acknowledgements

This work was supported by INSERM, the Ligue Régionale contre le Cancer, the INCACanceropole GSO and the ATCS-AO1 grant from Toulouse III University. We would like to thank the Center of Biological Resources directed by Pr. A. Gomez-Brouchet for the human samples and Y. Nicaise for the scanning of colon sections at the anatomopathological department of Rangueil hospital directed by Pr. M.B. Delisle. We also thank Pr. Valet for the gift of antibodies raised against the C-terminus of apelin peptide.

References

- [1] Audigier Y. Apelin receptor. AfCS-nature molecule pages; 2006. <http://dx.doi.org/10.1038/mp.a000304.01>.
- [2] O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, et al. A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 1993;136(1–2):355–60.
- [3] Devic E, Paquereau L, Vernier P, Knibiehler B, Audigier Y. Expression of a new G protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in *Xenopus laevis*. *Mech Dev* 1996;59(2):129–40.
- [4] Devic E, Rizzotti K, Bodin S, Knibiehler B, Audigier Y. Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of *Xenopus* X-msr and human API. *Mech Dev* 1999;84(1–2):199–203.
- [5] Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, et al. Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the

- human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251(2):471–6.
- [6] Masri B, Morin N, Pedebnarde L, Knibiehler B, Audigier Y. The apelin receptor is coupled to Gi1 or Gi2 protein and is differentially desensitized by apelin fragments. *J Biol Chem* 2006;281(27):18317–26.
- [7] Masri B, Lahlou H, Mazarguil H, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65–77) activates extracellular signal-regulated kinases via a PTX-sensitive G protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;290(1):539–45.
- [8] Masri B, Morin N, Cornu M, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin (65–77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J* 2004;18(15):1909–11.
- [9] De Mota N, Lenkei Z, Llorens-Cortes C. Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 2000;72(6):400–7.
- [10] O'Carroll AM, Selby TL, Palkovits M, Lolait SJ. Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* 2000;1492(1):72–80.
- [11] De Mota N, Reaux-Le Goazigo A, El Messari S, et al. Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(28):10464–9.
- [12] Saint-Geniez M, Masri B, Malecaze F, Knibiehler B, Audigier Y. Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mech Dev* 2002;110(1–2):183–6.
- [13] Cox CM, D'Agostino SL, Miller MK, Heimark RL, Krieg PA. Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev Biol* 2006;296(1):177–89.
- [14] Szokodi I, Tavi P, Foldes G, et al. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ Res* 2002;91(5):434–40.
- [15] Boucher J, Masri B, Daviaud D, et al. Apelin, a newly identified adipokine upregulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 2005;146(4):1764–71.
- [16] Sorhede Winzell M, Magnusson C, Ahren B. The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul Pept* 2005;131(1–3):12–7.
- [17] Susaki E, Wang G, Cao G, Wang HQ, Englander EW, Greeley Jr GH. Apelin cells in the rat stomach. *Regul Pept* 2005;129(1–3):37–41.
- [18] Wang G, Anini Y, Wei W, et al. Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology* 2004;145(3):1342–8.
- [19] Lambrecht NW, Yakubov I, Zer C, Sachs G. Transcriptomes of purified gastric ECL and parietal cells: identification of a novel pathway regulating acid secretion. *Physiol Genomics* 2006;25(1):153–65.
- [20] Wang G, Kundu R, Han S, et al. Ontogeny of apelin and its receptor in the rodent gastrointestinal tract. *Regul Pept* 2009;158(1–3):32–9.
- [21] Han S, Wang G, Qiu S, et al. Increased colonic apelin production in rodents with experimental colitis and in humans with IBD. *Regul Pept* 2007;142(3):131–7.
- [22] Han S, Wang G, Qi X, Lee HM, Englander EW, Greeley Jr GH. A possible role for hypoxia-induced apelin expression in enteric cell proliferation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2008;294(6):R1832–9.
- [23] Plate KH, Breier G, Millauer B, Ullrich A, Risau W. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1993;53(23):5822–7.
- [24] Sorli SC, Le Gonidec S, Knibiehler B, Audigier Y. Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene* 2007;26(55):7692–9.
- [25] Berta J, Kenessey I, Dobos J, et al. Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J Thorac Oncol* 2010;5(8):1120–9.
- [26] Heo K, Kim YH, Sung HJ, et al. Hypoxia-induced up-regulation of apelin is associated with a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2012;48(6):500–6.
- [27] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{−(Delta Delta C(T))} method. *Methods* 2001;25(4):402–8.
- [28] Tartakoff AM, Vassalli P. Plasma cell immunoglobulin secretion: arrest is accompanied by alterations of the golgi complex. *J Exp Med* 1977;146(5):1332–45.
- [29] Cui RR, Mao DA, Yi L, et al. Apelin suppresses apoptosis of human vascular smooth muscle cells via APJ/PI3-K/Akt signaling pathways. *Amino Acids* 2010;39(5):1193–200.
- [30] Xie H, Yuan LQ, Luo XH, et al. Apelin suppresses apoptosis of human osteoblasts. *Apoptosis* 2007;12(1):247–54.
- [31] Zeng XX, Wilm TP, Sepich DS, Solnica-Krezel L. Apelin and its receptor control heart field formation during zebrafish gastrulation. *Dev Cell* 2007;12(3):391–402.
- [32] Zhang Z, Yu B, Tao GZ. Apelin protects against cardiomyocyte apoptosis induced by glucose deprivation. *Chin Med J (Engl)* 2009;122(19):2360–5.
- [33] Kasai A, Shintani N, Oda M, et al. Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325(2):395–400.
- [34] Lee DK, Saldivia VR, Nguyen T, Cheng R, George SR, O'Dowd BF. Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* 2005;146(1):231–6.
- [35] Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988;319(9):525–32.
- [36] Nakata H, Wang SL, Chung DC, Westwick JK, Tillotson LG. Oncogenic ras induces gastrin gene expression in colon cancer. *Gastroenterology* 1998;115(5):1144–53.
- [37] Lu Q, Jiang YR, Qian J, Tao Y. Apelin-13 regulates proliferation, migration and survival of retinal Muller cells under hypoxia. *Diabetes Res Clin Pract* 2013;99(2):158–67.
- [38] Mylonis I, Chachami G, Samiotaki M, et al. Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem* 2006;281(44):33095–106.
- [39] Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 2006;24(1):21–44.
- [40] Iacovoni JS. Bioinformatics of apelin and its receptor. Trivandrum, India: Transworld Research Network; 2008.
- [41] Ronkainen VP, Ronkainen JJ, Hanninen SL, et al. Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J* 2007;21(8):1821–30.
- [42] Milanini-Mongiati J, Pouyssegur J, Pages G. Identification of two Sp1 phosphorylation sites for p42/p44 mitogen-activated protein kinases: their implication in vascular endothelial growth factor gene transcription. *J Biol Chem* 2002;277(23):20631–9.
- [43] Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Dhand R, et al. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 1994;370(6490):527–32.
- [44] Majumder PK, Febbo PG, Bikoff R, et al. MTOR inhibition reverses Akt-dependent prostate intraepithelial neoplasia through regulation of apoptotic and HIF-1-dependent pathways. *Nat Med* 2004;10(6):594–601.
- [45] Podsypanina K, Ellenson LH, Nemes A, et al. Mutation of Pten/Mmacl in mice causes neoplasia in multiple organ systems. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(4):1563–8.

- [46] Pore N, Liu S, Shu HK, et al. Sp1 is involved in Akt-mediated induction of VEGF expression through an HIF-1-independent mechanism. *Mol Biol Cell* 2004;15(11):4841–53.
- [47] Kim S, Jee K, Kim D, Koh H, Chung J. Cyclic AMP inhibits Akt activity by blocking the membrane localization of PDK1. *J Biol Chem* 2001;276(16):12864–70.
- [48] Wang L, Liu F, Adamo ML. Cyclic AMP inhibits extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways by inhibiting Rap1. *J Biol Chem* 2001;276(40):37242–9.
- [49] Voutsadakis IA. The ubiquitin-proteasome system in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta* 2008;1782(12):800–8.
- [50] Fujita T, Doihara H, Washio K, et al. Proteasome inhibitor bortezomib increases PTEN expression and enhances trastuzumab-induced growth inhibition in trastuzumabresistant cells. *Anticancer Drugs* 2006;17(4):455–62.
- [51] Yu C, Friday BB, Lai JP, et al. Cytotoxic synergy between the multikinase inhibitor sorafenib and the proteasome inhibitor bortezomib in vitro: induction of apoptosis through Akt and c-Jun NH2-terminal kinase pathways. *Mol Cancer Ther* 2006;5(9):2378–87.
- [52] Chen KF, Yeh PY, Yeh KH, Lu YS, Huang SY, Cheng AL. Down-regulation of phospho-Akt is a major molecular determinant of bortezomib-induced apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res* 2008;68(16):6698–707.
- [53] Kalin RE, Kretz MP, Meyer AM, Kispert A, Heppner FL, Brandli AW. Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev Biol* 2007;305(2):599–614.

Références bibliographiques :

- Aggarwal, G., Kamada, P., and Chari, S.T. (2013). Prevalence of Diabetes Mellitus in Pancreatic Cancer Compared to Common Cancers: *Pancreas* 42, 198–201.
- Aguirre, A.J., Bardeesy, N., Sinha, M., Lopez, L., Tuveson, D.A., Horner, J., Redston, M.S., and DePinho, R.A. (2003). Activated Kras and Ink4a/Arf deficiency cooperate to produce metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* 17, 3112–3126.
- Alitalo, K., and Carmeliet, P. (2002). Molecular mechanisms of lymphangiogenesis in health and disease. *Cancer Cell* 1, 219–227.
- Almoguera, C., Shibata, D., Forrester, K., Martin, J., Arnheim, N., and Perucho, M. (1988). Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-K-ras genes. *Cell* 53, 549–554.
- Altinkaya, S.O., Nergiz, S., Küçük, M., and Yüksel, H. (2015). Apelin levels are higher in obese patients with endometrial cancer. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 41, 294–300.
- Apelqvist, A., Ahlgren, U., and Edlund, H. (1997). Sonic hedgehog directs specialised mesoderm differentiation in the intestine and pancreas. *Curr. Biol. CB* 7, 801–804.
- Apelqvist, A., Li, H., Sommer, L., Beatus, P., Anderson, D.J., Honjo, T., Hrabe de Angelis, M., Lendahl, U., and Edlund, H. (1999). Notch signalling controls pancreatic cell differentiation. *Nature* 400, 877–881.
- Ardito, C.M., Grüner, B.M., Takeuchi, K.K., Lubeseder-Martellato, C., Teichmann, N., Mazur, P.K., DelGiorno, K.E., Carpenter, E.S., Halbrook, C.J., Hall, J.C., et al. (2012). EGF Receptor Is Required for KRAS-Induced Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Cell* 22, 304–317.
- Arslan AA, Helzlsouer KJ, Kooperberg C, and et al (2010). Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: A pooled analysis from the pancreatic cancer cohort consortium (panscan). *Arch. Intern. Med.* 170, 791–802.
- Ashley, E.A., Powers, J., Chen, M., Kundu, R., Finsterbach, T., Caffarelli, A., Deng, A., Eichhorn, J., Mahajan, R., Agrawal, R., et al. (2005). The endogenous peptide apelin potently improves cardiac contractility and reduces cardiac loading in vivo. *Cardiovasc. Res.* 65, 73–82.
- Atluri, P., Morine, K.J., Liao, G.P., Panlilio, C.M., Berry, M.F., Hsu, V.M., Hiesinger, W., Cohen, J.E., and Joseph Woo, Y. (2007). Ischemic heart failure enhances endogenous myocardial apelin and APJ receptor expression. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 12, 127–138.
- Attané, C., Daviaud, D., Dray, C., Dusaulcy, R., Masseboeuf, M., Prévot, D., Carpéné, C., Castan-Laurell, I., and Valet, P. (2011). Apelin stimulates glucose uptake but not lipolysis in human adipose tissue ex vivo. *J. Mol. Endocrinol.* 46, 21–28.
- Attané, C., Foussal, C., Gonidec, S.L., Benani, A., Daviaud, D., Wanecq, E., Guzmán-Ruiz, R., Dray, C., Bezaire, V., Rancoule, C., et al. (2012). Apelin Treatment Increases Complete

Fatty Acid Oxidation, Mitochondrial Oxidative Capacity, and Biogenesis in Muscle of Insulin-Resistant Mice. *Diabetes* 61, 310–320.

Azizi, M., Iturrioz, X., Blanchard, A., Peyrard, S., Mota, N.D., Chartrel, N., Vaudry, H., Corvol, P., and Llorens-Cortes, C. (2008). Reciprocal Regulation of Plasma Apelin and Vasopressin by Osmotic Stimuli. *J. Am. Soc. Nephrol.* 19, 1015–1024.

Baer, R., Cintas, C., Dufresne, M., Cassant-Sourdy, S., Schönhuber, N., Planque, L., Lulka, H., Couderc, B., Bousquet, C., Garmy-Susini, B., et al. (2014). Pancreatic cell plasticity and cancer initiation induced by oncogenic Kras is completely dependent on wild-type PI 3-kinase p110 α . *Genes Dev.* 28, 2621–2635.

Bai, B., Tang, J., Liu, H., Chen, J., Li, Y., and Song, W. (2008). Apelin-13 induces ERK1/2 but not p38 MAPK activation through coupling of the human apelin receptor to the Gi2 pathway. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 40, 311–318.

Bai, B., Liu, L., Zhang, N., Wang, C., Jiang, Y., and Chen, J. (2014a). Heterodimerization of human apelin and bradykinin 1 receptors: novel signal transduction characteristics. *Cell. Signal.* 26, 1549–1559.

Bai, B., Cai, X., Jiang, Y., Karteris, E., and Chen, J. (2014b). Heterodimerization of apelin receptor and neurotensin receptor 1 induces phosphorylation of ERK(1/2) and cell proliferation via G α q-mediated mechanism. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 2071–2081.

Bailey, J.M., Swanson, B.J., Hamada, T., Eggers, J.P., Singh, P.K., Caffery, T., Ouellette, M.M., and Hollingsworth, M.A. (2008). Sonic Hedgehog Promotes Desmoplasia in Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* 14, 5995–6004.

Bardeesy, N., and DePinho, R.A. (2002). Pancreatic cancer biology and genetics. *Nat. Rev. Cancer* 2, 897–909.

Becker, W. (2012). Emerging role of DYRK family protein kinases as regulators of protein stability in cell cycle control. *Cell Cycle* 11, 3389–3394.

Ben, Q., Xu, M., Ning, X., Liu, J., Hong, S., Huang, W., Zhang, H., and Li, Z. (2011). Diabetes mellitus and risk of pancreatic cancer: A meta-analysis of cohort studies. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 47, 1928–1937.

Benmerah, A., and Lamaze, C. (2002). Endocytose : chaque voie compte! *Médecine/sciences* 18, 1126–1136.

Berry, M.F., Pirolli, T.J., Jayasankar, V., Burdick, J., Morine, K.J., Gardner, T.J., and Woo, Y.J. (2004). Apelin Has In Vivo Inotropic Effects on Normal and Failing Hearts. *Circulation* 110, II – 187 – II – 193.

Berta, J., Kenessey, I., Dobos, J., Tovari, J., Klepetko, W., Jan Ankersmit, H., Hegedus, B., Renyi-Vamos, F., Varga, J., Lorincz, Z., et al. (2010). Apelin expression in human non-small cell lung cancer: role in angiogenesis and prognosis. *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 5, 1120–1129.

- Berta, J., Hoda, M.A., Laszlo, V., Rozsas, A., Garay, T., Torok, S., Grusch, M., Berger, W., Paku, S., Renyi-Vamos, F., et al. (2014). Apelin promotes lymphangiogenesis and lymph node metastasis. *Oncotarget* 5, 4426–4437.
- Bertrand, C., Pignalosa, A., Wanecq, E., Rancoule, C., Batut, A., Deleruyelle, S., Lionetti, L., Valet, P., and Castan-Laurell, I. (2013). Effects of dietary eicosapentaenoic acid (EPA) supplementation in high-fat fed mice on lipid metabolism and apelin/APJ system in skeletal muscle. *PLoS One* 8, e78874.
- Blackford, A., Parmigiani, G., Kensler, T.W., Wolfgang, C., Jones, S., Zhang, X., Parsons, D.W., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Eshleman, J.R., et al. (2009). Genetic Mutations Associated with Cigarette Smoking in Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* 69, 3681–3688.
- Blum, R., and Kloog, Y. (2014). Metabolism addiction in pancreatic cancer. *Cell Death Dis.* 5, e1065.
- Bockaert, J. (1999). Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J.* 18, 1723–1729.
- Bockaert, J., and Pin, J.-P. (1998). Utiliser un récepteur couplé aux protéines G pour communiquer. Un succès évolutif. *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. III - Sci. Vie* 321, 529–551.
- Bosetti, C., Lucenteforte, E., Silverman, D.T., Petersen, G., Bracci, P.M., Ji, B.T., Negri, E., Li, D., Risch, H.A., Olson, S.H., et al. (2012). Cigarette smoking and pancreatic cancer: an analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4). *Ann. Oncol.* 23, 1880–1888.
- Boucher, J., Masri, B., Daviaud, D., Gesta, S., Guigné, C., Mazzucotelli, A., Castan-Laurell, I., Tack, I., Knibiehler, B., Carpené, C., et al. (2005). Apelin, a newly identified adipokine up-regulated by insulin and obesity. *Endocrinology* 146, 1764–1771.
- Brame, A.L., Maguire, J.J., Yang, P., Dyson, A., Torella, R., Cheriyan, J., Singer, M., Glen, R.C., Wilkinson, I.B., and Davenport, A.P. (2015). Design, Characterization, and First-In-Human Study of the Vascular Actions of a Novel Biased Apelin Receptor Agonist. *Hypertension* HYPERTENSIONAHA.114.05099.
- Brembeck, F.H., Schreiber, F.S., Deramandt, T.B., Craig, L., Rhoades, B., Swain, G., Grippo, P., Stoffers, D.A., Silberg, D.G., and Rustgi, A.K. (2003). The Mutant K-ras Oncogene Causes Pancreatic Periductal Lymphocytic Infiltration and Gastric Mucous Neck Cell Hyperplasia in Transgenic Mice. *Cancer Res.* 63, 2005–2009.
- Bryant, K.L., Mancias, J.D., Kimmelman, A.C., and Der, C.J. (2014). KRAS: feeding pancreatic cancer proliferation. *Trends Biochem. Sci.* 39, 91–100.
- Buchanan, F.G., and DuBois, R.N. (2006). Emerging roles of beta-arrestins. *Cell Cycle Georget. Tex* 5, 2060–2063.
- Burris, H.A., Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P., et al. (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J. Clin. Oncol.* 15, 2403–2413.

- Calhoun, E.S., Jones, J.B., Ashfaq, R., Adsay, V., Baker, S.J., Valentine, V., Hempen, P.M., Hilgers, W., Yeo, C.J., Hruban, R.H., et al. (2003). BRAF and FBXW7 (CDC4, FBW7, AGO, SEL10) Mutations in Distinct Subsets of Pancreatic Cancer: Potential Therapeutic Targets. *Am. J. Pathol.* *163*, 1255–1260.
- Castan-Laurell, I., Vítková, M., Daviaud, D., Dray, C., Kováčiková, M., Kovacova, Z., Hejnova, J., Stich, V., and Valet, P. (2008). Effect of hypocaloric diet-induced weight loss in obese women on plasma apelin and adipose tissue expression of apelin and APJ. *Eur. J. Endocrinol.* *158*, 905–910.
- Cavallo, M.G., Sentinelli, F., Barchetta, I., Costantino, C., Incani, M., Perra, L., Capoccia, D., Romeo, S., Cossu, E., Leonetti, F., et al. (2012). Altered Glucose Homeostasis Is Associated with Increased Serum Apelin Levels in Type 2 Diabetes Mellitus. *PLoS ONE* *7*, e51236.
- Ceraudo, E., Galanth, C., Carpentier, E., Banegas-Font, I., Schonegge, A.-M., Alvear-Perez, R., Iturrioz, X., Bouvier, M., and Llorens-Cortes, C. (2014). Biased signaling favoring Gi over β -arrestin promoted by an apelin fragment lacking the C-terminal phenylalanine. *J. Biol. Chem.* *jbc.M113.541698*.
- Chari, S.T., Leibson, C.L., Rabe, K.G., Timmons, L.J., Ransom, J., de Andrade, M., and Petersen, G.M. (2008). Pancreatic cancer-associated diabetes mellitus: prevalence and temporal association with diagnosis of cancer. *Gastroenterology* *134*, 95–101.
- Charles, C.J. (2011). Update on apelin peptides as putative targets for cardiovascular drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* *6*, 633–644.
- Charo, D.N., Ho, M., Fajardo, G., Kawana, M., Kundu, R.K., Sheikh, A.Y., Finsterbach, T.P., Leeper, N.J., Ernst, K.V., Chen, M.M., et al. (2009). Endogenous regulation of cardiovascular function by apelin-APJ. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* *297*, H1904–H1913.
- Chaves-Almagro, C., Castan-Laurell, I., Dray, C., Knauf, C., Valet, P., and Masri, B. (2015). Apelin receptors: From signaling to antidiabetic strategy. *Eur. J. Pharmacol.*
- Chen, H., Zheng, C., Zhang, X., Li, J., Li, J., Zheng, L., and Huang, K. (2011). Apelin alleviates diabetes-associated endoplasmic reticulum stress in the pancreas of Akita mice. *Peptides* *32*, 1634–1639.
- Chen, M.M., Ashley, E.A., Deng, D.X.F., Tsalenko, A., Deng, A., Tabibiazar, R., Ben-Dor, A., Fenster, B., Yang, E., King, J.Y., et al. (2003). Novel Role for the Potent Endogenous Inotrope Apelin in Human Cardiac Dysfunction. *Circulation* *108*, 1432–1439.
- Chen, X., Bai, B., Tian, Y., Du, H., and Chen, J. (2014). Identification of serine 348 on the apelin receptor as a novel regulatory phosphorylation site in apelin-13-induced G protein-independent biased signaling. *J. Biol. Chem.* *289*, 31173–31187.
- Cheng, X., Cheng, X.S., and Pang, C.C.Y. (2003). Venous dilator effect of apelin, an endogenous peptide ligand for the orphan APJ receptor, in conscious rats. *Eur. J. Pharmacol.* *470*, 171–175.
- Chng, S.C., Ho, L., Tian, J., and Reversade, B. (2013). ELABELA: A Hormone Essential for Heart Development Signals via the Apelin Receptor. *Dev. Cell* *27*, 672–680.

- Chun, H.J., Ali, Z.A., Kojima, Y., Kundu, R.K., Sheikh, A.Y., Agrawal, R., Zheng, L., Leeper, N.J., Pearl, N.E., Patterson, A.J., et al. (2008). Apelin signaling antagonizes Ang II effects in mouse models of atherosclerosis. *J. Clin. Invest.* *118*, 3343–3354.
- Clemens, D.L., Wells, M.A., Schneider, K.J., and Singh, S. (2014). Molecular mechanisms of alcohol associated pancreatitis. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* *5*, 147–157.
- Cleveland, M.H., Sawyer, J.M., Afelik, S., Jensen, J., and Leach, S.D. (2012). Exocrine ontogenies: On the development of pancreatic acinar, ductal and centroacinar cells. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 711–719.
- Coleman, S.J., Chioni, A.-M., Ghallab, M., Anderson, R.K., Lemoine, N.R., Kocher, H.M., and Grose, R.P. (2014). Nuclear translocation of FGFR1 and FGF2 in pancreatic stellate cells facilitates pancreatic cancer cell invasion. *EMBO Mol. Med.* *6*, 467–481.
- Collins, M.A., Bednar, F., Zhang, Y., Brisset, J.-C., Galbán, S., Galbán, C.J., Rakshit, S., Flannagan, K.S., Adsay, N.V., and Pasca di Magliano, M. (2012). Oncogenic Kras is required for both the initiation and maintenance of pancreatic cancer in mice. *J. Clin. Invest.* *122*, 639–653.
- Collisson, E.A., Trejo, C.L., Silva, J.M., Gu, S., Korkola, J.E., Heiser, L.M., Charles, R.-P., Rabinovich, B.A., Hann, B., Dankort, D., et al. (2012). A central role for RAF→MEK→ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Discov.* *2*, 685–693.
- Commisso, C., Davidson, S.M., Soydaner-Azeloglu, R.G., Parker, S.J., Kamphorst, J.J., Hackett, S., Grabocka, E., Nofal, M., Drebin, J.A., Thompson, C.B., et al. (2013). Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* *497*, 633–637.
- Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.-L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., et al. (2011). FOLFIRINOX versus Gemcitabine for Metastatic Pancreatic Cancer. *N. Engl. J. Med.* *364*, 1817–1825.
- Cours Médecine (2010). Cours Médecine, Ostéopathie - Physiologie - - Partie 5 : Le pancréas.
- Cox, C.M., D’Agostino, S.L., Miller, M.K., Heimark, R.L., and Krieg, P.A. (2006). Apelin, the ligand for the endothelial G-protein-coupled receptor, APJ, is a potent angiogenic factor required for normal vascular development of the frog embryo. *Dev. Biol.* *296*, 177–189.
- Cubilla, A.L., and Fitzgerald, P.J. (1976). Morphological Lesions Associated with Human Primary Invasive Nonendocrine Pancreas Cancer. *Cancer Res.* *36*, 2690–2698.
- Cui, Y., and Andersen, D.K. (2012). Diabetes and pancreatic cancer. *Endocr. Relat. Cancer* *19*, F9–F26.
- Cui, R.-R., Mao, D.-A., Yi, L., Wang, C., Zhang, X.-X., Xie, H., Wu, X.-P., Liao, X.-B., Zhou, H., Meng, J.-C., et al. (2010). Apelin suppresses apoptosis of human vascular smooth muscle cells via APJ/PI3-K/Akt signaling pathways. *Amino Acids* *39*, 1193–1200.
- Dai, T., Ramirez-Correa, G., and Gao, W.D. (2006). Apelin increases contractility in failing cardiac muscle. *Eur. J. Pharmacol.* *553*, 222–228.

- Dang, C.V., Le, A., and Gao, P. (2009). MYC-induced Cancer Cell Energy Metabolism and Therapeutic Opportunities. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *15*, 6479–6483.
- Daviaud, D., Boucher, J., Gesta, S., Dray, C., Guigne, C., Quilliot, D., Ayav, A., Ziegler, O., Carpene, C., Saulnier-Blache, J.-S., et al. (2006). TNF α up-regulates apelin expression in human and mouse adipose tissue. *FASEB J.* *20*, 1528–1530.
- Deer, E.L., González-Hernández, J., Coursen, J.D., Shea, J.E., Ngatia, J., Scaife, C.L., Firpo, M.A., and Mulvihill, S.J. (2010). Phenotype and genotype of pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* *39*, 425–435.
- Delcourt, N., Bockaert, J., and Marin, P. (2007). GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation. *Trends Pharmacol. Sci.* *28*, 602–607.
- Delpu, Y., Hanoun, N., Lulka, H., Sicard, F., Selves, J., Buscail, L., Torrisani, J., and Cordelier, P. (2011). Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Curr. Genomics* *12*, 15–24.
- Deng, C., Chen, H., Yang, N., Feng, Y., and Hsueh, A.J.W. (2015). Apela regulates fluid homeostasis by binding to the APJ receptor to activate Gi signaling. *J. Biol. Chem.*
- Devic, E., Paquereau, L., Vernier, P., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (1996). Expression of a new G protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in *Xenopus laevis*. *Mech. Dev.* *59*, 129–140.
- Devic, E., Rizzoti, K., Bodin, S., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (1999a). Amino acid sequence and embryonic expression of msr/apj, the mouse homolog of *Xenopus* X-msr and human APJ. *Mech. Dev.* *84*, 199–203.
- Devic, E., Rizzoti, K., Bodin, S., Paquereau, L., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (1999b). [Expression of a new family of receptors similar to CXC chemokine receptors in endothelial cell precursors]. *Pathol. Biol. (Paris)* *47*, 330–338.
- Diakowska, D., Markocka-Mą, Czka, K., Szelachowski, P., and Grabowski, K. (2014). Serum Levels of Resistin, Adiponectin, and Apelin in Gastroesophageal Cancer Patients. *Dis. Markers* *2014*, e619649.
- Diaz, B., and Yuen, A. (2014). The impact of hypoxia in pancreatic cancer invasion and metastasis. *Hypoxia* *91*.
- Ding, X.Z., Fehsenfeld, D.M., Murphy, L.O., Permert, J., and Adrian, T.E. (2000). Physiological concentrations of insulin augment pancreatic cancer cell proliferation and glucose utilization by activating MAP kinase, PI3 kinase and enhancing GLUT-1 expression. *Pancreas* *21*, 310–320.
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Gonidec, S.L., et al. (2011). Cancer-Associated Adipocytes Exhibit an Activated Phenotype and Contribute to Breast Cancer Invasion. *Cancer Res.* *71*, 2455–2465.
- Distler, M., Aust, D., Weitz, J., Pilarsky, C., and Grützmann, R. (2014). Precursor lesions for sporadic pancreatic cancer: PanIN, IPMN, and MCN. *BioMed Res. Int.* *2014*, 474905.

- Doyle, S.L., Donohoe, C.L., Lysaght, J., and Reynolds, J.V. (2012). Visceral obesity, metabolic syndrome, insulin resistance and cancer. *Proc. Nutr. Soc.* *71*, 181–189.
- Dray, C., Knauf, C., Daviaud, D., Waget, A., Boucher, J., Buléon, M., Cani, P.D., Attané, C., Guigné, C., Carpené, C., et al. (2008). Apelin Stimulates Glucose Utilization in Normal and Obese Insulin-Resistant Mice. *Cell Metab.* *8*, 437–445.
- Dray, C., Debard, C., Jager, J., Disse, E., Daviaud, D., Martin, P., Attané, C., Wanecq, E., Guigné, C., Bost, F., et al. (2010). Apelin and APJ regulation in adipose tissue and skeletal muscle of type 2 diabetic mice and humans. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *298*, E1161–E1169.
- Dray, C., Sakar, Y., Vinel, C., Daviaud, D., Masri, B., Garrigues, L., Wanecq, E., Galvani, S., Negre-Salvayre, A., Barak, L.S., et al. (2013). The Intestinal Glucose–Apelin Cycle Controls Carbohydrate Absorption in Mice. *Gastroenterology* *144*, 771–780.
- Drougard, A., Duparc, T., Brenachot, X., Carneiro, L., Gouazé, A., Fournel, A., Geurts, L., Cadoudal, T., Prats, A.-C., Pénicaud, L., et al. (2014). Hypothalamic Apelin/Reactive Oxygen Species Signaling Controls Hepatic Glucose Metabolism in the Onset of Diabetes. *Antioxid. Redox Signal.* *20*, 557–573.
- Eagle, H. (1955). Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science* *122*, 501–514.
- Ebert, M., Yokoyama, M., Friess, H., Büchler, M.W., and Korc, M. (1994). Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* *54*, 5775–5778.
- Edling, C.E., Selvaggi, F., Buus, R., Maffucci, T., Di Sebastiano, P., Friess, H., Innocenti, P., Kocher, H.M., and Falasca, M. (2010). Key role of phosphoinositide 3-kinase class IB in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 4928–4937.
- Erdem, G., Dogru, T., Tasci, I., Sonmez, A., and Tapan, S. (2008). Low plasma apelin levels in newly diagnosed type 2 diabetes mellitus. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* *116*, 289–292.
- Eser, S., Reiff, N., Messer, M., Seidler, B., Gottschalk, K., Dobler, M., Hieber, M., Arbeiter, A., Klein, S., Kong, B., et al. (2013). Selective Requirement of PI3K/PDK1 Signaling for Kras Oncogene-Driven Pancreatic Cell Plasticity and Cancer. *Cancer Cell* *23*, 406–420.
- Evans, N.A., Groarke, D.A., Warrack, J., Greenwood, C.J., Dodgson, K., Milligan, G., and Wilson, S. (2001). Visualizing differences in ligand-induced β -arrestin–GFP interactions and trafficking between three recently characterized G protein-coupled receptors. *J. Neurochem.* *77*, 476–485.
- Eyries, M., Siegfried, G., Ciomas, M., Montagne, K., Agrapart, M., Lebrin, F., and Soubrier, F. (2008). Hypoxia-Induced Apelin Expression Regulates Endothelial Cell Proliferation and Regenerative Angiogenesis. *Circ. Res.* *103*, 432–440.
- Fan, X., Zhou, N., Zhang, X., Mukhtar, M., Lu, Z., Fang, J., DuBois, G.C., and Pomerantz, R.J. (2003). Structural and Functional Study of the Apelin-13 Peptide, an Endogenous Ligand of the HIV-1 Coreceptor, APJ \dagger . *Biochemistry (Mosc.)* *42*, 10163–10168.

- Faye, M.D., and Holcik, M. (2015). The role of IRES trans-acting factors in carcinogenesis. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Regul. Mech.* 1849, 887–897.
- Feldmann, G., Dhara, S., Fendrich, V., Bedja, D., Beaty, R., Mullendore, M., Karikari, C., Alvarez, H., Iacobuzio-Donahue, C., Jimeno, A., et al. (2007). Blockade of Hedgehog Signaling Inhibits Pancreatic Cancer Invasion and Metastases: A New Paradigm for Combination Therapy in Solid Cancers. *Cancer Res.* 67, 2187–2196.
- Fisher, W.E., Boros, L.G., and Schirmer, W.J. (1996). Insulin Promotes Pancreatic Cancer: Evidence for Endocrine Influence on Exocrine Pancreatic Tumors. *J. Surg. Res.* 63, 310–313.
- Fleming, J.B., Shen, G.-L., Holloway, S.E., Davis, M., and Brekken, R.A. (2005). Molecular Consequences of Silencing Mutant K-ras in Pancreatic Cancer Cells: Justification for K-ras–Directed Therapy. *Mol. Cancer Res.* 3, 413–423.
- Földes, G., Horkay, F., Szokodi, I., Vuolteenaho, O., Ilves, M., Lindstedt, K.A., Mäyränpää, M., Sárman, B., Seres, L., Skoumal, R., et al. (2003). Circulating and cardiac levels of apelin, the novel ligand of the orphan receptor APJ, in patients with heart failure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 480–485.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285, 1182–1186.
- Foussal, C., Lairez, O., Calise, D., Pathak, A., Guilbeau-Frugier, C., Valet, P., Parini, A., and Kunduzova, O. (2010). Activation of catalase by apelin prevents oxidative stress-linked cardiac hypertrophy. *FEBS Lett.* 584, 2363–2370.
- Fredriksson, R., Lagerström, M.C., Lundin, L.-G., and Schiöth, H.B. (2003). The G-Protein-Coupled Receptors in the Human Genome Form Five Main Families. Phylogenetic Analysis, Paralogon Groups, and Fingerprints. *Mol. Pharmacol.* 63, 1256–1272.
- Friedlander, S.Y.G., Chu, G.C., Snyder, E.L., Girnius, N., Dibelius, G., Crowley, D., Vasile, E., DePinho, R.A., and Jacks, T. (2009). Context-Dependent Transformation of Adult Pancreatic Cells by Oncogenic K-Ras. *Cancer Cell* 16, 379–389.
- Fritsche, P., Seidler, B., Schüler, S., Schnieke, A., Göttlicher, M., Schmid, R.M., Saur, D., and Schneider, G. (2009). HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA. *Gut* 58, 1399–1409.
- Fu, Q., Chen, Z., Gong, X., Cai, Y., Chen, Y., Ma, X., Zhu, R., and Jin, J. (2015). β -Catenin expression is regulated by an IRES-dependent mechanism and stimulated by paclitaxel in human ovarian cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 461, 21–27.
- Fu, Y., Zheng, S., An, N., Athanasopoulos, T., Popplewell, L., Liang, A., Li, K., Hu, C., and Zhu, Y. (2011). β -catenin as a potential key target for tumor suppression. *Int. J. Cancer* 129, 1541–1551.
- Fujii, S., Mitsunaga, S., Yamazaki, M., Hasebe, T., Ishii, G., Kojima, M., Kinoshita, T., Ueno, T., Esumi, H., and Ochiai, A. (2008). Autophagy is activated in pancreatic cancer cells and correlates with poor patient outcome. *Cancer Sci.* 99, 1813–1819.

Geiger, K., Muendlein, A., Stark, N., Saely, C.H., Wabitsch, M., Fraunberger, P., and Drexel, H. (2011). Hypoxia induces apelin expression in human adipocytes. *Horm. Metab. Res. Horm. Stoffwechselforschung Horm. Métabolisme* 43, 380–385.

Glassford, A.J., Yue, P., Sheikh, A.Y., Chun, H.J., Zarafshar, S., Chan, D.A., Reaven, G.M., Quertermous, T., and Tsao, P.S. (2007). HIF-1 regulates hypoxia- and insulin-induced expression of apelin in adipocytes. *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.* 293, E1590–E1596.

Gordan, J.D., Thompson, C.B., and Simon, M.C. (2007). HIF and c-Myc: Sibling Rivals for Control of Cancer Cell Metabolism and Proliferation. *Cancer Cell* 12, 108–113.

Gu, Q., Zhai, L., Feng, X., Chen, J., Miao, Z., Ren, L., Qian, X., Yu, J., Li, Y., Xu, X., et al. (2013). Apelin-36, a potent peptide, protects against ischemic brain injury by activating the PI3K/Akt pathway. *Neurochem. Int.* 63, 535–540.

Guerra, C., Schuhmacher, A.J., Cañamero, M., Grippo, P.J., Verdaguer, L., Pérez-Gallego, L., Dubus, P., Sandgren, E.P., and Barbacid, M. (2007). Chronic Pancreatitis Is Essential for Induction of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by K-Ras Oncogenes in Adult Mice. *Cancer Cell* 11, 291–302.

Guillaumond, F., Leca, J., Olivares, O., Lavaut, M.-N., Vidal, N., Berthezène, P., Dusetti, N.J., Loncle, C., Calvo, E., Turrini, O., et al. (2013). Strengthened glycolysis under hypoxia supports tumor symbiosis and hexosamine biosynthesis in pancreatic adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 3919–3924.

Guillaumond, F., Iovanna, J.L., and Vasseur, S. (2014). Pancreatic tumor cell metabolism: Focus on glycolysis and its connected metabolic pathways. *Arch. Biochem. Biophys.* 545, 69–73.

Guo, J.Y., Chen, H.-Y., Mathew, R., Fan, J., Strohecker, A.M., Karsli-Uzunbas, G., Kamphorst, J.J., Chen, G., Lemons, J.M.S., Karantza, V., et al. (2011). Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev.* 25, 460–470.

Guo, L., Li, Q., Wang, W., Yu, P., Pan, H., Li, P., Sun, Y., and Zhang, J. (2009). Apelin Inhibits Insulin Secretion in Pancreatic β -Cells by Activation of PI3-Kinase-Phosphodiesterase 3B. *Endocr. Res.* 34, 142–154.

Gysin, S., Lee, S.-H., Dean, N.M., and McMahon, M. (2005). Pharmacologic Inhibition of RAF→MEK→ERK Signaling Elicits Pancreatic Cancer Cell Cycle Arrest Through Induced Expression of p27Kip1. *Cancer Res.* 65, 4870–4880.

Habata, Y., Fujii, R., Hosoya, M., Fukusumi, S., Kawamata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Nishizawa, N., Murosaki, S., Kurokawa, T., et al. (1999). Apelin, the natural ligand of the orphan receptor APJ, is abundantly secreted in the colostrum. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1452, 25–35.

Habbe, N., Shi, G., Meguid, R.A., Fendrich, V., Esni, F., Chen, H., Feldmann, G., Stoffers, D.A., Konieczny, S.F., Leach, S.D., et al. (2008). Spontaneous induction of murine pancreatic intraepithelial neoplasia (mPanIN) by acinar cell targeting of oncogenic Kras in adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 18913–18918.

- Habchi, M., Duvillard, L., Cottet, V., Brindisi, M.-C., Bouillet, B., Beacco, M., Crevisy, E., Buffier, P., Baillet-Rudoni, S., Verges, B., et al. (2014). Circulating apelin is increased in patients with type 1 or type 2 diabetes and is associated with better glycaemic control. *Clin. Endocrinol. (Oxf.)* 81, 696–701.
- Hahn, S.A., Schutte, M., Hoque, A.T., Moskaluk, C.A., da Costa, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., et al. (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271, 350–353.
- Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3983–3988.
- Hakam, A., Fang, Q., Karl, R., and Coppola, D. (2003). Coexpression of IGF-1R and c-Src proteins in human pancreatic ductal adenocarcinoma. *Dig. Dis. Sci.* 48, 1972–1978.
- Halban, P.A., Polonsky, K.S., Bowden, D.W., Hawkins, M.A., Ling, C., Mather, K.J., Powers, A.C., Rhodes, C.J., Sussel, L., and Weir, G.C. (2014). β -cell failure in type 2 diabetes: postulated mechanisms and prospects for prevention and treatment. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 99, 1983–1992.
- Han, S., Wang, G., Qiu, S., de la Motte, C., Wang, H.-Q., Gomez, G., Englander, E.W., and Greeley, G.H. (2007). Increased colonic apelin production in rodents with experimental colitis and in humans with IBD. *Regul. Pept.* 142, 131–137.
- Han, S., Wang, G., Qi, X., Englander, E.W., and George H. Greeley, J. (2008a). Involvement of a Stat3 binding site in inflammation-induced enteric apelin expression. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 295, G1068–G1078.
- Han, S., Wang, G., Qi, X., Lee, H.M., Englander, E.W., and George H. Greeley, J. (2008b). A possible role for hypoxia-induced apelin expression in enteric cell proliferation. *Am. J. Physiol. - Regul. Integr. Comp. Physiol.* 294, R1832–R1839.
- Han, S., Englander, E.W., Gomez, G.A., Aronson, J.F., Rastellini, C., Garofalo, R.P., Kolli, D., Quertermous, T., Kundu, R., and George H. Greeley, J. (2013). Pancreatitis activates pancreatic apelin-APJ axis in mice. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 305, G139–G150.
- Han, S., Englander, E.W., Gomez, G.A., Rastellini, C., Quertermous, T., Kundu, R.K., and Greeley, G.H. (2015). PANCREATIC ISLET APJ DELETION REDUCES ISLET DENSITY AND GLUCOSE TOLERANCE IN MICE. *Endocrinology* en20141631.
- Hara, C., Kasai, A., Gomi, F., Satooka, T., Sakimoto, S., Nakai, K., Yoshioka, Y., Yamamuro, A., Maeda, S., and Nishida, K. (2013). Laser-Induced Choroidal Neovascularization in Mice Attenuated by Deficiency in the Apelin-APJ System. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 4321–4329.
- Hart, A., Papadopoulou, S., and Edlund, H. (2003). Fgf10 maintains notch activation, stimulates proliferation, and blocks differentiation of pancreatic epithelial cells. *Dev. Dyn.* 228, 185–193.

- Hashimoto, T., Kihara, M., Ishida, J., Imai, N., Yoshida, S., Toya, Y., Fukamizu, A., Kitamura, H., and Umemura, S. (2006). Apelin Stimulates Myosin Light Chain Phosphorylation in Vascular Smooth Muscle Cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, 1267–1272.
- Hashimoto, T., Kihara, M., Imai, N., Yoshida, S., Shimoyamada, H., Yasuzaki, H., Ishida, J., Toya, Y., Kiuchi, Y., Hirawa, N., et al. (2007). Requirement of Apelin-Apelin Receptor System for Oxidative Stress-Linked Atherosclerosis. *Am. J. Pathol.* *171*, 1705–1712.
- Hassan, R., and Ho, M. (2008). Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *Eur. J. Cancer* *44*, 46–53.
- He, S., Wang, F., Yang, L., Guo, C., Wan, R., Ke, A., Xu, L., Hu, G., Xu, X., Shen, J., et al. (2011). Expression of DNMT1 and DNMT3a Are Regulated by GLI1 in Human Pancreatic Cancer. *PLoS ONE* *6*, e27684.
- Hebrok, M., Kim, S.K., and Melton, D.A. (1998). Notochord repression of endodermal Sonic hedgehog permits pancreas development. *Genes Dev.* *12*, 1705–1713.
- van Heek, N.T., Meeker, A.K., Kern, S.E., Yeo, C.J., Lillemoe, K.D., Cameron, J.L., Offerhaus, G.J.A., Hicks, J.L., Wilentz, R.E., Goggins, M.G., et al. (2002). Telomere Shortening Is Nearly Universal in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. *Am. J. Pathol.* *161*, 1541–1547.
- Heinonen, M.V., Purhonen, A.K., Miettinen, P., Pääkkönen, M., Pirinen, E., Alhava, E., Åkerman, K., and Herzig, K.H. (2005). Apelin, orexin-A and leptin plasma levels in morbid obesity and effect of gastric banding. *Regul. Pept.* *130*, 7–13.
- Heo, K., Kim, Y.H., Sung, H.J., Li, H.Y., Yoo, C.W., Kim, J.Y., Park, J.Y., Lee, U.L., Nam, B.H., Kim, E.O., et al. (2012). Hypoxia-induced up-regulation of apelin is associated with a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* *48*, 500–506.
- Herreros-Villanueva, M., Gironella, M., Castells, A., and Bujanda, L. (2013). Molecular markers in pancreatic cancer diagnosis. *Clin. Chim. Acta* *418*, 22–29.
- Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., and DePinho, R.A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes Dev.* *20*, 1218–1249.
- Higashi, T., Tamaki, N., Honda, T., Torizuka, T., Kimura, T., Inokuma, T., Ohshio, G., Hosotani, R., Imamura, M., and Konishi, J. (1997). Expression of Glucose Transporters in Human Pancreatic Tumors Compared with Increased FDG Accumulation in PET Study. *J. Nucl. Med.* *38*, 1337–1344.
- Higuchi, K., Masaki, T., Gotoh, K., Chiba, S., Katsuragi, I., Tanaka, K., Kakuma, T., and Yoshimatsu, H. (2007). Apelin, an APJ receptor ligand, regulates body adiposity and favors the messenger ribonucleic acid expression of uncoupling proteins in mice. *Endocrinology* *148*, 2690–2697.
- Hill, R., Calvopina, J.H., Kim, C., Wang, Y., Dawson, D.W., Donahue, T.R., Dry, S., and Wu, H. (2010). PTEN Loss Accelerates KrasG12D-Induced Pancreatic Cancer Development. *Cancer Res.* *70*, 7114–7124.

Hingorani, S.R., Petricoin III, E.F., Maitra, A., Rajapakse, V., King, C., Jacobetz, M.A., Ross, S., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., Hitt, B.A., et al. (2003). Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* 4, 437–450.

Hingorani, S.R., Wang, L., Multani, A.S., Combs, C., Deramaudt, T.B., Hruban, R.H., Rustgi, A.K., Chang, S., and Tuveson, D.A. (2005). Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 7, 469–483.

Hiyama, E., Kodama, T., Shinbara, K., Iwao, T., Itoh, M., Hiyama, K., Shay, J.W., Matsuura, Y., and Yokoyama, T. (1997). Telomerase Activity Is Detected in Pancreatic Cancer but not in Benign Tumors. *Cancer Res.* 57, 326–331.

Von Hoff, D.D., Ervin, T., Arena, F.P., Chiorean, E.G., Infante, J., Moore, M., Seay, T., Tjulandin, S.A., Ma, W.W., Saleh, M.N., et al. (2013). Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *N. Engl. J. Med.* 369, 1691–1703.

Hofmann, I., Weiss, A., Elain, G., Schwaederle, M., Sterker, D., Romanet, V., Schmelzle, T., Lai, A., Brachmann, S.M., Bentires-Alj, M., et al. (2012). K-RAS mutant pancreatic tumors show higher sensitivity to MEK than to PI3K inhibition in vivo. *PloS One* 7, e44146.

Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., et al. (2007). Adipose Tissue Hypoxia in Obesity and Its Impact on Adipocytokine Dysregulation. *Diabetes* 56, 901–911.

Hosoya, M., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Fujii, R., Habata, Y., Hinuma, S., Kitada, C., Honda, S., Kurokawa, T., Onda, H., et al. (2000). Molecular and Functional Characteristics of APJ TISSUE DISTRIBUTION OF mRNA AND INTERACTION WITH THE ENDOGENOUS LIGAND APELIN. *J. Biol. Chem.* 275, 21061–21067.

Hotz, B., Arndt, M., Dullat, S., Bhargava, S., Buhr, H.-J., and Hotz, H.G. (2007). Epithelial to mesenchymal transition: expression of the regulators snail, slug, and twist in pancreatic cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13, 4769–4776.

Hruban, R.H., Goggins, M., Parsons, J., and Kern, S.E. (2000). Progression Model for Pancreatic Cancer. *Clin. Cancer Res.* 6, 2969–2972.

Hruban, R.H., Takaori, K., Klimstra, D.S., Adsay, N.V., Albores-Saavedra, J., Biankin, A.V., Biankin, S.A., Compton, C., Fukushima, N., Furukawa, T., et al. (2004). An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms. *Am. J. Surg. Pathol.* 28, 977–987.

Hus-Citharel, A., Bouby, N., Frugièrè, A., Bodineau, L., Gasc, J.-M., and Llorens-Cortes, C. (2008). Effect of apelin on glomerular hemodynamic function in the rat kidney. *Kidney Int.* 74, 486–494.

Hus-Citharel, A., Bodineau, L., Frugièrè, A., Joubert, F., Bouby, N., and Llorens-Cortes, C. (2014). APELIN COUNTERACTS VASOPRESSIN-INDUCED WATER REABSORPTION VIA CROSSTALK BETWEEN APELIN AND VASOPRESSIN RECEPTOR SIGNALING PATHWAYS IN THE RAT COLLECTING DUCT. *Endocrinology* en20141257.

- Huxley, R., Ansary-Moghaddam, A., Berrington de González, A., Barzi, F., and Woodward, M. (2005). Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *Br. J. Cancer* 92, 2076–2083.
- Hwang, H.-W., and Mendell, J.T. (2006). MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br. J. Cancer* 94, 776–780.
- Infante, J.R., Matsubayashi, H., Sato, N., Tonascia, J., Klein, A.P., Riall, T.A., Yeo, C., Iacobuzio-Donahue, C., and Goggins, M. (2007). Peritumoral Fibroblast SPARC Expression and Patient Outcome With Resectable Pancreatic Adenocarcinoma. *J. Clin. Oncol.* 25, 319–325.
- Inui, M., Fukui, A., Ito, Y., and Asashima, M. (2006). Xapelin and Xmsr are required for cardiovascular development in *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* 298, 188–200.
- Ishida, J., Hashimoto, T., Hashimoto, Y., Nishiwaki, S., Iguchi, T., Harada, S., Sugaya, T., Matsuzaki, H., Yamamoto, R., Shiota, N., et al. (2004). Regulatory Roles for APJ, a Seven-transmembrane Receptor Related to Angiotensin-type 1 Receptor in Blood Pressure in Vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 26274–26279.
- Itakura, J., Ishiwata, T., Friess, H., Fujii, H., Matsumoto, Y., Büchler, M.W., and Korc, M. (1997). Enhanced expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic cancer correlates with local disease progression. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 3, 1309–1316.
- Iturrioz, X., Messari, S. El, De Mota, N., Fassot, C., Alvear-Perez, R., Maigret, B., and Llorens-Cortes, C. (2007). [Functional dissociation between apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure]. *Arch. Mal. Coeur Vaiss.* 100, 704–708.
- Iturrioz, X., Alvear-Perez, R., Mota, N.D., Franchet, C., Guillier, F., Leroux, V., Dabire, H., Jouan, M.L., Chabane, H., Gerbier, R., et al. (2010). Identification and pharmacological properties of E339-3D6, the first nonpeptidic apelin receptor agonist. *FASEB J.* 24, 1506–1517.
- Iwanaga, Y., Kihara, Y., Takenaka, H., and Kita, T. (2006). Down-regulation of cardiac apelin system in hypertrophied and failing hearts: Possible role of angiotensin II–angiotensin type 1 receptor system. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 41, 798–806.
- Jacquemin, P., Yoshitomi, H., Kashima, Y., Rousseau, G.G., Lemaigre, F.P., and Zaret, K.S. (2006). An endothelial–mesenchymal relay pathway regulates early phases of pancreas development. *Dev. Biol.* 290, 189–199.
- Jain, R., and Lammert, E. (2009). Cell–cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes Obes. Metab.* 11, 159–167.
- Japp, A.G., Cruden, N.L., Amer, D.A.B., Li, V.K.Y., Goudie, E.B., Johnston, N.R., Sharma, S., Neilson, I., Webb, D.J., Megson, I.L., et al. (2008). Vascular Effects of Apelin In Vivo in Man. *J. Am. Coll. Cardiol.* 52, 908–913.

- Jensen, J.N., Cameron, E., Garay, M.V.R., Starkey, T.W., Gianani, R., and Jensen, J. (2005). Recapitulation of elements of embryonic development in adult mouse pancreatic regeneration. *Gastroenterology* 128, 728–741.
- Jeong, K., Oh, Y., Kim, S.-J., Kim, H., Park, K.-C., Kim, S.S., Ha, J., Kang, I., and Choe, W. (2014). Apelin is transcriptionally regulated by ER stress-induced ATF4 expression via a p38 MAPK-dependent pathway. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 19, 1399–1410.
- Jia, Y.-X., Pan, C.-S., Zhang, J., Geng, B., Zhao, J., Gerns, H., Yang, J., Chang, J.-K., Tang, C.-S., and Qi, Y.-F. (2006). Apelin protects myocardial injury induced by isoproterenol in rats. *Regul. Pept.* 133, 147–154.
- Jia, Y.X., Lu, Z.F., Zhang, J., Pan, C.S., Yang, J.H., Zhao, J., Yu, F., Duan, X.H., Tang, C.S., and Qi, Y.F. (2007). Apelin activates l-arginine/nitric oxide synthase/nitric oxide pathway in rat aortas. *Peptides* 28, 2023–2029.
- Jiang, H., Ye, X.-P., Yang, Z.-Y., Zhan, M., Wang, H.-N., Cao, H.-M., Xie, H.-J., Pan, C.-M., Song, H.-D., and Zhao, S.-X. (2013). Aldosterone directly affects apelin expression and secretion in adipocytes. *J. Mol. Endocrinol.* 51, 37–48.
- Jonsson, J., Carlsson, L., Edlund, T., and Edlund, H. (1994). Insulin-promoter-factor 1 is required for pancreas development in mice. *Nature* 371, 606–609.
- Kahn, S.E., Hull, R.L., and Utzschneider, K.M. (2006). Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444, 840–846.
- Kälin, R.E., Kretz, M.P., Meyer, A.M., Kispert, A., Heppner, F.L., and Brändli, A.W. (2007). Paracrine and autocrine mechanisms of apelin signaling govern embryonic and tumor angiogenesis. *Dev. Biol.* 305, 599–614.
- Kang, Y., Kim, J., Anderson, J.P., Wu, J., Gleim, S.R., Kundu, R.K., McLean, D.L., Kim, J., Park, H., Jin, S., et al. (2013). Apelin-APJ Signaling Is a Critical Regulator of Endothelial MEF2 Activation in Cardiovascular Development. *Circ. Res.* 113, 22–31.
- Karna, E., Surazynski, A., Orłowski, K., Łaszkiewicz, J., Puchalski, Z., Nawrat, P., and Pałka, J. (2002). Serum and tissue level of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-I binding proteins as an index of pancreatitis and pancreatic cancer. *Int. J. Exp. Pathol.* 83, 239–245.
- Kasai, A., Shintani, N., Oda, M., Kakuda, M., Hashimoto, H., Matsuda, T., Hinuma, S., and Baba, A. (2004). Apelin is a novel angiogenic factor in retinal endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 325, 395–400.
- Kasai, A., Shintani, N., Kato, H., Matsuda, S., Gomi, F., Haba, R., Hashimoto, H., Kakuda, M., Tano, Y., and Baba, A. (2008). Retardation of Retinal Vascular Development in Apelin-Deficient Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1717–1722.
- Kasai, A., Ishimaru, Y., Kinjo, T., Satooka, T., Matsumoto, N., Yoshioka, Y., Yamamuro, A., Gomi, F., Shintani, N., Baba, A., et al. (2010). Apelin Is a Crucial Factor for Hypoxia-Induced Retinal Angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 30, 2182–2187.

Kasai, A., Ishimaru, Y., Higashino, K., Kobayashi, K., Yamamuro, A., Yoshioka, Y., and Maeda, S. (2013). Inhibition of apelin expression switches endothelial cells from proliferative to mature state in pathological retinal angiogenesis. *Angiogenesis* 16, 723–734.

Katoh, Y., and Katoh, M. (2009). Hedgehog target genes: mechanisms of carcinogenesis induced by aberrant hedgehog signaling activation. *Curr. Mol. Med.* 9, 873–886.

Katugampola, S.D., Maguire, J.J., Matthewson, S.R., and Davenport, A.P. (2001). [(125)I]-(Pyr(1))Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *Br. J. Pharmacol.* 132, 1255–1260.

Kawaguchi, Y., Cooper, B., Gannon, M., Ray, M., MacDonald, R.J., and Wright, C.V.E. (2002). The role of the transcriptional regulator Ptf1a in converting intestinal to pancreatic progenitors. *Nat. Genet.* 32, 128–134.

Kawamata, Y., Habata, Y., Fukusumi, S., Hosoya, M., Fujii, R., Hinuma, S., Nishizawa, N., Kitada, C., Onda, H., Nishimura, O., et al. (2001). Molecular properties of apelin: tissue distribution and receptor binding. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* 1538, 162–171.

Kidoya, H., Ueno, M., Yamada, Y., Mochizuki, N., Nakata, M., Yano, T., Fujii, R., and Takakura, N. (2008). Spatial and temporal role of the apelin/APJ system in the caliber size regulation of blood vessels during angiogenesis. *EMBO J.* 27, 522–534.

Kim, J.-D., Kang, Y., Kim, J., Papangeli, I., Kang, H., Wu, J., Park, H., Nadelmann, E., Rockson, S.G., Chun, H.J., et al. (2014). Essential Role of Apelin Signaling During Lymphatic Development in Zebrafish. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 34, 338–345.

Kleinz, M.J., and Baxter, G.F. (2008). Apelin reduces myocardial reperfusion injury independently of PI3K/Akt and P70S6 kinase. *Regul. Pept.* 146, 271–277.

Kleinz, M.J., and Davenport, A.P. (2004). Immunocytochemical localization of the endogenous vasoactive peptide apelin to human vascular and endocardial endothelial cells. *Regul. Pept.* 118, 119–125.

Kleinz, M.J., and Davenport, A.P. (2005). Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacol. Ther.* 107, 198–211.

Kleinz, M.J., Skepper, J.N., and Davenport, A.P. (2005). Immunocytochemical localisation of the apelin receptor, APJ, to human cardiomyocytes, vascular smooth muscle and endothelial cells. *Regul. Pept.* 126, 233–240.

Klimstra, D.S., and Longnecker, D.S. (1994). K-ras mutations in pancreatic ductal proliferative lesions. *Am. J. Pathol.* 145, 1547–1550.

Kobilka, B.K. (2007). G Protein Coupled Receptor Structure and Activation. *Biochim. Biophys. Acta* 1768, 794–807.

Kopan, R., and Ilagan, M.X.G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell* 137, 216–233.

Korc, M. (2003). Pathways for aberrant angiogenesis in pancreatic cancer. *Mol. Cancer* 2, 8.

- Korc, M., Chandrasekar, B., Yamanaka, Y., Friess, H., Buchier, M., and Beger, H.G. (1992). Overexpression of the epidermal growth factor receptor in human pancreatic cancer is associated with concomitant increases in the levels of epidermal growth factor and transforming growth factor alpha. *J. Clin. Invest.* *90*, 1352–1360.
- Krist, J., Wieder, K., Klötting, N., Oberbach, A., Kralisch, S., Wiesner, T., Schön, M.R., Gärtner, D., Dietrich, A., Shang, E., et al. (2013). Effects of weight loss and exercise on apelin serum concentrations and adipose tissue expression in human obesity. *Obes. Facts* *6*, 57–69.
- Kuba, K., Zhang, L., Imai, Y., Arab, S., Chen, M., Maekawa, Y., Leschnik, M., Leibbrandt, A., Markovic, M., Schwaighofer, J., et al. (2007). Impaired Heart Contractility in Apelin Gene-Deficient Mice Associated With Aging and Pressure Overload. *Circ. Res.* *101*, e32–e42.
- Kunduzova, O., Alet, N., Delesque-Touchard, N., Millet, L., Castan-Laurell, I., Muller, C., Dray, C., Schaeffer, P., Herault, J.P., Savi, P., et al. (2008). Apelin/APJ signaling system: a potential link between adipose tissue and endothelial angiogenic processes. *FASEB J.* *22*, 4146–4153.
- Lacquaniti, A., Altavilla, G., Picone, A., Donato, V., Chirico, V., Mondello, P., Aloisi, C., Marabello, G., Loddo, S., Buemi, A., et al. (2015). Apelin beyond kidney failure and hyponatremia: a useful biomarker for cancer disease progression evaluation. *Clin. Exp. Med.* *15*, 97–105.
- Lambrecht, N.W.G., Yakubov, I., Zer, C., and Sachs, G. (2006). Transcriptomes of purified gastric ECL and parietal cells: identification of a novel pathway regulating acid secretion. *Physiol. Genomics* *25*, 153–165.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 178–196.
- Laurent, V., Nieto, L., Valet, P., and Muller, C. (2014). [Adipose tissue and cancer: a high risk tandem]. *Médecine Sci. MS* *30*, 398–404.
- Le, A., Cooper, C.R., Gouw, A.M., Dinavahi, R., Maitra, A., Deck, L.M., Royer, R.E., Jagt, D.L.V., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2010). Inhibition of lactate dehydrogenase A induces oxidative stress and inhibits tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 2037–2042.
- Lee, D.K., Cheng, R., Nguyen, T., Fan, T., Kariyawasam, A.P., Liu, Y., Osmond, D.H., George, S.R., and O’Dowd, B.F. (2000). Characterization of Apelin, the Ligand for the APJ Receptor. *J. Neurochem.* *74*, 34–41.
- Lee, D.K., Saldivia, V.R., Nguyen, T., Cheng, R., George, S.R., and O’Dowd, B.F. (2005). Modification of the terminal residue of apelin-13 antagonizes its hypotensive action. *Endocrinology* *146*, 231–236.
- Lee, D.K., Ferguson, S.S.G., George, S.R., and O’Dowd, B.F. (2010). The fate of the internalized apelin receptor is determined by different isoforms of apelin mediating differential interaction with β -arrestin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *395*, 185–189.

- Lesage, J., Eberlé, D., and Breton, C. (2015). [Discovery of Toddler/Elabela ligand and the double life of the apelin receptor]. *Médecine Sci. MS* 31, 481–483.
- Levy, L., and Hill, C.S. (2005). Smad4 Dependency Defines Two Classes of Transforming Growth Factor (TGF- β) Target Genes and Distinguishes TGF- β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition from Its Antiproliferative and Migratory Responses. *Mol. Cell. Biol.* 25, 8108–8125.
- Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of Pancreatic Cancer Stem Cells. *Cancer Res.* 67, 1030–1037.
- Li, D., Morris, J.S., Liu, J., Hassan, M.M., Day, R.S., Bondy, M.L., and Abbruzzese, J.L. (2009). Body mass index and risk, age of onset, and survival in patients with pancreatic cancer. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 301, 2553–2562.
- LI, G., JI, Y., LIU, C., LI, J., and ZHOU, Y. (2012). Reduced levels of p15INK4b, p16INK4a, p21cip1 and p27kip1 in pancreatic carcinoma. *Mol. Med. Rep.* 5, 1106–1110.
- Li, L., Yang, G., Li, Q., Tang, Y., Yang, M., Yang, H., and Li, K. (2006). Changes and relations of circulating visfatin, apelin, and resistin levels in normal, impaired glucose tolerance, and type 2 diabetic subjects. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 114, 544–548.
- Li, L., Li, L., Xie, F., Zhang, Z., Guo, Y., Tang, G., Lv, D., Lu, Q., Chen, L., and Li, J. (2013). Jagged-1/Notch3 signaling transduction pathway is involved in apelin-13-induced vascular smooth muscle cells proliferation. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 45, 875–881.
- Li, W., M. Albrecht, A., and Li, M. (2012a). Inflammation and Pancreatic Cancer: A Tale of Two Cytokines. *Cell Biol. Res. Ther.* 01.
- Li, X., Jiang, L., Yang, M., Wu, Y., Sun, S., and Sun, J. (2014). CTRP3 modulates the expression and secretion of adipokines in 3T3-L1 adipocytes. *Endocr. J.* 61, 1153–1162.
- Li, Y., Chen, J., Bai, B., Du, H., Liu, Y., and Liu, H. (2012b). Heterodimerization of human apelin and kappa opioid receptors: Roles in signal transduction. *Cell. Signal.* 24, 991–1001.
- Liu, C., Su, T., Li, F., Li, L., Qin, X., Pan, W., Feng, F., Chen, F., Liao, D., and Chen, L. (2010). PI3K/Akt signaling transduction pathway is involved in rat vascular smooth muscle cell proliferation induced by apelin-13. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 42, 396–402.
- Longley, D.B., Harkin, D.P., and Johnston, P.G. (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat. Rev. Cancer* 3, 330–338.
- Lorente-Cebrián, S., Bustos, M., Marti, A., Martinez, J.A., and Moreno-Aliaga, M.J. (2010). Eicosapentaenoic acid up-regulates apelin secretion and gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Nutr. Food Res.* 54 Suppl 1, S104–S111.
- Lucenteforte, E., La Vecchia, C., Silverman, D., Petersen, G.M., Bracci, P.M., Ji, B.T., Bosetti, C., Li, D., Gallinger, S., Miller, A.B., et al. (2012). Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* 23, 374–382.

- Luttrell, L.M., Roudabush, F.L., Choy, E.W., Miller, W.E., Field, M.E., Pierce, K.L., and Lefkowitz, R.J. (2001). Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by β -arrestin scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 2449–2454.
- Lv, S.-Y., Yang, Y.-J., and Chen, Q. (2013). Regulation of feeding behavior, gastrointestinal function and fluid homeostasis by apelin. *Peptides* *44*, 87–92.
- Lyssiotis, C.A., Son, J., Cantley, L.C., and Kimmelman, A.C. (2013). Pancreatic cancers rely on a novel glutamine metabolism pathway to maintain redox balance. *Cell Cycle Georget. Tex* *12*, 1987–1988.
- Macaluso, N.J.M., Pitkin, S.L., Maguire, J.J., Davenport, A.P., and Glen, R.C. (2011). Discovery of a competitive apelin receptor (APJ) antagonist. *ChemMedChem* *6*, 1017–1023.
- Maguire, J.J., Klein, M.J., Pitkin, S.L., and Davenport, A.P. (2009). [Pyr1]Apelin-13 Identified as the Predominant Apelin Isoform in the Human Heart Vasoactive Mechanisms and Inotropic Action in Disease. *Hypertension* *54*, 598–604.
- Maier, H.J., Wirth, T., and Beug, H. (2010). Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma. *Cancers* *2*, 2058–2083.
- Maisonneuve, P., and Lowenfels, A.B. (2010). Epidemiology of Pancreatic Cancer: An Update. *Dig. Dis.* *28*, 645–656.
- Maitra, A., and Hruban, R.H. (2008). Pancreatic Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* *3*, 157–188.
- Maitra, A., Fukushima, N., Takaori, K., and Hruban, R.H. (2005). Precursors to invasive pancreatic cancer. *Adv. Anat. Pathol.* *12*, 81–91.
- Maloney, P.R., Khan, P., Hedrick, M., Gosalia, P., Milewski, M., Li, L., Roth, G.P., Sergienko, E., Suyama, E., Sugarman, E., et al. (2012). Discovery of 4-oxo-6-((pyrimidin-2-ylthio)methyl)-4H-pyran-3-yl 4-nitrobenzoate (ML221) as a functional antagonist of the apelin (APJ) receptor. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* *22*, 6656–6660.
- Masri, B., Lahlou, H., Mazarguil, H., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2002). Apelin (65–77) Activates Extracellular Signal-Regulated Kinases via a PTX-Sensitive G Protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *290*, 539–545.
- Masri, B., Morin, N., Cornu, M., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2004). Apelin (65-77) activates p70 S6 kinase and is mitogenic for umbilical endothelial cells. *FASEB J.* *18*, 1909–1911.
- Masri, B., Morin, N., Pedebernade, L., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2006). The Apelin Receptor Is Coupled to Gi1 or Gi2 Protein and Is Differentially Desensitized by Apelin Fragments. *J. Biol. Chem.* *281*, 18317–18326.
- Mazzucotelli, A., Ribet, C., Castan-Laurell, I., Daviaud, D., Guigné, C., Langin, D., and Valet, P. (2008). The transcriptional co-activator PGC-1 α up regulates apelin in human and mouse adipocytes. *Regul. Pept.* *150*, 33–37.

- Means, A.L., Meszoely, I.M., Suzuki, K., Miyamoto, Y., Rustgi, A.K., Coffey, R.J., Wright, C.V.E., Stoffers, D.A., and Leach, S.D. (2005). Pancreatic epithelial plasticity mediated by acinar cell transdifferentiation and generation of nestin-positive intermediates. *Development* 132, 3767–3776.
- Medhurst, A.D., Jennings, C.A., Robbins, M.J., Davis, R.P., Ellis, C., Winborn, K.Y., Lawrie, K.W.M., Hervieu, G., Riley, G., Bolaky, J.E., et al. (2003). Pharmacological and immunohistochemical characterization of the APJ receptor and its endogenous ligand apelin. *J. Neurochem.* 84, 1162–1172.
- Mesmin, C., Dubois, M., Becher, F., Fenaille, F., and Ezan, E. (2010). Liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the absolute quantification of the expected circulating apelin peptides in human plasma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 24, 2875–2884.
- Mesmin, C., Fenaille, F., Becher, F., Tabet, J.-C., and Ezan, E. (2011). Identification and characterization of apelin peptides in bovine colostrum and milk by liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 10, 5222–5231.
- Messari, S. El, Iturrioz, X., Fassot, C., De Mota, N., Roesch, D., and Llorens-Cortes, C. (2004). Functional dissociation of apelin receptor signaling and endocytosis: implications for the effects of apelin on arterial blood pressure. *J. Neurochem.* 90, 1290–1301.
- Mira, E., Lacalle, R.A., González, M.A., Gómez-Moutón, C., Abad, J.L., Bernad, A., Martínez-A, C., and Mañes, S. (2001). A role for chemokine receptor transactivation in growth factor signaling. *EMBO Rep.* 2, 151–156.
- Mitra, A., Katovich, M.J., Mecca, A., and Rowland, N.E. (2006). Effects of central and peripheral injections of apelin on fluid intake and cardiovascular parameters in rats. *Physiol. Behav.* 89, 221–225.
- Miura, T., Luo, Y., Khrebtukova, I., Brandenberger, R., Zhou, D., Thies, R.S., Vasicek, T., Young, H., Lebkowski, J., Carpenter, M.K., et al. (2004). Monitoring early differentiation events in human embryonic stem cells by massively parallel signature sequencing and expressed sequence tag scan. *Stem Cells Dev.* 13, 694–715.
- Miyamoto, Y., Maitra, A., Ghosh, B., Zechner, U., Argani, P., Iacobuzio-Donahue, C.A., Sriuranpong, V., Iso, T., Meszoely, I.M., Wolfe, M.S., et al. (2003). Notch mediates TGF α -induced changes in epithelial differentiation during pancreatic tumorigenesis. *Cancer Cell* 3, 565–576.
- Moore, M.J., Goldstein, D., Hamm, J., Figer, A., Hecht, J.R., Gallinger, S., Au, H.J., Murawa, P., Walde, D., Wolff, R.A., et al. (2007). Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 25, 1960–1966.
- Moriyama, T., Ohuchida, K., Mizumoto, K., Yu, J., Sato, N., Naba, T., Takahata, S., Toma, H., Nagai, E., and Tanaka, M. (2009). MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance. *Mol. Cancer Ther.* 8, 1067–1074.

- De Mota, N., Lenkei, Z., and Llorens-Cortès, C. (2000). Cloning, pharmacological characterization and brain distribution of the rat apelin receptor. *Neuroendocrinology* 72, 400–407.
- De Mota, N., Reaux-Le Goazigo, A., Messari, S. El, Chartrel, N., Roesch, D., Dujardin, C., Kordon, C., Vaudry, H., Moos, F., and Llorens-Cortès, C. (2004). Apelin, a potent diuretic neuropeptide counteracting vasopressin actions through inhibition of vasopressin neuron activity and vasopressin release. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 10464–10469.
- Muller, C. (2013). Tumour-surrounding adipocytes are active players in breast cancer progression. *Ann. Endocrinol.* 74, 108–110.
- Murtaugh, L.C., Stanger, B.Z., Kwan, K.M., and Melton, D.A. (2003). Notch signaling controls multiple steps of pancreatic differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 14920–14925.
- Oakley, R.H., Laporte, S.A., Holt, J.A., Barak, L.S., and Caron, M.G. (2001). Molecular Determinants Underlying the Formation of Stable Intracellular G Protein-coupled Receptor- β -Arrestin Complexes after Receptor Endocytosis*. *J. Biol. Chem.* 276, 19452–19460.
- Oberstein, P.E., and Olive, K.P. (2013). Pancreatic cancer: why is it so hard to treat? *Ther. Adv. Gastroenterol.* 6, 321–337.
- O’Carroll, A.-M., and Lolait, S.J. (2003). Regulation of Rat APJ Receptor Messenger Ribonucleic Acid Expression in Magnocellular Neurones of the Paraventricular and Supraoptic Nuclei by Osmotic Stimuli. *J. Neuroendocrinol.* 15, 661–666.
- O’Carroll, A.-M., Selby, T.L., Palkovits, M., and Lolait, S.J. (2000). Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin in brain and peripheral tissues. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gene Struct. Expr.* 1492, 72–80.
- O’Carroll, A.-M., Don, A.L.J., and Lolait, S.J. (2003). APJ receptor mRNA expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus: regulation by stress and glucocorticoids. *J. Neuroendocrinol.* 15, 1095–1101.
- O’Carroll, A.-M., Lolait, S.J., and Howell, G.M. (2006). Transcriptional regulation of the rat apelin receptor gene: promoter cloning and identification of an Sp1 site necessary for promoter activity. *J. Mol. Endocrinol.* 36, 221–235.
- O’Donnell, L.A., Agrawal, A., Sabnekar, P., Dichter, M.A., Lynch, D.R., and Kolson, D.L. (2007). Apelin, an endogenous neuronal peptide, protects hippocampal neurons against excitotoxic injury. *J. Neurochem.* 102, 1905–1917.
- O’Dowd, B.F., Heiber, M., Chan, A., Heng, H.H., Tsui, L.C., Kennedy, J.L., Shi, X., Petronis, A., George, S.R., and Nguyen, T. (1993). A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136, 355–360.
- Offield, M.F., Jetton, T.L., Labosky, P.A., Ray, M., Stein, R.W., Magnuson, M.A., Hogan, B.L., and Wright, C.V. (1996). PDX-1 is required for pancreatic outgrowth and differentiation of the rostral duodenum. *Dev. Camb. Engl.* 122, 983–995.

- Ohlsson, H., Karlsson, K., and Edlund, T. (1993). IPF1, a homeodomain-containing transactivator of the insulin gene. *EMBO J.* *12*, 4251–4259.
- Ohno, S., Yakabi, K., Ro, S., Ochiai, M., Onouchi, T., Sakurada, T., Takabayashi, H., Ishida, S., and Takayama, K. (2012). Apelin-12 stimulates acid secretion through an increase of histamine release in rat stomachs. *Regul. Pept.* *174*, 71–78.
- Ohtsu, H., Dempsey, P.J., and Eguchi, S. (2006a). ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* *291*, C1–C10.
- Ohtsu, H., Dempsey, P.J., Frank, G.D., Brailoiu, E., Higuchi, S., Suzuki, H., Nakashima, H., Eguchi, K., and Eguchi, S. (2006b). ADAM17 mediates epidermal growth factor receptor transactivation and vascular smooth muscle cell hypertrophy induced by angiotensin II. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *26*, e133–e137.
- Olive, K.P., Jacobetz, M.A., Davidson, C.J., Gopinathan, A., McIntyre, D., Honess, D., Madhu, B., Goldgraben, M.A., Caldwell, M.E., Allard, D., et al. (2009). Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer. *Science* *324*, 1457–1461.
- O’Shea, M., Hansen, M.J., Tatemoto, K., and Morris, M.J. (2003). Inhibitory effect of apelin-12 on nocturnal food intake in the rat. *Nutr. Neurosci.* *6*, 163–167.
- Ottendorf, N.A., de Wilde, R.F., Maitra, A., Hruban, R.H., and Offerhaus, G.J.A. (2011). Molecular Characteristics of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pathol. Res. Int.* *2011*, 1–16.
- Park, J.Y., Helm, J., Coppola, D., Kim, D., Malafa, M., and Kim, S.J. (2011). MicroRNAs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol. WJG* *17*, 817–827.
- Parsa, I., Longnecker, D.S., Scarpelli, D.G., Pour, P., Reddy, J.K., and Lefkowitz, M. (1985). Ductal Metaplasia of Human Exocrine Pancreas and Its Association with Carcinoma. *Cancer Res.* *45*, 1285–1290.
- Patra, K.C., Wang, Q., Bhaskar, P.T., Miller, L., Wang, Z., Wheaton, W., Chandel, N., Laakso, M., Muller, W.J., Allen, E.L., et al. (2013). Hexokinase 2 is required for tumor initiation and maintenance and its systemic deletion is therapeutic in mouse models of cancer. *Cancer Cell* *24*, 213–228.
- Pauli, A., Norris, M.L., Valen, E., Chew, G.-L., Gagnon, J.A., Zimmerman, S., Mitchell, A., Ma, J., Dubrulle, J., Reyon, D., et al. (2014). Toddler: an embryonic signal that promotes cell movement via Apelin receptors. *Science* *343*, 1248636.
- Pchejetski, D., Foussal, C., Alfarano, C., Lairez, O., Calise, D., Guilbeau-Frugier, C., Schaak, S., Seguelas, M.-H., Wanecq, E., Valet, P., et al. (2012). Apelin prevents cardiac fibroblast activation and collagen production through inhibition of sphingosine kinase 1. *Eur. Heart J.* *33*, 2360–2369.
- Peng, D.-F., Kanai, Y., Sawada, M., Ushijima, S., Hiraoka, N., Kosuge, T., and Hirohashi, S. (2005). Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci.* *96*, 403–408.

- Philip, B., Roland, C.L., Daniluk, J., Liu, Y., Chatterjee, D., Gomez, S.B., Ji, B., Huang, H., Wang, H., Fleming, J.B., et al. (2013). A High-Fat Diet Activates Oncogenic Kras and COX2 to Induce Development of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma in Mice. *Gastroenterology* *145*, 1449–1458.
- Philip, P.A., Benedetti, J., Corless, C.L., Wong, R., O'Reilly, E.M., Flynn, P.J., Rowland, K.M., Atkins, J.N., Mirtsching, B.C., Rivkin, S.E., et al. (2010). Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *28*, 3605–3610.
- Piao, W., Wang, Y., Adachi, Y., Yamamoto, H., Li, R., Imsumran, A., Li, H., Maehata, T., Li, M., Arimura, Y., et al. (2008). Insulin-like growth factor-I receptor blockade by a specific tyrosine kinase inhibitor for human gastrointestinal carcinomas. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 1483–1493.
- Picault, F.-X., Chaves-Almagro, C., Projetti, F., Prats, H., Masri, B., and Audigier, Y. (2014). Tumour co-expression of apelin and its receptor is the basis of an autocrine loop involved in the growth of colon adenocarcinomas. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *50*, 663–674.
- Pinho, A.V., Chantrill, L., and Rooman, I. (2014). Chronic pancreatitis: a path to pancreatic cancer. *Cancer Lett.* *345*, 203–209.
- Pitkin, S.L., Maguire, J.J., Kuc, R.E., and Davenport, A.P. (2010). Modulation of the apelin/APJ system in heart failure and atherosclerosis in man. *Br. J. Pharmacol.* *160*, 1785–1795.
- Plentz, R., Park, J.-S., Rhim, A.D., Abravanel, D., Hezel, A.F., Sharma, S.V., Gurumurthy, S., Deshpande, V., Kenific, C., Settleman, J., et al. (2009). Inhibition of gamma-secretase activity inhibits tumor progression in a mouse model of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Gastroenterology* *136*, 1741–1749.e6.
- Pope, G.R., Roberts, E.M., Lolait, S.J., and O'Carroll, A.-M. (2012). Central and peripheral apelin receptor distribution in the mouse: Species differences with rat. *Peptides* *33*, 139–148.
- Pour, P.M., Weide, L., Liu, G., Kazakoff, K., Scheetz, M., Toshkov, I., Ikematsu, Y., Fienhold, M.A., and Sanger, W. (1997). Experimental evidence for the origin of ductal-type adenocarcinoma from the islets of Langerhans. *Am. J. Pathol.* *150*, 2167.
- Premont, R.T., and Gainetdinov, R.R. (2007). Physiological Roles of G Protein–Coupled Receptor Kinases and Arrestins. *Annu. Rev. Physiol.* *69*, 511–534.
- Principe, A., Melgar-Lesmes, P., Fernández-Varo, G., del Arbol, L.R., Ros, J., Morales-Ruiz, M., Bernardi, M., Arroyo, V., and Jiménez, W. (2008). The hepatic apelin system: A new therapeutic target for liver disease. *Hepatology* *48*, 1193–1201.
- Prossnitz, E.R. (2004). Novel roles for arrestins in the post-endocytic trafficking of G protein-coupled receptors. *Life Sci.* *75*, 893–899.
- Puffer, B.A., Sharron, M., Coughlan, C.M., Baribaud, F., McManus, C.M., Lee, B., David, J., Price, K., Horuk, R., Tsang, M., et al. (2000). Expression and Coreceptor Function of APJ for Primate Immunodeficiency Viruses. *Virology* *276*, 435–444.

- Qin, D., Zheng, X., and Jiang, Y. (2013). Apelin-13 induces proliferation, migration, and collagen I mRNA expression in human RPE cells via PI3K/Akt and MEK/Erk signaling pathways. *Mol. Vis.* *19*, 2227–2236.
- Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A., and Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* *83*, 993–1000.
- Raimondi, S., Lowenfels, A.B., Morselli-Labate, A.M., Maisonneuve, P., and Pezzilli, R. (2010). Pancreatic cancer in chronic pancreatitis; aetiology, incidence, and early detection. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *24*, 349–358.
- Rayasam, G.V., Tulasi, V.K., Sodhi, R., Davis, J.A., and Ray, A. (2009). Glycogen synthase kinase 3: more than a namesake. *Br. J. Pharmacol.* *156*, 885–898.
- Reaux, A., De Mota, N., Skultetyova, I., Lenkei, Z., Messari, S. El, Gallatz, K., Corvol, P., Palkovits, M., and Llorens-Cortès, C. (2001). Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *J. Neurochem.* *77*, 1085–1096.
- Reaux-Le Goazigo, A., Morinville, A., Bulet, A., Llorens-Cortés, C., and Beaudet, A. (2004). Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology* *145*, 4392–4400.
- Reichenbach, V., Ros, J., Fernández-Varo, G., Casals, G., Melgar-Lesmes, P., Campos, T., Makriyannis, A., Morales-Ruiz, M., and Jiménez, W. (2012). Prevention of Fibrosis Progression in CC14-Treated Rats: Role of the Hepatic Endocannabinoid and Apelin Systems. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* *340*, 629–637.
- Reichman-Fried, M., and Raz, E. (2014). Small proteins, big roles: The signaling protein Apela extends the complexity of developmental pathways in the early zebrafish embryo. *BioEssays* *36*, 741–745.
- Renehan, A.G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R.F., and Zwahlen, M. (2008). Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* *371*, 569–578.
- Ricard, N., Ciais, D., Levet, S., Subileau, M., Mallet, C., Zimmers, T.A., Lee, S.-J., Bidart, M., Feige, J.-J., and Bailly, S. (2012). BMP9 and BMP10 are critical for postnatal retinal vascular remodeling. *Blood* *119*, 6162–6171.
- Ringström, C., Nitert, M.D., Bennet, H., Fex, M., Valet, P., Rehfeld, J.F., Friis-Hansen, L., and Wierup, N. (2010). Apelin is a novel islet peptide. *Regul. Pept.* *162*, 44–51.
- Roberts, E.M., Newson, M.J.F., Pope, G.R., Landgraf, R., Lolait, S.J., and O'Carroll, A.-M. (2009). Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice. *J. Endocrinol.* *202*, 453–462.
- Rodal, S.K., Skretting, G., Garred, Ø., Vilhardt, F., van Deurs, B., and Sandvig, K. (1999). Extraction of Cholesterol with Methyl- β -Cyclodextrin Perturbs Formation of Clathrin-coated Endocytic Vesicles. *Mol. Biol. Cell* *10*, 961–974.

- Ronkainen, V.-P., Ronkainen, J.J., Hänninen, S.L., Leskinen, H., Ruas, J.L., Pereira, T., Poellinger, L., Vuolteenaho, O., and Tavi, P. (2007). Hypoxia inducible factor regulates the cardiac expression and secretion of apelin. *FASEB J.* *21*, 1821–1830.
- Rozenblum, E., Schutte, M., Goggins, M., Hahn, S.A., Panzer, S., Zahurak, M., Goodman, S.N., Sohn, T.A., Hruban, R.H., Yeo, C.J., et al. (1997). Tumor-suppressive Pathways in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.* *57*, 1731–1734.
- Rucki, A.A., and Zheng, L. (2014). Pancreatic cancer stroma: understanding biology leads to new therapeutic strategies. *World J. Gastroenterol.* *WJG 20*, 2237–2246.
- Ruggeri, B.A., Huang, L., Wood, M., Cheng, J.Q., and Testa, J.R. (1998). Amplification and overexpression of the AKT2 oncogene in a subset of human pancreatic ductal adenocarcinomas. *Mol. Carcinog.* *21*, 81–86.
- Saint-Geniez, M., Masri, B., Malecaze, F., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2002). Expression of the murine msr/apj receptor and its ligand apelin is upregulated during formation of the retinal vessels. *Mech. Dev.* *110*, 183–186.
- Sarzani, R., Forleo, C., Pietrucci, F., Capestro, A., Soura, E., Guida, P., Sorrentino, S., Iacoviello, M., Romito, R., Dessì-Fulgheri, P., et al. (2007). The 212A Variant of the APJ Receptor Gene for the Endogenous Inotrope Apelin is Associated With Slower Heart Failure Progression in Idiopathic Dilated Cardiomyopathy. *J. Card. Fail.* *13*, 521–529.
- Sato, N., Maitra, A., Fukushima, N., van Heek, N.T., Matsubayashi, H., Iacobuzio-Donahue, C.A., Rosty, C., and Goggins, M. (2003). Frequent Hypomethylation of Multiple Genes Overexpressed in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res.* *63*, 4158–4166.
- Sato, N., Fukushima, N., Hruban, R.H., and Goggins, M. (2008). CpG island methylation profile of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Mod. Pathol.* *21*, 238–244.
- Sawane, M., Kidoya, H., Muramatsu, F., Takakura, N., and Kajiya, K. (2011). Apelin attenuates UVB-induced edema and inflammation by promoting vessel function. *Am. J. Pathol.* *179*, 2691–2697.
- Sawane, M., Kajiya, K., Kidoya, H., Takagi, M., Muramatsu, F., and Takakura, N. (2013). Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes* *62*, 1970–1980.
- Schlieman, M.G., Fahy, B.N., Ramsamooj, R., Beckett, L., and Bold, R.J. (2003). Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer. *Br. J. Cancer* *89*, 2110–2115.
- Schmied, B.M., Ulrich, A.B., Friess, H., Büchler, M.W., and Pour, P.M. (2001). The patterns of extrainsular endocrine cells in pancreatic cancer. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* *21*, 69–81.
- Schneider, G., Krämer, O.H., Schmid, R.M., and Saur, D. (2011). Acetylation as a transcriptional control mechanism-HDACs and HATs in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Gastrointest. Cancer* *42*, 85–92.
- Schutte, M., Hruban, R.H., Geradts, J., Maynard, R., Hilgers, W., Rabindran, S.K., Moskaluk, C.A., Hahn, S.A., Schwarte-Waldhoff, I., Schmiegel, W., et al. (1997). Abrogation of the

Rb/p16 Tumor-suppressive Pathway in Virtually All Pancreatic Carcinomas. *Cancer Res.* 57, 3126–3130.

Scimia, M.C., Hurtado, C., Ray, S., Metzler, S., Wei, K., Wang, J., Woods, C.E., Purcell, N.H., Catalucci, D., Akasaka, T., et al. (2012). APJ acts as a dual receptor in cardiac hypertrophy. *Nature* 488, 394–398.

Scimia, M.C., Blass, B.E., and Koch, W.J. (2014). Apelin receptor: its responsiveness to stretch mechanisms and its potential for cardiovascular therapy. *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 12, 733–741.

Scott, I.C., Masri, B., D'Amico, L.A., Jin, S.-W., Jungblut, B., Wehman, A.M., Baier, H., Audigier, Y., and Stainier, D.Y.R. (2007). The G Protein-Coupled Receptor Agtr11b Regulates Early Development of Myocardial Progenitors. *Dev. Cell* 12, 403–413.

Seymour, P.A., Shih, H.P., Patel, N.A., Freude, K.K., Xie, R., Lim, C.J., and Sander, M. (2012). A Sox9/Fgf feed-forward loop maintains pancreatic organ identity. *Development* 139, 3363–3372.

Sheikh, A.Y., Chun, H.J., Glassford, A.J., Kundu, R.K., Kutschka, I., Ardigo, D., Hendry, S.L., Wagner, R.A., Chen, M.M., Ali, Z.A., et al. (2008). In vivo genetic profiling and cellular localization of apelin reveals a hypoxia-sensitive, endothelial-centered pathway activated in ischemic heart failure. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H88–H98.

Sheng, S.L., Liu, J.J., Dai, Y.H., Sun, X.G., Xiong, X.P., and Huang, G. (2012). Knockdown of lactate dehydrogenase A suppresses tumor growth and metastasis of human hepatocellular carcinoma. *FEBS J.* 279, 3898–3910.

Shenoy, S.K., and Lefkowitz, R.J. (2011). β -arrestin-mediated receptor trafficking and signal transduction. *Trends Pharmacol. Sci.* 32, 521–533.

Shih, H.P., Wang, A., and Sander, M. (2013). Pancreas organogenesis: from lineage determination to morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 29, 81–105.

Shin, K., Pandey, A., Liu, X.-Q., Anini, Y., and Rainey, J.K. (2013). Preferential apelin-13 production by the proprotein convertase PCSK3 is implicated in obesity. *FEBS Open Bio* 3, 328–333.

Shulman, G.I. (2000). Cellular mechanisms of insulin resistance. *J. Clin. Invest.* 106, 171–176.

Siddiquee, K., Hampton, J., McAnally, D., May, L., and Smith, L. (2013). The apelin receptor inhibits the angiotensin II type 1 receptor via allosteric trans-inhibition. *Br. J. Pharmacol.* 168, 1104–1117.

Simpkin, J.C., Yellon, D.M., Davidson, S.M., Lim, S.Y., Wynne, A.M., and Smith, C.C.T. (2007). Apelin-13 and apelin-36 exhibit direct cardioprotective activity against ischemia-reperfusion injury. *Basic Res. Cardiol.* 102, 518–528.

Slack, J.M. (1995). Developmental biology of the pancreas. *Development* 121, 1569–1580.

- Sommer, G., Dittmann, J., Kuehnert, J., Reumann, K., Schwartz, P.E., Will, H., Coulter, B.L., Smith, M.T., and Heise, T. (2011). The RNA-binding protein La contributes to cell proliferation and CCND1 expression. *Oncogene* 30, 434–444.
- Son, J., Lyssiotis, C.A., Ying, H., Wang, X., Hua, S., Ligorio, M., Perera, R.M., Ferrone, C.R., Mullarky, E., Shyh-Chang, N., et al. (2013). Glutamine supports pancreatic cancer growth through a KRAS-regulated metabolic pathway. *Nature* 496, 101–105.
- Sonmez, A., Celebi, G., Erdem, G., Tapan, S., Genc, H., Tasci, I., Ercin, C.N., Dogru, T., Kilic, S., Uckaya, G., et al. (2010). Plasma Apelin and ADMA Levels in Patients with Essential Hypertension. *Clin. Exp. Hypertens.* 32, 179–183.
- Sonveaux, P., Copetti, T., De Saedeleer, C.J., Végran, F., Verrax, J., Kennedy, K.M., Moon, E.J., Dhup, S., Danhier, P., Frérart, F., et al. (2012). Targeting the Lactate Transporter MCT1 in Endothelial Cells Inhibits Lactate-Induced HIF-1 Activation and Tumor Angiogenesis. *PLoS ONE* 7, e33418.
- Sörhede Winzell, M., Magnusson, C., and Ahrén, B. (2005). The apj receptor is expressed in pancreatic islets and its ligand, apelin, inhibits insulin secretion in mice. *Regul. Pept.* 131, 12–17.
- Soriguer, F., Garrido-Sanchez, L., Garcia-Serrano, S., Garcia-Almeida, J.M., Garcia-Arnes, J., Tinahones, F.J., and Garcia-Fuentes, E. (2009). Apelin levels are increased in morbidly obese subjects with type 2 diabetes mellitus. *Obes. Surg.* 19, 1574–1580.
- Sorli, S.C., van den Berghe, L., Masri, B., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2006). Therapeutic potential of interfering with apelin signalling. *Drug Discov. Today* 11, 1100–1106.
- Sorli, S.C., Gonidec, S.L., Knibiehler, B., and Audigier, Y. (2007). Apelin is a potent activator of tumour neoangiogenesis. *Oncogene* 26, 7692–7699.
- Sousa, C.M., and Kimmelman, A.C. (2014). The complex landscape of pancreatic cancer metabolism. *Carcinogenesis* 35, 1441–1450.
- Stanger, B.Z., Stiles, B., Lauwers, G.Y., Bardeesy, N., Mendoza, M., Wang, Y., Greenwood, A., Cheng, K., McLaughlin, M., Brown, D., et al. (2005). Pten constrains centroacinar cell expansion and malignant transformation in the pancreas. *Cancer Cell* 8, 185–195.
- Stoneley, M., Subkhankulova, T., Quesne, J.P.C.L., Coldwell, M.J., Jopling, C.L., Belsham, G.J., and Willis, A.E. (2000). Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Res.* 28, 687–694.
- Sun, T., Kong, X., Du, Y., and Li, Z. (2014). Aberrant MicroRNAs in Pancreatic Cancer: Researches and Clinical Implications. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2014, e386561.
- Sun, X., Iida, S., Yoshikawa, A., Senbonmatsu, R., Imanaka, K., Maruyama, K., Nishimura, S., Inagami, T., and Senbonmatsu, T. (2011). Non-activated APJ suppresses the angiotensin II type 1 receptor, whereas apelin-activated APJ acts conversely. *Hypertens. Res.* 34, 701–706.
- Sunter, D., Hewson, A.K., and Dickson, S.L. (2003). Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci. Lett.* 353, 1–4.

- Susaki, E., Wang, G., Cao, G., Wang, H.-Q., Englander, E.W., and Greeley, G.H. (2005). Apelin cells in the rat stomach. *Regul. Pept.* 129, 37–41.
- Szafranska, A.E., Davison, T.S., John, J., Cannon, T., Sipos, B., Maghnouj, A., Labourier, E., and Hahn, S.A. (2007). MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 26, 4442–4452.
- Szokodi, I., Tavi, P., Földes, G., Voutilainen-Myllylä, S., Ilves, M., Tokola, H., Pikkarainen, S., Piuholta, J., Rysä, J., Tóth, M., et al. (2002). Apelin, the Novel Endogenous Ligand of the Orphan Receptor APJ, Regulates Cardiac Contractility. *Circ. Res.* 91, 434–440.
- Taheri, S., Murphy, K., Cohen, M., Sujkovic, E., Kennedy, A., Dhillon, W., Dakin, C., Sajedi, A., Ghatei, M., and Bloom, S. (2002). The Effects of Centrally Administered Apelin-13 on Food Intake, Water Intake and Pituitary Hormone Release in Rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 291, 1208–1212.
- Tang, S.-Y., Xie, H., Yuan, L.-Q., Luo, X.-H., Huang, J., Cui, R.-R., Zhou, H.-D., Wu, X.-P., and Liao, E.-Y. (2007). Apelin stimulates proliferation and suppresses apoptosis of mouse osteoblastic cell line MC3T3-E1 via JNK and PI3-K/Akt signaling pathways. *Peptides* 28, 708–718.
- Tatemoto, K., Hosoya, M., Habata, Y., Fujii, R., Kakegawa, T., Zou, M.-X., Kawamata, Y., Fukusumi, S., Hinuma, S., Kitada, C., et al. (1998). Isolation and Characterization of a Novel Endogenous Peptide Ligand for the Human APJ Receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 471–476.
- Tatemoto, K., Takayama, K., Zou, M.X., Kumaki, I., Zhang, W., Kumano, K., and Fujimiya, M. (2001). The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul. Pept.* 99, 87–92.
- Than, A., Cheng, Y., Foh, L.-C., Leow, M.K.-S., Lim, S.C., Chuah, Y.J., Kang, Y., and Chen, P. (2012). Apelin inhibits adipogenesis and lipolysis through distinct molecular pathways. *Mol. Cell. Endocrinol.* 362, 227–241.
- Than, A., Zhang, X., Leow, M.K.-S., Poh, C.L., Chong, S.K., and Chen, P. (2014). Apelin Attenuates Oxidative Stress in Human Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 289, 3763–3774.
- Thayer, S.P., di Magliano, M.P., Heiser, P.W., Nielsen, C.M., Roberts, D.J., Lauwers, G.Y., Qi, Y.P., Gysin, S., Fernández-del Castillo, C., Yajnik, V., et al. (2003). Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature* 425, 851–856.
- del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J.S., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., Fukamizu, A., et al. (2010). Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* 116, 4025–4033.
- Torrisani, J., Bournet, B., Rieu, M.C. du, Bouisson, M., Souque, A., Escourrou, J., Buscail, L., and Cordelier, P. (2009). let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum. Gene Ther.* 20, 831–844.
- Trajkovic-Arsic, M., Kalideris, E., and Siveke, J.T. (2013). The role of insulin and IGF system in pancreatic cancer. *J. Mol. Endocrinol.* 50, R67–R74.

- Ueda, S., Ogata, S., Tsuda, H., Kawarabayashi, N., Kimura, M., Sugiura, Y., Tamai, S., Matsubara, O., Hatsuse, K., and Mochizuki, H. (2004). The correlation between cytoplasmic overexpression of epidermal growth factor receptor and tumor aggressiveness: poor prognosis in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma. *Pancreas* 29, e1–e8.
- Ueki, T., Toyota, M., Skinner, H., Walter, K.M., Yeo, C.J., Issa, J.-P.J., Hruban, R.H., and Goggins, M. (2001). Identification and Characterization of Differentially Methylated CpG Islands in Pancreatic Carcinoma. *Cancer Res.* 61, 8540–8546.
- Valle, A., Hoggard, N., Adams, A.C., Roca, P., and Speakman, J.R. (2008). Chronic central administration of apelin-13 over 10 days increases food intake, body weight, locomotor activity and body temperature in C57BL/6 mice. *J. Neuroendocrinol.* 20, 79–84.
- Vanhaesebroeck, B., Ali, K., Bilancio, A., Geering, B., and Foukas, L.C. (2005). Signalling by PI3K isoforms: insights from gene-targeted mice. *Trends Biochem. Sci.* 30, 194–204.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B. (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 329–341.
- Végran, F., Boidot, R., Michiels, C., Sonveaux, P., and Feron, O. (2011). Lactate Influx through the Endothelial Cell Monocarboxylate Transporter MCT1 Supports an NF- κ B/IL-8 Pathway that Drives Tumor Angiogenesis. *Cancer Res.* 71, 2550–2560.
- Vickers, C., Hales, P., Kaushik, V., Dick, L., Gavin, J., Tang, J., Godbout, K., Parsons, T., Baronas, E., Hsieh, F., et al. (2002). Hydrolysis of Biological Peptides by Human Angiotensin-converting Enzyme-related Carboxypeptidase. *J. Biol. Chem.* 277, 14838–14843.
- Vittet, D., and Feige, J.-J. (2007). [Lymphangiogenesis and tumor progression]. *Bull. Cancer (Paris)* 94, 881–886.
- Volkoff, H., and Wyatt, J.L. (2009). Apelin in goldfish (*Carassius auratus*): cloning, distribution and role in appetite regulation. *Peptides* 30, 1434–1440.
- Vongsuvan, R., George, J., Qiao, L., and van der Poorten, D. (2013). Visceral adiposity in gastrointestinal and hepatic carcinogenesis. *Cancer Lett.* 330, 1–10.
- Wang, P., and DeFea, K.A. (2006). Protease-activated receptor-2 simultaneously directs beta-arrestin-1-dependent inhibition and G α q-dependent activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Biochemistry (Mosc.)* 45, 9374–9385.
- Wang, G., Anini, Y., Wei, W., Qi, X., OCarroll, A.-M., Mochizuki, T., Wang, H.-Q., Hellmich, M.R., Englander, E.W., and Greeley, G.H. (2004). Apelin, a new enteric peptide: localization in the gastrointestinal tract, ontogeny, and stimulation of gastric cell proliferation and of cholecystokinin secretion. *Endocrinology* 145, 1342–1348.
- Wang, G., Qi, X., Wei, W., Englander, E.W., and Greeley, G.H. (2006). Characterization of the 5'-regulatory regions of the rat and human apelin genes and regulation of breast apelin by USF. *FASEB J.* 20, 2639–2641.

- Wang, G., Kundu, R., Han, S., Qi, X., Englander, E.W., Quertermous, T., and Greeley Jr., G.H. (2009). Ontogeny of apelin and its receptor in the rodent gastrointestinal tract. *Regul. Pept.* *158*, 32–39.
- Wang, Z., Yu, D., Wang, M., Wang, Q., Kouznetsova, J., Yang, R., Qian, K., Wu, W., Shuldiner, A., Sztalryd, C., et al. (2015). Elabela-Apelin Receptor Signaling Pathway is Functional in Mammalian Systems. *Sci. Rep.* *5*, 8170.
- Wei, L., Hou, X., and Tatemoto, K. (2005). Regulation of apelin mRNA expression by insulin and glucocorticoids in mouse 3T3-L1 adipocytes. *Regul. Pept.* *132*, 27–32.
- Wilentz, R.E., Jacobuzio-Donahue, C.A., Argani, P., McCarthy, D.M., Parsons, J.L., Yeo, C.J., Kern, S.E., and Hruban, R.H. (2000). Loss of Expression of Dpc4 in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: Evidence That DPC4 Inactivation Occurs Late in Neoplastic Progression. *Cancer Res.* *60*, 2002–2006.
- Wolfgang, C.L., Herman, J.M., Laheru, D.A., Klein, A.P., Erdek, M.A., Fishman, E.K., and Hruban, R.H. (2013). Recent progress in pancreatic cancer. *CA. Cancer J. Clin.* *63*, 318–348.
- Wörmann, S.M., and Algül, H. (2013). Risk factors and therapeutic targets in pancreatic cancer. *Gastrointest. Cancers* *3*, 282.
- Xie, H., Tang, S., Cui, R., Huang, J., Ren, X., Yuan, L., Lu, Y., Yang, M., Zhou, H., Wu, X., et al. (2006a). Apelin and its receptor are expressed in human osteoblasts. *Regul. Pept.* *134*, 118–125.
- Xie, H., Tang, S., Cui, R., Huang, J., Ren, X., Yuan, L., Lu, Y., Yang, M., Zhou, H., Wu, X., et al. (2006b). Apelin and its receptor are expressed in human osteoblasts. *Regul. Pept.* *134*, 118–125.
- Xie, H., Yuan, L.-Q., Luo, X.-H., Huang, J., Cui, R.-R., Guo, L.-J., Zhou, H.-D., Wu, X.-P., and Liao, E.-Y. (2007). Apelin suppresses apoptosis of human osteoblasts. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* *12*, 247–254.
- Xu, S., Tsao, P.S., and Yue, P. (2011). Apelin and insulin resistance: another arrow for the quiver? *J. Diabetes* *3*, 225–231.
- Yachida, S., Jones, S., Bozic, I., Antal, T., Leary, R., Fu, B., Kamiyama, M., Hruban, R.H., Eshleman, J.R., Nowak, M.A., et al. (2010). Distant metastasis occurs late during the genetic evolution of pancreatic cancer. *Nature* *467*, 1114–1117.
- Yamamoto, T., Habata, Y., Matsumoto, Y., Yasuhara, Y., Hashimoto, T., Hamajyo, H., Anayama, H., Fujii, R., Fuse, H., Shintani, Y., et al. (2011). Apelin-transgenic mice exhibit a resistance against diet-induced obesity by increasing vascular mass and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* *1810*, 853–862.
- Yang, Y., and Oliver, G. (2014). Development of the mammalian lymphatic vasculature. *J. Clin. Invest.* *124*, 888–897.
- Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J.M., Dell’Antonio, G., et al. (2011). Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth. *Genes Dev.* *25*, 717–729.

- Yang, X., Zhu, W., Zhang, P., Chen, K., Zhao, L., Li, J., Wei, M., and Liu, M. (2014). Apelin-13 stimulates angiogenesis by promoting cross-talk between AMP-activated protein kinase and Akt signaling in myocardial microvascular endothelial cells. *Mol. Med. Rep.* *9*, 1590–1596.
- Ying, H., Kimmelman, A.C., Lyssiotis, C.A., Hua, S., Chu, G.C., Fletcher-Sananikone, E., Locasale, J.W., Son, J., Zhang, H., Coloff, J.L., et al. (2012). Oncogenic Kras Maintains Pancreatic Tumors through Regulation of Anabolic Glucose Metabolism. *Cell* *149*, 656–670.
- Yue, P., Jin, H., Aillaud, M., Deng, A.C., Azuma, J., Asagami, T., Kundu, R.K., Reaven, G.M., Quertermous, T., and Tsao, P.S. (2010). Apelin is necessary for the maintenance of insulin sensitivity. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* *298*, E59–E67.
- Yue, P., Jin, H., Xu, S., Aillaud, M., Deng, A.C., Azuma, J., Kundu, R.K., Reaven, G.M., Quertermous, T., and Tsao, P.S. (2011). Apelin Decreases Lipolysis via G_q, G_i, and AMPK-Dependent Mechanisms. *Endocrinology* *152*, 59–68.
- Yun, J., Rago, C., Cheong, I., Pagliarini, R., Angenendt, P., Rajagopalan, H., Schmidt, K., Willson, J.K.V., Markowitz, S., Zhou, S., et al. (2009). Glucose deprivation contributes to the development of KRAS pathway mutations in tumor cells. *Science* *325*, 1555–1559.
- Zagon, I.S., Roesener, C.D., Verderame, M.F., Ohlsson-Wilhelm, B.M., Levin, R.J., and McLaughlin, P.J. (2000). Opioid growth factor regulates the cell cycle of human neoplasias. *Int. J. Oncol.* *17*, 1053–1061.
- Zamboni, G., Hirabayashi, K., Castelli, P., and Lennon, A.M. (2013). Precancerous lesions of the pancreas. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* *27*, 299–322.
- Zhang, R., Hu, C., Wang, C., Ma, X., Bao, Y., Xu, J., Lu, J., Qin, W., Xiang, K., and Jia, W. (2009). Association of apelin genetic variants with type 2 diabetes and related clinical features in Chinese Hans. *Chin. Med. J. (Engl.)* *122*, 1273–1276.
- Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W.G. (1998). ARF Promotes MDM2 Degradation and Stabilizes p53: ARF-INK4a Locus Deletion Impairs Both the Rb and p53 Tumor Suppression Pathways. *Cell* *92*, 725–734.
- Zhen, E.Y., Higgs, R.E., and Gutierrez, J.A. (2013). Pyroglutamyl apelin-13 identified as the major apelin isoform in human plasma. *Anal. Biochem.* *442*, 1–9.
- Zhong, H., Sanchez, C., Spitzner, D., Plambeck-Suess, S., Gibbs, J., Hawkins, W.G., Denardo, D., Gao, F., Pufahl, R.A., Lockhart, A.C., et al. (2013). Synergistic Effects of Concurrent Blockade of PI3K and MEK Pathways in Pancreatic Cancer Preclinical Models. *PLoS ONE* *8*, e77243.
- Zhou, L., Zhang, R., Yao, W., Wang, J., Qian, A., Qiao, M., Zhang, Y., and Yuan, Y. (2009). Decreased expression of angiotensin-converting enzyme 2 in pancreatic ductal adenocarcinoma is associated with tumor progression. *Tohoku J. Exp. Med.* *217*, 123–131.
- Zhou, N., Zhang, X., Fan, X., Argyris, E., Fang, J., Acheampong, E., DuBois, G.C., and Pomerantz, R.J. (2003a). The N-terminal domain of APJ, a CNS-based coreceptor for HIV-1, is essential for its receptor function and coreceptor activity. *Virology* *317*, 84–94.

Zhou, N., Fan, X., Mukhtar, M., Fang, J., Patel, C.A., DuBois, G.C., and Pomerantz, R.J. (2003b). Cell–cell fusion and internalization of the CNS-based, HIV-1 co-receptor, APJ. *Virology* 307, 22–36.

Zhou, N., Fang, J., Acheampong, E., Mukhtar, M., and Pomerantz, R.J. (2003c). Binding of ALX40-4C to APJ, a CNS-based receptor, inhibits its utilization as a co-receptor by HIV-1. *Virology* 312, 196–203.

Zhou, W., Capello, M., Fredolini, C., Racanicchi, L., Piemonti, L., Liotta, L.A., Novelli, F., and Petricoin, E.F. (2012). Proteomic analysis reveals Warburg effect and anomalous metabolism of glutamine in pancreatic cancer cells. *J. Proteome Res.* 11, 554–563.

Zhou, Y., Wang, Y., and Qiao, S. (2014). Apelin: a potential marker of coronary artery stenosis and atherosclerotic plaque stability in ACS patients. *Int. Heart. J.* 55, 204–212.

Zhu, S., Sun, F., Li, W., Cao, Y., Wang, C., Wang, Y., Liang, D., Zhang, R., Zhang, S., Wang, H., et al. (2011). Apelin stimulates glucose uptake through the PI3K/Akt pathway and improves insulin resistance in 3T3-L1 adipocytes. *Mol. Cell. Biochem.* 353, 305–313.

Zhu, S., Cheng, G., Zhu, H., and Guan, G. (2015). A study of genes involved in adipocyte differentiation. *J. Pediatr. Endocrinol. Metab. JPEM* 28, 93–99.

