



# Développement d'une thérapie anti-angiogène et anti-tumorale utilisant les propriétés de la protéine à doigts de zinc TIS11b

Séverine Planel

► **To cite this version:**

Séverine Planel. Développement d'une thérapie anti-angiogène et anti-tumorale utilisant les propriétés de la protéine à doigts de zinc TIS11b. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2008. Français. <tel-00341228>

**HAL Id: tel-00341228**

**<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00341228>**

Submitted on 24 Nov 2008

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER  
(GRENOBLE I)

THESE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Discipline : Biologie

Présentée et soutenue publiquement  
Par

Séverine PLANEL

Le 17 novembre 2008

Développement d'une thérapie anti-angiogène et anti-tumorale utilisant les propriétés de la protéine à doigts de zinc TIS11b

Thèse dirigée par Jean-Jacques FEIGE et Nadia CHERRADI

MEMBRES DU JURY

Dr. G. PAGES  
Dr. P. JALINOT  
Pr. J.Y. BLAY  
Dr. J.L. COLL  
Dr. J.J. FEIGE  
Dr. N. CHERRADI

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Examineur  
Directeur de thèse  
Co-Directrice de thèse



Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse : Gilles Pagès, Pierre Jalinot, Jean-Yves Blay et Jean-Luc Coll d'avoir accepté de juger mon travail.

Je souhaite également remercier Jean-Jacques Feige pour avoir dirigé cette thèse. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée et tous les efforts et démarches que tu as faits pour que je puisse travailler et rester dans ton labo. Je te remercie aussi pour ta disponibilité et ton ouverture d'esprit.

Un grand merci à Nadia Cherradi pour avoir co-encadré cette thèse. Merci infiniment pour la confiance que tu m'as témoigné en me laissant beaucoup d'autonomie tout en étant présente pour m'aiguiller quand j'en avais besoin. Je te remercie également pour tous tes précieux conseils, et pour tout ce qu'on a partagé en dehors de la science !

Je souhaite remercier Delphine Ciais pour avoir initié ce travail, ainsi que pour toutes nos discussions et pour m'avoir remonté le moral face aux difficultés de travailler sur TIS11b (enfin quelqu'un qui me comprend !). Je te souhaite de réussir dans ton entreprise et salue ton immense courage à continuer à travailler sur cette 🧬🧪🧬 protéine : ah ! TIS11b quand tu nous tiens !!

Merci à Mickael Thomas et Maryline Herbet pour leur aide dans les expériences in vivo et l'IHC, ainsi que pour toutes les discussions parfois un peu animées...

Merci à Fred et Nico, les animaliers, pour leur aide et leur perpétuelle bonne humeur (si, si, quand ils râlent c'est qu'ils sont de bonne humeur !)

Merci à tous les membres de l'unité EMI0105/U878 pour leur présence au quotidien, et plus particulièrement à Tania et Marianna (nos soleils brésiliens) et à Michelle (notre maman du labo).

Un grand merci à mes colloques de bureau pour m'avoir supportée toute la journée (et ce n'est pas peu dire !!) : Loulou (il fait rien que m'embêter quand je travaille), Mamyline (ma moitié, enfin mon quart depuis qu'elle a un chéri), Marie Bidart (elle est chouette elle m'amène des goûters quand je répète !), Caliméro et Priscilla (bon d'accord ils sont un peu malades !).

Merci à mon pôpô et ma môman pour leur soutien : si, si, je vous jure c'est bien fini !! Bon, j'ai pas encore tout à fait un travail mais c'est plutôt grand chez vous non ?

Et puis merci à toutes les personnes qui ont été là ces quelques années à Grenoble pour partager des moments et quelques bières : Moul et Caro (qui a vaillamment affronté la soutenance de thèse avant nous et nous a montré le chemin : tu es notre héroïne !), K et Fab, Max et Tany, Mélanie et Marie, Flo, Jojo et Bertrand, Yannick et Pierre, Sophie et Capucine, Fophie et Flavy in the sky, Peggy et Alex, Alex (B), Ben, Sandrine, Jessica...



|  |   |
|--|---|
| Liste des schémas et des figures ..... | 7 |
|--|---|

|                              |   |
|------------------------------|---|
| Liste des abréviations ..... | 9 |
|------------------------------|---|

|                    |    |
|--------------------|----|
| INTRODUCTION ..... | 13 |
|--------------------|----|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. L'Angiogenèse.....</b>   | <b>17</b> |
| <b>1.1. Le réseau vasculaire .....</b>   | <b>17</b> |
| 1.1.1. Structure des vaisseaux sanguins.....                                       | 17        |
| 1.1.2. La vasculogenèse.....   | 19        |
| 1.1.3. L'angiogenèse .....   | 21        |
| 1.1.4. La lymphangiogenèse .....   | 23        |
| <b>1.2. L'angiogenèse tumorale .....</b>   | <b>25</b> |
| 1.2.1. Structure des vaisseaux tumoraux.....                                       | 27        |
| 1.2.2. Switch angiogénique .....   | 31        |
| 1.2.3. Tumeur et environnement tumoral .....                                       | 33        |
| <b>Conclusion .....</b>  | <b>34</b> |
| <br>   |           |
| <b>2. Le VEGF-A.....</b>   | <b>39</b> |
| <b>2.1. Rôle du VEGF.....</b>  | <b>39</b> |
| 2.1.1. Les différents types de VEGF et leurs récepteurs .....                      | 39        |
| 2.1.2. Le VEGF-A .....   | 41        |
| 2.1.2.1. Les isoformes xxx du VEGF-A.....  | 41        |
| 2.1.2.2. Les isoformes xxxb .....  | 43        |
| 2.1.3. Les récepteurs du VEGF .....  | 44        |
| 2.1.4. Les effets du VEGF .....  | 45        |
| 2.1.4.1. Effets paracrines .....   | 46        |
| 2.1.4.1.1. Effets sur les cellules endothéliales.....                              | 46        |
| 2.1.4.1.2. Effets sur les autres types cellulaires .....                           | 47        |
| 2.1.4.2. Effets autocrines .....   | 48        |
| 2.1.5. VEGF et angiogenèse tumorale .....  | 48        |
| <b>2.2. Régulation de l'expression du VEGF .....</b>                               | <b>51</b> |
| 2.2.1. Régulation de la transcription.....   | 51        |
| 2.2.2. Régulations post-transcriptionnelles .....                                  | 53        |
| 2.2.2.1. Régulation de la stabilité de l'ARNm.....                                 | 53        |
| 2.2.2.1.1. Les protéines stabilisatrices et déstabilisatrices .....                | 53        |
| 2.2.2.1.2. Les séquences ARE et la région 3'-UTR de l'ARNm du VEGF.....            | 55        |
| 2.2.2.2. Régulation de la traduction .....   | 57        |
| <b>2.3. Thérapies anti-angiogènes et VEGF .....</b>                                | <b>57</b> |
| 2.3.1. Les différentes thérapies ciblant le VEGF et leurs effets secondaires.....  | 59        |
| 2.3.2. Les résistances aux traitements anti-angiogènes .....                       | 61        |
| <b>Conclusion .....</b>  | <b>65</b> |
| <br>   |           |
| <b>3. Les protéines de la famille TIS11 et la protéine TIS11b .....</b>            | <b>69</b> |
| <b>3.1. Les protéines de la famille TIS11 .....</b>                                | <b>69</b> |
| 3.1.1. TTP .....   | 69        |
| 3.1.2. TIS11b .....  | 72        |
| 3.1.3. TIS11d.....   | 73        |
| <b>3.2. Expression des protéines TIS11 .....</b>                                   | <b>74</b> |
| 3.2.1. Expression physiologique.....   | 75        |
| 3.2.2. Expression dans des tumeurs ou lignées tumorales.....                       | 75        |
| <b>3.3. Mécanismes de déstabilisation des ARNm .....</b>                           | <b>75</b> |
| 3.3.1. Les éléments ARE.....   | 75        |
| 3.3.2. Mécanismes moléculaires de déstabilisation et de dégradation des ARNm ..... | 78        |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| 3.4.      | <b>Domaines actifs et troncations des protéines TIS11</b> .....            | <b>83</b>  |
| 3.5.      | <b>Régulation de l'activité déstabilisatrice des protéines TIS11</b> ..... | <b>84</b>  |
| 3.5.1.    | Autorégulation de l'expression de l'ARNm des protéines TIS11 .....         | 85         |
| 3.5.2.    | Régulation par phosphorylation.....  | 86         |
|           | <b>Conclusion</b> .....  | <b>89</b>  |
| <b>4.</b> | <b>Les PTD</b> .....   | <b>93</b>  |
| 4.1.      | Origine et principe .....  | 93         |
| 4.2.      | Mécanismes de l'internalisation .....                                      | 95         |
| 4.3.      | Vectorisation de molécule et toxicité .....                                | 100        |
|           | <b>Conclusion</b> .....  | <b>104</b> |

## RESULTATS ..... 107

|                        |  |            |
|------------------------|--|------------|
| <b>1<sup>ère</sup></b> | <b>Partie : Adressage intracellulaire de TIS11b et déstabilisation de l'ARNm du VEGF</b> .....   | <b>111</b> |
| 1.                     | <b>Introduction</b> .....  | <b>113</b> |
| 2.                     | <b>Article : "Protein Transduction Domain-mediated intracellular delivery of the TTP family member TIS11b/BRF1 downregulates VEGF expression in vitro and in vivo"</b> ..... | <b>117</b> |
| 3.                     | <b>Résumé des résultats et discussion</b> .....  | <b>159</b> |
| 3.1.                   | Construction des protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b et évaluation de leur activité déstabilisatrice .....   | 159        |
| 3.2.                   | Activité déstabilisatrice de TIS11b et des protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b sur l'ARNm du VEGF endogène .....   | 160        |
| 3.3.                   | Production et purification des protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b .....   | 162        |
| 3.4.                   | Internalisation des protéines de fusion Flag-TIS11b et Flag-PTD-TIS11b .....   | 163        |
| 3.5.                   | Activité des protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b purifiées sur la stabilité de l'ARNm du VEGF et la production de la protéine VEGF .....                                     | 164        |
| 3.6.                   | Effet des protéines de fusion Flag-R7- ou Flag-R9-TIS11b sur l'expression du VEGF dans la glande corticosurrénalienne .....  | 165        |
|                        | <b>Conclusion</b> .....  | <b>166</b> |
| <b>2<sup>ème</sup></b> | <b>Partie : Effet de TIS11b sur la croissance tumorale</b> .....   | <b>169</b> |
| 1.                     | <b>Introduction</b> .....  | <b>171</b> |
| 2.                     | <b>Résultats et discussion</b> .....   | <b>171</b> |
| 2.1.                   | Effet de TIS11b sur la stabilité de l'ARNm du VEGF dans les cellules LL2.....  | 171        |
| 2.2.                   | Prolifération des cellules LL2 et LL2-TIS11b in vitro.....   | 173        |
| 2.3.                   | Croissance tumorale des cellules LL2 et LL2-TIS11b chez la souris nude .....   | 174        |
|                        | <b>Conclusion</b> .....  | <b>176</b> |
| 2.4.                   | Effet de l'injection de protéines Flag-PTD-TIS11b sur la croissance tumorale de tumeurs pré-établies. ....   | 176        |
|                        | <b>Conclusion</b> .....  | <b>180</b> |
| 3.                     | <b>Matériel et méthodes</b> .....  | <b>181</b> |
| 3.1.                   | Co-transfection et mesure de l'activité « Dual Luciferase » .....  | 181        |
| 3.2.                   | Construction des plasmides rétroviraux .....   | 182        |
| 3.3.                   | Transfection des plasmides rétroviraux dans les cellules LL2.....  | 182        |
| 3.4.                   | Tests de prolifération des cellules .....  | 182        |
| 3.5.                   | Transplantation des cellules par voie sous-cutanée .....   | 182        |
| 3.6.                   | Injection des protéines Flag-R7- ou Flag-R9-TIS11b dans les tumeurs pré-établies   | 183        |
| 3.7.                   | Purification des ARNm et Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) semi quantitative .....  | 183        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>3<sup>ème</sup> Partie : Phosphorylation de TIS11b par la protéine kinase A (PKA) .....</b>                                       | <b>185</b> |
| <b>1. Introduction.....</b>  | <b>187</b> |
| <b>2. Résultats et discussion .....</b>  | <b>189</b> |
| 2.1. Phosphorylation de TIS11b dans les cellules BAC en culture en réponse à l'ACTH  | 189        |
| 2.2. Phosphorylation de TIS11b par la PKA in vitro .....   | 190        |
| 2.3. Identification des sites potentiels de phosphorylation par la PKA in silico.....  | 190        |
| 2.4. Phosphorylation in vitro des protéines TIS11b mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A par la PKA.....                                  | 191        |
| 2.5. Détermination du site de phosphorylation par la réalisation d'une carte peptidique.   | 192        |
| 2.6. Effet des protéines TIS11b tronquées sur la stabilité de l'ARNm du VEGF .....   | 194        |
| 2.6.1. Construction des protéines TIS11b tronquées .....   | 194        |
| 2.6.2. Effet des protéines TIS11b tronquées sur la stabilité de l'ARNm du VEGF .....   | 195        |
| 2.7. Effet des protéines mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A sur la stabilité de l'ARNm du VEGF dans les cellules COS7 en culture ..... | 198        |
| 2.8. Effet des protéines mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A sur la stabilité de l'ARNm du VEGF dans les cellules BAC en culture .....  | 199        |
| <b>Conclusion .....</b>  | <b>201</b> |
| <b>3. Matériel et méthodes.....</b>  | <b>201</b> |
| 3.1. Phosphorylation de TIS11b dans les cellules BAC en culture en réponse à l'ACTH  | 201        |
| 3.2. Phosphorylation de TIS11b par la PKA in vitro à partir d'extrait bactérien .....  | 202        |
| 3.3. Phosphorylation des peptides par la PKA in vitro. ....  | 202        |
| 3.4. Construction des plasmides. ....  | 202        |
| 3.5. Synthèse et purification des protéines TIS11b sauvage ou mutées. ....   | 203        |
| 3.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide .....  | 203        |
| 3.7. Co-transfection et mesure de l'activité « Dual Luciferase » .....   | 204        |
| 3.8. Purification des ARNm et Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) semi quantitative .....                       | 204        |
| 3.9. Western blot .....  | 205        |
| <br>   |            |
| <b>4<sup>ème</sup> Partie : Effet de la protéine tronquée TIS11b-ZnC, fusionnée à l'Opicalcine, sur l'ARNm du VEGF .....</b>         | <b>207</b> |
| <b>1. Introduction.....</b>  | <b>209</b> |
| <b>2. Résultats et discussion .....</b>  | <b>210</b> |
| 2.1. Construction de la protéine de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ.....  | 210        |
| 2.2. Effet de TIS11b-ZnC-OCaQ sur la stabilité de l'ARNm Luc-3'UTR du VEGF .....   | 211        |
| 2.3. Effet de TIS11b-ZnC-OCaQ purifiée sur l'ARNm du VEGF endogène.....  | 212        |
| 2.4. Effet de TIS11b-ZnC-OCaQ purifiée sur l'expression de la protéine VEGF endogène. .  | 213        |
| 2.5. Effet de TIS11b-ZnC-OCaQ sur l'expression du VEGF dans la glande corticosurrénale de souris.....                                | 214        |
| <b>Conclusion. ....</b>  | <b>214</b> |
| <b>3. Matériel et méthodes.....</b>  | <b>215</b> |
| 3.1. Mutation de l'OCa en OCaQ .....   | 215        |
| 3.2. Construction de TIS11b-ZnC-OCaQ .....   | 215        |

|   |     |
|---|-----|
| DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES..... | 217 |
|---|-----|

|                    |     |
|--------------------|-----|
| BIBLIOGRAPHIE..... | 225 |
|--------------------|-----|



# Liste des schémas et des figures

## INTRODUCTION

|  |     |
|--|-----|
| <b>Schéma 1</b> : Structure des vaisseaux sanguins.....  | 18  |
| <b>Schéma 2</b> : Différenciation de l'endothélium. ....   | 18  |
| <b>Schéma 3</b> : La vasculogenèse. ....   | 20  |
| <b>Schéma 4</b> : Le réseau vasculaire est un circuit fermé. ....  | 20  |
| <b>Schéma 5</b> : Les mécanismes d'angiogenèse.....  | 20  |
| <b>Schéma 6</b> : Structure des vaisseaux lymphatiques.....  | 22  |
| <b>Schéma 7</b> : Echange entre les réseaux sanguin et lymphatique. ....   | 24  |
| <b>Schéma 8</b> : Le réseau lymphatique.....   | 24  |
| <b>Schéma 9</b> : Les différents mécanismes de vascularisation tumorale. ....  | 26  |
| <b>Schéma 10</b> : Les vaisseaux tumoraux sont anormaux. ....  | 28  |
| <b>Schéma 11</b> : Rôle de la normalisation des vaisseaux tumoraux en réponse à une thérapie anti-angiogène. ....              | 30  |
| <b>Schéma 12</b> : Les membres de la famille VEGF et leur récepteurs.....  | 38  |
| <b>Schéma 13</b> : Les différentes isoformes du VEGF. ....   | 40  |
| <b>Schéma 14</b> : Induction de l'expression du VEGF par l'hypoxie. ....   | 50  |
| <b>Schéma 15</b> : Séquences riches en AU de la région 3'UTR de l'ARNm du VEGF.....  | 55  |
| <b>Schéma 16</b> : La traduction alternative de l'ARNm du VEGF.....  | 56  |
| <b>Schéma 17</b> : Exemple de stratégies anti-angiogènes dirigées contre le VEGF ou ses récepteurs.....                        | 58  |
| <b>Schéma 18</b> : Exemples d'agents anti-angiogènes en développement clinique. ....   | 60  |
| <b>Schéma 19</b> : Exemples de résistances aux traitements anti-VEGF ou anti-angiogènes.....                                   | 62  |
| <b>Schéma 20</b> : Alignement des séquences des protéines de la famille TIS11.....   | 68  |
| <b>Schéma 21</b> : Alignement des séquences des protéines de la famille TIS11 de différentes espèces...70                      | 70  |
| <b>Schéma 22</b> : Structure et séquence des deux doigts de zinc. ....   | 70  |
| <b>Schéma 23</b> : Classification des séquences ARE selon Chen et coll. ....   | 76  |
| <b>Schéma 24</b> : Classification des séquences ARE selon Wilusz et coll. ....   | 76  |
| <b>Schéma 25</b> : Interaction des protéines TIS11 avec les enzymes de la machinerie de dégradation des ARNm. ....             | 80  |
| <b>Schéma 26</b> : Homologie des régions N-Terminale et C-terminale des trois membres de la famille TIS11 . ....               | 83  |
| <b>Schéma 27</b> : La région 3'UTR de TTP et ses séquences ARE. ....   | 85  |
| <b>Schéma 28</b> : Les différentes voies d'endocytose. ....  | 96  |
| <b>Schéma 29</b> : Les différentes hypothèses de mécanismes d'internalisation. ....  | 98  |
| <b>Schéma 30</b> : Ciblage des tumeurs via l'utilisation d'un polyanion couplé à un site de clivage des métalloprotéases. .... | 102 |
| <b>Schéma 31</b> : Ciblage des tumeurs via le pH. ....   | 102 |

## RESULTAT

|   |                    |
|---|--------------------|
| <b>Figure 1 à 6</b> : cf article.....   | <b>p.151 à 156</b> |
| <b>Figure 7</b> : TIS11b diminue le taux d'ARNm du VEGF endogène.....   | 160                |
| <b>Figure 8</b> : TIS11b diminue l'activité luciférase via le transcrit Luc-3'UTR dans des cellules LL2.....  | 172                |
| <b>Figure 9</b> : Les cellules LL2 et LL2-TIS11b prolifèrent de manière identique en culture. ....  | 173                |
| <b>Figure 10</b> : TIS11b ralentit la croissance tumorale des cellules LL2. ....  | 174                |
| <b>Figure 11</b> : Les tumeurs LL2-TIS11b croissent moins vite que les tumeurs LL2, néanmoins, les résultats sont moins marqués que précédemment. ....  | 175                |
| <b>Figure 12</b> : L'injection de 100 nM de protéine R7-TIS11b dans une tumeur pré-établie induit une diminution de l'expression de l'ARNm du VEGF. ....  | 177                |
| <b>Figure 13</b> : L'injection de protéine purifiée Flag-R9-TIS11b à 75 nM toutes les 48 h ou 50 nM toutes les 24 h, dans des tumeurs pré-établies ralentit la croissance tumorale. ....  | 179                |
| <b>Figure 14</b> : Phosphorylation de TIS11b dans les cellules BAC en culture en réponse à l'ACTH.....  | 189                |
| <b>Figure 15</b> : Phosphorylation de TIS11b par la PKA in vitro.....   | 190                |
| <b>Figure 16</b> : Détermination des sites potentiels de phosphorylation de TIS11b par la PKA par analyse bio-informatique utilisant le moteur NetPhosK 1.0 ( <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/">http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/</a> ). .... | 191                |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figure 17</b> : Phosphorylation in vitro des protéines TIS11b mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A par la PKA. ....  | 192 |
| <b>Figure 18</b> : Phosphorylation in vitro des peptides N-Ter et C-Ter par la PKA.....   | 193 |
| <b>Figure 19</b> : Séquence de la protéine TIS11b et construction des protéines TIS11b tronquées. ....  | 194 |
| <b>Figure 20</b> : TIS11b totale diminue l'activité luciférase de manière plus importante que les protéines tronquées.....  | 195 |
| <b>Figure 21</b> : L'expression des protéines TIS11b totale ou tronquées est dépendante de la dose de plasmide transfectée et identique quelle que soit la construction.....          | 196 |
| <b>Figure 22</b> : Mise en évidence d'une surexpression dose-dépendante de TIS11b totale et de TIS11b-ZnC par Western blot.....   | 197 |
| <b>Figure 23</b> : Activité déstabilisatrice des protéines TIS11b mutées TIS11b-54A et TIS11-334A dans les cellules COS7. ....  | 198 |
| <b>Figure 24</b> : Effet des protéines mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A sur la stabilité de l'ARNm du VEGF dans les cellules BAC en réponse à l'ACTH. ....                            | 199 |
| <b>Figure 25</b> : Construction de la protéine de fusion Flag-TIS11b-ZnC-OCaQ. ....   | 210 |
| <b>Figure 26</b> : La protéine de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ diminue l'activité luciférase de manière dose-dépendante, et est plus efficace que la protéine TIS11b-ZnC. ....              | 211 |
| <b>Figure 27</b> : La protéine tronquée de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ induit une diminution du taux d'ARNm du VEGF plus marquée que les protéines de fusion comportant TIS11b totale..... | 212 |
| <b>Figure 28</b> : La protéine de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ induit une diminution de la protéine VEGF dans le milieu de culture. ....  | 213 |
| <b>Figure 29</b> : L'injection de la protéine de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ dans la glande surrénale induit une diminution de l'expression du VEGF après 24 h. ....                       | 214 |

## Liste des abréviations

|  |  |
|--|--|
| A : adénine  | OCa : Opicalcine   |
| AA : acide aminé   | OCaQ : Opicalcine mutée 24 R→Q                             |
| ACTH : Adreno Cortico Tropic Hormone                         | PAI2 : plasminogen activator inhibitor 2                   |
| ADN : acide désoxyribonucléique                              | PARN : poly(A)-specific ribonuclease                       |
| ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire              | P-bodies : processing bodies                               |
| Ang-1 : angiopoïétine 1                                      | PDGF : platelet-derived growth factor                      |
| Ang-2 : angiopoïétine 2                                      | PECAM : platelet-endothelial cell adhesion molecule        |
| Antp : antennapedia  | PHD : prolyl-hydroxylases                                  |
| ARE : AU rich element  | PI3K : phosphatidylinositol 3'-kinase                      |
| ARED : AU-rich elements (AREs) containing mRNA database      | PKA : protéine kinase A                                    |
| ARN : acide ribonucléique                                    | PKB : protéine kinase B                                    |
| ARNm : acide ribonucléique messenger                         | PKC : protéine kinase C                                    |
| ARNt : acide ribonucléique de transfert                      | PLC $\gamma$ : phospholipase C $\gamma$                    |
| BAC : bovin adrenal cell                                     | PIGF : placental growth factor                             |
| Berg36 : B-cell early response gene encoding a 36-kD protein | PP2A : protein phosphatase 2A                              |
| bFGF : basic fibroblast growth factor = FGF-2                | PTD : protein transduction domain                          |
| BRF1 : butyrate response factor 1                            | RGD : Arginine-Glycine-acide aspartique                    |
| C : cytosine   | RRM : RNA recognition motif                                |
| CHIP : chromatin immunoprecipitation                         | SDF-1 : stromal cell-derived factor -1                     |
| COX-2 : cyclooxygenase-2                                     | siRNA : small interference RNA                             |
| CPP : cell-penetrating peptides                              | shRNA : short hairpin RNA                                  |
| CTP : cell-targeting peptides                                | S-S : pont dissulfure                                      |
| DRB : 5,6-Dichloro- $\beta$ -D ribofuranosyl benzimidazole   | T : thymidine  |
| ELAV : Embryonic Lethal Abnormal Vision                      | TGF- $\beta$ 1 : transforming growth factor beta 1         |
| ERF1 : Epidermal Growth Factor-response factor 1             | TSP1 ou 2 : thrombospondine 1 ou 2                         |
| FDA : Food and Drug Administration                           | TIS11 : Tetra-décanoyl Phorbol Acetate-induced-sequence 11 |
| FGF-2 : Fibroblast Growth Factor-2 = bFGF                    | TNF-alpha : tumor necrosis factor-alpha                    |
| Flk-1 : fetal liver kinase 1                                 | TTP : tristétraproline                                     |
| Flt-1 : Fms-like tyrosine kinase 1                           | TTP-/- : souris ou cellule invalidée pour le gène TTP      |
| G : guanine  | U : uracile  |
| GM-CSF : granulocytes-macrophage colony stimulating factor   | (3')UTR : 3' untranslated region                           |
| GOS24 : G0/G1 switch regulatory gene 24                      | R : arginine   |
| GSK3b : glycogen synthase kinase-3b                          | RGD : arginine-glycine acide aspartique                    |
| HGF : hepatic growth factor                                  | SG : stress granule  |
| HIF : hypoxia-inducible transcription factor                 | VE-cadhérine : vascular endothelial cadhérine              |
| hnRNP D : heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D          | VEGF : vascular endothelial growth factor                  |
| HRE : hypoxia response element                               | VEGFR-1 : VEGF receptor 1                                  |
| IFN-gamma : interféron-gamma                                 | VEGFR-2 : VEGF receptor 2                                  |
| IL : interleukine  | VEGFR-3 : VEGF receptor 3                                  |
| iNOS : inducible NO synthase                                 | VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine – 1            |
| IPTG : isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside                | VHL : Von Hippel Lindau                                    |
| IRES : Internal Ribosomal Entry Site                         | VPF : vascular permeability factor                         |
| JNK : c-jun-N-terminal kinase                                | ZFP36 : zinc finger protein 36 – like 1                    |
| kb : kilo-base   | ZFP36L1 : zinc finger protein 36 – like 2                  |
| KDR : kinase-insert domain-containing receptor               | ZFP36L2 : zinc finger protein 36                           |
| KO : knock-out   | Zn 2+ : ion zinc   |
| LLC : Lewis lung carcinoma                                   |  |
| LL2 : Lewis lung carcinoma (dérivées des cellules LLC)       |  |
| LPS : lipopolysaccharides                                    |  |
| L-VEGF : large VEGF  |  |
| MAPK : mitogen-activated protein kinase                      |  |
| MiR : microRNA   |  |
| MK2 : MAPK-activated kinase 2                                |  |
| MK2-/- : souris ou cellule invalidée pour le gène MK2        |  |
| NOS : nitric oxide synthase                                  |  |
| Nrp1 ou 2 : neuropilin receptors 1 ou 2                      |  |
| NUP475 : nuclear protein 475                                 |  |







# **INTRODUCTION**



1<sup>ère</sup> Partie :  
L'Angiogenèse



# 1. L'Angiogenèse

Les vaisseaux sanguins sont apparus au cours de l'évolution afin d'approvisionner les organes en oxygène. Chacune des cellules de l'organisme doit être à proximité d'un vaisseau sanguin car la limite de diffusion de l'oxygène, dans un tissu, est de 200  $\mu\text{m}$  (Folkman, 1972). Un réseau complexe de vaisseaux sanguins se développe donc dans l'embryon et irrigue toutes les cellules d'un organisme. Ce réseau vasculaire est formé par deux processus : la vasculogenèse et l'angiogenèse. La vasculogenèse consiste en la formation du réseau vasculaire primitif dans l'embryon, à partir de cellules hémangioblastiques. L'angiogenèse consiste en la formation de néovaisseaux, à partir des vaisseaux préexistants. Elle correspond à l'extension du réseau vasculaire. Le réseau de vaisseaux sanguins est complété par un deuxième réseau de vaisseaux, le réseau lymphatique. On parle alors de lymphangiogenèse. Ces deux réseaux peuvent être impliqués dans de nombreuses pathologies, et notamment dans le cancer (Alitalo *et coll.*, 2005; Ferrara, 2005). En effet, l'angiogenèse et la lymphangiogenèse tumorales ont un rôle prépondérant dans le développement des tumeurs, leur dissémination sous forme de métastases, et parfois même leur résistance à certains traitements, ces réseaux de vaisseaux tumoraux sanguins et lymphatiques étant anormaux.

## 1.1. Le réseau vasculaire

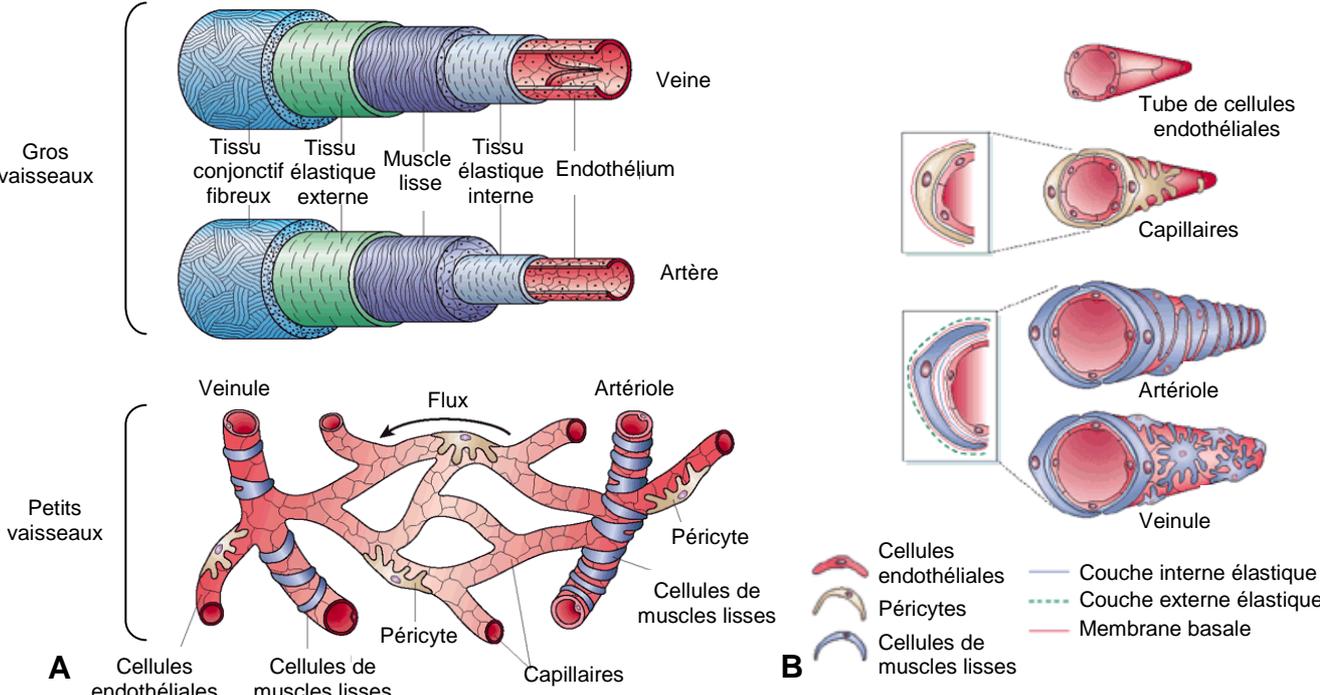
### 1.1.1. Structure des vaisseaux sanguins

Le réseau vasculaire est composé de trois types de vaisseaux sanguins : les artères, les veines et les capillaires (Cleaver et Melton, 2003; Jain, 2003).

Les artères et les veines sont composées de trois tuniques de la lumière vers la périphérie : l'intima, la média et l'adventice (schéma 1A).

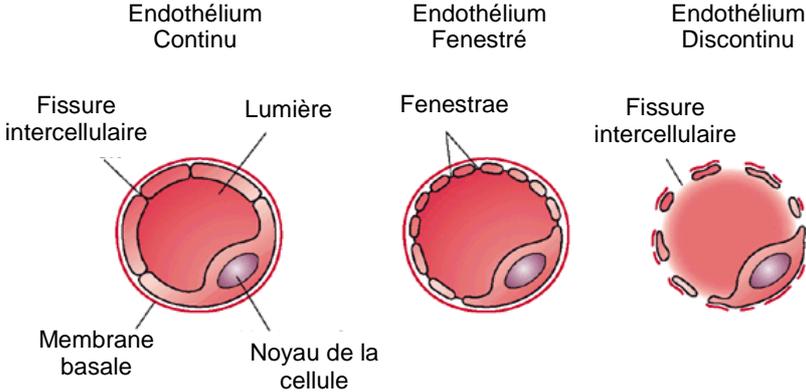
- l'intima est constituée d'une couche de cellules endothéliales en contact direct avec la circulation sanguine et reposant sur la membrane basale, ainsi que d'une couche interne élastique.

- la média, qui entoure l'intima, constitue un revêtement concentrique de cellules musculaires lisses qui participent au contrôle du diamètre des vaisseaux et contribue à la régulation du tonus vasculaire. L'épaisseur de la couche de cellules musculaires lisses est plus importante



**Schéma 1 : Structure des vaisseaux sanguins.**

A) d'après Cleaver et coll., Nat. Medicine 2003;9(6):661-668, B) d'après Jain, Nat. Medicine 2003;9(6):685-693



**Schéma 2 : Différenciation de l'endothélium.**

D'après Cleaver et coll., Nat. Medicine 2003;9(6):661-668.

dans les artères, ce qui permet un maintien dynamique des vaisseaux exposés à une forte pression sanguine.

- l'adventice est constituée d'une couche de tissu conjonctif qui contient des fibres de collagène et des fibroblastes permettant l'ancrage du vaisseau dans le tissu.

La vascularisation de l'organisme est essentiellement assurée par un réseau complexe d'artérioles et de veinules, ramifications des artères et des veines (schéma 1A). Ces artérioles et veinules sont constituées d'une monocouche de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses plus ou moins éparses, implantées dans la lame basale des cellules endothéliales (schéma 1B).

Les capillaires, qui font le lien entre les artérioles et les veinules, forment un réseau complexe au sein duquel se font les échanges sanguins avec le tissu environnant. Ils représentent la part la plus importante des vaisseaux sanguins. Ils sont essentiellement constitués d'une monocouche de cellules endothéliales (schéma 1A et 1B). Lors de leur ramification en capillaires, les cellules de muscle lisse des artérioles et veinules sont remplacées par les péricytes, qui ont la même origine ontogénique. Ces cellules partagent des caractéristiques phénotypiques communes avec les cellules du muscle lisse, mais diffèrent essentiellement par leur forme étoilée.

Les capillaires eux-mêmes présentent des différences morphologiques importantes. Les besoins particuliers des divers tissus, en terme de qualité et de quantité d'échanges définissent un niveau de différenciation particulier en fonction des organes considérés (endothélium fenêtré dans les glandes endocrines ou le rein, continu dans le cerveau) (schéma 2).

### 1.1.2. La vasculogenèse

La vasculogenèse constitue le processus de formation des premiers vaisseaux sanguins dans l'embryon (schéma 3). Ce phénomène permet la mise en place d'un arbre vasculaire primitif. Il s'effectue à partir de précurseurs, les hémangioblastes qui dérivent du mésoderme. Ces cellules pluripotentes se différencient et s'agrègent pour former des îlots sanguins constitués d'angioblastes entourant des cellules souches hématopoïétiques. Les angioblastes se différencient en cellules endothéliales tandis que les îlots sanguins fusionnent et forment une lumière, créant ainsi un plexus vasculaire primaire (Risau et Flamme, 1995). De manière intéressante, une différenciation des vaisseaux en artères ou veines peut déjà être observée à ce stade indiquant que ce phénomène est génétiquement

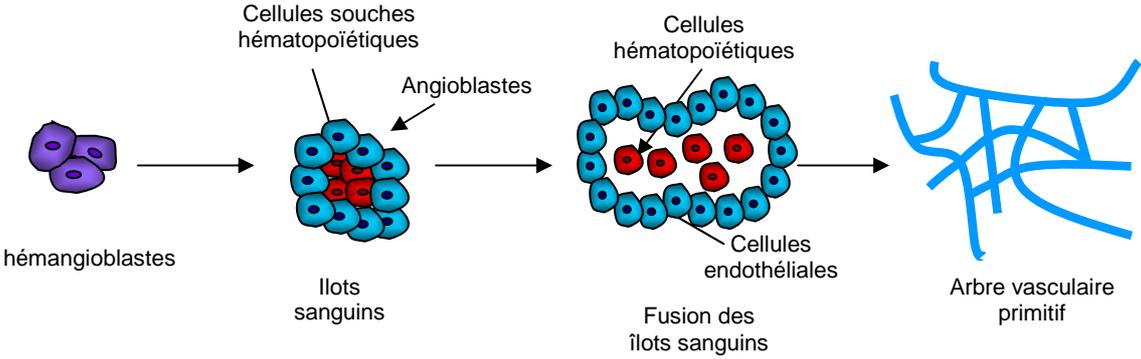


Schéma 3 : La vasculogenèse.

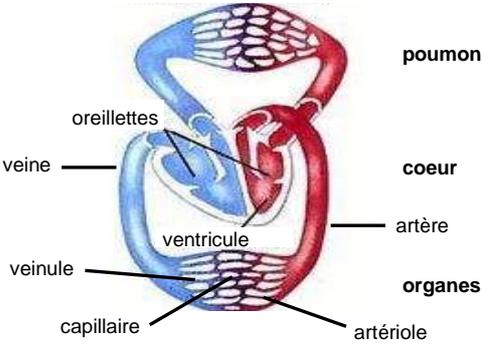


Schéma 4 : Le réseau vasculaire est un circuit fermé.  
D'après <http://www.ideacenter.org/contentmgr/showdetails.php/id/1113>

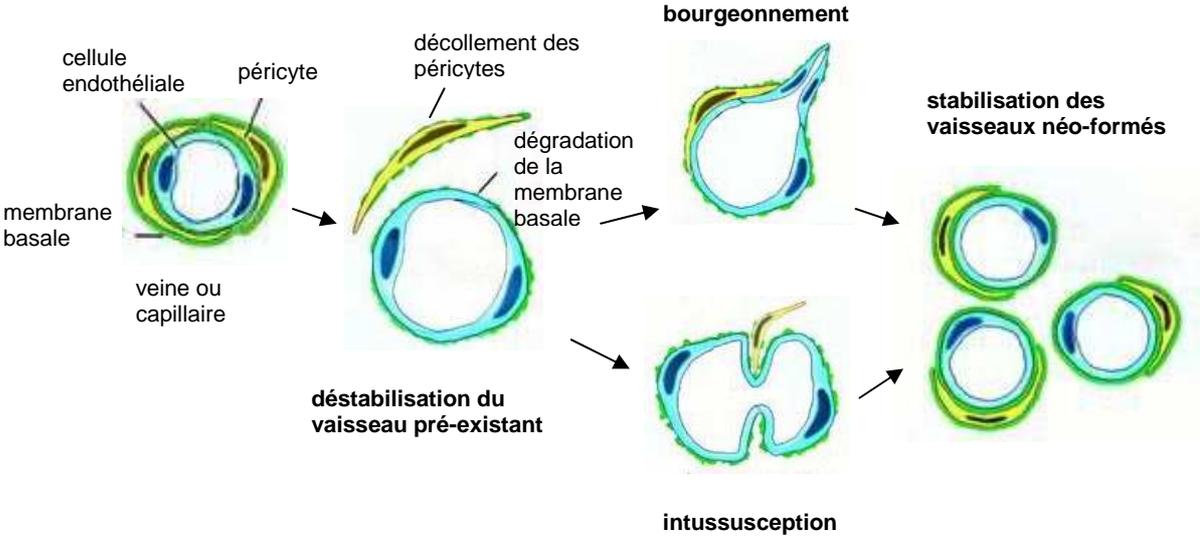


Schéma 5 : Les mécanismes d'angiogenèse.  
Elaboré à partir de Pettersson et coll. Lab Invest 2000, 80:99-115

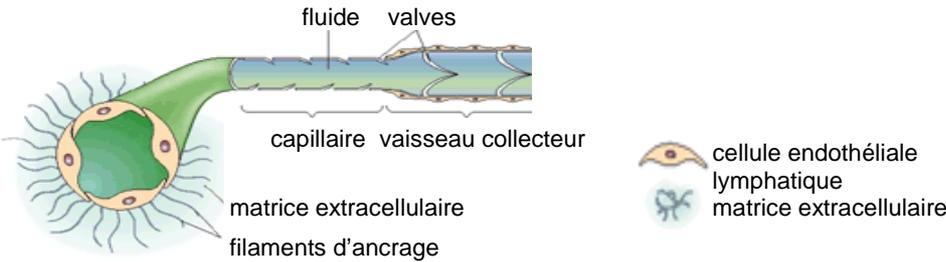
programmé, et pas seulement déterminé par la pression hémodynamique (Coultas *et coll.*, 2005). La génération de novo de vaisseaux sanguins à partir de précurseurs endothéliaux est un phénomène qui a lieu essentiellement durant l'embryogenèse précoce. Toutefois, chez l'adulte, des progéniteurs endothéliaux provenant de la moelle osseuse ont pu être isolés à partir de sang périphérique. Ces cellules sont capables de se différencier en cellules endothéliales *in vitro*, et semblent pouvoir être recrutées sur des sites de néo-vascularisation, dans différents modèles animaux d'ischémie (Asahara *et coll.*, 1997). On parle alors de vasculogenèse post-natale. L'incorporation, dans les néovaisseaux, de précurseurs endothéliaux issus de la moelle osseuse, contribuerait à la croissance vasculaire en complément des cellules endothéliales résidentes lors du bourgeonnement (Ferrara, 2005). Certains auteurs suggèrent que la vasculogenèse post-natale pourrait être impliquée dans la vascularisation de certaines tumeurs (Asahara *et coll.*, 1999; Lyden, 2001). Cependant, les avis diffèrent sur la hauteur de la contribution de ce processus à la néo-angiogenèse.

### 1.1.3. L'angiogenèse

L'angiogenèse correspond à la formation de nouveaux vaisseaux à partir du réseau préexistant. Une fois le plexus vasculaire primaire établi, le réseau vasculaire se déploie et envahit l'embryon pour former un réseau très organisé où les artères se ramifient en artérioles puis en capillaires qui irriguent les organes, se rejoignent pour former des veinules puis des veines qui ramènent le sang au cœur. Ils forment ainsi un circuit fermé (schéma 4). Les cellules endothéliales différenciées prolifèrent et s'associent pour former de nouveaux vaisseaux. Il existe deux types de mécanismes d'angiogenèse : l'intussusception et le bourgeonnement (schéma 5).

Lors de l'angiogenèse par intussusception, les cellules endothéliales forment la lumière du vaisseau en s'invaginant à l'intérieur de ce dernier puis établissent une cloison divisant la lumière préexistante (Flamme *et coll.*, 1997).

L'angiogenèse par bourgeonnement est composée d'une étape de déstabilisation du vaisseau préexistant, puis de la morphogenèse du néovaisseau et enfin de la stabilisation des structures vasculaires nouvellement formées. Dans un premier temps, en réponse à un signal déclencheur tel que le VEGF (vascular endothelial growth factor), le vaisseau se dilate et devient perméable. L'angiopoïétine-1 (Ang-1), et les molécules de jonction, telles que les VE-cadhérines (vascular endothelial cadherine) et les molécules PECAM (platelet-endothelial cell adhesion molecule), maintiennent une interaction entre les cellules. Ces



**Schéma 6 : Structure des vaisseaux lymphatiques.**  
D'après Jain, Nat. Medicine 2003;9(6):685-693.

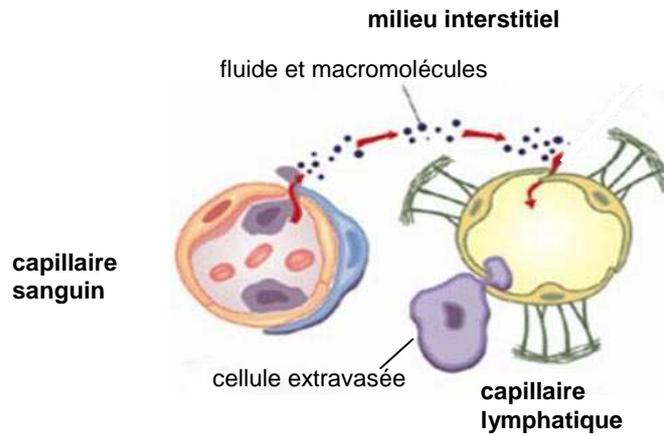
interactions doivent être inhibées pour permettre une déstabilisation du vaisseau. L'angiopoïétine-2 (Ang-2) et la sécrétion de protéases spécifiques (activateur du plasminogène, collagénase et métalloprotéases) induisent une dégradation locale de la matrice extracellulaire et de la membrane basale. Sous l'influence de divers facteurs et notamment du VEGF, de l'Ang-1 et du bFGF (basic fibroblast growth factor), les cellules endothéliales proches migrent vers l'espace périvasculaire où elles prolifèrent et s'associent pour former un néovaisseau. Au cours de cette étape, des récepteurs de la matrice cellulaire, les intégrines  $\alpha\beta3$  et  $\alpha\beta5$  participent à la diffusion et la migration des cellules. Il s'ensuit alors une étape dite de maturation du capillaire, assurée notamment par le recrutement de cellules périvasculaires telles que les péricytes ou des cellules de muscle lisse, et la synthèse de nouvelles protéines matricielles. Le TGF- $\beta$ 1 (Transforming growth factor beta 1) et Ang-1, favorisent les interactions entre les cellules endothéliales et les cellules de muscle lisse, ce qui permet la stabilisation du vaisseau néo-formé et son retour à la quiescence. (Les mécanismes de l'angiogenèse ont fait l'objet d'une revue intéressante (Carmeliet et Jain, 2000; Yancopoulos *et coll.*, 2000)).

L'angiogenèse a un rôle prépondérant dans la néovascularisation des tumeurs, mais dans ce contexte pathologique, elle comporte quelques particularités en comparaison de l'angiogenèse physiologique. L'angiogenèse tumorale et ses caractéristiques seront développées plus loin (1.2. L'angiogenèse tumorale).

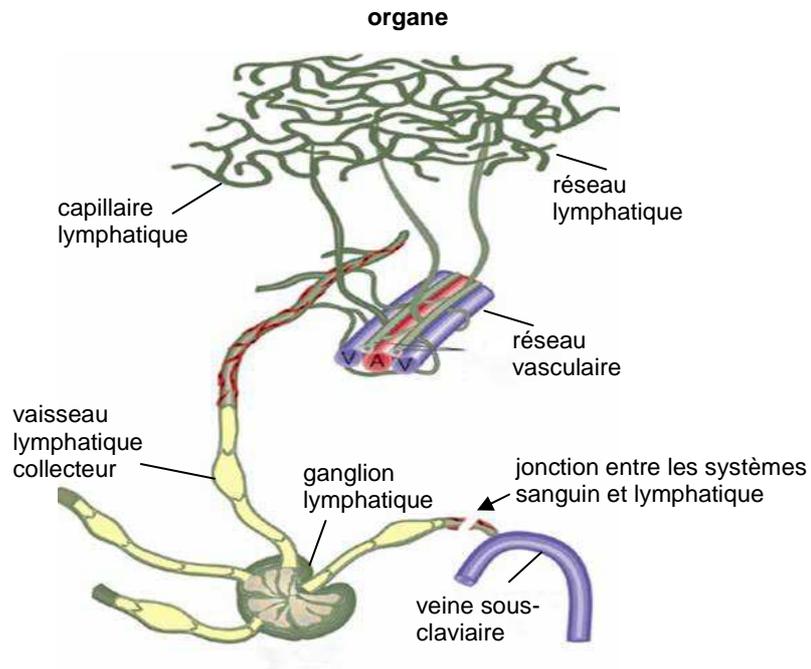
#### 1.1.4. La lymphangiogenèse

Le réseau vasculaire lymphatique est formé de vaisseaux parallèles au réseau sanguin. Il draine les fluides du milieu interstitiel des tissus, et les réintègre à la circulation sanguine. Le réseau lymphatique est présent dans la plupart des organes à l'exception du système nerveux central, de la moelle osseuse, et de tissus avasculaires tels que le cartilage, la cornée ou l'épiderme. Il maintient ainsi l'homéostasie plasmatique et régule la pression tissulaire. Il joue également un rôle essentiel dans la défense immunitaire de l'organisme, et est ainsi impliqué dans la pathogenèse de diverses maladies et notamment du cancer.

Les capillaires lymphatiques sont des vaisseaux à paroi fine. Ils sont composés d'une monocouche de cellules endothéliales, ne comportent pas de péricytes ou de cellules musculaires lisses, et n'ont pas ou peu de membrane basale. Les vaisseaux lymphatiques collecteurs comportent une couche de cellules musculaires, une membrane basale et des valves (schéma 6).



**Schéma 7 : Echange entre les réseaux sanguin et lymphatique.**  
D'après Alitalo et coll. Nature, 2005; 438, 946-953.



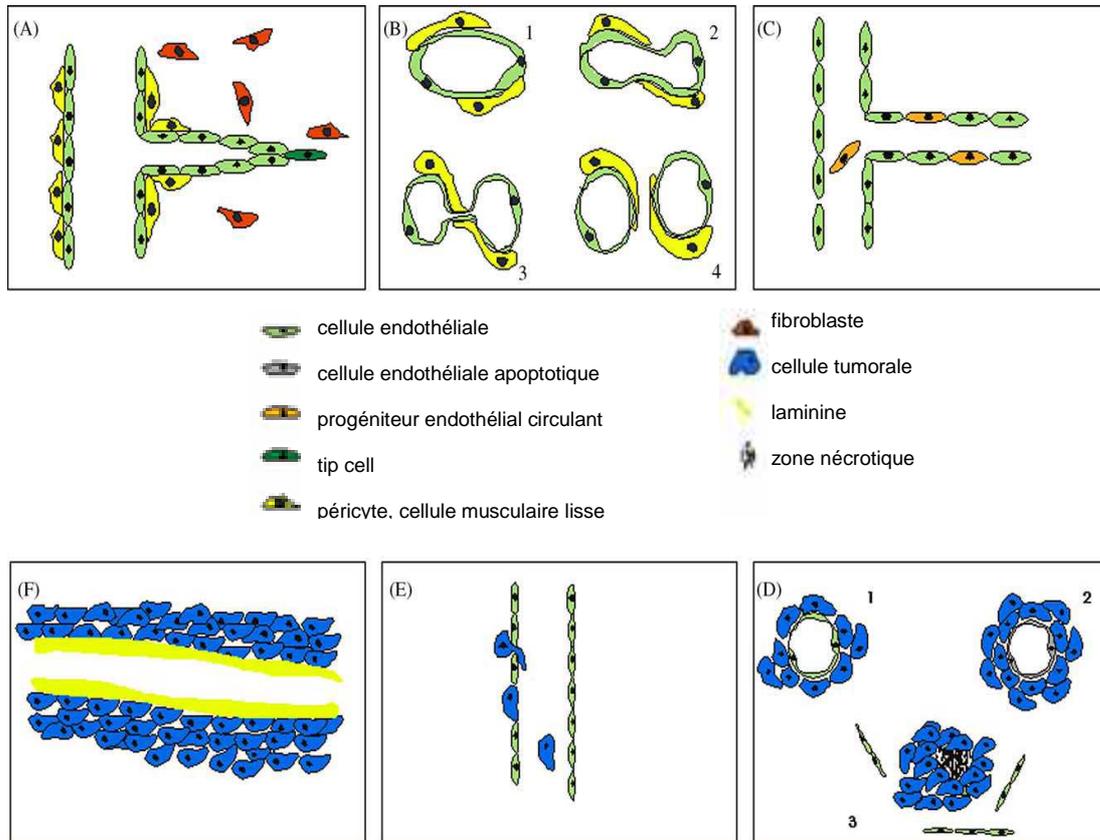
**Schéma 8 : Le réseau lymphatique.**  
D'après Alitalo et coll. Nature, 2005; 438, 946-953.  
V = veinule, A = artériole

Au cours de l'embryogenèse, le réseau lymphatique apparaît après le réseau vasculaire, ce qui indique qu'il pourrait avoir une origine vasculaire. Le réseau lymphatique s'initierait par bourgeonnement à partir, notamment, de la veine jugulaire embryonnaire et se développerait à partir de ce point (Oliver, 2004).

La pression sanguine induit continuellement une diffusion de plasma, à partir des capillaires, dans l'espace interstitiel (schéma 7). La fonction principale du réseau lymphatique est de réintroduire ces fluides dans la circulation sanguine. Contrairement au réseau sanguin qui est continu et forme un circuit, les vaisseaux lymphatiques se terminent dans les organes (schéma 8). Ils collectent les fluides interstitiels, très riches en macromolécules et cellules extravasées comme les leucocytes ou les cellules présentatrices d'antigènes, et les transportent jusqu'à des vaisseaux lymphatiques collecteurs puis à la circulation sanguine, au niveau d'une jonction entre les réseaux lymphatique et vasculaire située à proximité de la veine jugulaire. Au cours de ce trajet, ces fluides sont filtrés au niveau des ganglions lymphatiques, les cellules présentatrices d'antigènes peuvent alors activer, le cas échéant, une réponse immunitaire spécifique. Les cellules tumorales qui se détachent d'une tumeur, et constituent des métastases potentielles, transitent également par ce réseau. De manière intéressante, la présence de métastases dans le ganglion régional est un facteur de mauvais pronostic des carcinomes chez l'homme (Pepper, 2001). (La lymphangiogenèse a fait l'objet d'une revue intéressante : (Alitalo *et coll.*, 2005)).

## 1.2. L'angiogenèse tumorale

Chez l'adulte, la plupart des cellules endothéliales sont quiescentes : seulement une cellule sur 10 000 est dans un cycle de division (Hanahan et Folkman, 1996). L'angiogenèse est alors restreinte à quelques situations physiologiques particulières telles que la cicatrisation, le cycle ovarien chez la femme ou la placentation au cours de la grossesse (Ferrara, 2004). Cependant, les cellules endothéliales conservent une importante capacité proliférative en réponse à des stimuli physiologiques tels que l'hypoxie pour les vaisseaux sanguins ou l'inflammation pour les vaisseaux lymphatiques. La croissance et la régression du réseau vasculaire sont extrêmement régulées et un dysfonctionnement dans le contrôle de la quiescence des capillaires sanguins contribue au développement, ou aggrave, de nombreuses maladies (psoriasis, arthrite, cécité, ischémie, ostéoporose, obésité, cancer) (Carmeliet, 2003). Parmi les maladies associées à une modification du réseau vasculaire, le cancer est une de celles dont la prévalence est des plus importantes. Une tumeur solide ne peut croître au delà de quelques mm<sup>3</sup> sans pourvoir à son approvisionnement en oxygène et



**Schéma 9 : Les différents mécanismes de vascularisation tumorale.**

D'après Auguste et coll., Critical Reviews in Oncology/Hematology 54 (2005) 53–61

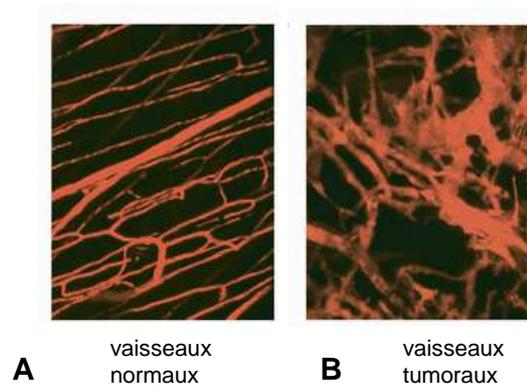
A) Angiogenèse par bourgeonnement, B) angiogenèse par intussusception, C) recrutement de progéniteurs endothéliaux circulant, D) cooption, E) vaisseau mosaïque, F) mimétisme vasculaire.

nutriments. Elle est alors capable de sécréter des facteurs pro-angiogènes qui induisent sa propre vascularisation et permettent ainsi son développement et sa dissémination (Folkman, 1971; Folkman et Hanahan, 1991; Holash *et coll.*, 1999). En effet, une corrélation a été observée entre la densité des micro-vaisseaux tumoraux, les métastases ganglionnaires et la survie des patients. Cette corrélation a été établie pour différents types de tumeurs, notamment les tumeurs du sein (Weidner *et coll.*, 1991; Horak *et coll.*, 1992), du poumon (Macchiarini *et coll.*, 1992), de la prostate (Wakui *et coll.*, 1992) et du côlon (Bigler *et coll.*, 1993). Il avait ainsi été proposé que le nombre de vaisseaux présents sur une coupe tumorale pourrait être un facteur pronostique pour les patients atteints d'un cancer.

Néanmoins, la vascularisation tumorale est anormale. Elle résulte d'un processus angiogénique moins finement régulé que le processus physiologique, pouvant aboutir à un réseau disproportionné, mimétique et peu fonctionnel (Carmeliet et Jain, 2000; Auguste *et coll.*, 2005; Jain, 2005).

### 1.2.1. Structure des vaisseaux tumoraux

Diverses molécules sont impliquées dans le processus d'angiogenèse tumorale (pour revue : (Carmeliet et Jain, 2000; Yancopoulos *et coll.*, 2000)). Parmi celles-ci, le VEGF et la famille des angiopoïétines ont un rôle prépondérant, et les anomalies associées aux vaisseaux tumoraux pourraient provenir d'un déséquilibre entre ces facteurs régulateurs de l'angiogenèse. La vascularisation tumorale est un processus qui peut se rapprocher de l'angiogenèse physiologique, avec néanmoins quelques particularités (schéma 9). Les vaisseaux tumoraux sont, pour la plupart, issus du réseau vasculaire pré-existant et peuvent être induits par bourgeonnement ou par intussusception (Carmeliet et Jain, 2000). Un mécanisme de vasculogenèse post-natale, par incorporation de précurseurs endothéliaux circulants dérivés de la moelle osseuse, a également été décrit (Asahara *et coll.*, 1999). Par ailleurs, des cellules tumorales peuvent se développer autour d'un vaisseau préexistant, formant ainsi une sorte de manchon autour du vaisseau. Un processus de mimétisme vasculaire a également été évoqué. Il est illustré par la capacité des cellules de mélanomes agressifs à exprimer un phénotype de cellules endothéliales et à former un réseau de pseudo-vaisseaux dépourvus de cellules endothéliales où les cellules tumorales sont en contact direct avec le sang (Maniotis *et coll.*, 1999). Des analyses transcriptomiques globales, comparant des lignées très agressives et peu agressives de cellules de mélanomes humains de la peau ou de l'uvée, ont montré de manière surprenante que les



**Schéma 10 : Les vaisseaux tumoraux sont anormaux.**

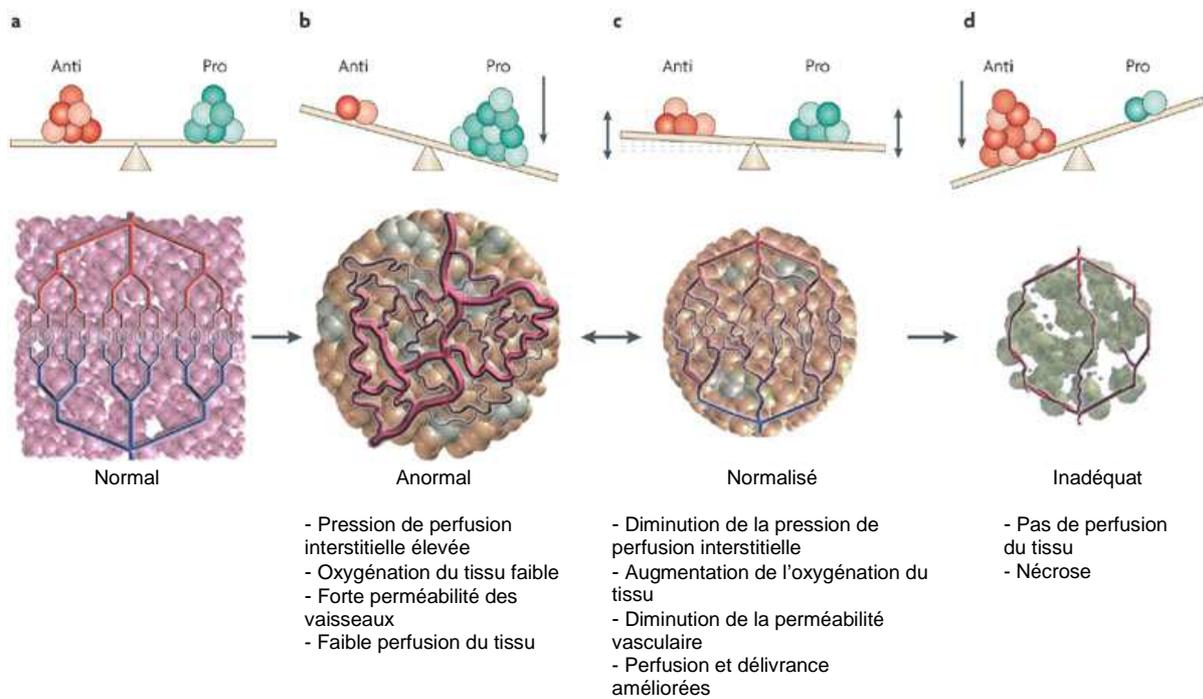
D'après Jain, Nat. Medicine 2003;9(6):685-693.

Images obtenues au microscope bi-photonique. A) capillaires normaux de souris issus de peau du dos et de muscle strié, B) capillaires tumoraux d'une xénogreffe humaine

cellules agressives étaient capables d'exprimer des gènes associés à de multiples phénotypes cellulaires. Notamment, elles peuvent exprimer des marqueurs de cellules endothéliales, épithéliales, de péricytes ou encore de fibroblastes. Elles pourraient également exprimer des gènes associés aux phénotypes des cellules souches précurseurs de ces différents types cellulaires (Seftor EA *et coll.*, 2002; Seftor RE *et coll.*, 2002; Hendrix *et coll.*, 2003a). Ce mécanisme de mimétisme vasculaire a été confirmé dans divers carcinomes comme ceux du sein, de la prostate, des ovaires, du chorion ou des poumons, ainsi que dans le phéochromocytome et plusieurs sarcomes (Hendrix *et coll.*, 2003b).

Par ailleurs, les vaisseaux tumoraux sont structurellement et fonctionnellement anormaux (Carmeliet et Jain, 2000). Contrairement aux vaisseaux normaux, la vascularisation tumorale est très désorganisée. Les vaisseaux tumoraux sont dilatés, tortueux et souvent hémorragiques. Ils présentent un diamètre irrégulier et des branchements et dérivations excessifs (schéma 10). En conséquence, le flux sanguin tumoral est variable et chaotique (Baish et Jain, 2000), et induit une hypoxie et une acidification de certaines régions de la tumeur (Carmeliet et Jain, 2000). Ce phénomène ne se limite pas aux tumeurs solides. En effet, alors que les vaisseaux sont simples et droits dans une moelle osseuse normale, les microvaisseaux d'une moelle osseuse leucémique présentent un réseau complexe de branchements (Perez-Atayde *et coll.*, 1997).

L'ultra-structure des vaisseaux tumoraux est également anormale, leur paroi comporte de nombreuses ouvertures et fenestrations, des jonctions inter-endothéliales élargies ainsi qu'une membrane basale discontinue voire absente. Les vaisseaux tumoraux ne possèdent pas ou peu les mécanismes protecteurs que les vaisseaux normaux acquièrent lors de leur formation. Notamment, ils ne possèdent pas de péricytes fonctionnels qui protègent les vaisseaux des modifications de l'équilibre en oxygène ou en hormones, permettent un contrôle vaso-actif régulant les besoins métaboliques ou induisent une quiescence du vaisseau (Benjamin LE *et coll.*, 1999). De plus, la paroi vasculaire des vaisseaux tumoraux n'est pas toujours composée d'une couche homogène de cellules endothéliales (Jain, 1988). En effet, les vaisseaux tumoraux peuvent être bordés d'une couche homogène de cellules tumorales ou d'une mosaïque de cellules endothéliales et de cellules tumorales. Chang *et coll.* ont montré que 15 % des vaisseaux d'une xénogreffe de carcinome du côlon ainsi que d'un carcinome spontané chez l'homme, étaient composés d'une mosaïque de cellules endothéliales et tumorales (Chang *et coll.*, 2000). Cependant, on ignore si ces vaisseaux résultent d'une invasion de la paroi vasculaire par des cellules tumorales, si ces cellules tumorales miment les cellules endothéliales, ou si la présence de ces cellules tumorales est due à une apoptose des cellules endothéliales, exposant ainsi les cellules tumorales bordant le vaisseau. Par ailleurs, les cellules endothéliales elles-mêmes peuvent être anormales (Carmeliet et Jain, 2000).



### Schéma 11 : Rôle de la normalisation des vaisseaux tumoraux en réponse à une thérapie anti-angiogène.

D'après Jain, Nature Reviews Neuroscience 2007; 8, 610-622.

**a)** Physiologiquement, un équilibre se crée entre les facteurs pro- et anti-angiogènes conduisant à un réseau vasculaire organisé et fonctionnel. **b)** La tumeur produit des facteurs pro-angiogènes de manière non-contrôlée induisant un réseau vasculaire tumoral anormal et non fonctionnel. **c)** l'administration judicieuse d'une thérapie anti-angiogène peut rétablir l'équilibre entre les facteurs pro- et anti-angiogènes, induire une normalisation partielle du réseau vasculaire et améliorer la délivrance de molécules ou l'oxygénation du tissu nécessaire à la radiothérapie. **d)** le maintien de la thérapie anti-angiogène peut conduire à la destruction du réseau vasculaire tumoral et de la tumeur elle-même.

Les défauts décrits précédemment induisent une vascularisation anormale et perméable, qui irrigue difficilement la tumeur (Hobbs *et coll.*, 1998; Dvorak *et coll.*, 1999; Hashizume *et coll.*, 2000). La prolifération des cellules tumorales, peut exercer une pression sur les vaisseaux sanguins et lymphatiques, et empêcher parfois le flux sanguin (Jain, 2005). Cette vascularisation anormale maintient une hypertension interstitielle qui induit, en plus d'une hypoxie et d'une acidification, un défaut de perfusion de la tumeur et limite ainsi la délivrance de molécules thérapeutiques (Carmeliet et Jain, 2000). Par ailleurs, le défaut d'oxygénation des cellules tumorales réduit également l'efficacité et la possibilité de traitement par radiothérapie (Jain, 2005). Au-delà de la limitation de l'efficacité de certaines thérapies, ces particularités peuvent engendrer une sélection de clones résistants, moins sensibles à l'hypoxie. Il a ainsi été proposé, qu'au lieu de détruire les capillaires tumoraux, un traitement anti-angiogène, permettrait de normaliser la vascularisation tumorale et de faciliter ainsi l'accès aux tumeurs des agents chimio-thérapeutiques (schéma 11).

Cette vascularisation tumorale résulte d'une commutation d'un stade quiescent du réseau vasculaire maintenu par des facteurs anti-angiogènes, à un stade activé de l'angiogenèse par des facteurs pro-angiogènes. Ce « switch » angiogénique est induit par les cellules tumorales elles-mêmes, mais également par d'autres cellules environnant la tumeur (Folkman, 1995; Boehm *et coll.*, 1997).

### 1.2.2. Switch angiogénique

L'observation qu'une angiogenèse se produisait dans l'environnement des tumeurs a été effectuée par Goldman en 1907 (pour revue (Carmeliet et Jain, 2000)). En 1968, il a été proposé dans une étude chez le hamster, que les tumeurs produisaient une substance angiogène diffusible. En effet, des cellules tumorales isolées du réseau vasculaire hôte par une chambre à filtre induisaient une angiogenèse. En 1971, Folkman a proposé que la croissance tumorale et l'émission de métastases, étaient dépendantes de l'angiogenèse et que par conséquent, l'inhibition de l'angiogenèse pourrait constituer une stratégie anti-tumorale (Folkman, 1971). En 1978, Gullino a montré que des tissus pré-cancéreux acquéraient des propriétés pro-angiogènes au cours de leur processus de cancérisation. Ceci a été confirmé en 2000 par une approche génétique (Hanahan *et coll.*, 2000).

Divers signaux peuvent déclencher ce « switch » angiogénique, notamment un stress métabolique, tel qu'une diminution de pression partielle en oxygène, une diminution de pH ou une hypoglycémie, ainsi qu'une réponse inflammatoire (Carmeliet et Collen, 1999; Kerbel,

2000). En particulier, l'hypoxie est un facteur prépondérant du switch angiogénique et du maintien du déséquilibre en faveur des facteurs pro-angiogènes. Notamment, elle a un rôle majeur dans l'induction de divers facteurs pro-angiogènes tels que le VEGF, la NOS (nitric oxide synthase), le PDGF (platelet-derived growth factor), ou encore l'Ang2 via le facteur de transcription HIF-1 (hypoxia-inducible transcription factor) (Carmeliet et Jain, 2000). L'induction de la transcription du VEGF par le facteur HIF-1 en réponse à l'hypoxie sera décrite plus précisément dans la 2<sup>ème</sup> partie de cette introduction.

Des tumeurs humaines peuvent rester dormantes pendant plusieurs années, un équilibre se créant entre la prolifération des cellules et leur apoptose. La demi-vie des inhibiteurs de l'angiogenèse étant plus longue que celle des activateurs, l'équilibre activateurs/inhibiteurs de l'angiogenèse favorise les facteurs anti-angiogènes (Carmeliet et Jain, 2000). Au sein d'une tumeur, l'équilibre approprié entre les facteurs pro- et anti-angiogènes n'existe plus. Les vaisseaux tumoraux sont dans l'incapacité de devenir quiescents. Ils sont constamment remodelés pour répondre à la croissance rapide de la tumeur. Une des preuves de la nécessité de cette commutation angiogénique vient de tests effectués dans un site avasculaire comme la cornée de lapin. Des tumeurs, ou des lignées de cellules tumorales placées dans une cornée de lapin induisent la formation de nouveaux capillaires qui se développent à partir du limbe pour irriguer la tumeur. Le blocage physique de l'accession des capillaires à la tumeur, ou l'inhibition de l'angiogenèse, limite fortement la croissance tumorale. La tumeur ne dépasse pas une taille de 0,4 mm (Gimbrone *et coll.*, 1972). Ces résultats ont été confirmés par la suite. L'absence de néovascularisation de la tumeur induit une nécrose (Brem *et coll.*, 1976) ou une apoptose de la tumeur (Holmgren *et coll.*, 1995; Parangi *et coll.*, 1996). Cette nécrose compense la prolifération continue des cellules tumorales et limite ainsi la taille de la tumeur à celle observée à l'état de dormance.

Parmi les différents inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse, on note l'endostatine et l'angiostatine (Kalluri, 2003). Ces deux protéines sont des inhibiteurs spécifiques de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales et ont de plus, la capacité d'induire l'apoptose de ces cellules par des mécanismes d'action différents (Gupta et Qin, 2003). Des cycles d'administration d'endostatine ont montré une inhibition de la croissance tumorale avec différentes lignées cellulaires (Lewis lung carcinoma (LLC), fibrosarcome T241 et mélanome B16F10) sans reprise après l'arrêt du traitement, et n'ont pas généré de résistance (Boehm *et coll.*, 1997). L'angiostatine a montré une inhibition de la croissance de tumeurs primaires et de métastases de cellules tumorales pulmonaires (LLC) par inhibition de l'angiogenèse (Gorski *et coll.*, 1998). Par ailleurs, son association avec une radiothérapie a montré un effet anti-tumoral synergique entre les deux types de thérapies.

La thrombospondine 1 (TSP1) et la thrombospondine 2 (TSP2) sont deux glycoprotéines qui présentent une activité anti-angiogène (de Fraipont *et coll.*, 2000). TSP1 inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales et la néovascularisation *in vivo*. La surexpression de TSP1 au niveau de la peau entraîne des défauts du processus de cicatrisation (Streit *et coll.*, 2000). L'analyse des phénotypes des souris déficientes en TSP1 ou en TSP2 montre, bien que les souris soient viables, que la déplétion en TSP2 a des effets plus sévères que celle de TSP1, avec en particulier une vascularisation accrue dans divers organes (Kyriakides *et coll.*, 1998). Ces résultats suggèrent que TSP2 aurait un rôle dans le contrôle du niveau de la vascularisation des organes.

Parmi les facteurs pro-angiogènes capables d'activer la prolifération et la migration des cellules endothéliales, se trouve, chez l'homme, la famille de facteurs de croissance des VEGF : les VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le PlGF (placental growth factor). Le VEGF-A est le facteur prépondérant de l'angiogenèse physiologique et tumorale. Ses caractéristiques et propriétés seront développées dans la 2<sup>ème</sup> partie de cette introduction.

Outre la famille du VEGF, le FGF-2 (Fibroblast Growth Factor-2, ou bFGF) a été le premier facteur de croissance identifié possédant une activité angiogène (Gospodarowicz et Thakral, 1978). Il représente le prototype d'une famille de facteurs de croissance liant l'héparine et dont l'expression est ubiquitaire. Ce facteur paraît important au cours de l'angiogenèse par sa capacité à favoriser la prolifération, la migration et l'organisation tubulaire des cellules endothéliales, et à induire l'angiogenèse *in vitro* (Montesano *et coll.*, 1986). Il est aussi responsable, du moins en partie, de la libération de protéases susceptibles de dégrader la membrane basale, notamment par sa capacité à moduler l'activation du plasminogène, et permettre ainsi la pénétration des cellules endothéliales vers l'espace périvasculaire (Mignatti *et coll.*, 1991).

### 1.2.3. Tumeur et environnement tumoral

Bien qu'il soit communément admis que la croissance tumorale est fortement dépendante de la capacité de la tumeur à induire sa propre vascularisation, il apparaît de plus en plus clairement que l'environnement de la tumeur et notamment les cellules qui l'entourent, contribuent également à la croissance tumorale et à sa vascularisation. En effet, les facteurs pro- et anti-angiogènes sont synthétisés par les cellules tumorales mais également par d'autres types cellulaires environnant la tumeur tels que les cellules endothéliales, les cellules sanguines, (plaquettes ou cellules de l'immunité), les cellules musculaires (Kut *et*

*coll.*, 2007), les cellules stromales et les fibroblastes (Shojaei *et coll.*, 2007), ou encore par la matrice extracellulaire (Fukumura *et coll.*, 1998). Les contributions relatives de chacun de ces types cellulaires ou de la matrice extracellulaire peuvent varier selon le type de tumeur et sa localisation. De manière générale, ces contributions favorisent la commutation angiogène d'un état anti-angiogène à un état pro-angiogène, mais peuvent également être à l'origine du recrutement de progéniteurs endothéliaux.

En effet, la co-culture de cellules stromales osseuses fœtales avec des cellules primaires humaines de myélome multiple favorise la survie et la croissance de ces dernières (Vincent et Mehti, 2005). Par ailleurs, il a été rapporté, dans un modèle de cancer du sein chez la souris, que l'acquisition du caractère malin par la tumeur est précédée d'un recrutement de macrophages contribuant au « switch angiogénique » (Lin et Pollard, 2007). Ces études ont également pu mettre en évidence une corrélation entre la présence de macrophages, la densité vasculaire et un mauvais pronostic dans les cancers du sein. De plus, les macrophages associés aux tumeurs répondent aux conditions d'hypoxie en induisant l'expression d'agents mitogènes, pro-angiogènes et inducteurs de métastases via le facteur de transcription HIF-1 (Lewis et Murdoch, 2005). Une autre étude a montré, dans un modèle de cancer du pancréas, que des neutrophiles exprimant la métalloprotéase MMP-9 sont majoritairement infiltrés dans les tumeurs et dysplasies des îlots qui présentent une angiogenèse, et qu'une déplétion transitoire en neutrophiles diminue significativement la fréquence de « switch » angiogénique dans les dysplasies (Nozawa *et coll.*, 2006).

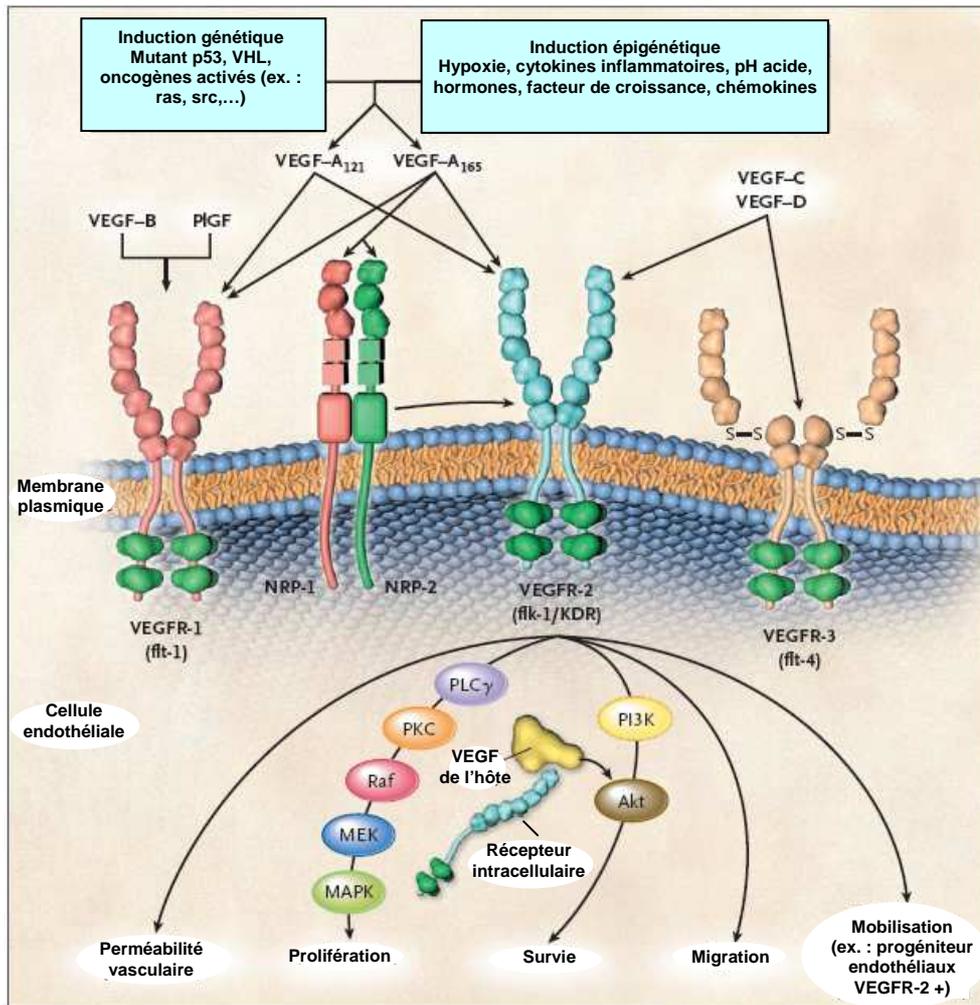
Par ailleurs, les fibroblastes (Orimo, 2005) et différentes cellules pro-inflammatoires infiltrant la tumeur sécrèteraient des facteurs qui favorisent la survie et la migration des cellules endothéliales (Albini *et coll.*, 2005). Les fibroblastes associés à la tumeur favoriseraient également l'angiogenèse tumorale par la sécrétion de SDF-1 (stromal cell-derived factor -1). Ce facteur induit le recrutement de cellules dérivées de la moelle osseuse dans la vasculature tumorale (Orimo, 2005). Cette hypothèse est étayée par les travaux de Peters *et coll.* qui ont analysé les cellules endothéliales tumorales de 6 patients ayant subi une transplantation de moelle osseuse de donneurs de sexe opposé. Il a ainsi pu être observé qu'en moyenne, 4,9 % des cellules endothéliales totales provenaient de la moelle osseuse (Peters BA, 2005).

**En conclusion**, l'angiogenèse et le « switch » angiogénique apparaissent comme des éléments cruciaux de la tumorigenèse, permettant à la tumeur à la fois de se développer au-

delà d'une certaine taille, mais également d'émettre des métastases qui vont coloniser d'autres sites. L'angiogenèse tumorale apparaît donc comme une cible de choix, dans le développement de stratégies anti-tumorales. Un des facteurs clefs de l'angiogenèse tumorale est représenté par le VEGF et les récepteurs associés à sa voie de signalisation. Les caractéristiques de ce facteur pro-angiogène sont développées dans la 2<sup>ème</sup> partie de cette introduction.



## 2<sup>ème</sup> Partie : Le VEGF-A



**Schéma 12 : Les membres de la famille VEGF et leurs récepteurs.**

D'après Kerbel, N Engl J Med. 2008 May 8;358(19):2039-49.

L'expression du VEGF-A peut être induite par différents mécanismes. Il est exprimé sous différentes isoformes dont les VEGF<sub>121</sub> et VEGF<sub>165</sub> qui sont les deux isoformes prépondérantes. Le VEGF-A peut se lier au VEGFR-1 et au VEGFR-2. Seul le VEGF<sub>165</sub> peut se lier aux neuropilines (NRP-1 et 2) qui agissent comme des co-récepteurs de VEGFR-2. Le signal induit par le VEGFR-1 est plutôt faible. L'activation du VEGFR-2 engendre la dimérisation du récepteur et l'activation de différentes voies de signalisation. Le VEGFR-3 n'est activé que par les VEGF-C et D, et est impliqué dans la lymphangiogenèse. Des récepteurs intracellulaires ont également été décrits et sont impliqués dans la survie des cellules par stimulation intracrine du VEGF-A.

VHL = Von Hippel Lindau, PLC $\gamma$  = phospholipase C $\gamma$ , PKC = protéine kinase C, MAPK = mitogen-activated protein kinase, PI3K = phosphatidylinositol 3'-kinase, S-S = pont dissulfure.

## 2. Le VEGF-A

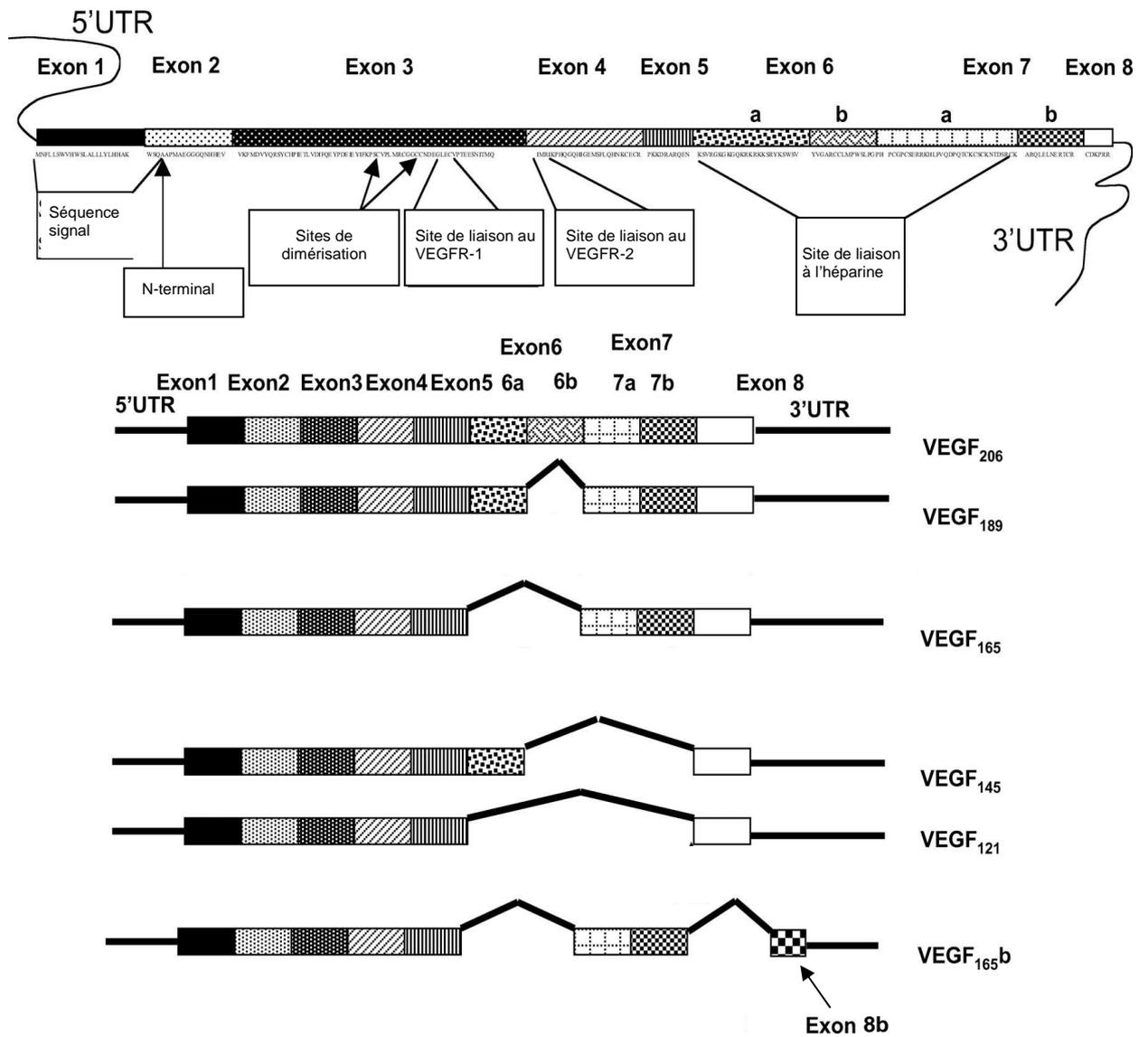
### 2.1. Rôle du VEGF

#### 2.1.1. Les différents types de VEGF et leurs récepteurs

Parmi les facteurs pro-angiogènes, une attention particulière a été portée sur la famille des facteurs de croissance VEGF et de leurs récepteurs à activité tyrosine kinase (Ferrara, 2002; Hicklin et Ellis, 2005). Cette famille de molécules structurellement apparentées, inclut chez l'homme les VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le PlGF (placental growth factor). Le médiateur clef de l'angiogenèse est le VEGF-A. Il est généralement appelé VEGF. Il s'agit du membre de la famille le plus documenté et a été caractérisé en 1989 par deux équipes simultanément (Ferrara et Henzel, 1989; Plouet *et coll.*, 1989). Il se lie préférentiellement à deux récepteurs, le VEGFR-1 (VEGF receptor 1) et le VEGFR-2 (VEGF receptor 2). En revanche, le VEGF ne montre pas d'affinité pour le VEGFR-3 (VEGF receptor 3) (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). Il peut par ailleurs, activer directement les neuropilines 1 et 2 (Nrp1 et Nrp2) qui agissent comme des co-récepteurs (schéma 12).

Le PlGF ou placental growth factor, dénommé ainsi car il a été cloné dans une banque d'ADNc de placenta humain (Maglione *et coll.*, 1991), existe sous deux isoformes : le PlGF-1 et le PlGF-2. Il peut former des hétérodimères avec le VEGF, qui ne sont pas nécessairement fonctionnels (Eriksson *et coll.*, 2002). Contrairement au VEGF, il n'est capable de se lier qu'au VEGFR-1 et aux neuropilines (Park *et coll.*, 1994). Des études d'inactivation du gène PlGF n'ont montré aucune anomalie du développement vasculaire chez l'embryon. Cependant, le PlGF semblerait impliqué dans l'angiogenèse pathologique et l'angiogenèse tumorale. Celui-ci augmenterait l'angiogenèse induite par le VEGF, en déplaçant le VEGF du VEGFR-1 et favorisant sa liaison au VEGFR-2 (Carmeliet, 2003). Plus récemment, une approche thérapeutique visant le PlGF au moyen d'un anticorps a été testée chez la souris et a montré des résultats intéressants dans l'inhibition de la croissance tumorale (Fischer C *et coll.*, 2007).

Le VEGF-B, comme le PlGF, ne se lierait pas au VEGFR-2. La délétion de son gène chez la souris n'induit pas de défaut de développement au cours de l'embryogenèse. Néanmoins, ces souris présentent après la naissance un cœur plus petit, un dysfonctionnement de la vascularisation coronarienne ainsi qu'une incapacité à se rétablir après un accident ischémique cardiaque (Bellomo *et coll.*, 2000). Par ailleurs, le VEGF-B pourrait être impliqué dans la vasculogenèse post-natale (Mould *et coll.*, 2005).



**Schéma 13 : Les différentes isoformes du VEGF.**  
D'après Woolard, J. et al. Cancer Res 2004;64:7822-7835.

Le VEGF-C et le VEGF-D seraient plutôt impliqués dans la croissance, la migration et la survie des cellules endothéliales lymphatiques. Tous deux activent le VEGFR-3, exprimé par les cellules endothéliales lymphatiques (Jeltsch *et coll.*, 1997; Makinen *et coll.*, 2001). Le VEGFR-3 serait également exprimé par certaines cellules tumorales issues par exemple d'adénocarcinomes du côlon (Witte *et coll.*, 2002). Le VEGF-C et le VEGF-D peuvent par ailleurs être protéolysés et ces formes plus courtes sont capables de se lier au VEGFR-2 et de l'activer, néanmoins avec une affinité plus faible que le VEGF (Joukov, 1996; Baldwin *et coll.*, 2001).

## 2.1.2. Le VEGF-A

Le VEGF est un facteur de croissance dont l'expression est très finement régulée. En effet, la délétion d'un seul allèle de son gène est létale (Carmeliet *et coll.*, 1996; Ferrara *et coll.*, 1996), ce qui indique une sensibilité importante de l'organisme au taux de VEGF, du moins au cours du développement embryonnaire (Dibbens *et coll.*, 2001). De même, la surexpression de 2 à 3 fois du VEGF par rapport à son expression endogène entraîne de graves anomalies du développement cardiaque et une létalité embryonnaire (Miquerol *et coll.*, 2000). Le VEGF est exprimé sous différentes isoformes, plus ou moins actives, qui ont été décrites comme pro-angiogènes pour certaines (les isoformes xxx) et anti-angiogènes pour d'autres (les isoformes xxxb), ce qui permet un niveau supplémentaire de régulation de son effet (Houck *et coll.*, 1992), selon les niveaux d'expression de chacune de ces deux « sous-familles ».

### 2.1.2.1. Les isoformes xxx du VEGF-A

Le VEGF existe sous différentes isoformes qui résultent d'un épissage alternatif des 8 exons de son gène (schéma 13). Toutes les isoformes comportent les exons 1 à 5, ainsi que le dernier exon, l'exon 8. Les exons 6 et 7 codent pour un site de liaison à l'héparine et peuvent être ainsi inclus ou exclus de la protéine. Ces différentes isoformes sont nommées en fonction du nombre d'acides aminés qu'elles comportent et sont ainsi appelées chez l'homme VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub> et VEGF<sub>206</sub>. Les trois formes majoritaires, sont les isoformes 121, 165 et 189, alors que la forme la plus rare est l'isoforme 206 qui n'aurait été décrite que dans une banque d'ADNc de foies fœtaux (Houck *et coll.*, 1991). L'isoforme 145 a été décrite plus tardivement dans l'utérus humain, et est également assez rare (Charnock-Jones *et coll.*, 1993).

Le VEGF<sub>121</sub> est une protéine faiblement acide et ne comporte pas de site de liaison à l'héparine. Le VEGF<sub>165</sub> est, à l'inverse, une glycoprotéine basique capable de se lier à l'héparine (Ferrara et Davis-Smyth, 1997). Alors que le VEGF<sub>121</sub> est une protéine soluble, le VEGF<sub>165</sub> est majoritairement associé à la surface cellulaire ainsi qu'à la matrice extracellulaire, bien qu'une fraction soit également sécrétée. En revanche, les VEGF<sub>189</sub> et <sub>206</sub> sont presque exclusivement séquestrés dans la matrice extracellulaire (Park *et coll.*, 1993). Le site de liaison à l'héparine serait à l'origine des interactions avec les protéoglycanes de la surface cellulaire. L'affinité de liaison à l'héparine augmente avec la longueur des isoformes. Par ailleurs, les isoformes associées à la matrice extracellulaire peuvent être libérées sous forme soluble et bioactive par de l'héparine ou de la plasmine, par digestion de la partie C-terminale. La partie biologiquement active du VEGF est localisée dans les 110 acides aminés N-terminaux de la protéine (Keyt *et coll.*, 1996), ce qui suggère que le VEGF pourrait être accessible à ses cellules cibles par deux mécanismes : la sécrétion de protéines librement diffusibles (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub>), et la libération des isoformes plus longues de la matrice extracellulaire (VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>) (Ferrara et Davis-Smyth, 1997). Néanmoins, la forme 121 est moins active que la forme 165 (Keyt *et coll.*, 1996) et il semblerait que les isoformes plus longues, même liées à la matrice extracellulaire, soient capables d'activer la prolifération de cellules endothéliales (Park *et coll.*, 1993). Ceci suggère que les différentes isoformes du VEGF, par leur hétérogénéité de structure et de fonction, permettent une réponse biologique graduelle et contrôlée (Ferrara et Davis-Smyth, 1997).

Le ratio des différentes isoformes du VEGF varie au cours de l'embryogenèse, et varie chez l'adulte selon les organes (Ng *et coll.*, 2001). La création de souris transgéniques exprimant séparément ces différentes isoformes a permis de préciser les rôles et l'importance de ces diverses isoformes ainsi que leur complémentarité. Les souris transgéniques qui expriment uniquement la forme la plus courte i.e. l'isoforme 120 chez la souris qui correspond à l'isoforme 121 chez l'homme, présentent des défauts importants de l'angiogenèse myocardique, rénale, osseuse (Carmeliet *et coll.*, 1999), pulmonaire (Ng *et coll.*, 2001) ou encore rétinienne (Stalmans *et coll.*, 2002). Par ailleurs, les souris qui n'expriment que l'isoforme 188, qui correspond à l'isoforme 189 humaine, montrent une croissance normale des veines, mais un défaut de croissance artérielle. En revanche, les souris qui n'expriment que l'isoforme 164, qui correspond à l'isoforme 165 humaine, montrent un poids et une fertilité normale ainsi qu'un développement rétinien normal, suggérant une angiogenèse rétinienne efficace (Stalmans *et coll.*, 2002). De plus, l'expression des isoformes 120 et 188 ensemble, sans l'isoforme 165, serait suffisante pour observer une néovascularisation rétinienne normale (Ishida *et coll.*, 2003).

Le profil d'expression des différentes isoformes varie lors de la progression tumorale de

certain types de tumeurs. L'expression des isoformes diffusibles serait favorisée (Cheung *et coll.*, 1998). En effet, l'isoforme 121 est considérée comme plus tumorigène que les autres isoformes dans le carcinome du sein (Zhang *et coll.*, 2000) et est prépondérante dans la progression du mélanome malin (Yu JL *et coll.*, 2002b). De plus, cette isoforme est la plus exprimée dans un poumon sain, mais son expression, relativement à l'expression globale du VEGF, est augmentée dans la tumeur. A l'inverse, l'expression relative de l'isoforme 189 est diminuée dans les carcinomes pulmonaires (Zygalaki *et coll.*, 2007). Néanmoins, la prépondérance de l'isoforme 189 est associée à une vascularisation importante de la tumeur, un faible taux de survie et des rechutes précoces dans le cancer du poumon non à petites cellules (Yuan *et coll.*, 2001). L'isoforme 165 est associée à une forte vascularisation intra-tumorale ainsi qu'un mauvais pronostic dans les ostéosarcomes (Lee *et coll.*, 1999).

### 2.1.2.2. Les isoformes xxxb

Plus récemment, de nouvelles isoformes du VEGF ont été mises en évidence et sont appelées les isoformes VEGFxxx<sub>b</sub>. Elles résultent de deux possibilités d'épissage au niveau de l'exon 8, conduisant à la formation de deux familles d'isoformes possédant la même longueur, mais qui diffèrent au niveau de leur région C-terminale : les isoformes VEGFxxx et les isoformes VEGFxxx<sub>b</sub> (Bates *et coll.*, 2002). Les isoformes VEGFxxx comportent la partie proximale de l'exon 8, dite 8a, alors que les isoformes VEGFxxx<sub>b</sub> comportent la partie distale, dite 8b (schéma 13). Le VEGF<sub>165b</sub> est la première isoforme VEGFxxx<sub>b</sub> à avoir été identifiée. Les isoformes 121b, 145b et 189b ont également été décrites (Perrin *et coll.*, 2005; Miller-Kasprzak et Jagodzinski, 2008).

Les conséquences fonctionnelles de cette différence dans la région C-terminale, sont que les homodimères de VEGF<sub>165b</sub> entrent en compétition avec les homodimères de VEGF<sub>165</sub> pour la liaison au récepteur principal du VEGF, le VEGFR-2, pour lequel elles ont la même affinité, mais inhibent la prolifération et la migration de cellules endothéliales en culture (Woolard *et coll.*, 2004). Elles bloquent également l'induction de l'angiogenèse *in vivo* dans la cornée de lapin et du mésentère de rat. De plus, le VEGF<sub>165b</sub> humain recombinant montre également un effet anti-angiogène dans des expériences d'angiogenèse induite par hypoxie dans un modèle oculaire de rétinopathie chez la souris (Konopatskaya *et coll.*, 2006).

Par ailleurs, Varey *et coll.* ont montré en utilisant un test ELISA spécifique des isoformes VEGFxxx ou VEGFxxx<sub>b</sub>, que plus de 90% du VEGF exprimé dans un colon normal était du VEGFxxx<sub>b</sub> (Varey *et coll.*, 2008). Cependant, dans le carcinome colorectal métastatique, le VEGFxxx est surexprimé et le VEGFxxx<sub>b</sub> est sous-exprimé. De plus, les cellules d'adénome du côlon en culture expriment principalement du VEGFxxx<sub>b</sub> alors que les cellules de

carcinome expriment du VEGF<sub>xxx</sub> de manière prépondérante. Par ailleurs, ces cellules d'adénome soumises à une hypoxie permutent leur expression prépondérante de VEGF<sub>xxx</sub> en VEGF<sub>xxx</sub> (Varey *et coll.*, 2008).

La surexpression de VEGF<sub>165b</sub> dans des cellules de carcinome du côlon inhibe la croissance tumorale dans un modèle de xénogreffe chez la souris. Par ailleurs, cette étude a également montré que le VEGF<sub>165</sub> et le VEGF<sub>165b</sub> se liaient au bevacizumab avec la même affinité (Varey *et coll.*, 2008).

### 2.1.3. Les récepteurs du VEGF

En plus de la régulation des effets du VEGF par l'existence de ses différentes isoformes xxx et xxxb, les récepteurs du VEGF sont également régulés. Ils existent sous deux formes : soluble et membranaire, qui permettent ou non la transduction du signal, ce qui constitue un niveau de régulation supplémentaire de l'action du VEGF.

Le VEGF agit principalement via deux récepteurs : le VEGFR-1 également appelé Flt-1 (Fms-like tyrosine kinase-1) chez la souris et le VEGFR-2 également appelé KDR (kinase-insert domain-containing receptor) chez l'homme et Flk-1 (fetal liver kinase) chez la souris. Les VEGFR-1 et VEGFR-2 semblent être tous les deux indispensables au développement d'un réseau vasculaire normal de l'embryon. Les souris invalidées pour l'un ou l'autre gène, meurent in utero entre J8,5 et J9,5, mais montrent des phénotypes différents indiquant que leurs rôles sont distincts (Fong *et coll.*, 1995; Shalaby *et coll.*, 1995). L'inactivation du gène du VEGFR-1 entraîne une incapacité des cellules endothéliales à s'organiser en canal vasculaire normal, celle du gène du VEGFR-2 induit un défaut de vasculogénèse et de développement des cellules hématopoïétiques.

Le VEGFR-1 existe sous deux formes, une forme transmembranaire et une forme soluble. Le rôle du VEGFR-1 n'est pas tout à fait élucidé. Il est capable de lier le VEGF avec une affinité dix fois supérieure à celle de VEGFR-2, mais ses propriétés de transduction du signal sont extrêmement faibles (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). Il aurait un rôle inhibiteur de la vasculogénèse et de l'angiogénèse dans l'embryogénèse précoce, mais un rôle activateur de l'angiogénèse ou de la réponse inflammatoire chez l'adulte. De plus, il est exprimé à la fois dans les cellules endothéliales en prolifération et dans les cellules quiescentes, suggérant un rôle de ce récepteur dans le maintien de la survie des cellules endothéliales (Peters KG *et coll.*, 1993). Par ailleurs, il a été montré que le VEGFR-1 était exprimé à la surface des monocytes/macrophages et régulait la migration ainsi que d'autres fonctions de

ce type cellulaire (Barleon *et coll.*, 1996). De plus, le VEGFR-1 est également exprimé à la surface de cellules dendritiques, d'ostéoclastes, de péricytes et de trophoblastes dans le placenta (Nomura *et coll.*, 1995; Dikov *et coll.*, 2005). Le rôle du VEGFR-1 dans ces types cellulaires n'est pas toujours élucidé. Il pourrait jouer un rôle dans leur survie.

Le VEGFR-2 est exprimé de manière importante par les cellules endothéliales engagées dans le processus d'angiogenèse et par les progéniteurs endothéliaux circulants, issus de la moelle osseuse. La liaison du VEGF à son récepteur VEGFR-2 induit la dimérisation du récepteur et l'activation de différentes voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la migration et également la survie des cellules endothéliales ainsi que dans la perméabilité vasculaire (Shibuya et Claesson-Welsh, 2006). Parmi ces voies de signalisation, on peut citer la voie impliquant les kinases PLC $\gamma$ /PKC/Raf/MEK/MAPK et la voie PI3K/Akt (schéma 12). Par ailleurs, une forme soluble du récepteur VEGFR-2 a également été mise en évidence (Ebos *et coll.*, 2004). Comme le VEGFR-1 soluble, il pourrait avoir un rôle régulateur négatif de l'angiogenèse.

Chez la souris, le récepteur VEGFR-2 est le premier marqueur des précurseurs angioblastiques à apparaître. Il est donc fortement exprimé dans les cellules progénitrices des cellules endothéliales dans l'embryogenèse précoce. A un stade plus tardif du développement vasculaire, l'expression du VEGFR-2 diminue. Le VEGFR-2 devient surexprimé dans des conditions d'angiogenèse, qui peut être pathologique comme dans une tumeur (Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001). Par ailleurs, l'expression du VEGFR-2 a également été décrite dans les cellules neurales, les ostéoblastes, les cellules du canal pancréatique, les cellules progénitrices de la rétine et les mégacaryocytes (Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001). De même que pour le VEGFR-1, le rôle du VEGFR-2 dans ces cellules n'est pas complètement élucidé.

#### 2.1.4. Les effets du VEGF

Les deux récepteurs du VEGF sont exprimés à différents niveaux, dans les cellules endothéliales des vaisseaux. Des études d'autoradiographie de ligand sur des coupes de tissus fœtaux et adultes de rat ont montré que les sites de liaison de haute affinité du VEGF étaient principalement localisés sur l'endothélium vasculaire des petits et des gros vaisseaux (Jakeman *et coll.*, 1992; Jakeman *et coll.*, 1993). Ces résultats étayaient l'hypothèse selon laquelle l'endothélium vasculaire est la cible principale de l'action du VEGF. De manière intéressante, ces études ont également montré que le VEGF se liait à la fois aux cellules endothéliales en prolifération et aux cellules quiescentes, suggérant, comme pour le VEGFR-1, un rôle potentiel du VEGF dans le maintien de la survie des cellules

endothéliales. Néanmoins, il a également été montré, dans d'autres études, que le VEGFR-1 et le VEGFR-2 étaient exprimés dans d'autres types cellulaires que les cellules endothéliales, et que la transduction du signal pouvait induire une survie, une prolifération ainsi qu'une migration de ces cellules (Matsumoto et Claesson-Welsh, 2001). Par ailleurs, les effets observés sur les cellules endothéliales ou les autres types cellulaires ne sont pas toujours clairement attribué à l'un ou l'autre de ces récepteurs.

#### 2.1.4.1. Effets paracrines

##### 2.1.4.1.1. Effets sur les cellules endothéliales

Le VEGF a tout d'abord été décrit comme un facteur de perméabilité vasculaire et a été intitulé pour cela VPF ou vascular permeability factor (Senger *et coll.*, 1986; Connolly *et coll.*, 1989). L'administration locale de VEGF entraîne une fenestration de l'endothélium des capillaires, également dans les régions où les capillaires ne sont pas normalement fenêtrés, et est associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire (Roberts et Palade, 1995). Par ailleurs, le VEGF est un agent mitogène des cellules endothéliales des micro- et des macro-vaisseaux sanguins ou lymphatiques, mais n'induit pas ou très peu cet effet avec d'autres types cellulaires (Connolly *et coll.*, 1989; Ferrara et Henzel, 1989; Keck *et coll.*, 1989; Leung *et coll.*, 1989; Plouet *et coll.*, 1989; Conn *et coll.*, 1990; Pepper *et coll.*, 1994). Dans un modèle d'angiogenèse en gel de collagène, l'addition de VEGF induit une angiogenèse, et les cellules endothéliales confluentes envahissent le gel et forment des structures pseudo-capillaires (Pepper *et coll.*, 1992). Le rôle du VEGF dans l'angiogenèse physiologique est primordial. L'application de polymère diffusant du VEGF dans la zone avasculaire de la cornée de lapin suffit à induire la formation de vaisseaux sanguins (Phillips GD *et coll.*, 1994). Dans ce test, la neutralisation de la signalisation du VEGF par un peptide synthétique bloquant l'interaction entre le VEGF et ses récepteurs inhibe la néo-angiogenèse induite par le VEGF (Binetruy-Tournaire *et coll.*, 2000). Par ailleurs, l'induction de l'expression du VEGF augmente la densité de vascularisation dans l'ischémie du membre inférieur (Isner *et coll.*, 1996) et empêche la régression de la vascularisation rétinienne induite par une hyperoxie dans la rétinopathie du prématuré (Alon *et coll.*, 1995).

Au-delà de l'induction d'une néo-vascularisation par angiogenèse, les différentes propriétés du VEGF engendrent une interaction entre les cellules des différents organes qui le produisent et les cellules endothéliales qui expriment ses récepteurs. Notamment, les cellules endothéliales maintiendraient un lien étroit avec les organes de même origine embryonnaire (Coultas *et coll.*, 2005). Dans le foie, les cellules endothéliales activées par le

VEGF favorisent la survie et la prolifération des hépatocytes. En réponse au VEGF, les cellules endothéliales du sinus hépatique sécrètent, de manière dépendante du récepteur VEGFR-1, différents facteurs mitogènes, le facteur de croissance hépatique (HGF) et l'IL6, induisant ainsi une croissance hépatique et protégeant les hépatocytes contre des attaques toxiques *in vivo* (LeCouter *et coll.*, 2003). Dans le pancréas, les cellules endocrines des îlots (telles que les cellules de Langerhans produisant l'insuline) s'associent étroitement avec les cellules endothéliales, sécrétant leurs hormones directement dans le sang. Il semblerait qu'un échange entre les cellules endothéliales et les cellules endocrines s'effectue pour établir un pancréas fonctionnel, notamment via le VEGF et la fenestration des capillaires irriguant (Lammert *et coll.*, 2003). Dans le rein, une régulation fine du taux de VEGF est cruciale pour l'établissement et le maintien de la barrière de filtration glomérulaire. La délétion hétérozygote du VEGF dans les podocytes entraîne une maladie rénale caractérisée par une protéinurie et une endothéliose (décrite habituellement dans la pré-éclampsie), associée à la disparition de la fenestration des capillaires (Eremina *et coll.*, 2003). De même, pour la glande surrénale, l'expression du VEGF est induite par l'ACTH dans les cellules fasciculées bovines et humaines *in vitro* (Gaillard *et coll.*, 2000; Heikkila *et coll.*, 2000). L'administration de dexaméthasone chez la souris inhibe la sécrétion d'ACTH et induit une forte diminution de l'expression du VEGF ainsi que l'altération de l'architecture vasculaire conjointement à la régression du tissu endocrine (Keramidas *et coll.*, 2004). Par ailleurs, le VEGF est capable d'induire *in vitro* et de manière dose-dépendante une vasodilatation, et de produire ainsi une hypotension associée à une tachycardie transitoire (Ku *et coll.*, 1993). Cet effet serait provoqué par de l'oxyde nitrique issu des cellules endothéliales.

#### 2.1.4.1.2. Effets sur les autres types cellulaires

La majorité des études consacrée au VEGF s'est focalisée sur son action biologique sur les cellules endothéliales. Toutefois, son activité sur d'autres types cellulaires a également été décrite. Il est cependant toujours difficile d'évaluer la part de l'effet direct du VEGF versus celle d'un effet indirect via les cellules endothéliales.

Diverses études montrent un effet neuro-protecteur du VEGF pour les cellules de Schwann, les astrocytes et les cellules microgliales (Oosthuysen, 2001). Par ailleurs, le VEGF est impliqué dans la survie et l'activité des cellules chondrogéniques et ostéogéniques dans le métabolisme de l'os. Notamment, il aurait un effet protecteur direct sur les chondrocytes en réponse à un stress hypoxique (Zelzer *et coll.*, 2004). Le VEGF aurait également un rôle important dans la réparation de fracture chez l'animal, pas seulement en induisant une revascularisation de la zone lésée mais également par un effet direct sur les cellules

osseuses. In vitro, le VEGF stimule l'activité d'ostéoblastes et ostéoclastes isolés (Street *et coll.*, 2002). De plus, le VEGF montre un effet inhibiteur de la maturation des cellules présentatrices de l'antigène comme les cellules dendritiques et aurait peu d'effets sur les cellules déjà matures (Gabilovich *et coll.*, 1995). Il a ainsi été suggéré que le VEGF pourrait favoriser la croissance tumorale en empêchant une réaction immunitaire dirigée contre la tumeur, en plus de l'induction de l'angiogenèse tumorale.

#### 2.1.4.2. Effets autocrines

Les récepteurs du VEGF sont majoritairement localisés à la surface des cellules. Cependant, ils peuvent également dans certains cas être exprimés de manière intracellulaire. La structure du récepteur intracellulaire n'est pas encore connue mais semble être peu différente de celle du récepteur complet normalement exprimé à la surface cellulaire (Carmeliet, 2003) (schéma 12). Ces récepteurs intracellulaires peuvent induire, par effet intracrine du VEGF, la survie voire la croissance de cellules souches hématopoïétiques (VEGFR-1 et VEGFR-2) (Gerber *et coll.*, 2002), la survie de cellules de cancer du sein (VEGFR-1) (Lee TH *et coll.*, 2007) ou la survie des cellules endothéliales (VEGFR-2) (Lee S *et coll.*, 2007). Le défaut de VEGF induit l'apoptose des cellules endothéliales ainsi qu'une régression de la vascularisation (Bergers et Benjamin, 2003). Des souris transgéniques comportant une mutation du gène du VEGF uniquement dans les cellules endothéliales montrent qu'une très faible quantité de VEGF, agissant de manière intracrine via le VEGFR-2, est suffisante pour induire la survie des cellules endothéliales et l'homéostasie vasculaire. Ces souris présentent par ailleurs des dysfonctionnements cardiaques sévères et sont sujettes à des événements thrombotiques et des perforations gastro-intestinales. Ces effets secondaires ont été parfois décrits chez des patients traités avec un anticorps anti-VEGF (Eskens et Verweij, 2006; Verheul et Pinedo, 2007).

#### 2.1.5. VEGF et angiogenèse tumorale

La plupart des cellules cancéreuses humaines expriment le VEGF et souvent à des taux élevés. Cette expression est probablement une conséquence des nombreuses et diverses voies génétiques et épigénétiques pouvant induire le VEGF (Kerbel et Folkman, 2002). L'hypoxie, une caractéristique des tumeurs solides, est un facteur d'induction important du VEGF (Semenza, 2003). Dans les glioblastomes et les tumeurs qui présentent des nécroses importantes, l'expression de l'ARNm du VEGF est fortement induite dans les cellules de tumeurs juxtaposées aux zones de nécrose (Shweiki *et coll.*, 1992). Cette observation

suggère qu'une hypoxie locale est un facteur d'induction majeur de l'expression du VEGF dans le microenvironnement de la tumeur. Par ailleurs, des mutations génétiques induisant l'activation de différents oncogènes tout comme la perte ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs peuvent également induire l'expression du VEGF. De plus, Freeman et coll. ont montré que les lymphocytes infiltrant les tumeurs pouvaient également constituer une source de VEGF qui contribuerait à l'angiogenèse tumorale (Freeman *et coll.*, 1995). Comme indiqué dans la 1<sup>ère</sup> partie de l'introduction, différents types cellulaires proches de la tumeur, en plus des cellules tumorales elles-mêmes, contribuent à la production de VEGF favorisant ainsi l'angiogenèse tumorale. Des études d'hybridation in situ, ont montré que le VEGF était surexprimé dans la majorité des tumeurs examinées (pour revue : (Ferrara et Davis-Smyth, 1997)). Seuls des coupes de carcinome lobulaire du sein ou de la papille vésicale n'ont pas montré de surexpression du VEGF (Brown *et coll.*, 1993; Brown *et coll.*, 1995).

Par ailleurs, les récepteurs du VEGF (VEGFR-1 et -2) ou ses co-récepteurs (Nrp-1 et -2), considérés comme des récepteurs spécifiquement exprimés par les cellules endothéliales, se sont avérés également exprimés dans les cellules tumorales et impliqués dans le développement de la tumeur (Boockock *et coll.*, 1995; de Jong *et coll.*, 1998; Lee TH *et coll.*, 2007). L'observation que les cellules de différents types de tumeurs solides expriment les récepteurs du VEGF et produisent également du VEGF indique que le VEGF peut agir comme un facteur de croissance autocrine pour les cellules tumorales (Ellis, 2006). De plus, une augmentation de l'expression du VEGF par la tumeur est considérée comme un facteur de mauvais pronostic. L'élévation du taux de VEGF a été détectée dans le sérum de patients atteints de cancer (Kondo *et coll.*, 1994) et une corrélation a été observée entre l'expression du VEGF et la densité des microvaisseaux dans des coupes de cancer du sein (Toi *et coll.*, 1994). Une étude post-opératoire a montré que le taux de survie sans rechute de patientes qui présentaient des tumeurs riches en VEGF était significativement moins bon que celui des patientes présentant des tumeurs exprimant peu de VEGF. Cette observation suggère que l'expression du VEGF est associée à une stimulation de l'angiogenèse et des rechutes précoces dans le cancer du sein primaire (Toi *et coll.*, 1994). Une corrélation similaire a été décrite pour les patients présentant un carcinome gastrique (Maeda *et coll.*, 1996). L'expression du VEGF, mise en évidence par marquage de coupes de tumeurs, est corrélée à la vascularisation, aux métastases ganglionnaires et aux métastases hépatiques. De plus, les tumeurs positives pour le VEGF sont de moins bon pronostic que les tumeurs négatives. Par ailleurs, dans les tumeurs où le VEGF et le PlGF sont co-exprimés, seul l'expression du VEGF corrèle avec le degré de malignité et de vascularisation de ces tumeurs (Viglietto *et coll.*, 1995; Viglietto *et coll.*, 1996).

L'angiogenèse tumorale semble donc fortement dépendante de l'expression du VEGF. En

effet, l'inactivation du gène dans des cellules souches embryonnaires réduit de manière importante la capacité de ces cellules à induire des tumeurs après transplantation chez la souris nude (Ferrara *et coll.*, 1996). De plus, l'utilisation d'anticorps anti-VEGF spécifiques, capables d'inhiber l'angiogenèse induite par le VEGF *in vitro* et *in vivo*, a fourni des évidences directes quant à l'implication du VEGF dans l'angiogenèse tumorale et la tumorigenèse (Kim KJ *et coll.*, 1992). L'administration d'anticorps dirigés contre le VEGF réduit fortement la croissance et la vascularisation de tumeurs issues de l'implantation de différentes lignées tumorales, alors que cet anticorps n'a pas d'activité inhibitrice sur la prolifération *in vitro* de ces cellules (Kim KJ *et coll.*, 1993). Par la suite, de nombreuses études ont montré le même effet sur d'autres types tumoraux (pour revue (Ferrara et Davis-Smyth, 1997)). L'importance du VEGF et de sa voie de signalisation dans le processus d'angiogenèse tumorale a été confirmée par l'utilisation d'un récepteur VEGFR-2 mutant. Ce récepteur dominant négatif inactif a engendré une inhibition de la croissance tumorale de différentes lignées *in vivo* (Millauer *et coll.*, 1996). A l'inverse, la surexpression du VEGF dans la peau de souris transgéniques induit l'angiogenèse dans la carcinogenèse de l'épiderme chez la souris ainsi qu'un développement tumoral accéléré (Larcher *et coll.*, 1998).

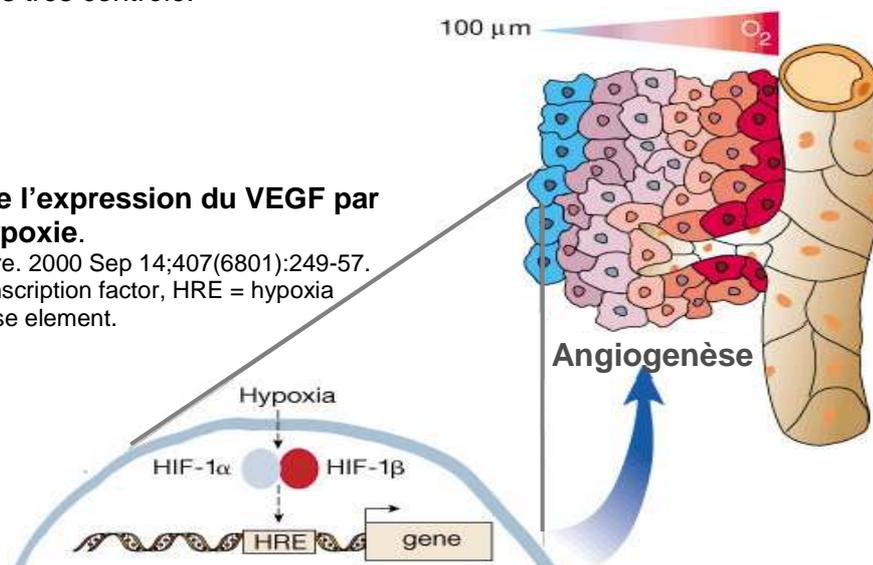
Par ailleurs, le VEGF aurait également un rôle dans le recrutement de progéniteurs endothéliaux circulants issus de la moelle osseuse et la vascularisation post-natale (Asahara *et coll.*, 1999). Au cours de la progression tumorale, le taux de VEGF circulant augmente et corrèle avec l'augmentation du nombre de progéniteurs endothéliaux dans la circulation.

Cependant, l'angiogenèse tumorale est différente de l'angiogenèse physiologique et mène, comme nous avons pu le voir, à un réseau vasculaire anormal et peu fonctionnel. Ce phénomène serait la conséquence d'une expression anarchique des facteurs pro-angiogènes et notamment du VEGF. En effet, au niveau physiologique, l'expression du VEGF est un processus très contrôlé.

#### Schéma 14 : Induction de l'expression du VEGF par l'hypoxie.

D'après Carmeliet et Jain Nature. 2000 Sep 14;407(6801):249-57.

HIF = hypoxia inducible transcription factor, HRE = hypoxia response element.



## 2.2. Régulation de l'expression du VEGF

### 2.2.1. Régulation de la transcription

L'expression du gène VEGF est régulée par diverses conditions, notamment l'hypoxie, la déplétion en glucose, la diminution du pH, les cytokines inflammatoires (ex. : IL-6), les facteurs de croissance (ex. : bFGF), les hormones (les oestrogènes et les androgènes) et les chimiokines (ex. : stromal cell derived factor) (Kerbel, 2008).

En effet, l'expression du VEGF peut être hormono-dépendante. Notamment, le VEGF est un facteur clef de la néovascularisation des follicules ovariens, du corps jaune et de la régénération de l'endomètre (Charnock-Jones *et coll.*, 1993; Ferrara *et coll.*, 1998). Les œstrogènes et la progestérone induisent l'expression du VEGF dans les cellules de l'endomètre via des éléments de réponse spécifiques sur son promoteur (Cullinan-Bove et Koos, 1993; Perrot-Appanat *et coll.*, 2000). Par ailleurs, la castration chez le rat induit une régression de la prostate et de son réseau vasculaire, suggérant que la vascularisation de cet organe est sous le contrôle des androgènes (Haggstrom *et coll.*, 1999). En effet, la testostérone induit la régénération de l'organe et l'expression du VEGF alors que la castration diminue son expression.

Néanmoins, le facteur régulateur prépondérant de l'expression du VEGF est l'hypoxie (Shweiki *et coll.*, 1992) qui induit fortement la transcription et la stabilisation de l'ARNm du VEGF (Dor *et coll.*, 2001). L'analyse du promoteur du VEGF a permis de mettre en évidence l'existence d'un élément de réponse à l'hypoxie (HRE ou hypoxia response element) présent également sur le promoteur de l'érythropoïétine (Levy JR *et coll.*, 1995). Cette séquence est impliquée dans la transcription en réponse à l'hypoxie par le recrutement du facteur de transcription HIF-1 (hypoxia-inducible transcription factor) (schéma 14). L'implication de HIF-1 dans la régulation de la transcription du VEGF, en réponse à l'hypoxie, a ensuite été confirmée. D'une part la transcription du VEGF n'est pas induite en réponse à une hypoxie dans des cellules exprimant une forme dominante négative de HIF-1, et d'autre part, la liaison de HIF-1 sur le promoteur du VEGF a été caractérisée (Forsythe *et coll.*, 1996). Le complexe de transcription HIF-1 est un hétérodimère. Son activité est assurée par l'association d'une sous-unité nucléaire HIF-1β dont l'expression est constitutive, et d'une sous-unité HIF-1α, dont l'expression est régulée par l'hypoxie et qui représente la sous-unité régulatrice (Pugh et Ratcliffe, 2003). En normoxie, la demi-vie de la protéine HIF-1α est très courte. Elle interagit avec la protéine VHL (Von Hippel Lindau) qui présente

une activité E3 ubiquitine ligase, ce qui induit son ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome (Cockman *et coll.*, 2000). En hypoxie, l'ubiquitination de HIF-1alpha est inhibée et l'expression de HIF-1alpha est rétablie. HIF1-alpha est alors déplacée du cytoplasme vers le noyau et l'association avec HIF1-béta permet alors l'induction de la transcription du VEGF. Les mécanismes moléculaires qui permettent d'enregistrer les changements de pression d'oxygène au sein des cellules impliquent l'hydroxylation d'un résidu proline (P564) de HIF1alpha, qui contrôle son interaction avec VHL et donc sa dégradation par le protéasome (Ivan *et coll.*, 2001; Jaakkola *et coll.*, 2001). Un second résidu proline (P402) a également été impliqué dans l'interaction entre HIF1alpha et VHL (Masson *et coll.*, 2001). L'hydroxylation spécifique de résidus aminés de HIF1alpha serait donc le moyen de contrôler la stabilité de cette protéine en fonction de la teneur en oxygène locale et ainsi de permettre l'augmentation de la transcription du VEGF en hypoxie. Trois prolyl-hydroxylases (PHD1-3) capables d'hydroxyler *in vitro* les résidus prolines de HIF1alpha impliqués dans son interaction avec VHL ont été identifiées chez les mammifères (Epstein *et coll.*, 2001). Parmi celles-ci, il semble que la PHD2 soit responsable de la faible expression de la protéine HIF1alpha en normoxie et puisse représenter le senseur majeur de la teneur en oxygène (Berra *et coll.*, 2003). Par ailleurs, l'hydroxylation d'un résidu asparagine inhibe l'interaction de HIF1alpha avec son co-activateur de transcription p300 et empêche ainsi la transcription de ses gènes cibles (Lando *et coll.*, 2002). De manière intéressante, la mutation ou la délétion du gène VHL a été décrite chez les patients atteints de la maladie de Von Hippel-Lindau, un syndrome regroupant de multiples cancers caractérisés par le développement de tumeurs bénignes ou malignes fortement vascularisées parmi lesquelles : des hémangioblastomes de la rétine ou du système nerveux central, des phéochromocytomes, des tumeurs pancréatiques neuro-endocrines ou des carcinomes rénaux (Richard *et coll.*, 2003). La mutation ou la délétion de ce gène seraient également impliquées dans certains cancers sporadiques (Gimenez-Bachs *et coll.*, 2007).

L'analyse de l'expression du VEGF en hypoxie révèle que l'induction de la transcription du VEGF n'est pas le seul processus impliqué dans cette régulation (Shima *et coll.*, 1996). En effet, il a été démontré que le taux de transcription du VEGF en hypoxie était multiplié par 3 alors que le taux d'ARNm était multiplié par 12 (Levy JR *et coll.*, 1995). Cette différence peut être expliquée par une modulation de la stabilité de l'ARNm du VEGF qui a été proposée comme un processus important du contrôle de l'expression du VEGF (Levy AP *et coll.*, 1996). Ce mécanisme de modulation de la stabilité de l'ARNm du VEGF a également été évoqué dans l'augmentation de son expression en réponse à une déplétion en glucose (Iida *et coll.*, 2002).

## 2.2.2. Régulations post-transcriptionnelles

### 2.2.2.1. Régulation de la stabilité de l'ARNm

La réponse cellulaire à des signaux physiologiques et environnementaux nécessite une régulation fine et coordonnée de l'expression des gènes. Cette régulation peut avoir lieu à différents niveaux. Bien que la transcription soit un point de contrôle majeur, les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle jouent également un rôle important dans le contrôle de l'expression des gènes. En particulier, la régulation de la stabilité des ARNm impliquant des séquences en cis et des facteurs en trans permet d'ajuster rapidement le niveau d'expression d'un gène aux besoins de la cellule. Parmi les séquences en cis impliquées dans la modulation de la stabilité des ARNm, les éléments riches en AU (ARE ou AU rich element) sont les plus étudiés. Ils ont été identifiés dans la région 3' non traduite ou 3'-UTR (3' untranslated region) des ARNm à demi-vie courte. Les éléments ARE sont en général composés de plusieurs séquences consensus pentamériques AUUUA, nonamériques UAUUU(A/U)(A/U) ou simplement des motifs riches en U (Chen et Shyu, 1995). Plusieurs protéines de liaison de ces domaines ARE ont été identifiées comme influençant le renouvellement des ARNm mais les mécanismes exacts impliqués ne sont pas encore complètement compris. De manière intéressante, ces séquences ARE peuvent induire autant une stabilisation qu'une déstabilisation des ARNm (Koeller *et coll.*, 1989).

#### 2.2.2.1.1. Les protéines stabilisatrices et déstabilisatrices

A ce jour, les protéines déstabilisatrices les plus étudiées sont AUF1 et la famille de protéines TIS11 (Tetra-décanoyl Phorbol Acetate-induced-sequence 11). Par ailleurs, une famille de protéines stabilisatrices des ARNm a été décrite, il s'agit de la famille de protéines ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Vision) dont le prototype HuR est exprimé de façon ubiquitaire.

La protéine AUF1 également appelée hnRNP D (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D), se lie aux séquences ARE des régions 3'-UTR des ARNm et induit une dégradation de ces ARNm, *in vitro* et *in vivo* (Brewer G, 1991; Loflin *et coll.*, 1999). AUF1 est exprimée sous forme de quatre isoformes qui résultent d'un épissage alternatif de son transcrite. Ces

différentes isoformes présentent des caractéristiques différentes de liaison aux ARNm, d'ubiquitinylation et de stabilité (Lu et Schneider, 2004). Le rôle déstabilisateur d'AUF1 *in vivo* est controversé. Dans les cellules NIH 3T3, la surexpression des différentes isoformes de AUF1 induit la stabilisation des ARNm via les séquences ARE. Cet effet stabilisateur impliquerait les séquences ARE de classe II. En fait, il semble que la régulation de la stabilité des ARNm par AUF1 via les séquences ARE dépende du contexte cellulaire et des isoformes considérées (Xu *et coll.*, 2001). De plus, très récemment, AUF1 a également été impliquée dans la stabilisation de l'ARNm de l'IL8 dans la salive (Palanisamy *et coll.*, 2008). Par ailleurs, la surexpression de AUF1 dans des souris transgéniques a démontré son implication dans la tumorigenèse (Gouble *et coll.*, 2002), et sa surexpression a également été observée dans des tumeurs pulmonaires (Blaxall *et coll.*, 2000).

La famille TIS11 est composée de trois protéines : TTP (*ZFP36*), TIS11b (*ZFP36L1*) et TIS11d (*ZFP36L2*), décrites toutes les trois pour leur capacité à induire une déstabilisation des ARNm via les séquences ARE (Carballo *et coll.*, 1998; Lai *et coll.*, 2000; Stoecklin *et coll.*, 2002). Notre laboratoire a été le premier à montrer l'implication de l'un des membres de cette famille, la protéine TIS11b, dans la déstabilisation de l'ARNm du VEGF (Chinn *et coll.*, 2002; Ciais *et coll.*, 2004). Par la suite, l'implication de TTP a également été rapportée dans la régulation de la stabilité de ce transcrite (Essafi-Benkhadir *et coll.*, 2007). Les caractéristiques et propriétés de la famille TIS11 seront développées dans la 3<sup>ème</sup> partie de cette introduction.

Les membres de la famille ELAV : HuA/R, HuB, HuC et HuD, initialement identifiés pour leur action dans le développement neuronal chez la drosophile, ont été décrits comme des ligands sélectifs des séquences ARE (Ma *et coll.*, 1996). Alors que HuR est une protéine ubiquitaire, HuB, HuC et HuD, sont exprimées spécifiquement dans le tissu neuronal, et sont des antigènes cibles d'un anticorps auto-immun associé à un syndrome auto-immun, le Syndrome de Hu (Keene, 1999). La surexpression des protéines HuR et HuB induit une stabilisation des ARNm, et notamment celle de l'ARNm du VEGF (Levy NS *et coll.*, 1998), ainsi que celle d'ARNm rapporteurs contenant des séquences ARE définies (Fan et Steitz, 1998; Peng *et coll.*, 1998). Ces quatre protéines présentent de fortes homologues de séquence et de structure, et contiennent trois motifs RRM (RNA recognition motif). Les motifs RRM1 et RRM2 sont impliqués dans la liaison des séquences ARE et le motif RRM3 est impliqué dans la liaison à la queue poly(A) (Brennan et Steitz, 2001). La surexpression de HuR déléetée du motif RRM3, ne permet plus à la protéine d'exercer son activité stabilisatrice. L'importance de ce motif dans le processus de stabilisation suggère que

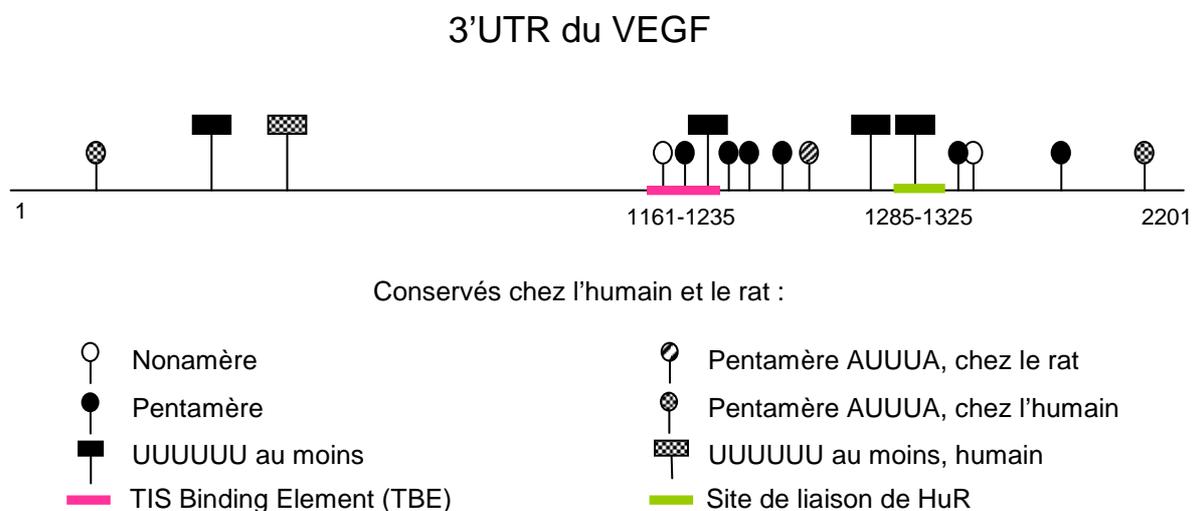
l'interaction entre HuR et la queue poly(A) est nécessaire à la stabilisation du transcrit (Fan et Steitz, 1998).

La protéine HuR a également été décrite pour sa capacité à naviguer entre le noyau et le cytoplasme (Fan et Steitz, 1998). Plus récemment, notre laboratoire a confirmé cette translocation du noyau vers le cytoplasme, dans le contexte d'une réponse des cellules primaires corticosurréaliennes bovines à une stimulation par l'hormone hypophysaire ACTH. Cette translocation s'accompagne d'une stabilisation de l'ARNm du VEGF et est nécessaire à l'induction du taux d'ARNm du VEGF par l'ACTH (Cherradi *et coll.*, 2006).

Par ailleurs, comme pour AUF1, la surexpression de HuR a également été observée dans des tumeurs malignes du cerveau (Nabors *et coll.*, 2001) et du poumon (Blaxall *et coll.*, 2000).

### 2.2.2.1.2. Les séquences ARE et la région 3'-UTR de l'ARNm du VEGF

L'identification des séquences de l'ARNm du VEGF responsables de sa demi-vie courte (1 à 2 h) a démontré que la région 3'-UTR était suffisante pour déclencher le renouvellement rapide, *in vitro*, d'un ARNm rapporteur caractérisé normalement par une demi-vie longue (Shima *et coll.*, 1996). En effet, l'étude de la région 3'-UTR du VEGF a révélé de nombreux motifs connus pour leur implication dans la régulation de la stabilité de l'ARNm (Levy JR *et coll.*, 1995). En particulier deux séquences consensus UUAUUUA(U/A)(U/A), ainsi que cinq motifs AUUUA ont été identifiés (Claffey *et coll.*, 1998) (schéma 15).

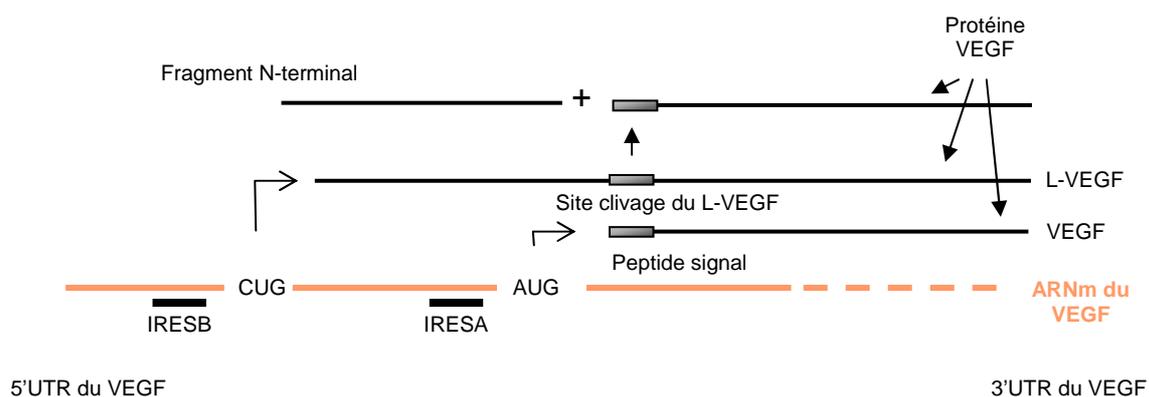


**Schéma 15 : Séquences riches en AU de la région 3'UTR de l'ARNm du VEGF.**  
Les numéros des nucléotides indiqués correspondent à la séquence du 3'UTR chez le rat.

L'étude de la région 3'-UTR de l'ARNm du VEGF de rat a conduit notre équipe à montrer que TIS11b interagit avec un fragment de 75 paires de bases dans la région 3'-UTR (2201 paires de bases) de l'ARNm de VEGF et diminue son expression (Ciais *et coll.*, 2004). Ce fragment a été appelé TBE pour TIS Binding Element. Il contient deux motifs consensus de liaison pour TIS11b : un nonamère UUAUUAAU et un pentamère AUUUA, et est situé entre les bases 1161 et 1235. Le site de liaison de HuR a été décrit comme étant très proche du TBE : entre les bases 1285 et 1325 (Goldberg-Cohen *et coll.*, 2002). Une étude ultérieure de notre laboratoire a montré que les deux protéines TIS11b et HuR étaient capables de se lier en même temps à l'ARNm du VEGF. Néanmoins, la surexpression de TIS11b déplace HuR de sa cible et induit une déstabilisation de l'ARNm du VEGF (Cherradi *et coll.*, 2006).

Plusieurs classifications des séquences ARE ont été proposées et regroupent les différentes catégories de séquences ARE. Celles-ci ainsi que les mécanismes de déstabilisation de l'ARNm du VEGF par la famille de protéines TIS11 dépendants de ces séquences, seront explicités dans la 3<sup>ème</sup> partie de cette introduction. Toutefois, ces classifications placent la région 3'UTR du VEGF dans la classe II, caractérisée par la présence de motifs AUUUA en tandem (Wilusz *et coll.*, 2001).

Un niveau de régulation supplémentaire peut être amené par l'existence de plusieurs sites de polyadénylation dans la région 3'-UTR de l'ARNm du VEGF, qui peuvent inclure ou non dans le transcrit, les séquences ARE modulatrices de la stabilité de l'ARNm (Dibbens *et coll.*, 2001). L'analyse de la région 3'-UTR de l'ARNm du VEGF de rat a montré quatre sites potentiels de polyadénylation (Levy JR *et coll.*, 1995). Le site le plus utilisé serait situé 1,9 kb en aval du codon stop (Conn *et coll.*, 1990). Un deuxième site engendre un transcrit d'environ 2,2 kb (Shima *et coll.*, 1996). Il y a 82 % d'homologie entre de la région 3'-UTR humaine et la région 3'-UTR de rat. Les 4 sites de polyadénylation ainsi que les régions ARE nonamériques sont conservés entre ces deux espèces (Levy NS *et coll.*, 1997). En revanche, chez la souris, seuls deux sites de polyadénylation sont utilisés, et il s'avère que le site induisant le transcrit le plus long est majoritairement utilisé, que ce soit dans des conditions d'hypoxie ou de normoxie (Dibbens *et coll.*, 2001).



**Schéma 16 : La traduction alternative de l'ARNm du VEGF.**

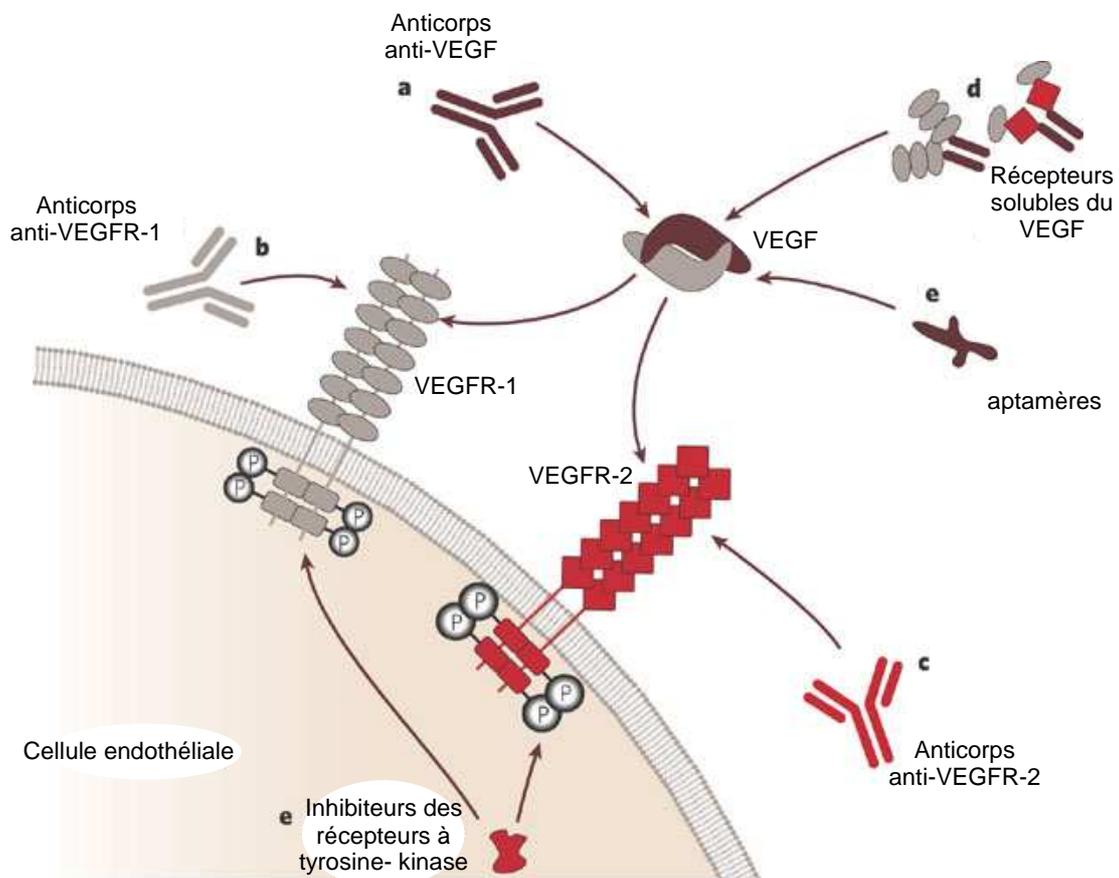
### 2.2.2.2. Régulation de la traduction

L'initiation de la traduction de la protéine VEGF peut avoir lieu en différents sites. En effet, une autre isoforme du VEGF que celles exposées précédemment, a également été décrite (schéma 16). Il s'agit du L-VEGF (large VEGF), qui n'est pas issu cette fois d'un épissage alternatif, mais de l'utilisation d'un codon d'initiation CUG, situé en amont du codon ATG classiquement utilisé (Huez *et coll.*, 2001). Cette initiation de traduction alternative est gouvernée par un IRES (Internal Ribosomal Entry Site). Deux IRES ont été décrits dans la partie 5' non traduite (5'UTR) de l'ARNm du VEGF. L'IRES A, placé en amont du codon d'initiation AUG a été le plus communément identifié dans l'initiation de la traduction de la protéine VEGF. Récemment, une étude a montré l'implication d'un second IRES, l'IRES B, situé en amont de l'IRES A et d'une séquence CUG, qui se comporte comme un site d'initiation alternatif de la traduction *in vivo*, et produisant une nouvelle isoforme du VEGF : le L-VEGF (Huez *et coll.*, 2001). Cette nouvelle isoforme est plus longue de 206 acides aminés que le VEGF initié au codon ATG. Des modifications post-traductionnelles induisent le clivage protéolytique de cette protéine L-VEGF et engendrent un fragment N-terminal de 206 acides aminés séquestré dans l'appareil de Golgi, et un fragment C-terminal correspondant à la protéine VEGF initiée au codon ATG et sécrété par la cellule. Le L-VEGF est exprimé dans des tissus murins et humains qu'ils soient sains ou tumoraux (Huez *et coll.*, 2001; Rosenbaum-Dekel *et coll.*, 2005).

## 2.3. Thérapies anti-angiogènes et VEGF

Il est relativement difficile d'établir une classification des différentes stratégies dirigées contre la vascularisation tumorale. Toutefois, elles ont été divisées en deux catégories principales : les stratégies inhibant la formation des néo-vaisseaux tumoraux, et les stratégies ciblant les vaisseaux déjà établis (Siemann *et coll.*, 2005). Les voies de signalisation induisant l'angiogenèse et impliquant le VEGF et ses récepteurs s'avèrent également impliquées dans la survie des cellules endothéliales formant les vaisseaux réduisant ainsi la frontière entre ces deux catégories stratégiques. De plus, nous avons également pu voir, que les cellules tumorales et les cellules endothéliales ne sont pas les seuls types cellulaires à être impliqués dans l'angiogenèse tumorale, mais que de nombreux types cellulaires environnant la tumeur participent également à cette néo-vascularisation. Cependant, la cible principale de ces différentes stratégies reste en définitive la cellule endothéliale. En effet, la néo-angiogenèse tumorale nécessite l'induction de la prolifération des cellules endothéliales par un agent

mitogène spécifique ou non (Browder *et coll.*, 2000) et le maintien de la vasculature par leur survie ou leur adhésion entre elles. Les agents anti-angiogènes peuvent donc cibler la production de ces agents mitogènes endothéliaux, les agents mitogènes eux-mêmes, leurs récepteurs, ou encore les voies de signalisation associées et les molécules d'adhésion cellulaire, comme les intégrines.



**Schéma 17 : Exemple de stratégies anti-angiogènes dirigées contre le VEGF ou ses récepteurs.**

D'après Ferrara et Kerbel Nature. 2005 Dec 15;438(7070):967-74.

### 2.3.1. Les différentes thérapies ciblant le VEGF et leurs effets secondaires

La recherche de thérapies anti-angiogènes pour le traitement des tumeurs a été initiée par une hypothèse émise par Judah Folkman en 1971 (Folkman, 1971). Il aura fallu 33 années pour que le premier inhibiteur de l'angiogenèse soit approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) (Ferrara *et coll.*, 2004). Il s'agit du bevacizumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le VEGF. Cet anticorps a en effet montré, en combinaison avec une chimiothérapie conventionnelle, un bénéfice de survie lors d'un essai clinique randomisé de phase 3 dans le traitement en première ligne du cancer colorectal métastatique (Hurwitz, 2004). Depuis, le bevacizumab a reçu les autorisations dans le traitement en première ligne du cancer du poumon non à petites cellules à un stade avancé, toujours associé à une chimiothérapie standard (Sandler A *et coll.*, 2006) ainsi que dans le traitement du cancer du sein métastatique et du cancer du rein avancé et/ou métastatique (Escudier *et coll.*, 2007b; Miller K *et coll.*, 2007). En mai 2008, près de 360 essais sur le bevacizumab étaient recensés selon le National Cancer Institute.

Deux autres drogues anti-angiogènes ont également reçu des autorisations de mise sur le marché, le sorafenib et le sunitinib, qui sont de petites molécules inhibitrices de l'activité tyrosine kinase des récepteurs de plusieurs facteurs de croissance, dont les récepteurs du VEGF et les récepteurs du PDGF (platelet-derived growth factor) (Faivre *et coll.*, 2007). Ces deux molécules, utilisées seules, ont montré un bénéfice dans le traitement du cancer rénal métastatique (Motzer, 2006; Escudier *et coll.*, 2007a).

Les bénéfices de survie de ces traitements anti-angiogènes sont relativement modestes, généralement comptés en mois, très coûteux, et comportent des effets secondaires (Eskens et Verweij, 2006; Verheul et Pinedo, 2007). Les études se sont surtout portées sur la famille de facteurs de croissance du VEGF et des récepteurs à tyrosine-kinase qui médient leurs effets pro-angiogènes (Ferrara, 2002; Hicklin et Ellis, 2005) (schéma 17). D'autres types de thérapies anti-angiogènes sont également à l'étude, parfois même dans des essais cliniques de phase III, et ont fait l'objet d'une revue récente, et la plupart sont référencés sur le site internet du « National Cancer Institute » à l'adresse suivante : <http://www.nci.nih.gov/clinicaltrials> (Dome *et coll.*, 2007) (schéma 18).

Bien que le bevacizumab soit généralement bien toléré, des effets secondaires sérieux et inhabituels ont été notés. Le traitement a été associé à des perforations gastro-intestinales et des problèmes de cicatrisation chez 2 % des patients. De plus, l'incidence des complications

| <b>Agents</b>   | <b>Cible/mécanisme d'action</b>   |
|---|---|
| <b>Agents anti-VEGF</b>   |   |
| Bevacizumab   | Anticorps anti-VEGF-A   |
| VEGF-trap   | Liaison aux VEGF-A, PlGF, VEGF-B  |
| VEGF-anti-sens  | VEGF-A, VEGF-C, VEGF-D  |
| <b>Agents ciblant les récepteurs du VEGF et autres récepteurs à tyrosine kinase</b> |   |
| IMC-1C11  | Anticorps anti-VEGFR2   |
| ZD6474  | VEGFR-2, EGFR, RET  |
| PTK787/ZK222584 (vatalanib)   | VEGFR-1, -2, -3; PDGFR-β, c-Kit   |
| BAY 43-9006 (sorafenib)   | VEGFR-2, -3; PDGFR, RET, c-Kit, Raf   |
| SU11248 (sunitinib)   | VEGFR-1, -2; PDGFR, FLT3, c-Kit   |
| <b>Signalisation des intégrines</b>   |   |
| EMD 121974 (Cilengitide)  | Mimétisme du domaine peptidique de reconnaissance RGD commun aux ligands des intégrines alpha-v |
| MEDI-522 (Vitaxin)  | Anticorps anti-alpha-v-béta-3   |
| AE-941  | Inhibiteurs des MMP-2, -9, -12, et VEGFR-2  |
| Marimastat, Bay-12-9566 ou AG3340   | MMP2/9  |
| Endostatine   | Intégrine alpha-5-béta-1  |

**Schéma 18 : Exemples d'agents anti-angiogènes en développement clinique.**

D'après Dôme et coll. Am J Pathol. 2007 Jan;170(1):1-15.

thromboemboliques artérielles a été multipliée par 2 chez les patients à hauts risques, de 65 ans et plus, ayant déjà subi des incidents thromboemboliques par rapport aux patients recevant la chimiothérapie seule. Bien que les mécanismes à l'origine de ces troubles n'aient pas été complètement élucidés, il est probable que l'effet cytotoxique des agents chimiothérapeutiques soit exacerbé par le blocage du VEGF (Hurwitz, 2004). De plus, des effets secondaires assez proches ont pu être observés pour le sorafenib et le sunitinib (Escudier *et coll.*, 2007a; Faivre *et coll.*, 2007). Notamment, il a été rapporté des toxicités gastro-intestinales, de l'hypertension, de l'ischémie cardiaque, de la fatigue, et des réactions cutanées au niveau des mains et des pieds. Ces deux molécules étant utilisées seules, il est possible de déterminer la part des effets secondaires dus aux inhibiteurs de la voie de signalisation du VEGF et de ses récepteurs. Par ailleurs, la petite taille des inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase des récepteurs leur permet de pénétrer à l'intérieur de la cellule et donc d'avoir un effet sur les récepteurs exprimés de manière intracellulaire (Kerbel, 2008). Ces propriétés peuvent avoir des conséquences cliniques dans la mesure où ces récepteurs intracellulaires semblent être impliqués majoritairement dans la survie des cellules qui les expriment, et notamment participer à la myélosuppression (Gerber *et coll.*, 2002) ou à l'atteinte de l'homéostasie vasculaire nécessaire au bon fonctionnement de nombreux organes (Lee S *et coll.*, 2007).

### 2.3.2. Les résistances aux traitements anti-angiogènes

De nombreux patients traités avec des inhibiteurs du VEGF, et particulièrement en association avec une chimiothérapie, ont une espérance de vie plus longue mais décèdent en définitive de leur pathologie. Le blocage du VEGF par le bevacizumab ou par son précurseur murin inhibe significativement l'angiogenèse et la croissance de xénogreffes humaines chez la souris (Gerber et Ferrara, 2005). Cependant, le degré d'inhibition varie selon la lignée de cellules tumorales et les effets inhibiteurs sont plus prononcés lorsque le traitement est débuté à un stade précoce de la croissance tumorale. Les événements moléculaires et cellulaires à l'origine de la résistance aux anticorps anti-VEGF ne sont pas complètement compris.

Les résistances tumorales intrinsèques et acquises envers les thérapies anti-angiogènes sont des problèmes cliniques significatifs, et des études pré-cliniques ont commencé à éclaircir certains mécanismes de résistance (Miller KD *et coll.*, 2003) (schéma 19). Il a été montré que les lignées de cellules tumorales de souris résistantes aux anticorps anti-VEGF

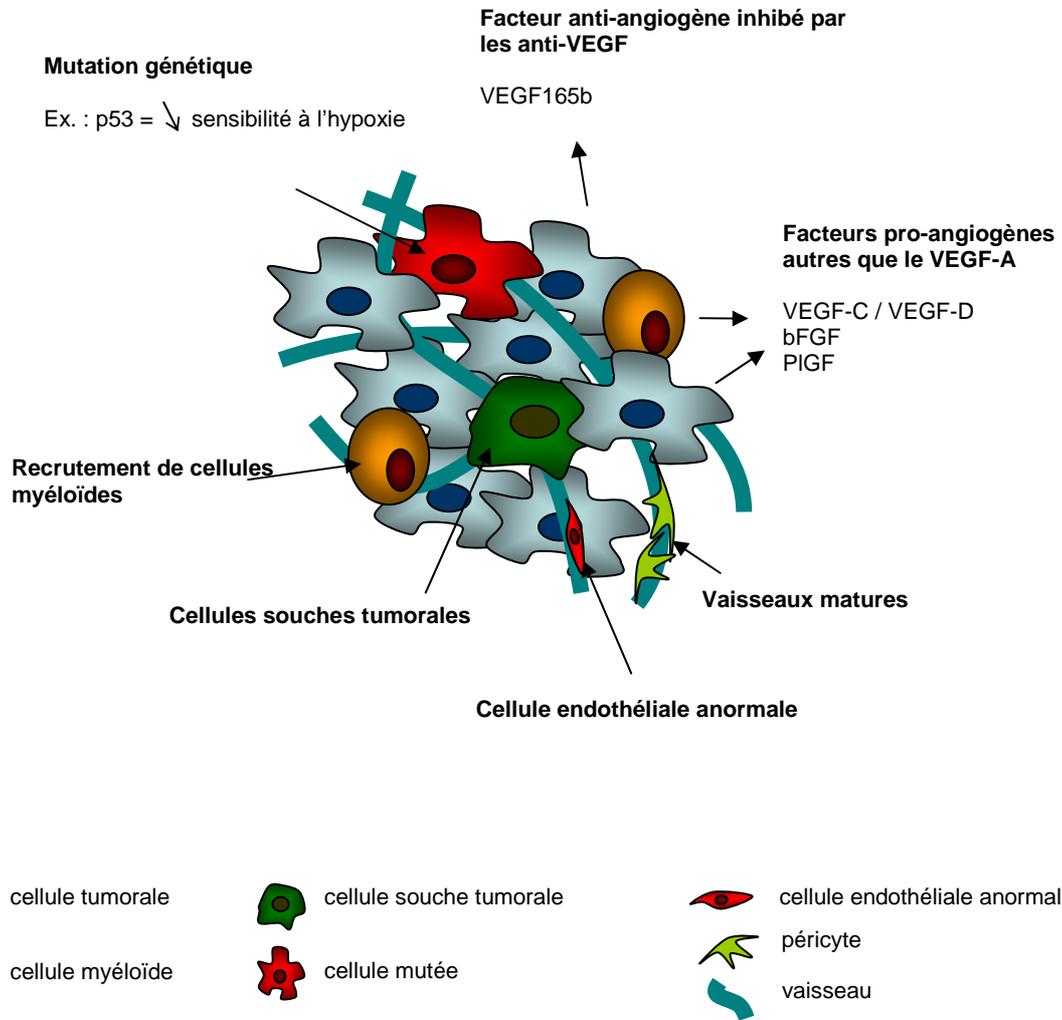


Schéma 19 : Exemples de résistances aux traitements anti-VEGF ou anti-angiogènes.

étaient colonisées par des cellules dérivées de la moelle osseuse CD11b+Gr1+, lorsqu'elles sont transplantées chez la souris (Shojaei *et coll.*, 2007). Lorsque des cellules tumorales sensibles aux anticorps anti-VEGF sont mélangées à ces cellules résistantes et transplantées chez une autre souris, la tumeur transplantée résiste aux anticorps anti-VEGF, toujours par le recrutement des cellules myéloïdes. Ces dernières induiraient une résistance par la sécrétion de facteurs pro-angiogènes, remplaçant le VEGF.

Il apparaît qu'au cours de la maladie et de son traitement, le VEGF pourrait être substitué par d'autres facteurs angiogènes (Ferrara, 2005) utilisant des voies de signalisation différentes de celle du VEGF ou d'autres membres de la famille. Notamment, les facteurs lymphangiogéniques, VEGF-C et VEGF-D, seraient capables d'activer le récepteur VEGFR-2, après leur clivage protéolytique (Alitalo *et coll.*, 2005). Par ailleurs, après un traitement avec un anticorps anti-VEGFR-2, le taux de bFGF (fibroblast growth factor), facteur stimulateur de l'angiogenèse, est augmenté, probablement en réponse à l'hypoxie induite par le traitement (Casanovas *et coll.*, 2005). Chez l'homme, le traitement par le bevacizumab augmente le taux circulant de PlGF (Willett *et coll.*, 2005). De même, l'utilisation du sunitinib peut induire une augmentation des taux circulants de PlGF et de VEGF, qui reviennent à la normale entre deux périodes de traitement (Motzer, 2006). Ces derniers résultats peuvent être reproduits chez la souris en absence d'une tumeur, indiquant que c'est l'inhibition des récepteurs à tyrosine kinase qui induit cette augmentation (Ebos *et coll.*, 2007).

Outre la redondance des facteurs de croissance pro-angiogènes, d'autres mécanismes de résistance ont été évoqués, comme la présence dans le microenvironnement de la tumeur de facteurs anti-apoptiques ou de facteurs de survie, la difficulté à établir une dose et un protocole thérapeutique efficace, la sélection de variants tumoraux résistants à l'hypoxie et donc moins dépendant de l'angiogenèse, ainsi que le remodelage des vaisseaux tumoraux immatures en vaisseaux matures et stabilisés, moins sensibles aux thérapies anti-angiogènes (Kerbel *et coll.*, 2001; Sweeney *et coll.*, 2003; Glade Bender *et coll.*, 2004).

Une résistance peut également se développer via la sélection et l'invasion de la tumeur par des cellules comportant une mutation de gènes tels que p53, les rendant moins sensibles à l'hypoxie (Yu JL *et coll.*, 2002a). Ces variants seraient moins dépendant d'un apport en oxygène par des vaisseaux nouvellement formés que les cellules tumorales ne comportant pas de mutations. Cette résistance à l'hypoxie peut également être induite par un traitement inefficace. En effet, Browder *et coll.* utilisent des transplantations successives chez la souris, associées à un traitement anti-angiogène insuffisant, pour créer un modèle d'étude de lignée cellulaire tumorale résistante (Browder *et coll.*, 2000).

Par ailleurs, le remodelage des vaisseaux associés à la tumeur a une conséquence sur les thérapies anti-angiogènes et peuvent être une cause de résistance (Glade Bender *et coll.*,

2004). Les vaisseaux matures sont plus résistants aux traitements anti-angiogènes qui ciblent habituellement les vaisseaux relativement immatures (Benjamin LE *et coll.*, 1999). En effet, les vaisseaux nouvellement formés, qu'ils soient associés à une tumeur ou non, sont particulièrement sensibles à une inhibition du VEGF alors que des vaisseaux matures, recouverts de péricytes et de la matrice extracellulaire seraient plus résistants aux inhibiteurs du VEGF comme aux autres agents anti-angiogènes (Bergers et Benjamin, 2003).

Par ailleurs, il a été décrit que les cellules endothéliales associées aux tumeurs pouvaient, dans certains cas, être structurellement et fonctionnellement anormales. Hida et coll. ont montré que des cellules endothéliales murines, isolées de xénogreffes de tumeurs humaines, comportaient de nombreuses anomalies cytogénétiques (Hida, 2004). De plus, Streubel et coll. ont rapporté qu'un pourcentage significatif de cellules endothéliales issues de lymphome à cellules B humain, comportaient des anomalies chromosomiques spécifiques des lymphomes, suggérant une parenté entre les cellules tumorales et les cellules endothéliales tumorales, du moins dans ce type de tumeur (Streubel *et coll.*, 2004). Ces cellules endothéliales anormales pourraient être résistantes aux traitements anti-angiogènes.

Des études ont identifié dans la tumeur, une population minoritaire de cellules qui auraient les caractéristiques de cellules souches cancéreuses initiatrices de tumeurs (Lapidot *et coll.*, 1994; Al-Hajj *et coll.*, 2003; Marx, 2003). Ces cellules sont suspectées de diriger la croissance de la tumeur et d'être la source des résistances aux traitements. La transplantation d'une très petite quantité de ces cellules montre d'importants taux de réussite de prise tumorale alors que la transplantation d'un grand nombre de cellules ne comportant pas ces caractéristiques de cellules souches tumorales, est moins efficace (Lapidot *et coll.*, 1994; Al-Hajj *et coll.*, 2003). Il a été suggéré que les chimiothérapies conventionnelles et les autres types de thérapies ne cibleraient pas ces cellules souches tumorales (Marx, 2003). Par ailleurs, ces cellules seraient fortement pro-angiogènes (Bao *et coll.*, 2006).

Récemment, une nouvelle sous-famille d'isoformes du VEGF a été mise en évidence. Il s'agit des isoformes VEGF<sub>xxx</sub>b (Bates *et coll.*, 2002). Comme décrit précédemment, ces isoformes anti-angiogènes seraient en compétition avec les isoformes VEGF<sub>xxx</sub> pour la liaison au récepteur VEGFR-2, mais n'induiraient pas de transduction de signal (Woolard *et coll.*, 2004; Konopatskaya *et coll.*, 2006). Ces isoformes <sub>xxx</sub>b exprimées dans les conditions normales seraient remplacées par les isoformes pro-angiogènes VEGF<sub>xxx</sub> lors d'une hypoxie ou de la carcinogenèse (Perrin *et coll.*, 2005). Le bevacizumab se lie à toutes les isoformes conventionnelles (Kim KJ *et coll.*, 1992), via un épitope localisé dans la partie commune de toutes les isoformes, proche du site de liaison aux récepteurs (Muller *et coll.*,

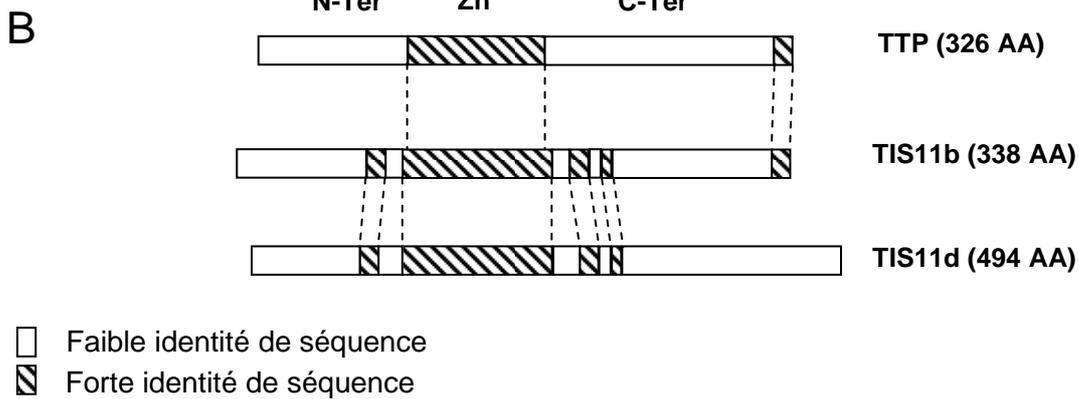
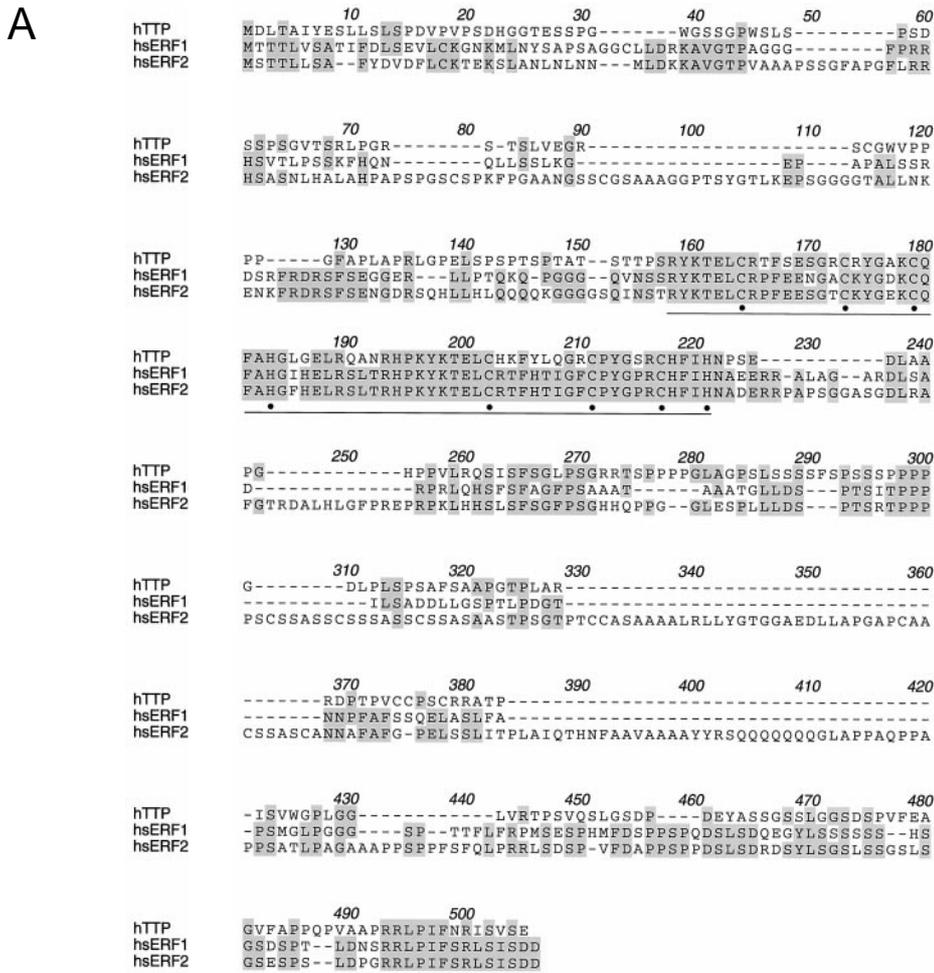
1997). Le bevacizumab reconnaît donc également les isoformes VEGF<sub>xxx</sub>b, et la variabilité de réponse au bevacizumab pourrait être expliquée par l'existence de ces isoformes anti-angiogènes (Varey *et coll.*, 2008). Les travaux de Varey *et coll.* ont montré que le VEGF<sub>165</sub>b inhibait à la fois la croissance d'une tumeur colorectale, de manière dépendante du VEGF, et l'effet du bevacizumab sur la croissance de cette tumeur. Par ailleurs le VEGF<sub>165</sub>b est un facteur de survie autocrine des cellules épithéliales du colon, suggérant que son inhibition pourrait induire des effets toxiques sur ces cellules.

D'autre part, il a également été décrit que la vascularisation tumorale était anormale, tortueuse et peu efficace, réduisant ainsi la distribution de molécules thérapeutiques ou l'oxygénation tissulaire nécessaire à la radiothérapie (Jain, 2005). L'administration de molécules anti-angiogènes permettrait donc dans un premier temps de normaliser la vascularisation tumorale et de faciliter l'accès de molécules thérapeutiques à la tumeur, avant de détruire complètement le réseau vasculaire tumoral et empêcher autant la distribution de molécules anti-angiogènes que d'autres thérapies. Un protocole séquentiel d'administration n'étant jamais respecté chez l'homme, il reste à établir si un tel mécanisme pourrait expliquer le bénéfice à long terme observé dans certains essais cliniques combinant plusieurs types de thérapies. L'administration aiguë d'inhibiteurs de l'angiogenèse induit des modifications vasculaires qui pourraient correspondre au phénomène de normalisation vasculaire chez l'homme. Une seule administration de bevacizumab chez 6 patients atteints d'un cancer colorectal induit une diminution rapide de la perfusion tumorale, du volume vasculaire, de la densité micro-vasculaire et de la pression interstitielle, ainsi que du nombre de cellules endothéliales circulantes viables (Willett *et coll.*, 2004). L'association de plusieurs stratégies thérapeutiques semble donc être la meilleure option pour contrecarrer les phénomènes de résistance.

**En conclusion**, le VEGF est une cytokine dont l'expression et l'activité sont très finement régulées à différents niveaux. De plus, chaque niveau apparaît être subdivisé en d'autres niveaux de régulation potentielle. Le VEGF apparaît donc comme un facteur important de l'organisme, qui au-delà de son effet sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales dans l'angiogenèse, participe à leur survie et à celle d'autres types cellulaires. Il apparaît également essentiel dans le fonctionnement de nombreux organes par la modulation fonctionnelle des vaisseaux et leur maintien. Les thérapies anti-angiogènes commercialisées à ce jour, ciblant le VEGF et ses récepteurs, ont montré des effets bénéfiques chez les patients et démontré l'importance de cette voie de signalisation dans

l'angiogenèse tumorale et des thérapies anti-angiogènes pour le traitement du cancer. Elles ont également souligné l'importance du VEGF dans l'homéostasie vasculaire et la fonctionnalité de divers organes, en révélant des effets secondaires plutôt inattendus. Par ailleurs, certains types de tumeurs restent insensibles à ces traitements et des phénomènes de résistance commencent à émerger. L'exploration d'autres stratégies utilisant ces mêmes cibles, mais par des approches différentes, semble donc être pertinente pour à la fois limiter les effets secondaires et contrecarrer les phénomènes de résistance.

3<sup>ème</sup> Partie :  
Les protéines de la famille TIS11 et  
la protéine TIS11b



**Schéma 20 : Alignement des séquences des protéines de la famille TIS11.**

A) D'après Lai et coll. J Biol Chem. 2000 Jun 9;275(23):17827-37.

Les séquences proviennent de la base de données GenBankTM et correspondent au numéro d'accèsion M63625 pour hTTP, X71901 pour hERF1 (hTIS11b) et X78992 pour hERF2 (hTIS11d). L'alignement a été réalisé avec le logiciel MacVector 6.5. La séquence soulignée correspond aux deux doigts de zinc.

B) D'après Herschman et coll. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol. 1994;47:113-48.

### 3. Les protéines de la famille TIS11 et la protéine TIS11b

#### 3.1. Les protéines de la famille TIS11

La famille de protéines TIS11 (Tetra-décanoyl Phorbol Acetate-induced-sequence 11), dont la première caractérisation a été réalisée en 1989 par Varnum et coll. comme un gène de réponse au TPA (Varnum *et coll.*, 1989), est composée de 3 membres chez les mammifères : TTP, TIS11b et TIS11d (Lai *et coll.*, 1990). Les trois protéines de cette famille sont exprimées à partir de différents chromosomes et sont clairement le produit de gènes différents. Néanmoins, elles possèdent des points communs et sont notamment caractérisées par leur structure à deux doigts de zinc qui est extrêmement bien conservée entre les trois membres de la famille, et pour chaque membre, entre différentes espèces (schéma 20 et 21). Les deux doigts de zinc sont composés chacun d'une séquence YKTEL introduisant un motif  $CX_8CX_5CX_3H$ , et sont espacés de 18 acides aminés (Blackshear, 2002; Carrick *et coll.*, 2004) (schéma 22). Ces trois protéines comportent également un signal d'export nucléaire et un signal de localisation nucléaire, qui leur permettent de circuler entre le noyau et le cytoplasme (Phillips RS *et coll.*, 2002). Les trois membres de la famille TIS11 sont impliqués dans la régulation de la stabilité des ARNm dans des conditions physiologiques. In vitro, elles sont toutes les trois capables d'induire la désadénylation et la dégradation des ARNm comportant une séquence ARE avec la même efficacité (Carballo *et coll.*, 1998; Lai *et coll.*, 2000; Stoecklin *et coll.*, 2002).

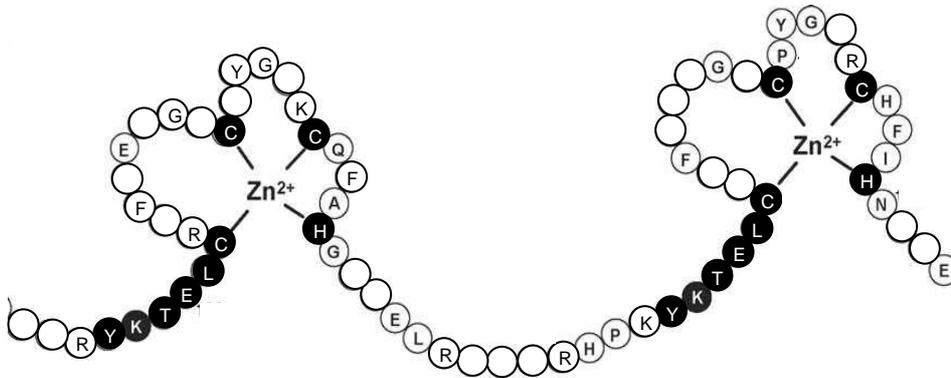
##### 3.1.1. TTP

Le membre de la famille TIS11 le plus étudié est une protéine comportant trois motifs tétraproline : la Tristétraproline (TTP), également appelée TIS11, ZFP36 (zinc finger protein 36), NUP475 (nuclear protein 475) ou G0S24 (G0/G1 switch regulatory gene 24). L'expression de TTP est rapidement induite par des facteurs de croissance, l'insuline, des agents mitogènes ou les esters de phorbol. TTP est ainsi considérée comme le produit d'un gène de réponse précoce (Lai *et coll.*, 1990). Identifiée initialement dans le noyau de fibroblastes murins, elle a été d'abord décrite comme un facteur de transcription (Taylor *et coll.*, 1995). Sa localisation intracellulaire dépendrait du type cellulaire étudié dans la mesure où TTP a été décrite par la suite comme étant uniquement cytoplasmique dans les macrophages (Carballo *et coll.*, 1998; Fairhurst *et coll.*, 2003). Son rôle sur la régulation de la stabilité des ARNm a été découvert avec l'analyse du phénotype de souris invalidée pour

|              |                     |                     |                     |           |
|--------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------|
| rat_cmgl     | R Y K T E L C R P F | E E N G A C K Y G D | K C Q F A H G I H E | L R S L T |
| human_cmgl   | R Y K T E L C R P F | E E N G A C K Y G D | K C Q F A H G I H E | L R S L T |
| mouse_cmgl   | R Y K T E L C R P F | E E N G A C K Y G D | K C Q F A H G I H E | L R S L T |
| human_tislid | R Y K T E L C R P F | E E S G T C K Y G E | K C Q F A H G F H E | L R S L T |
| mouse_tislid | R Y K T E L C R P F | E E S G T C K Y G E | K C Q F A H G F H E | L R S L T |
| human_ttp    | R Y K T E L C R T F | S E S G R C R Y G A | K C Q F A H G L G E | L R Q A N |
| bovine_ttp   | R Y K T E L C R T F | S E S G R C R Y G A | K C Q F A H G L G E | L R Q A N |
| mouse_ttp    | R Y K T E L C R T Y | S E S G R C R Y G A | K C Q F A H G L G E | L R Q A N |
| rat_ttp      | R Y K T E L C R T Y | S E S G R C R Y G A | K C Q F A H G P G E | L R Q A N |
| rat_cmgl     | R H P K Y K T E L C | R T F H T I G F C P | Y G P R C H F I H   | -         |
| human_cmgl   | R H P K Y K T E L C | R T F H T I G F C P | Y G P R C H F I H   | -         |
| mouse_cmgl   | R H P K Y K T E L C | R T F H T I G F C P | Y G P R C H F I H   | -         |
| human_tislid | R H P K Y K T E L C | R T F H T I G F C P | Y G P R C H F I H   | -         |
| mouse_tislid | R H P K Y K T E L C | R T F H T I G F C P | Y G P R C H F I H   | -         |
| human_ttp    | R H P K Y K T E L C | H K F Y L Q G R C P | Y G S R C H F I H   | -         |
| bovine_ttp   | R H P K Y K T E L C | H K F Y L Q G R C P | Y G S R C H F I H   | -         |
| mouse_ttp    | R H P K Y K T E L C | H K F Y L Q G R C P | Y G S R C H F I H   | -         |
| rat_ttp      | R H P K Y K T E L C | H K F Y L Q G R C P | Y G S R C H F I H   | -         |

**Schéma 21 : Alignement des séquences des protéines de la famille TIS11 de différentes espèces.**

D'après Lai et coll. J Biol Chem. 2000 Jun 9;275(23):17827-37.  
cMG1 = TIS11b



**Schéma 22 : Structure et séquence des deux doigts de zinc.**

D'après Murata et coll. Exp Cell Res. 2005 Feb 15;303(2):287-99.

son gène : des souris TTP<sup>-/-</sup>. Ces souris développent un syndrome inflammatoire auto-immun caractérisé par une cachexie, des dermatites, de l'arthrite et une hyperplasie myéloïde (Taylor *et coll.*, 1996). Les symptômes observés sont essentiellement dus à la surexpression de la cytokine pro-inflammatoire TNF-alpha (tumeur necrosis factor-alpha). L'ARNm de cette cytokine était connu comme étant instable, et cette instabilité était dépendante de la présence d'une séquence ARE très conservée dans sa région 3'-UTR (Carballo *et coll.*, 1997; Carballo *et coll.*, 1998). Il a été montré que les macrophages dérivés de souris TTP<sup>-/-</sup> produisaient en réponse à une stimulation au LPS (lipopolysaccharides), deux fois plus d'ARNm du TNF-alpha et cinq fois plus de protéines TNF-alpha (Carballo *et coll.*, 1997) et que cette augmentation de la biosynthèse du TNF-alpha était due à une augmentation de la stabilité de son ARNm (Carballo *et coll.*, 1998). TTP se lie directement à la séquence ARE de la région 3'-UTR de l'ARNm du TNF-alpha in vitro. Des mutations de TTP empêchant cette liaison à l'ARNm induisent une incapacité de TTP à diminuer les taux d'ARNm du TNF-alpha dans des expériences de co-transfection dans les cellules 293 (Carballo *et coll.*, 1998; Lai *et coll.*, 1999). Il a été établi ainsi que TTP était un facteur agissant en trans, capable de se lier à la séquence ARE de la région 3'-UTR de l'ARNm du TNF-alpha et impliqué dans la déstabilisation de cet ARNm.

Les études ultérieures des macrophages dérivés de ces souris déficientes en TTP ont identifié d'autres cibles physiologiques de TTP et notamment l'ARNm du GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) (Carballo *et coll.*, 2000) dont la région 3'-UTR possède une séquence ARE responsable de l'instabilité de cet ARNm. Dans les cellules stromales dérivées de la moelle osseuse de souris TTP<sup>-/-</sup>, l'ARNm du GM-CSF est stabilisé par rapport à celui issu de souris sauvages, indiquant un rôle de TTP dans la déstabilisation de cet ARNm. Il reste à déterminer si cette stabilisation de l'ARNm du GM-CSF en absence de TTP joue un rôle dans l'hyperplasie myéloïde caractéristique du phénotype des souris TTP<sup>-/-</sup>. Par la suite, l'ARNm de l'IL-2 a également été identifié comme une cible de TTP dans les lymphocytes T de souris TTP<sup>-/-</sup> (Ogilvie *et coll.*, 2005). A ce jour, aucune corrélation entre cette cible et le phénotype des souris TTP<sup>-/-</sup> n'a été établie. Plus récemment, l'analyse par microarray des ARNm de cellules issues de souris TTP<sup>-/-</sup> ou de cellules invalidées pour le gène de TTP par des shRNA ont identifié Ier3, une protéine impliquée dans la régulation de la pression sanguine (Lai *et coll.*, 2006), et l'IL10 (Stoecklin *et coll.*, 2008) comme des cibles de TTP. Pour ces cibles également, aucune corrélation avec le phénotype des souris TTP<sup>-/-</sup> n'a été observée. Par ailleurs, des expériences de surexpression de TTP ont confirmé ou mis en évidence d'autres cibles potentielles, notamment l'ARNm de l'IL-3 (interleukin-3) (Carballo *et coll.*, 1998), de l'IL-6 (Stoecklin *et coll.*, 2001), de COX-2 (cyclooxygenase-2) (Sawaoka *et coll.*, 2003), de PAI2 (plasminogen activator inhibitor 2) (Yu H *et coll.*, 2003), de c-jun (Briata *et coll.*, 2003), de iNOS (inducible

NO synthase) (Fechir *et coll.*, 2005), de c-myc et la cycline D1 (Marderosian *et coll.*, 2006), du VEGF (Essafi-Benkhadir *et coll.*, 2007) et de l'IL8 (Winzen *et coll.*, 2007).

### 3.1.2. TIS11b

Le deuxième membre de la famille TIS11 le plus documenté est la protéine TIS11b, aussi connue sous le nom de ZFP36L1 (zinc finger protein 36-like 1), cMG1, BRF1 (butyrate response factor 1), ERF1 (Epidermal Growth Factor-response factor 1), et Berg36 (B-cell early response gene encoding a 36-kDa protein) (Blackshear, 2002). TIS11b a été identifiée pour la première fois en 1990 comme un gène de réponse précoce à la stimulation mitogène de cellules épithéliales intestinales de rat (Gomperts *et coll.*, 1990). De même que pour TTP, l'ARNm de TIS11b peut être induit par différents facteurs mitogènes et des facteurs de croissance, mais avec des cinétiques d'induction différentes de celles de TTP (Stumpo *et coll.*, 2004). Il a par ailleurs été décrit que l'expression de TIS11b dans le cœur et dans le foie suivait le rythme circadien, et pouvait être pratiquement doublée dans la journée (Storch *et coll.*, 2002). Cela pourrait indiquer un rôle potentiel de TIS11b dans la variation du taux de cytokines dans le sang selon le rythme circadien, variation qui a été décrite pour le TNF-alpha chez l'homme (Petrovsky et Harrison, 1998). Il semblerait également que le niveau d'expression de TIS11b soit élevé dans les cellules comportant la translocation chromosomique t(8 ;21) souvent associée à la leucémie myéloïde aiguë (Shimada *et coll.*, 2000). Par ailleurs, TIS11b a été identifiée comme le membre de la famille TIS11 prépondérant dans la myogenèse (Busse *et coll.*, 2008).

Cependant, TIS11b a des caractéristiques similaires à celles de TTP (Lai *et coll.*, 2000; Lai *et coll.*, 2003), que ce soit en terme de liaison à une sonde ARN comportant une séquence ARE, de déstabilisation de l'ARNm du TNF-alpha dans des expériences de co-transfection ou de stimulation de la désadénylation via des séquences ARE dans un système acellulaire. Le rôle de TIS11b dans la régulation de la stabilité des ARNm a été démontré par l'analyse de mutants cellulaires sélectionnés pour leur incapacité à dégrader les ARNm de cytokines comportant des séquences ARE. Ces mutants cellulaires ont été infectés par une banque rétrovirale d'ADNc, et l'analyse des mutants dont le phénotype avait été rétabli par cette infection a permis le clonage fonctionnel de TIS11b (Stoecklin *et coll.*, 2002). Ces mutants cellulaires comportaient des mutations modifiant le cadre de lecture du gène et n'exprimaient donc pas TIS11b. Le rôle de TIS11b dans le défaut de déstabilisation des ARNm chez ces mutants a également été vérifié par l'utilisation de siRNA empêchant son expression. Dans une étude antérieure, ces mutants défectifs pour l'expression de TIS11b présentaient des

défauts du contrôle de la stabilité des ARNm contenant les séquences ARE de l'IL-3, du GM-CSF, du TNF $\alpha$ , de l'IL-2, et de l'IL-6. La surexpression dans ces cellules de TTP a permis de rétablir le phénotype sauvage, suggérant une forte redondance entre TTP et TIS11b dans ces conditions (Stoecklin *et coll.*, 2001). TIS11b pourrait donc avoir un rôle physiologique équivalent à TTP dans la cellule. Cependant, le phénotype des souris KO TIS11b $^{-/-}$  est très différent de celui des souris TTP $^{-/-}$  (Taylor *et coll.*, 1996; Stumpo *et coll.*, 2004). Les souris TIS11b $^{-/-}$  meurent in utero généralement avant J11, ce qui indique que TIS11b aurait un rôle important dans le développement embryonnaire précoce. La plupart des embryons meurent en raison d'un défaut de fusion de la membrane chorioallantoïdienne. Lorsque les embryons ne présentent pas ce défaut de fusion, il semblerait que la prolifération cellulaire soit diminuée et que ces embryons présentent des anomalies de placentation et meurent également dans les mêmes délais que les précédents, à un stade où TIS11b est normalement exprimée. Cependant, cette étude n'a pas pu montrer d'ARNm cibles de TIS11b dans ce modèle, et écarte l'implication potentielle du TNF-alpha et du GM-CSF dans ce phénotype. Par ailleurs, une autre étude rapportant le KO du gène de TIS11b, a montré que TIS11b semblait nécessaire à la formation d'une vascularisation normale au cours de l'embryogenèse via le VEGF-A (Bell *et coll.*, 2006). Notre laboratoire avait précédemment montré, que l'hormone hypophysaire ACTH induisait une augmentation de l'expression de TIS11b concomitante avec la déstabilisation de l'ARNm du VEGF (Chinn *et coll.*, 2002). Dans ce contexte, notre équipe avait décrit pour la première fois, un rôle de TIS11b dans la déstabilisation de l'ARNm d'un gène rapporteur cloné en amont de la région 3'-UTR du VEGF dans des cellules NIH-3T3 en culture (Chinn *et coll.*, 2002). L'interaction entre TIS11b et la région 3'-UTR de l'ARNm du VEGF dans les cellules vivantes a par la suite été démontrée par l'immunoprécipitation de complexes ribonucléoprotéiques (Ciais *et coll.*, 2004). Enfin, l'extinction de l'expression de TIS11b par des ARN interférents, dans des cellules primaires corticosurréaliennes bovines, indique clairement que TIS11b participe au contrôle de l'expression de l'ARNm du VEGF dans les conditions basales et plus fortement en réponse à une stimulation par de l'ACTH (Ciais *et coll.*, 2004).

### 3.1.3. TIS11d

Le troisième membre de la famille TIS11 est la protéine TIS11d, également appelée ZFP36L2, ERF2 ou BRF2. Peu de données sont disponibles en ce qui concerne cette protéine hormis sa capacité, comme les autres membres de la famille, à se lier aux ARNm et

à induire leur dégradation de manière dépendante des séquences ARE (Lai *et coll.*, 2002; 2003), à naviguer entre le noyau et le cytoplasme de manière dépendante du récepteur CRM1 (Phillips RS *et coll.*, 2002) et à se lier aux protéines 14-3-3 (Johnson *et coll.*, 2002). Bien que le rôle de TIS11d dans l'apoptose ait été renforcé par l'observation que la protéine pro-apoptotique p53 induisait son expression (Jackson *et coll.*, 2006), cette protéine semble être plutôt impliquée dans les mécanismes de la grossesse. Son expression est diminuée dans les placentas issus de différentes grossesses pathologiques par rapport à celle de placentas normaux (Durand *et coll.*, 2003) et l'inactivation de son gène induit une infertilité chez la femelle, notamment par inhibition de la progression de l'embryon au-delà du stade de deux cellules (Ramos *et coll.*, 2004).

### 3.2. Expression des protéines TIS11

Bien que les expériences de surexpression aient montré que les différents membres de la famille TIS11 étaient capables de lier et de déstabiliser les mêmes ARNm cibles, les souris déficientes en chacun de ces gènes présentent des phénotypes très différents, et contrairement à TTP, TIS11b et TIS11d sont essentielles dans le développement précoce de l'embryon (Taylor *et coll.*, 1996; Ramos *et coll.*, 2004; Stumpo *et coll.*, 2004). Les trois gènes montrent des différences de réactivité importantes en fonction du stimulus, ce qui suggère que leurs promoteurs sont très différents. TIS11b et TIS11d peuvent montrer des niveaux d'expression basale plus élevés, mais des capacités d'induction plus réduites que TTP. De plus, ces trois protéines possèdent clairement des différences d'expression basale selon les organes étudiés. L'expression et la régulation des membres de la famille TIS11 dépendent donc du type cellulaire étudié et pour un même type cellulaire, du stimulus utilisé, ce qui suggère que les membres de la famille TIS11 agiraient dans des circonstances différentes (Carrick et Blackshear, 2007). Ce serait donc leur spécificité d'expression et de régulation dans les tissus qui contribuerait à leur spécificité d'action (Ciais *et coll.*, 2004). Bien que les études dans les fibroblastes et les macrophages dérivés des souris KO pour ces gènes n'aient pas montré de mécanismes de compensation entre les trois membres de la famille TIS11, il est néanmoins possible qu'ils fonctionnent comme des équivalents dans certaines situations physiologiques ou pathologiques (Carrick et Blackshear, 2007).

### 3.2.1. Expression physiologique

Chez l'homme, l'expression globale des trois protéines est différente selon les organes. Par exemple, Carrick et coll. ont montré que l'expression globale était assez importante au niveau du poumon, du colon, du pancréas, des surrénales et des ovaires et assez basse dans l'estomac, le foie, la rate ou le cœur. Par ailleurs, pour un même organe, les trois membres de la famille ne sont pas toujours exprimés dans des proportions équivalentes. TIS11b est par exemple exprimée de manière prépondérante dans le cerveau, la vessie et le poumon. TIS11b et TIS11d sont tous les deux surexprimés par rapport à TTP dans le pancréas, les surrénales et l'ovaire (Carrick et Blackshear, 2007).

### 3.2.2. Expression dans des tumeurs ou lignées tumorales

L'expression des trois membres de la famille TIS11 a également été mesurée par RT-QPCR dans un panel de 60 lignées tumorales (Carrick et Blackshear, 2007). Cette étude a montré une importante hétérogénéité d'expression des trois membres de la famille TIS11 entre les différentes lignées cellulaires de tumeurs touchant un même organe, rendant difficile le dégagement d'une tendance. Il semblerait tout de même que de nombreuses lignées tumorales présentent plutôt des surexpressions des protéines de la famille TIS11. La fonctionnalité de ces protéines surexprimées n'a cependant pas été évaluée. TTP est par ailleurs exprimée à des taux variables selon les lignées cellulaires de gliome malin (Suswam et coll., 2008).

## 3.3. Mécanismes de déstabilisation des ARNm

### 3.3.1. Les éléments ARE

La stabilité des ARNm est régulée à la fois par des séquences en cis et des protéines en trans qui se lient à elles. Les séquences les plus connues pour avoir un rôle dans la stabilité des ARNm sont les séquences ARE (AU rich element) situées dans la région 3'-UTR de certains ARNm, le plus souvent des ARNm rapidement inductibles et à demi-vie courte (Chen et Shyu, 1995). Ces séquences ARE sont hétérogènes par leur fonction comme par leur composition. Cette hétérogénéité est illustrée par le fait que 15 à 20 protéines différentes sont susceptibles de réguler la stabilité et la traduction des ARNm comportant ces séquences (Barreau et coll., 2005; Stoecklin et Anderson, 2006) et notamment d'induire

| <i>Classe ARE</i>             | <i>Exemple</i> | <i>Motif</i>   | <i>Désadenylation</i> |
|-------------------------------|----------------|--|-----------------------|
| <i>Contenant AUUUA</i>        |                |  |                       |
| <i>Classe I</i>               | <i>c-fos</i>   | <i>1 à 3 motifs AUUUA<br/>dans une région riche en U</i>                       | <i>Synchrone</i>      |
| <i>Classe II</i>              | <i>GM-CSF</i>  | <i>Au moins 2 motifs<br/>UUAUUUA(A/U)(A./U)<br/>dans une région riche en U</i> | <i>Non synchrone</i>  |
| <i>Ne contenant pas AUUUA</i> |                |  |                       |
| <i>Classe III</i>             | <i>c-jun</i>   | <i>Région riche en U</i>   | <i>Synchrone</i>      |

Schéma 23 : Classification des séquences ARE selon Chen et coll.

D'après Chen et coll. Trends Biochem Sci. 1995 Nov;20(11):465-70.

| <i>Groupe</i> | <i>Motif</i>                         | <i>Exemples</i>                       |
|---------------|--------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>I</i>      | <i>WAUUUW et région riche en U</i>   | <i>c-fos, c-myc</i>                   |
| <i>IIA</i>    | <i>AUUUAUUUAUUUAUUUAUUUA</i>         | <i>GM-CSF, TNF<math>\alpha</math></i> |
| <i>IIB</i>    | <i>AUUUAUUUAUUUAUUUA</i>             | <i>Interferon-<math>\alpha</math></i> |
| <i>IIC</i>    | <i>WAUUUAUUUAUUUAW</i>               | <i>cox-2, IL-2</i>                    |
| <i>IID</i>    | <i>WWAUUUUUUUAWW</i>                 | <i>FGF2, VEGF</i>                     |
| <i>IIE</i>    | <i>WWWUAUUUAWWWW</i>                 | <i>u-PAR</i>                          |
| <i>III</i>    | <i>Région riche en U, sans AUUUA</i> | <i>c-jun</i>                          |

Schéma 24 : Classification des séquences ARE selon Wilusz et coll.

D'après Wilusz et coll. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001 Apr;2(4):237-46.

dans certains cas la stabilisation de l'ARNm cible et dans d'autres cas, sa déstabilisation (Chen et Shyu, 1995; Wilusz *et coll.*, 2001). Le rôle des séquences ARE dans l'instabilité des ARNm a été établi par Shaw et coll., lorsqu'ils ont montré que l'ARNm de la bêta-globine, connu comme étant relativement stable, perdait cette stabilité lorsqu'on insérait la séquence ARE de l'ARNm du GM-CSF dans sa région 3'-UTR (Shaw et Kamen, 1986).

Les séquences ARE ont la particularité d'être très riches en adénine et uracile, et, pour certaines, contiennent une ou plusieurs copies du pentamère AUUUA ou du nonamère UUAUUUA(A/U)(A/U). Malgré d'importantes variations dans leur longueur et leur composition, les séquences ARE ont été réparties en plusieurs catégories, essentiellement en fonction de la présence de pentamères ou de nonamères dans leurs séquences. Les ARE de classe I contiennent différentes copies du pentamère AUUUA encadré par des séquences riches en U telle que UUAUUUAUU, les ARE de classe II comportent des motifs AUUUA répétés en tandem et les ARE de classe III, correspondent à des séquences riches en U sans la présence du motif AUUUA (schéma 23) (Chen et Shyu, 1995).

Par la suite, une base de données informatique regroupant les ARNm labiles comportant des séquences ARE dans leur 3'-UTR a été réalisée. Elle est appelée ARED (ARE mRNA Database) et a donné naissance à une nouvelle classification découpée en 5 catégories de séquences ARE selon le nombre de motifs AUUUA répétés, la classe I comportant 5 motifs AUUUA en tandem et la classe V un seul motif (Bakheet *et coll.*, 2001). Cette classification ne prend donc pas en compte les séquences ARE de classe III de la précédente classification qui ne comportent que des uraciles. L'analyse de cette base de données a montré que 5-8% des ARNm du répertoire humain comportent une séquence ARE et codent pour des protéines à fonctions diverses plutôt impliquées dans des processus biologiques transitoires (Bakheet *et coll.*, 2001). Une dernière classification établie par Wilusz et coll. en 2001, réunit les deux classifications précédentes (schéma 24) (Wilusz *et coll.*, 2001).

Les études sur la spécificité d'ARNm cibles montrent que TTP se lie uniquement à certaines séquences ARE. Les sites de liaison de TTP identifiés dans les cytokines seraient plutôt des séquences ARE de classe II mais des séquences ARE de classe I ont également été identifiées comme des cibles de TTP (Chen et Shyu, 1995; Raghavan *et coll.*, 2001). La séquence ARE minimale reconnue par TTP serait le nonamère plutôt que le pentamère (Lagnado *et coll.*, 1994; Chen et Shyu, 1995; Zubiaga *et coll.*, 1995; Worthington *et coll.*, 2002). Par exemple, l'insertion du pentamère AUUUA seul en aval du gène de la bêta-globine n'est pas suffisante pour induire l'instabilité de l'ARNm, même si plusieurs copies du pentamère sont présentes (Lagnado *et coll.*, 1994; Zubiaga *et coll.*, 1995). Par contre, l'insertion dans les mêmes conditions des nonamères UUAUUUA(A/U)(A/U) ou UUAUUUAUU semble suffire à induire l'instabilité des ARNm. Deux copies du motif nonamérique permettent une déstabilisation plus puissante qu'une seule copie (Lai *et coll.*,

2005). Les trois membres de la famille TIS11 peuvent se lier au site consensus nonamérique UUAUUUAUU et des variations de cette séquence permettent également une liaison de forte affinité (Brewer BY *et coll.*, 2004; Ciais *et coll.*, 2004; Hudson *et coll.*, 2004; Lai *et coll.*, 2005). Notre laboratoire a mis en évidence une région de 75 pb dans la région 3'-UTR de l'ARNm du VEGF de rat (1161-1235) qui interagit avec TIS11b (Ciais *et coll.*, 2004). Cette région a été dénommée TBE (TIS Binding Element), elle contient 2 motifs consensus, un nonamère UUAUUUAU et un pentamère AUUUA, et régule l'activité de déstabilisation de l'ARNm du VEGF par TIS11b. L'équipe de Gilles Pagès a par la suite montré que TTP pouvait influencer la stabilité de l'ARNm du VEGF par l'intermédiaire de cet élément TBE mais également via d'autres régions ne comportant pas de motif AUUUA (Essafi-Benkhadir *et coll.*, 2007). Il a été montré que la suppression de motifs AUUUA spécifiques dans la région 3'-UTR de l'ARNm de la Cycline D1 n'empêchait pas sa déstabilisation par TTP (Marderosian *et coll.*, 2006). De même, c-jun a été décrit comme une cible de TTP alors que sa région 3'-UTR ne contient ni le pentamère ni le nonamère de AU mais uniquement une région riche en uraciles (Chen et Shyu, 1995; Briata *et coll.*, 2003). Le fait que TTP et TIS11b puissent utiliser des sites consensus différents sur le même ARNm suggère que TTP et TIS11b n'auraient pas une activité redondante sur la stabilité de l'ARNm du VEGF (Essafi-Benkhadir *et coll.*, 2007).

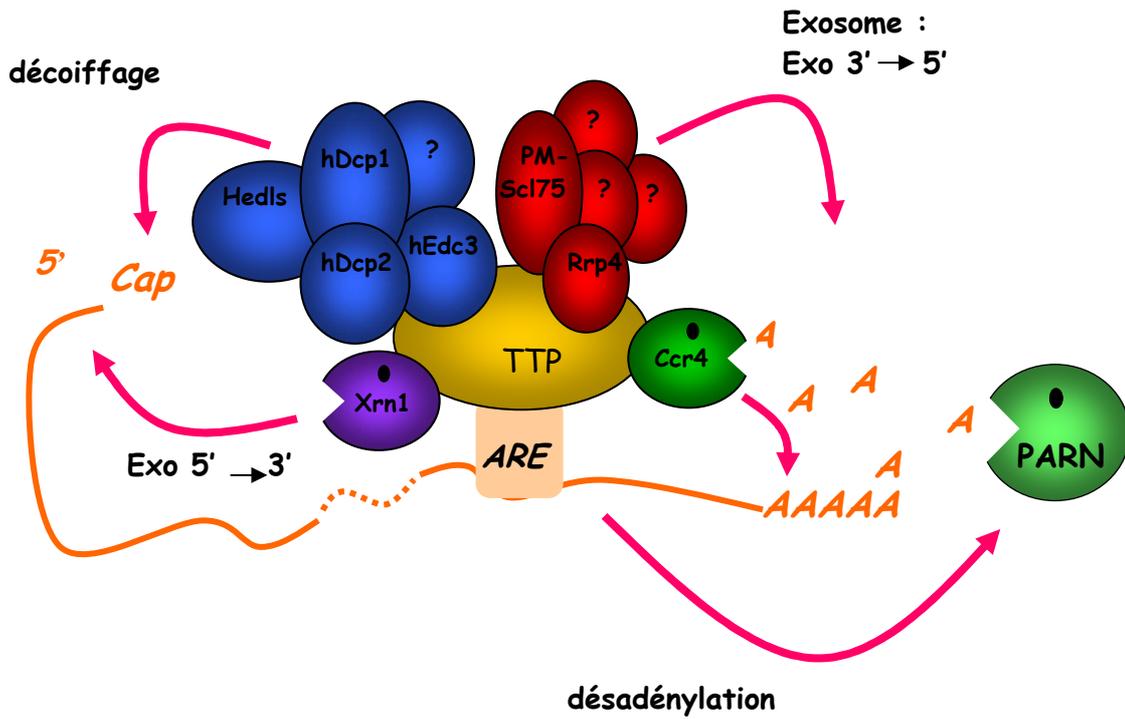
Enfin, il semblerait que les différentes classes de séquences ARE n'induisent pas les mêmes processus de dégradation. Les classes I et III seraient caractérisées par une désadénylation synchrone de la dégradation du corps de l'ARNm, tandis que la classe II serait caractérisée par une désadénylation découplée (non synchrone) qui favoriserait l'apparition de formes intermédiaires complètement désadénylées (Chen et Shyu, 1995).

### 3.3.2. Mécanismes moléculaires de déstabilisation et de dégradation des ARNm

Les mécanismes moléculaires qui régulent la dégradation des ARNm sont encore peu compris (Hau *et coll.*, 2007). Néanmoins, il a été montré que la dégradation des ARNm était dépendante de la liaison des protéines TIS11 aux ARNm, et que cette liaison et cette déstabilisation étaient dépendantes de la présence d'une séquence ARE (Carballo *et coll.*, 1998). En effet, Kontoyiannis *et coll.* ont montré que la suppression de la séquence ARE de l'ARNm du TNF-alpha empêchait sa dégradation et produisait chez la souris un phénotype présentant des similitudes avec le syndrome inflammatoire observé dans les souris TTP-/- (Kontoyiannis *et coll.*, 1999). Par ailleurs, des séquences de 22 à 32 nucléotides riches en

AU issues des régions 3'-UTR des ARNm du GM-CSF, du TNF-alpha, de l'IL2 ou de c-fos se lient avec une forte affinité à TTP et sont suffisantes pour permettre la dégradation de l'ARNm de la bêta-globine dans lequel elles ont été insérées (Hau *et coll.*, 2007). Ces résultats suggèrent que le rôle des séquences ARE dans la déstabilisation des ARNm réside dans la liaison de TTP à l'ARNm via ces séquences, et que ce mécanisme ne nécessite pas l'intervention d'une séquence en cis supplémentaire (Hau *et coll.*, 2007). Cette hypothèse est par ailleurs étayée par les résultats de Lykke-Andersen *et coll.* qui montrent que TTP ou TIS11b ne sont fonctionnelles, en absence d'un ARE, que si elles sont reliées à l'ARNm par un autre mode de liaison que l'interaction doigts de zinc/séquence ARE. En effet, dans cette étude TTP ou TIS11b ont été fusionnées à une protéine de l'enveloppe du bactériophage MS2 et des sites de liaison de cette protéine ont été insérées dans l'ARNm cible, permettant ainsi l'interaction entre TTP ou TIS11b et l'ARNm en l'absence d'une séquence ARE (Lykke-Andersen *et Wagner*, 2005). Par ailleurs, il a également été décrit que la conformation des deux doigts de zinc était dépendante de la liaison à l'ARN (Blackshear *et coll.*, 2003). En effet, en solution, seul le premier doigt de zinc présente sa structure tridimensionnelle. C'est la liaison à l'ARN qui va induire le repliement du deuxième doigt de zinc.

La dégradation de l'ARNm cible se ferait dans un premier temps par la désadénylation de l'ARNm, i.e. par la digestion de la queue poly(A), par des exonucléases spécifiques, suivie de la dégradation du corps de l'ARNm, par des exonucléases (Lai *et coll.*, 1999). L'implication de la désadénylation dans le mécanisme de déstabilisation des ARNm par TTP a été confirmée par l'étude du rôle de TTP sur la stabilité de l'ARNm du GM-CSF dans des cellules stromales dérivées de la moelle osseuse de souris TTP<sup>-/-</sup> (Carballo *et coll.*, 2000). L'ARNm du GM-CSF dans les cellules de phénotype sauvage est révélé par Northern blot sous deux formes, correspondant à une forme adénylée et une forme désadénylée. La disparition de la forme désadénylée dans les cellules de souris TTP<sup>-/-</sup> suggère que TTP favorise la désadénylation des ARNm. Néanmoins, il a également été montré que la présence d'une queue poly(A), n'était pas indispensable à la déstabilisation des ARNm par TTP (Lai *et Blackshear*, 2001). Par ailleurs, ce mécanisme dépendrait également de la quantité de protéine TTP : une faible expression de TTP induit une réduction de la quantité de l'ARNm du TNF-alpha et de sa taille par désadénylation, et une plus forte expression de TTP induit une accumulation de la forme désadénylée. Par la suite, il a été décrit dans un modèle acellulaire de désadénylation des ARNm que TTP comme TIS11b ou TIS11d, induisent la désadénylation des ARNm par le recrutement et l'activation de la poly(A)-ribonucléase (PARN), de manière dépendante de la liaison à l'ARNm par la séquence ARE, bien qu'aucune interaction directe n'ait pu être mise en évidence entre les protéines de la famille TIS11 et PARN (schéma 25). La mutation de TTP comme de la séquence ARE empêchent cette désadénylation (Lai *et coll.*, 2003). Par ailleurs, TTP



**Schéma 25 : Interaction des protéines TIS11 avec les enzymes de la machinerie de dégradation des ARNm.**

Cap = coiffe, Exo = activité exonucléasique, ARE = séquence riche en AU, en bleu = enzymes de décoiffage, en violet = exonucléase, en rouge = enzymes de l'exosome, en vert = désadénylase

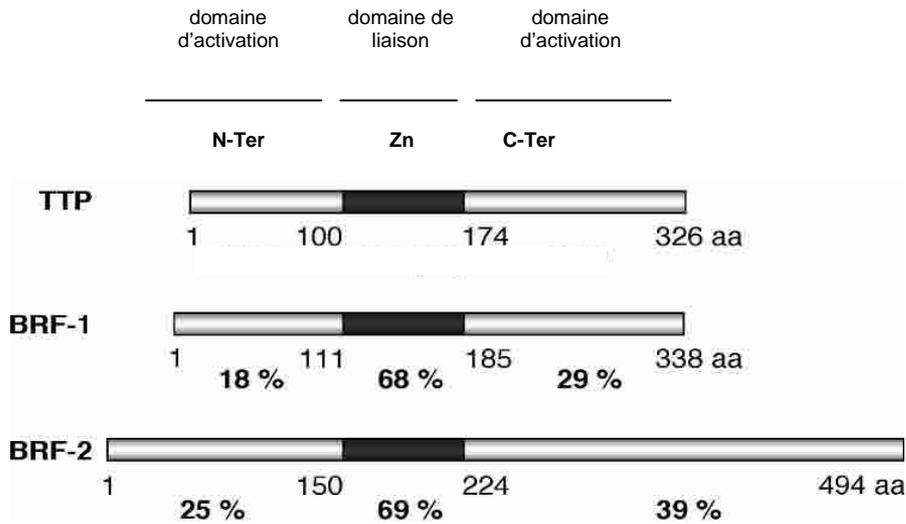
pourrait stimuler la dégradation des ARNm en favorisant le recrutement de l'exosome (Chen *et coll.*, 2001). Il a été montré que TTP et TIS11b co-précipitaient avec des composants de la machinerie cellulaire de dégradation des ARNm, incluant des enzymes de décoiffage, l'exonucléase 5'-3' Xrn1, la désadénylase Ccr4, ou de l'exosome avec les sous unités PM-Sci75 et Rrp4 pour TTP (Chen *et coll.*, 2001; Fenger-Gron *et coll.*, 2005; Lykke-Andersen et Wagner, 2005) (schéma 25). Dans la mesure où de nombreuses protéines qui interagissent avec TTP sont des sous-unités de complexes moléculaires, il est parfois difficile de déterminer si les interactions sont directes ou indirectes. Il a néanmoins été montré que TTP était capable d'interagir avec la machinerie de décoiffage des ARNm via différentes sous-unités de cette machinerie (hDcp1a, hDcp2, hEdc3 et Hedls) et d'activer le décoiffage d'ARNm contenant une séquence ARE in vitro (Fenger-Gron *et coll.*, 2005) (schéma 25). Cependant, la présence de la coiffe ne semble pas être importante dans le mécanisme de dégradation de ces ARNm, dans la mesure où des sondes d'ARN comportant une coiffe comme celles qui n'en comportent pas répondent de la même manière à la désadénylation par TTP co-exprimée avec PARN (Lai *et coll.*, 2003).

Le fait que TTP et TIS11b soient capables de s'associer avec des membres de la machinerie cellulaire de dégradation des ARNm a conduit à l'hypothèse que ces protéines ne se liaient pas à l'ARNm de manière isolée mais probablement sous forme d'un complexe de protéines (Jing *et coll.*, 2005; Lykke-Andersen et Wagner, 2005). Il n'est cependant pas clair si les protéines de la famille TIS11 se lient à l'ARNm puis recrutent les protéines de l'exosome, ou si ces protéines se lient à l'ARNm sous forme de complexe pré-formé. Dans la mesure où l'association des protéines de l'exosome avec TTP et TIS11b peut s'effectuer indépendamment des ARN (Lykke-Andersen et Wagner, 2005), il est probable que ces dernières se lient à l'ARNm sous forme de complexe protéique. Ce modèle n'exclut pas la possibilité que TTP ou TIS11b coopèrent également avec d'autres facteurs de régulation qui se lieraient sur des séquences adjacentes de la séquence ARE ou avec d'autres éléments régulateurs dans le transcrit. Notre laboratoire a également mis en évidence que la région 3'-UTR de l'ARNm du VEGF pouvait être le siège d'une compétition entre la protéine stabilisatrice HuR et TIS11b (Cherradi *et coll.*, 2006). Ces 2 protéines se lient à l'ARNm sur des sites très proches mais différents et bien que ces 2 protéines puissent se lier à l'ARNm simultanément, HuR semble être déplacée par TIS11b.

Par ailleurs, la dégradation des ARNm a lieu dans le cytoplasme et plus particulièrement dans des structures dynamiques ou foyers, qui peuvent être de différents types et isolent spatialement les ARNm des polysomes et donc de la traduction (Franks et Lykke-Andersen, 2007) Ces structures peuvent être associées à différentes protéines de la machinerie de

dégradation des ARNm et de l'exosome, ou à des protéines impliquées dans le processus de dégradation des ARNm par les MicroRNA (miRNA). Certaines de ces structures ont été appelées les « processing bodies » ou P-bodies. Des ARNm spécifiques sont recrutés dans ces P-bodies, notamment les transcrits dont la traduction est éteinte par les miRNA et ceux ciblés pour la dégradation via leur séquence ARE (Liu *et coll.*, 2005; Franks et Lykke-Andersen, 2007). Il semblerait que TTP et TIS11b soient fortement associées aux P-bodies voire initieraient leur formation (Franks et Lykke-Andersen, 2007). Notamment, les protéines de la famille TIS11 seraient responsables de l'adressage des ARNm comportant une séquence ARE dans les P-bodies. La déplétion en TTP ou TIS11b par des siRNA inhibe la localisation des ARNm du GM-CSF ou du TNF-alpha dans les P-bodies. De plus, la fixation de TTP ou TIS11b à un ARNm rapporteur qui ne contient pas d'ARE, via une protéine de l'enveloppe du bactériophage MS2 et ses sites de liaison à l'ARN ajoutés à la séquence de l'ARNm de la bêta-globine, est suffisante pour localiser l'ARNm dans les P-bodies et induire sa dégradation (Franks et Lykke-Andersen, 2007). Il a été montré que TTP interagit avec les membres de la famille Argonaute/eiF2C impliqués dans la maturation et les fonctions des miRNA (Jing *et coll.*, 2005). MiR16, un miRNA comportant une séquence complémentaire d'une portion de la séquence ARE de l'ARNm du TNF-alpha, serait nécessaire à la déstabilisation de l'ARNm du TNF-alpha de manière dépendante de TTP (Jing *et coll.*, 2005). Bien qu'il ne soit pas clair si TTP se lie directement avec Argonaute/eiF2C ou miR16, il apparaît que les deux soient nécessaires pour la déstabilisation de l'ARNm du TNF-alpha par TTP (Jing *et coll.*, 2005).

D'autres structures dynamiques dans lesquelles TTP ou TIS11b peuvent adresser des ARNm comportant une séquence ARE sont les granules de stress ou SG. Ces SG vont être formés par les cellules en réponse à un stress environnemental afin de mettre en attente les ARNm inutiles dans la gestion du stress et libérer ainsi la machinerie de traduction pour l'expression d'autres protéines (Schmidlin *et coll.*, 2004). Ces ARNm ne sont pas dégradés et peuvent donc être par la suite réinsérés dans le processus de traduction ou détruits. TTP et TIS11b seraient responsables d'interactions entre les P-bodies et les SG, probablement pour transférer les ARNm des SG, où ils sont en attente, aux P-bodies où ils vont être dégradés (Kedersha *et coll.*, 2005). L'adressage dans les SG semble être dépendant de la structure à doigts de zinc et donc de la liaison à l'ARNm dans la mesure où la mutation de l'un ou des deux doigts de zinc diminue ou abolie respectivement le recrutement de TTP dans les SG (Murata *et coll.*, 2005).



**Schéma 26 : Homologie des régions N-Terminale et C-terminale des trois membres de la famille TIS11.**

D'après Lykke-Andersen et Wagner *Genes Dev.* 2005 Feb 1;19(3):351-61.  
BRF-1 = TIS11b, BRF-2 = TIS11d

### 3.4. Domaines actifs et troncations des protéines TIS11

Les membres de la famille TIS11 sont composés de trois parties : la région N-terminale, les deux doigts de zinc en tandem et la région C-terminale (schéma 26). Un alignement des trois protéines montre que la région composée des deux doigts de zinc est très conservée entre les 3 protéines TIS11, par contre, les régions N- et C-terminales sont assez divergentes (Varnum *et coll.*, 1991), et pourraient être à l'origine des spécificités des 3 protéines (Stoecklin *et coll.*, 2002). En effet, l'homologie entre TTP et TIS11b ou TIS11d est de 70% dans la région à deux doigts de zinc et de l'ordre de 20% pour le reste de la protéine (Herschman *et coll.*, 1994). Les trois protéines de la famille TIS11 ont été décrites comme comportant un signal de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'export nucléaire (NES). Chez les 3 membres, le NLS est situé au niveau des doigts de zinc, par contre, le NES est localisé dans la région N-terminale de TTP et dans la région C-terminale de TIS11b et TIS11d (Murata *et coll.*, 2002; Phillips RS *et coll.*, 2002). Par ailleurs, il a été démontré pour TTP uniquement, que sa région N-terminale, qui n'est pas du tout conservée dans les autres

protéines de la famille TIS11, était impliquée dans l'induction d'apoptose en synergie avec le TNF-alpha (Johnson et Blackwell, 2002).

En ce qui concerne la déstabilisation des ARNm, la structure à deux doigts de zinc est nécessaire et suffisante pour la liaison à la séquence ARE de la région 3'-UTR des ARNm cibles (Lai *et coll.*, 1999). L'intégrité des deux domaines à doigt de zinc, que ce soit pour TTP, TIS11b ou TIS11d est essentielle pour la liaison et l'initiation de la dégradation des ARNm. La mutation d'une seule cystéine ou histidine de l'un ou l'autre doigt de zinc, au niveau des séquences CX<sub>8</sub>CX<sub>5</sub>CX<sub>3</sub>H, inhibe complètement la liaison de TTP à des sondes d'ARN comportant une séquence ARE (Lai *et coll.*, 2002). Par ailleurs, une liaison apparemment normale et de forte affinité à l'ARN peut être effectuée avec un fragment de TTP d'environ 70 acides aminés comportant les 2 doigts de zinc et quelques acides aminés supplémentaires de chaque côté (Lai *et coll.*, 2000; Blackshear *et coll.*, 2003), alors qu'un peptide synthétique de 36 acides aminés qui contient uniquement le premier doigt de zinc de TTP se lie à une séquence UUUUUU mais avec une affinité moindre (Michel *et coll.*, 2003). Par la suite, il a été montré que les mutations des doigts de zinc n'empêchaient pas que la liaison aux ARNm mais également leur dégradation (Lai *et coll.*, 2002). Les doigts de zinc seuls ne sont pas suffisants pour induire la déstabilisation de l'ARNm du TNF-alpha. En effet, la troncation de la région N-terminale comme celle de la région C-terminale, entraîne une diminution de l'activité de TTP (Rigby *et coll.*, 2005). Toutefois, il semblerait que la région N-terminale de TTP associée aux doigts de zinc (TTP-NZn) soit plus active que la région C-terminale associée aux doigts de zinc (TTP-ZnC) (Lai *et coll.*, 2000; Lykke-Andersen et Wagner, 2005; Rigby *et coll.*, 2005). Les domaines N- et C-terminaux servent chacun de domaines d'activation de la dégradation des ARNm. Ils peuvent induire cette dégradation en absence d'un ARE si ils sont reliés à cet ARNm par un site de liaison hétérologue, que ce soit pour TTP ou pour TIS11b (Lykke-Andersen et Wagner, 2005). Le domaine N-terminal de TTP interagit avec des composants de la machinerie cellulaire de dégradation des ARNm et notamment l'enzyme de décoiffage Dcp1, l'exonucléase 5'-3' Xrn1 et l'exosome. Il a également été démontré que la région N-terminale était nécessaire pour l'interaction avec le complexe de décoiffage et l'initiation du décoiffage *in vitro* (Fenger-Gron *et coll.*, 2005). Le domaine C-terminal de TTP induit également l'activation de la dégradation des ARNm mais par un mécanisme encore non connu.

### 3.5. Régulation de l'activité déstabilisatrice des protéines TIS11

L'activité des protéines de la famille TIS11 résulte de la combinaison de différents mécanismes. Elle est régulée par l'expression des protéines TIS11 au niveau

transcriptionnel et traductionnel, mais également par des modifications post-traductionnelles qui vont activer ou inactiver ces protéines, ainsi que par leur localisation intracellulaire.

### 3.5.1. Autorégulation de l'expression de l'ARNm des protéines TIS11

La possibilité d'une autorégulation de l'expression de TTP a été suggérée par la présence dans la région distale de la région 3'-UTR de l'ARNm de TTP, comme pour ses ARNm cibles, de séquences ARE et notamment la répétition de 2 motifs AUUUA espacés, encadrant un motif UUAUUUAAU (Brooks SA *et coll.*, 2004; Tchen *et coll.*, 2004) (schéma 27). Par ailleurs, il a été montré que la demi-vie de l'ARNm de TTP dans les cellules THP-1 (lignée de cellules humaines monocytaires) est de 22 minutes, en absence de stimulation par du LPS, et de 43 minutes après stimulation, indiquant que l'expression de TTP est elle-même régulée par la stabilisation/déstabilisation de son ARNm (Brooks SA *et coll.*, 2004). De même, une autre équipe a montré que l'inhibition de la voie p38 MAPK induisait une importante déstabilisation de l'ARNm de TTP ainsi qu'une augmentation de sa mobilité sur gel suggérant son raccourcissement ou une perte de la queue polyA (Tchen *et coll.*, 2004). Par ailleurs, des études d'immuno-précipitation ont montré que TTP était capable de se lier à la région 3'-UTR de son propre ARNm dans ces cellules, qu'elles soient stimulées par du LPS ou non (Brooks SA *et coll.*, 2004).

```

991  caaagtgaact gcccggtcag atcagctgga tctcagcggg gagccacgct
1041  tcttgcaactg tggctctctgc atggacccca gggctgtggg gacttggggg
1091  acagtaatca agtaatcccc ttttcagaa tgcattaacc cactcccctg
1141  acctcacgct ggggcaggtc cccaagtgtg caagctcagt attcatgatg
1191  gtgggggatg gagtgtcttc cgaggttctt gggggaaaaa aaattgtagc
1241  atatttaagg gaggcaatga acctctctcc ccacctcttc cctgccccaa
1291  tctgtctctct agaattctat gtgtctgtgaa taataggcct tcactgcccc
1341  tccagttttt atagaactga ggttccagtg tctctgtgta actggaacct
1391  ctctgagggg ggaatcctgg tgcctcaaatt acctccaaa agcaagtgac
1441  caaagccggt gccaaacccc acccataaat caatggggccc ARE-1 tttattttatg
1491  acgactttat ttattttaat atgattttat agtattttata tatattgggt
1541  cgtctgcttc ccttgtattt ttctctcttt ttttgaata ttgaaaacga
1591  cgatataatt attataagta gactataata tatttaagtaa tatatattat
1641  taccttaaaa gtctattttt gtgttttggg catttttaaa taaa

```

**Schéma 27 : La région 3'UTR de TTP et ses séquences ARE.**  
D'après Brooks et coll. J Immunol. 2004 Jun 15;172(12):7263-71.

### 3.5.2. Régulation par phosphorylation

Les trois protéines de la famille TIS11 sont fortement phosphorylées et certains de ces sites semblent être importants pour les interactions avec d'autres protéines. Les sites potentiels de phosphorylation et les séquences les entourant ne sont pas particulièrement bien conservés entre les trois membres et il est probable que les spécificités de liaison à des protéines ou des organelles vont résulter de ces différences (Carrick et Blackshear, 2007). La phosphorylation de TIS11b est beaucoup moins documentée que celle de TTP, et si de nombreuses voies de phosphorylation ont été décrites dans la régulation de TTP ou TIS11b, la phosphorylation de la protéine et les sites de phosphorylation concernés, ne sont pas toujours décrits.

Le rôle de la phosphorylation n'est pas encore bien déterminé et peut varier en fonction de la kinase, du site phosphorylé et de la protéine de la famille TIS11 concernée. Les effets de la phosphorylation sur la liaison à l'ARNm et sur l'activité déstabilisatrice reste controversés (Carballo *et coll.*, 2001; Zhu *et coll.*, 2001; Cao *et coll.*, 2003; Chrestensen *et coll.*, 2004; Sun *et coll.*, 2007). Carballo *et coll.* ont montré que TTP phosphorylée, issue d'extraits de cellules 293 surexprimant la protéine, lie moins bien une sonde ARE que ne le fait TTP issue des mêmes extraits en présence de phosphatases (Carballo *et coll.*, 2001). De même, Hitti *et coll.* ont décrit qu'un état de phosphorylation moins important de TTP était corrélé à une augmentation de la liaison à l'ARNm du TNF-alpha (Hitti *et coll.*, 2006). Cependant, Cao *et coll.* ont montré que la phosphorylation *in vitro* de protéines recombinantes TTP ne semblait pas avoir de conséquences sur la liaison de sondes ARE (Cao *et coll.*, 2003). De même que pour TTP, la phosphorylation de TIS11b ne semble pas avoir d'influence sur sa capacité à se lier aux ARNm (Maitra *et coll.*, 2008).

TTP est une protéine hyperphosphorylée, décrite comme étant un substrat potentiel de nombreuses kinases dont la p42/ ERK2 et la p38 MAPK, la MAPKAP kinase 2 (MK2), JNK, GSK3b, PKA, PKB et PKC (Taylor *et coll.*, 1995; Winzen *et coll.*, 1999; Mahtani *et coll.*, 2001; Cao *et coll.*, 2003; Brook *et coll.*, 2006; Cao et Lin, 2008). Selon les kinases, différents sites peuvent être phosphorylés, par exemple, p42/ERK2 phosphoryle TTP sur la sérine 220 et p38 induit la phosphorylation de TTP sur les sérines 52 et 178 via MK2. A ce jour, la phosphorylation de TTP par la voie p38 MAPK/MK2 est la plus documentée. La p38 MAPK augmente l'expression du TNF-alpha via la stabilité de son ARNm (Mahtani *et coll.*, 2001). Cette action de p38 est induite par MK2 qui phosphoryle TTP *in vitro* comme *in vivo* (Winzen *et coll.*, 1999; Neiningner *et coll.*, 2002; Chrestensen *et coll.*, 2004; Stoecklin *et coll.*, 2004). TTP est une des cibles majeures de MK2 lors de l'activation immunitaire et est directement

phosphorylée au niveau des résidus sérines 52 et 178 chez la souris (Chrestensen *et coll.*, 2004). Dans les macrophages de souris doublement déficientes pour MK2 et TTP, le faible niveau d'expression du TNF-alpha observé chez les souris MK2<sup>-/-</sup> est restauré au niveau d'expression élevé observé dans les souris TTP<sup>-/-</sup> (Hitti *et coll.*, 2006). La phosphorylation des sérines 52 et 178 par l'activation de la voie p38 MAPK/MK2 entraîne la formation d'un complexe avec la protéine chaperonne 14-3-3 (Chrestensen *et coll.*, 2004) qui réduit l'activité déstabilisatrice des ARNm de TTP (Johnson *et coll.*, 2002; Stoecklin *et coll.*, 2004). Les 3 membres de la famille TIS11 sont capables de se lier à la protéine 14-3-3 (Johnson *et coll.*, 2002), cependant, le rôle précis de cette association n'est pas encore bien déterminé (Stoecklin *et coll.*, 2004). Les protéines 14-3-3 sont une famille de protéines ubiquitaires capables de se lier à des phospho-protéines au niveau des sérines comme des thréonines, et peuvent exercer ainsi différentes modifications telles que des changements conformationnels, un encombrement stérique d'une séquence consensus ou une modification du repliement (Bridges et Moorhead, 2004). L'importance de la liaison à la protéine 14-3-3 pour l'inhibition de TTP est illustrée par le fait qu'un mutant non phosphorylable ne se lie pas à la protéine 14-3-3 et est constitutivement actif (Stoecklin *et coll.*, 2004). Cependant, la liaison de TTP à la protéine 14-3-3 n'empêche pas sa liaison à la séquence ARE des ARNm (Stoecklin *et coll.*, 2004). La fonction de TTP serait également dépendante de sa localisation intracellulaire. L'association avec la protéine 14-3-3 induit le cas échéant une délocalisation de TTP du noyau vers le cytoplasme (Mahtani *et coll.*, 2001; Johnson *et coll.*, 2002; Brook *et coll.*, 2006). Cette délocalisation pourrait être due à un masquage, par la protéine 14-3-3, de la séquence de localisation nucléaire, ou un démasquage, de la séquence d'export nucléaire (Muslin et Xing, 2000). Dans la mesure où la dégradation des ARNm est un phénomène qui a lieu dans le cytoplasme, cette délocalisation n'explique pas la diminution des fonctions de TTP. Il semblerait que la liaison à la protéine 14-3-3 exclue également TTP des granules de stress (Stoecklin *et coll.*, 2004).

Près de 10 ans se sont écoulés entre les premiers travaux publiés sur la phosphorylation de TTP et ceux de TIS11b. Notamment la protéine kinase B (PKB) phosphoryle TIS11b sur les sérines 92 (Schmidlin *et coll.*, 2004) et 203 (Benjamin D *et coll.*, 2006), ce qui induit la formation d'un complexe avec la protéine 14-3-3 et une diminution de l'activité déstabilisatrice des ARNm. Ces deux sites sont impliqués dans la liaison à la protéine 14-3-3 mais la phosphorylation de la sérine 203 semble avoir un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité déstabilisatrice de TIS11b. Il a été montré plus récemment que TIS11b était également phosphorylée par MK2 au niveau des sérines 54, 92, 203 et d'un site non identifié dans la région C-terminale (Maitra *et coll.*, 2008). Cependant, l'inhibition de l'activité de TIS11b n'impliquerait que les trois premières sérines. L'expression de TIS11b a également été décrite comme étant régulée par la protéine kinase A (PKA) dans des cellules

humaines « osteoblastes-like » (Reppe *et coll.*, 2004) et la voie p38 MAPK dans des myoblastes de souris (Busse *et coll.*, 2008), mais sans que la phosphorylation de la protéine ne soit caractérisée.

Par ailleurs, la notion que la phosphorylation pourrait stabiliser les protéines de la famille TIS11 a été suggérée. TIS11b est une protéine relativement labile avec une demi-vie inférieure à 3 h, en raison de sa dégradation par le protéasome (Benjamin D *et coll.*, 2006). Cependant, la protéine TIS11b est stabilisée par la phosphorylation par la PKB et déstabilisée dans les cellules PKB<sup>-/-</sup>. La phosphorylation de TTP sur les sérines 52 et 178 empêcherait également directement la dégradation de la protéine par le protéasome (Brook *et coll.*, 2006). Des expériences de fractionnement des compartiments cellulaires supportent un modèle dans lequel la protéine 14-3-3 séquestre TIS11b par une relocalisation et empêche ainsi sa fonction déstabilisatrice des ARNm et également sa dégradation par le protéasome. Ceci permettrait de maintenir un taux de protéine TIS11b important dans la cellule et de rétablir une activité déstabilisatrice ultérieure (Benjamin D *et coll.*, 2006). Outre l'exclusion des granules de stress, la phosphorylation pourrait affecter également les interactions protéines-protéines par lesquelles les protéines TIS11 recrutent la machinerie de dégradation des ARNm (Sandler H et Stoecklin, 2008).

Enfin, des résultats récents suggèrent que la phosphorylation inhibitrice de TTP par MK2 serait équilibrée par la phosphatase PP2A (protein phosphatase 2A), qui entre directement en compétition avec la protéine 14-3-3 pour la liaison à TTP (Sun *et coll.*, 2007). PP2A déphosphorylerait TTP au niveau de la sérine 178, et peut être au niveau d'autres sites potentiels, ce qui activerait la dégradation des ARNm. Le rôle de la voie p38-MAPK/MK2 dans la fonction de TTP n'est qu'une simple inhibition de l'activité de la protéine par phosphorylation, dans la mesure où MK2 est également un activateur de TTP. Au cours des premières minutes d'activation des macrophages par le LPS, MK2 induit l'expression de TTP en même temps que celle des cytokines qu'elle va réguler. L'augmentation de TTP est due d'une part, à la stabilisation de son ARNm de manière dépendante de MK2, et d'autre part, à la stabilisation de la protéine (Hitti *et coll.*, 2006). La phosphorylation de TTP par MK2 induit l'accumulation de la protéine dans le cytoplasme sous forme inactive. Les ARNm des cytokines sont donc stabilisés et exprimés durant cette première phase d'induction des cytokines. Dans la deuxième phase, lorsque la production de cytokine est ralentie, une importante quantité de TTP est prête à être activée dans le cytoplasme par déphosphorylation par PP2A. Les ARNm des cytokines sont alors déstabilisés et ne sont plus traduits. Ainsi, MK2 et PP2A coordonneraient séquentiellement la réponse inflammatoire en contrôlant la stabilité, la localisation et l'activité de TTP (Sun *et coll.*, 2007).

**En conclusion**, les protéines de la famille TIS11 sont des protéines qui sont relativement similaires en terme de mécanismes d'activité ou de régulation. Leur spécificité serait plutôt liée au type cellulaire et aux circonstances dans lesquelles elles sont exprimées et exercent leur activité. Par ailleurs, il a été montré à plusieurs reprises qu'une dérégulation de la stabilité des ARNm dépendante des ARE pouvait contribuer à une transformation oncogénique (Frankel et Pabo, 1988; Nair *et coll.*, 1994; Stoecklin *et coll.*, 2003). Les protéines de la famille TIS11 pourraient donc également être impliquées dans cette transformation. Notamment, dans une étude recherchant des gènes pertinents dans la transformation oncogénique, TTP a été identifiée comme un gène candidat dans plusieurs types de leucémies (Li *et coll.*, 1999). A l'inverse, ces protéines pourraient également être utilisées comme suppresseurs de tumeur, et cela a été décrit pour TTP, dans un modèle tumoral issu de mastocytes transformés par v-H-Ras (Stoecklin *et coll.*, 2003). Ces tumeurs expriment un ARNm de l'IL-3 anormalement stable. La transfection de ces cellules tumorales par TTP, avant leur implantation chez la souris, retarde la croissance des tumeurs de 4 semaines et les tumeurs qui finissent par se développer ont perdu l'expression de TTP. De plus, une étude a montré plus récemment que la surexpression de TTP régule la stabilité de l'ARNm du VEGF, bloque son expression dans des cellules tumorales transformées par Ras et induit une diminution du développement de ces tumeurs chez la souris nude (Essafi-Benkhadir *et coll.*, 2007). Ces cellules transformées par Ras montrent une activité accrue de la voie ERK et une augmentation de la stabilité de l'ARNm du VEGF par inhibition de l'activité déstabilisatrice de TTP. La surexpression de TTP dans ces cellules retarde la croissance tumorale et diminue la vascularisation des tumeurs.



# 4<sup>ème</sup> Partie :

## Les PTD



## 4. Les PTD

Les PTD (protein transduction domain) sont également appelé CPP (cell penetrating peptides). Ce sont, pour la plupart, de petits peptides de l'ordre de la dizaine d'acides aminés qui sont capables de pénétrer à l'intérieur des cellules et de permettre le passage à travers les membranes de diverses molécules auxquelles ils ont été fusionnés. Cette propriété leur confère un intérêt certain en recherche médicale et a suscité de nombreuses études sur leur nature, leurs mécanismes de pénétration et leur éventuelle toxicité.

### 4.1. Origine et principe

La découverte des PTD a été réalisée suite à l'observation que des facteurs de croissance étaient capables de s'internaliser dans les cellules. Pour la plupart des molécules, la membrane plasmique représente une barrière imperméable. Il est donc fortement singulier que certaines protéines ou peptides aient la capacité de traverser cette frontière et d'atteindre le cytoplasme. Parmi ceux-ci, se trouvent des facteurs de transcription tels que l'homéodomaine du gène *antennapedia* de *Drosophila melanogaster* (Joliot *et coll.*, 1991) et la protéine Tat issue du VIH-1 (virus de l'immunodéficience humaine) (Frankel et Pabo, 1988), ou une protéine de structure, la protéine VP22 du virus de l'herpès (Elliott et O'Hare, 1997). L'étude de ces protéines a permis de mettre en évidence qu'une petite portion de la protéine, de l'ordre de la dizaine d'acides aminés, souvent composée d'acides aminés basiques, était suffisante pour permettre le passage à travers les membranes. Ces séquences ont été intitulées PTD (protein transduction domain). Le premier peptide de la protéine Tat composé des acides aminés (37-72), a permis d'internaliser la protéine bêta-galactosidase (Fawell *et coll.*, 1994). Cette étude a montré que le peptide Tat était capable de délivrer des protéines dans la plupart des cellules testées. Plus tard, il a été montré que le PTD Tat-(47-57) (YGRKKRRQRRR) était suffisant pour induire cette internalisation (Potocky *et coll.*, 2003). De même pour l'homéodomaine du gène *antennapedia*, un fragment de 16 acides aminés : Antp(43-58) ou Pénétratine (RQIKIYFQNRMMKWKK) correspondant à la 3<sup>ème</sup> hélice de l'homéodomaine est capable de traverser les membranes plasmiques. La suppression d'un seul acide aminé supplémentaire de ce peptide entraîne la perte de cette capacité (Derossi *et coll.*, 1994). Les études de structure/activité ont permis de mettre en évidence des caractères communs de ces peptides et notamment que ces PTD sont constitués en majorité d'acides aminés basiques arginine ou lysine. La délétion du groupe d'acides aminés basiques RKKRRQRRR du PTD Tat 37-72 inhibe son internalisation (Vives *et coll.*, 1997). Ces observations ont conduit à la synthèse et à la modélisation de peptides synthétiques, notamment les polyarginines et les polylysines (Mitchell *et coll.*, 2000).

Néanmoins, bien que tous les PTD présentent la propriété universelle d'être chargés positivement, cette propriété ne semble pas être suffisante pour permettre la pénétration. Les résidus arginines ont une contribution plus importante à la capacité de pénétration que les résidus lysines alors que ces deux acides aminés confèrent au peptide une charge nette équivalente (Mitchell *et coll.*, 2000). Cette différence pourrait être expliquée par la possibilité de deux liaisons hydrogène avec l'arginine contre une seule avec la lysine dans des conditions de pH physiologique, avec les phospholipides membranaires (Mitchell *et coll.*, 2000; Rothbard *et coll.*, 2004). La longueur de ces peptides semble également avoir une importance. Il a été rapporté qu'une taille optimale autour de 8 arginines était nécessaire (Futaki *et coll.*, 2001).

## 4.2. Mécanismes de l'internalisation

A l'heure actuelle, les mécanismes d'internalisation utilisés par ces peptides restent controversés, et sembleraient dépendre de nombreux éléments tels que la nature du peptide lui-même, sa concentration, la nature de la molécule transportée, le type de liaison à la molécule transportée et le type cellulaire impliqué (Patel *et coll.*, 2007).

Initialement, l'internalisation de ces peptides était supposée se produire par diffusion directe à travers la membrane (Prochiantz, 2000). De nombreuses études avaient montré que ce phénomène d'internalisation n'était inhibé ni par une température de +4°, ni par une déplétion en ATP, se produisait en quelques minutes (5 à 10 min) et à de faibles concentrations (de l'ordre de 100 nM) (Derossi *et coll.*, 1994; Vives *et coll.*, 1997; Futaki *et coll.*, 2001; Thoren *et coll.*, 2003). Par ailleurs, l'utilisation des isomères D- des acides aminés n'influence pas l'internalisation du peptide Tat (Futaki *et coll.*, 2001). Aucun récepteur spécifique n'a été mis en évidence dans l'internalisation de ces molécules (Derossi *et coll.*, 1996) et l'utilisation d'inhibiteurs de l'endocytose n'a pas non plus montré d'influence sur la capacité de pénétration des PTD (Vives *et coll.*, 1997; Suzuki *et coll.*, 2002). Toutes ces observations suggéraient un mécanisme de transduction direct des PTD à travers la membrane sans que l'endocytose ne soit impliquée (Derossi *et coll.*, 1994; Derossi *et coll.*, 1996; Vives *et coll.*, 1997).

Cependant en 2003, Richard *et coll.* ont rapporté que les méthodes utilisées jusque là pour l'analyse de l'internalisation, i.e. la cytométrie de flux et la fixation des cellules, étaient inadéquates (Richard *et coll.*, 2003). En effet, il est apparu que la fixation des cellules entraîne des artéfacts de pénétration et que la cytométrie de flux doit être précédée d'un traitement des cellules par une digestion à la trypsine afin d'éliminer tout peptide qui serait fixé à la membrane et qui induirait ainsi des faux positifs. La méthode de choix d'analyse de l'internalisation de ces peptides marqués avec un fluorochrome est alors devenue l'imagerie confocale sur cellules vivantes. Depuis, la prévalence d'une voie de pénétration indépendante de l'endocytose s'est transformée en celle de l'endocytose, comme voie majoritaire d'internalisation dans des cellules vivantes (Lundberg *et coll.*, 2003; Potocky *et coll.*, 2003; Richard *et coll.*, 2003).

L'endocytose est un terme général pour évoquer un processus cellulaire d'internalisation de macromolécules dépendant de l'énergie et caractérisé par la formation de vésicules. On peut distinguer 2 types d'endocytose. La phagocytose qui concerne l'internalisation de grosses particules (typiquement les corps apoptotiques) et la pinocytose, qui correspond à l'internalisation de liquides et de solutés. La pinocytose elle-même regroupe 4 mécanismes, l'endocytose dépendante des puits de clathrine, l'endocytose dépendante des cavéoles (puits recouverts de cavéoline), l'endocytose indépendante de la clathrine et de la cavéoline, et la macropinocytose (schéma 28).

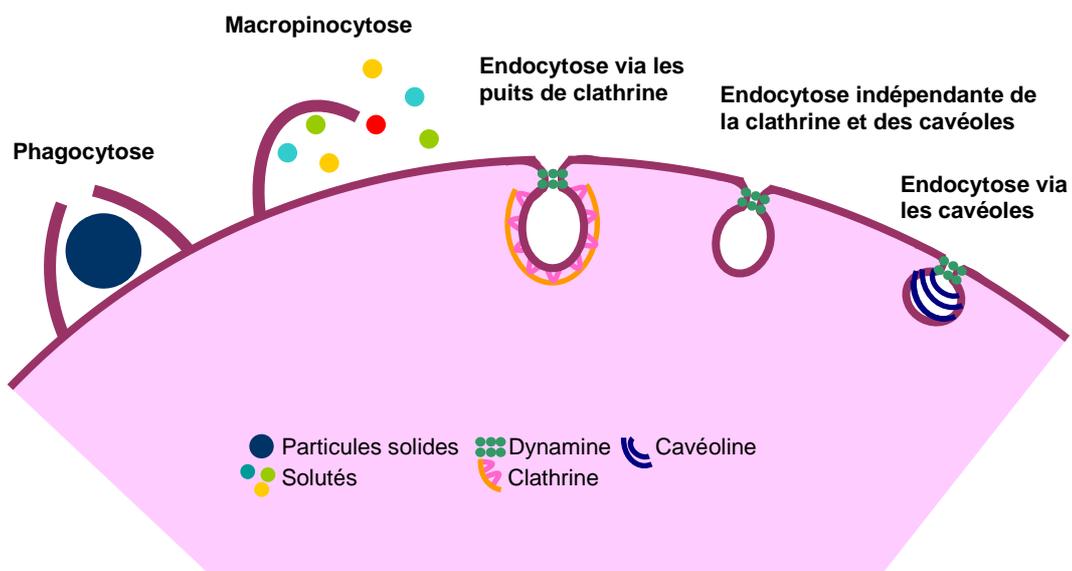


Schéma 28 : Les différentes voies d'endocytose.

L'endocytose serait fortement impliquée dans l'internalisation des peptides fortement basiques et riches en arginines comme Tat et les poly-arginines, ainsi que dans le transport de la protéine Tat entière (Richard *et coll.*, 2003). Néanmoins, les résultats restent controversés quant à l'implication des différentes voies de l'endocytose. Kaplan *et coll.* ont montré que le PTD Tat utilisait exclusivement un mécanisme d'internalisation impliquant la macropinocytose (Kaplan *et coll.*, 2005). Richard *et coll.* ont démontré que l'internalisation de Tat impliquait l'endocytose via les puits de clathrine mais pas via les cavéoles (Richard *et coll.*, 2005). En effet, des cellules déficientes en cavéoline-1 internalisent Tat et des inhibiteurs de la voie d'endocytose clathrine-dépendante réduisent l'internalisation du peptide aussi bien dans les cellules qui expriment la cavéoline-1 que dans celles qui ne l'expriment pas. Ceci suggère par ailleurs, que l'inhibition d'une des voies d'endocytose n'est pas compensée par une autre voie dans ce modèle. A l'inverse, Fittipaldi *et coll.* évoquent quant à eux une voie d'internalisation dépendante des cavéoles. Ils ont montré d'une part, que Tat et la cavéoline-1 étaient co-localisées dans les endosomes, et d'autre part, que l'utilisation d'inhibiteur de la voie cavéole-dépendante empêchait l'internalisation de Tat (Fittipaldi *et coll.*, 2003).

Par ailleurs, dans certains cas, l'association initiale à la membrane plasmique a été attribuée à des interactions multivalentes avec les protéoglycanes de la surface cellulaire et notamment les héparane-sulfates (Console *et coll.*, 2003; Ziegler *et Seelig*, 2004). Les héparane-sulfates composent majoritairement la matrice extracellulaire et agissent comme des points d'ancrage pour de nombreuses molécules et de pathogènes à la surface de la cellule. Le premier contact entre le PTD et la surface cellulaire s'effectuerait avec ces protéoglycanes. Le regroupement des protéoglycanes de surface et la réorganisation des fibres d'actine se comporteraient comme une plateforme de capture déclenchant l'internalisation de molécules polycationiques comme les PTD (Rusnati *et coll.*, 1999; Ziegler *et coll.*, 2005). Notamment, Ziegler *et coll.* ont observé, dans des fibroblastes, un import rapide et dépendant des héparane-sulfates du peptide Tat marqué avec de la fluorescéine (Ziegler *et coll.*, 2005). La suppression enzymatique des héparane-sulfates réduit l'internalisation des PTD. De même Tyagi *et coll.* ont montré que des cellules ayant un défaut de biosynthèse des héparane-sulfates sont incapables d'internaliser Tat (Tyagi *et coll.*, 2001).

Certains auteurs proposent que les PTD interagiraient avec la matrice extracellulaire via les héparane-sulfates puis seraient internalisés par la voie endosomale (Console *et coll.*, 2003; Lundberg *et coll.*, 2003; Gump *et Dowdy*, 2007). Néanmoins, une voie d'internalisation dépendante des héparane-sulfates mais indépendante de l'endocytose a été également

|   |   |
|---|---|
| <p><b>Selon la nature du PTD</b></p>        | <p><b>Tat</b> → <b>Transduction</b> (Zaro <i>et coll.</i>, 2003)</p> <p><b>Polyarginines</b> → <b>Transduction</b> (Zaro <i>et coll.</i>, 2003; Thoren <i>et coll.</i>, 2003)</p> <p><b>Polylysines</b> → <b>Endocytose</b> (Zaro <i>et coll.</i>, 2003)</p> <p><b>Pénétratine</b> → <b>Endocytose</b> (Thoren <i>et coll.</i>, 2003)</p>                                 |
| <p><b>Selon la taille, ex. de Tat</b></p>   | <p><b>Seul</b> → <b>Endocytose</b> (Richard <i>et coll.</i>, 2003; 2005; Kaplan <i>et coll.</i>, 2004; Potocky 2003)</p> <p>→ <b>Transduction</b> (Zaro <i>et coll.</i>, 2003)</p> <hr/> <p><b>Fusionné (peptide)</b> → <b>Transduction</b> (Tunnemann <i>et coll.</i>, 2006)</p> <p><b>Fusionné (protéine)</b> → <b>Endocytose</b> (Tunnemann <i>et coll.</i>, 2006)</p> |
| <p><b>Selon la concentration en PTD</b></p> | <p><b>≈ 1 μM</b> → <b>Endocytose</b> (Duchardt <i>et coll.</i>, 2007)</p> <p>→ <b>Transduction</b> (Vitte <i>et coll.</i>, 2008)</p> <hr/> <p><b>&gt; 1 μM</b> → <b>Endocytose</b> (Tunnemann <i>et coll.</i>, 2006)</p>  |

**Schéma 29 : Les différentes hypothèses de mécanismes d'internalisation.**

évoquée, ce qui ferait des héparane-sulfates les médiateurs d'une voie supplémentaire d'internalisation (Ziegler *et coll.*, 2005).

Devant toutes ces contradictions, plusieurs auteurs ont évoqué la possibilité de l'implication simultanée de plusieurs voies de pénétration parmi les différentes variantes d'endocytose et/ou la voie indépendante de l'endocytose. L'utilisation différentielle de ces voies se ferait selon la nature du PTD, sa taille i.e. s'il est seul ou fusionné à une séquence d'acides aminés plus longue, ou sa concentration (schéma 29). Zaro et coll. ont montré que lorsque l'on compare plusieurs peptides composés d'acides aminés différents ou avec une distribution de charges modifiée, le ratio d'internalisation par endocytose versus transduction est modifié (Zaro et Shen, 2003). Le peptide Tat et les polyarginines seraient donc plutôt internalisées par transduction alors que les polylysines pénétreraient par endocytose (Zaro et Shen, 2003; 2005). De même, Thoren et coll. ont montré que les polyarginines étaient internalisées par transduction (Thoren *et coll.*, 2003), et Tunnemann et coll. ont rapporté que le peptide Tat conjugué à un petit peptide pénétrait dans la cellule par un processus rapide et indépendant de l'endocytose, donc par déduction : la transduction (Tunnemann *et coll.*, 2006). Néanmoins, dans cette dernière étude, Tat associé à des conjugués plus gros, empruntait la voie de l'endocytose. Il avait donc été alors conclu que l'endocytose était réservée aux complexes de haut poids moléculaire. Cependant, cette hypothèse s'oppose à de nombreux travaux sur les mécanismes de pénétration du peptide Tat seul montrant l'utilisation d'un mode de pénétration vésiculaire i.e. l'endocytose (Potocky *et coll.*, 2003; Richard *et coll.*, 2003; Kaplan *et coll.*, 2005; Richard *et coll.*, 2005). Récemment, une hypothèse conciliant ces résultats a été émise par Duchardt et coll. qui ont montré que la concentration en peptide influençait également le mode d'internalisation (Duchardt *et coll.*, 2007). A des concentrations de l'ordre du micromolaire, Antp, Tat et R9, utilisent simultanément les trois voies d'endocytoses : la macropinocytose, l'endocytose via les puits de clathrine et l'endocytose via les caveolae /radeaux lipidiques. A de plus fortes concentrations, aucune vésicule endosomale n'a pu être détectée, suggérant l'implication d'une voie de pénétration intracellulaire indépendante de l'endocytose impliquant les héparane-sulfates. Cependant, Vitte et coll. ont décrit par la suite qu'une voie indépendante de l'endocytose était compatible avec l'utilisation de concentration de l'ordre de grandeur de la micromole (Vitte et Jalinot, 2008). Les mécanismes exacts d'internalisation et les conditions les influençant ne sont donc pas clairement déterminés pour l'instant.

Par ailleurs, alors que les PTD internalisés par transduction sont directement localisés dans le cytoplasme après le passage membranaire, les PTD internalisés par endocytose sont

confinés dans des vésicules d'endocytose et peuvent être libérés ou non dans le cytoplasme. Il est également possible que seule une petite fraction soit libérée dans le cytoplasme ou le noyau (Richard *et coll.*, 2005). Il semblerait que cette libération dans le cytoplasme des PTD et leur molécule associée dépende de l'acidification des endosomes (Fischer C *et coll.*, 2007). En effet, les changements de pH à l'intérieur de l'endosome modifieraient la conformation du peptide et faciliteraient ainsi leur libération de l'endosome (Potocky *et coll.*, 2003; Fischer R *et coll.*, 2004).

Une fois libérés à l'intérieur de la cellule, les PTD, aussi bien Antp, Tat que les polyarginines, semblent être localisés à la fois dans le cytoplasme et dans le noyau, même si le signal nucléaire est généralement plus faible (Potocky *et coll.*, 2003; Thoren *et coll.*, 2003). En effet, il avait été décrit précédemment que la séquence GRKKR du peptide Tat était un signal de localisation nucléaire potentiel (Ruben *et coll.*, 1989). La fusion de ces quelques acides aminés à la bêta-galactosidase entraîne une accumulation de celle-ci dans le noyau. Néanmoins, les polyarginines peuvent également induire une localisation nucléaire. Il semblerait que la concentration en PTD influence cette localisation subcellulaire (Duchardt *et coll.*, 2007). L'augmentation de la concentration en PTD s'accompagne d'une augmentation de la localisation nucléaire. Par ailleurs, la nature et la composition des molécules transportées contribuent également de manière importante à cette localisation subcellulaire (Tunnemann *et coll.*, 2006; Vitte et Jalinot, 2008).

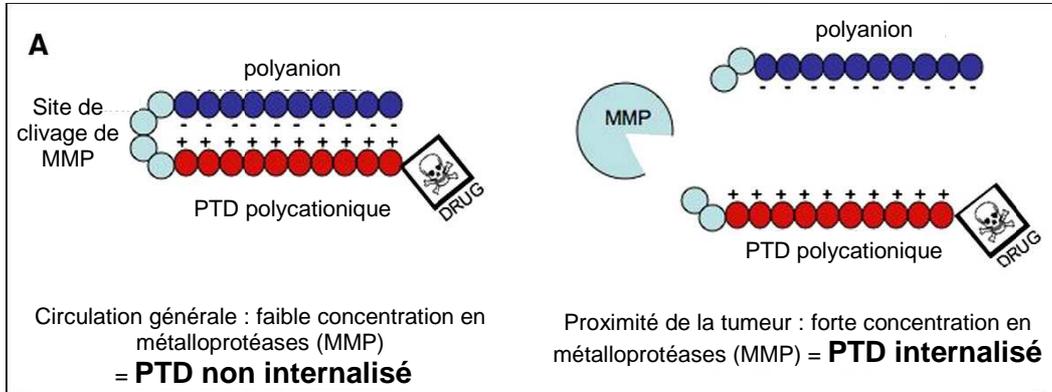
### 4.3. Vectorisation de molécule et toxicité

L'intérêt suscité par ces peptides dans la recherche biomédicale est une conséquence directe de leur capacité à importer efficacement à l'intérieur de la cellule des molécules aussi diverses que des siRNA (Moschos *et coll.*, 2007), des oligonucléotides anti-sens (Astria-Fisher *et coll.*, 2002), des peptides (Pooga *et coll.*, 1998; Shibagaki et Udey, 2002), des protéines entières (Schwarze *et coll.*, 1999), des plasmides (Ignatovich *et coll.*, 2003), des nano-particules (Lewin *et coll.*, 2000) ou des liposomes (Torchilin *et coll.*, 2001), que ce soit in vitro comme in vivo (pour revue (Dietz et Bahr, 2004)). Ces molécules peuvent être des marqueurs ou des molécules biologiquement actives. La première étude in vivo qui ait été réalisée a concerné la protéine de fusion Tat-bétagalactosidase qui a été délivrée par voie intrapéritonéale chez la souris. La protéine de fusion a été retrouvée dans presque tous les tissus y compris le cerveau, confirmant l'absence de spécificité cellulaire observée in vitro. De manière intéressante, le pic d'activité de la bêta-galactosidase était observé 2 h après

celui de la concentration intracellulaire de la protéine, probablement en raison du délai de repliement de la protéine par les protéines chaperonnes après son internalisation. Cette étude a ainsi démontré la possibilité de délivrer une protéine biologiquement active *in vivo* par cette approche (Schwarze *et coll.*, 1999). Par la suite, d'autres études du même type ont été effectuées et ont montré des résultats intéressants *in vitro* et *in vivo*, confirmant ainsi la pertinence de cette approche (Roisin *et coll.*, 2004; Snyder *et coll.*, 2004; Hotchkiss *et coll.*, 2006; Nagel *et coll.*, 2008).

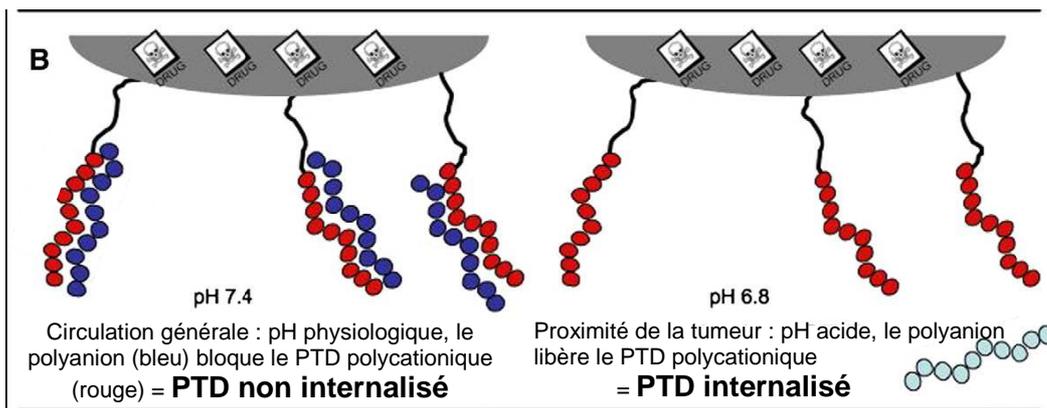
Afin qu'une application médicale soit envisageable chez l'homme, la toxicité potentielle de ces PTD a été évaluée. Notamment, il a été décrit que le peptide Tat initial de 82 acides aminés était neurotoxique (Nath *et coll.*, 1996). C'est le fragment 31-61 qui serait responsable de cet effet. Le fragment 48-85 qui contient le PTD Tat 47-57 utilisé depuis, n'induirait pas cette neurotoxicité. Par la suite, des études de toxicité concernant uniquement le fragment 47-57 ont été réalisées *in vitro*. Vives *et coll.* ont montré que l'incubation de 100  $\mu\text{M}$  de PTD Tat avec des cellules Hela en culture n'induisait que 10 % de mort cellulaire après 24 h (Vives *et coll.*, 1997). De même, une étude comparative de toxicité du PTD Tat et des polyarginines a été réalisée dans ces mêmes conditions et a montré une mortalité cellulaire de 5 à 10 % pour les deux types de peptides (Suzuki *et coll.*, 2002). De plus, une étude a également été effectuée *in vivo* chez la souris, par injection de 1 mg/kg du PTD Tat fusionné à la bêta-galactosidase pendant 14 jours consécutifs, et aucun signe de toxicité n'a pu être révélé chez l'animal dans ces conditions (Schwarze *et coll.*, 1999).

Par ailleurs, ces peptides sont capables de pénétrer dans la plupart des cellules de mammifères testées mais également dans les levures (Holm *et coll.*, 2005), les bactéries (Nekhotiaeva *et coll.*, 2004) et les cellules de plantes (Mae *et coll.*, 2005). Cette absence de spécificité cellulaire a amené l'utilisation de ces PTD en association avec diverses stratégies d'adressage cellulaire (pour revue, (Vives *et coll.*, 2008)). Pour cela, différents systèmes ont été envisagés et permettent, soit l'activation de la molécule associée au PTD de manière locale ou spécifique, soit l'internalisation des complexes « PTD-molécule active » spécifiquement dans le type cellulaire visé. Parmi les stratégies d'activation, l'utilisation de transporteur thermo-sensible a été évoquée et notamment de liposome (Dromi *et coll.*, 2007). La libération des molécules est induite par une source d'hyperthermie externe et focalisée, telle que des ultrasons, et permet de délivrer le complexe « PTD-molécule active » à un site précis. Le PTD associé à la molécule active est alors internalisé préférentiellement dans les cellules environnant le site d'activation thermique. D'autres stratégies utilisent les spécificités environnementales des cellules visées et notamment la présence des métalloprotéases de la matrice (Jiang *et coll.*, 2004). Cette stratégie utilise les PTD



**Schéma 30 : Ciblage des tumeurs via l'utilisation d'un polyanion couplé à un site de clivage des métalloprotéases.**

D'après Vivès et coll., Biochim. Biophys. Acta 2008



**Schéma 31 : Ciblage des tumeurs via le pH.**

D'après Vivès et coll., Biochim. Biophys. Acta 2008

polyarginines et leur capacité à se lier, par des interactions ioniques avec une molécule polyanionique (schéma 30). Ces deux molécules sont reliées entre elles par une séquence de clivage par les métalloprotéases, qui forme une structure en « épingle à cheveux ». Dans la circulation sanguine, la concentration en métalloprotéases est faible, il n'y a donc pas de clivage du PTD et du polyanion et les charges anioniques empêchent les charges cationiques du PTD de se lier de manière non spécifique aux héparane-sulfates de la surface cellulaire, ce qui induirait l'internalisation du complexe. Les cellules tumorales sécrétant des métalloprotéases (Talvensaari-Mattila *et coll.*, 2003), l'environnement de la tumeur est plus riche en métalloprotéases et le clivage de la structure PTD/polyanion se produit, libérant ainsi le complexe « PTD-molécule active » qui peut alors être internalisé. Une stratégie très similaire à celle-ci utilise le pH acide environnant la tumeur pour libérer le complexe « PTD-molécule active » d'un transporteur masquant le PTD à un pH plus élevé (Sethuraman et Bae, 2007) (schéma 31).

Hormis ce type de stratégies, un nouveau type de peptide émerge et est appelée « cell targeting peptide » ou CTP. Il s'agit de petits peptides (3 à 10 acides aminés), spécifiques de types cellulaires et internalisés par endocytose (Vives *et coll.*, 2008). Ces CTP montrent d'importantes spécificité et affinité pour un type cellulaire donné via une interaction avec un récepteur, fortement voire exclusivement exprimé à la surface de ces cellules, et sont internalisés via ces récepteurs. Un des CTP les plus documentés est le motif RGD ou arginine-glycine-acide aspartique (Wickham *et coll.*, 1995). Ce motif peut reconnaître spécifiquement le récepteur  $\alpha\beta 3$  des intégrines en fonction des séquences l'encadrant et de sa conformation (Aumailley *et coll.*, 1991). Ce récepteur  $\alpha\beta 3$  est surexprimé de manière sélective à la surface des cellules endothéliales de vaisseaux croissants (Brooks PC *et coll.*, 1994), et dans certains cas, directement à la surface de cellules tumorales (Gladson et Cheresch, 1991; Danen *et coll.*, 1995). Il est donc de plus en plus utilisé pour cibler les tumeurs via les cellules tumorales elles-mêmes ou via l'angiogenèse associée aux tumeurs. Afin de potentialiser les propriétés de ce motif RGD, Garanger et coll. utilisent un décapeptide cyclique appelé RAFT qui permet, d'une part la fixation de quatre motifs cRGD (forme cyclique du RGD qui permet une reconnaissance optimale du récepteur  $\alpha\beta 3$ ), et d'autre part la fixation de molécules actives ou de molécules « traceurs » permettant de détecter la tumeur en imagerie (Garanger *et coll.*, 2005). Cette étude a montré que ce système pourrait être utilisé pour délivrer des molécules biologiquement actives.

**En conclusion**, les PTD sont des outils intéressants dans la délivrance de molécules biologiquement actives et ont montré à plusieurs reprises leur potentiel d'utilisation *in vivo*. Leur faible voire absence de toxicité et les diverses stratégies d'adressage pour un type cellulaire donné qui peuvent leur être associés, ouvrent le champ d'une utilisation biomédicale de ces peptides. Néanmoins, un PTD en particulier ne peut pas être considéré comme un système universel d'internalisation (Zavaglia *et coll.*, 2005). La capacité des PTD à internaliser des molécules et leur permettre une activité biologique à l'intérieur de la cellule dépend beaucoup de la molécule transportée. Le choix du PTD à utiliser doit être réévalué pour chaque cas, en fonction de la molécule active et notamment de sa nature et de la localisation subcellulaire de son activité.





# RESULTATS



## Objectif de la thèse :

Le laboratoire au sein duquel j'ai effectué ma thèse étudie l'angiogenèse hormono-régulée et l'angiogenèse tumorale. En 2002, notre équipe a montré que la stimulation de cellules primaires cortico-surréaliennes bovines en culture primaire par l'hormone hypophysaire ACTH induisait l'expression du VEGF de manière indépendante de sa transcription. En effet, en réponse à l'ACTH, l'expression du VEGF est régulée au niveau post-transcriptionnel par la stabilisation/déstabilisation de son transcrit via des séquences riches en AU (ARE) situées dans la région 3' non traduite (3'UTR) de son ARNm. Le laboratoire a mis en évidence une protéine, TIS11b, exprimée également en réponse à une stimulation des cellules par l'ACTH, mais de manière concomitante avec la phase de déstabilisation de l'ARNm du VEGF. TIS11b appartient à une famille de protéines déstabilisatrices des ARNm via les séquences ARE. L'interaction de TIS11b avec l'ARNm du VEGF a été confirmée par la suite, et le site de liaison de la protéine à l'ARNm a également été identifié.

Dans ce contexte, le **premier objectif** de ma thèse était d'évaluer la possibilité d'utiliser les propriétés déstabilisatrices de TIS11b sur l'ARNm du VEGF pour une thérapie anti-angiogène et anti-tumorale. Pour cela, la protéine a été vectorisée par la fusion de petits peptides ou PTD (protein transduction domain) lui permettant de traverser les membranes et d'atteindre sa cible intracellulaire, l'ARNm du VEGF.

L'ACTH étant une hormone qui active la voie de l'AMPc et de la protéine kinase A (PKA), le **deuxième objectif** de ma thèse était de caractériser la phosphorylation de TIS11b par la PKA en réponse à une stimulation par l'ACTH et d'étudier les conséquences de cette phosphorylation sur son activité déstabilisatrice des ARNm.



1<sup>ère</sup> Partie :

Adressage intracellulaire de TIS11b  
et déstabilisation de l'ARNm du  
VEGF



## 1. Introduction

De nombreuses données cliniques et expérimentales montrent que la croissance tumorale et la formation de métastases sont influencées par l'interaction des cellules tumorales avec le micro-environnement du tissu hôte, en particulier avec les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins adjacents (Folkman, 1971; Holash *et coll.*, 1999). En effet, les cellules endothéliales vasculaires, qui sont quiescentes dans des conditions physiologiques, sont activées par différents facteurs angiogènes sécrétés soit par les cellules tumorales, soit par des cellules de l'environnement tumoral. La migration des cellules endothéliales des vaisseaux préexistants vers le stimulus angiogène et leur prolifération conduisent à la formation d'un réseau de néo-capillaires au sein de la tumeur (Fukumura *et coll.*, 1998). Des modèles de souris transgéniques développant spontanément des carcinomes (« Oncomice » Rip-Tag, MMTV-ras) ont permis d'établir que l'induction de l'angiogenèse est un commutateur important (« angiogenic switch ») de la progression tumorale contrôlant l'expansion de la tumeur et sa dissémination éventuelle sous forme de métastases (Zetter, 1998). De plus, plusieurs études ont montré que la densité de la vascularisation tumorale est corrélée dans certaines tumeurs à l'agressivité tumorale mesurée par l'incidence des métastases et/ou la diminution de la survie du patient (Cherrington *et coll.*, 2000). Cette reconnaissance de l'angiogenèse comme composante essentielle de la progression tumorale a suscité le développement d'inhibiteurs de la néo-vascularisation tumorale pour le traitement du cancer. L'hypothèse de départ était que les agents anti-angiogéniques présentaient l'avantage de cibler les cellules endothéliales diploïdes des vaisseaux qui sont génétiquement stables, réduisant ainsi les risques de résistance observés au cours des thérapies classiques (chimio- et radiothérapie) (Kerbel, 1997). En outre, la néo-vascularisation étant dormante chez les adultes sains, il a été anticipé que son inhibition ne devrait pas entraîner d'effets secondaires majeurs.

De nombreux facteurs pro- et anti-angiogènes endogènes ont été identifiés au cours de la dernière décennie (Hanahan et Folkman, 1996). La famille du facteur de croissance des cellules endothéliales ou VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) apparaît actuellement comme un des acteurs majeurs de l'angiogenèse physiologique et tumorale. Son prototype, le VEGF-A, stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales par le biais de leurs récepteurs à activité tyrosine kinase (Flt-1=VEGF-R1 et Flk-1=VEGF-R2). Dans divers modèles de tumeurs expérimentales chez la souris, le VEGF sécrété par ces tumeurs est indispensable à la croissance tumorale. La pertinence du VEGF en tant que cible des stratégies anti-angiogènes a été confirmée en 2004 par la mise sur le marché américain par Genentech de l'anticorps anti-VEGF (Avastin ou bevacizumab) pour le traitement en

première ligne du cancer métastatique du colon. Cet anticorps a constitué le premier succès de thérapie anti-tumorale par une approche anti-angiogène. Depuis, le bevacizumab a reçu les autorisations dans le traitement en première ligne du cancer du poumon non à petites cellules à un stade avancé (Sandler A *et coll.*, 2006), du cancer du sein métastatique et du cancer du rein avancé et/ou métastatique (Escudier *et coll.*, 2007b; Miller K *et coll.*, 2007). Ce médicament délivré par voie systémique présente une avancée notoire dans le traitement du cancer. Cependant, des phénomènes de résistance insoupçonnés commencent à apparaître. Le développement de stratégies combinatoires et/ou synergiques reste donc nécessaire pour contrecarrer l'action du VEGF.

L'expression du VEGF est finement contrôlée au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel (stabilité de l'ARNm et traduction). Les mécanismes impliqués dans le contrôle de la stabilité de l'ARNm du VEGF font intervenir la liaison de protéines spécifiques sur les séquences ARE de l'extrémité 3'-non traduite (3'-UTR) de l'ARNm de VEGF (Levy NS *et coll.*, 1998). Dans une étude récente (Chinn *et coll.*, 2002; Ciais *et coll.*, 2004), notre équipe a identifié pour la première fois, une protéine possédant la capacité de déstabiliser l'ARNm du VEGF. Il s'agit de la protéine à doigts de zinc TIS11b. Des expériences utilisant la co-transfection d'un plasmide codant pour TIS11b et d'un plasmide codant pour un gène rapporteur luciférase placé en amont de l'extrémité 3'-UTR de l'ARNm du VEGF ont révélé que TIS11b diminue l'activité du gène rapporteur en corrélation avec une diminution du taux d'ARNm de la luciférase. Cette étude (Ciais *et coll.*, 2004) a également montré que TIS11b interagit avec un fragment de 75 paires de bases dans la région 3'-UTR (2201 paires de bases) de l'ARNm de VEGF et diminue son expression. Ce fragment, nommé TBE (TIS Binding Element), régule l'activité de déstabilisation de l'ARNm du VEGF (Ciais *et coll.*, 2004). Ces résultats suggèrent que TIS11b pourrait exercer un effet anti-angiogénique, et de ce fait avoir un effet anti-tumoral. Dans ce contexte, nous avons entrepris de développer une nouvelle stratégie anti-tumorale visant à inhiber l'expression du VEGF dans les cellules tumorales par déstabilisation de son ARNm par la protéine TIS11b. Notre hypothèse est que cette stratégie devrait permettre de cibler également certains types de tumeurs VEGF-dépendantes, jusque là résistantes à l'Avastin<sup>TM</sup>.

Par ailleurs, les travaux récents dans le domaine des thérapies anti-angiogènes montrent clairement que les combinaisons de molécules agissant sur plusieurs cibles moléculaires sont plus efficaces que les agents mono-spécifiques (Chan et Camphausen, 2003). Du fait que TIS11b déstabilise l'ARNm de plusieurs cytokines inflammatoires et pro-angiogènes (TNF $\alpha$ , IL3,...) et de facteurs angiogènes (VEGF), cette protéine pourrait être utilisée avantageusement pour inhiber simultanément l'expression de ces médiateurs de

l'inflammation et de l'angiogenèse. L'objectif majeur de mon travail de thèse était de déterminer si la protéine TIS11b pouvait être utilisée pour déstabiliser l'ARNm du VEGF dans des tumeurs, et induire un effet anti-angiogène voire anti-tumoral.

Pour ce faire, nous avons entrepris de mettre au point une stratégie permettant d'internaliser la protéine TIS11b pour qu'elle puisse atteindre sa cible intracellulaire, l'ARNm du VEGF. Cette stratégie d'adressage utilise de petits peptides, les PTD (protein transduction domain), qui ont été décrits pour leur capacité à traverser les membranes et à internaliser les molécules qui leur sont associées (Schwarze et Dowdy, 2000). Ces PTD ont été fusionnés à la protéine TIS11b, et les constructions ainsi réalisées ont été testées pour leur efficacité à induire une déstabilisation de l'ARNm du VEGF et une inhibition de la sécrétion de VEGF. Les protéines de fusion ont ensuite été produites et purifiées. Leur capacité d'internalisation et leur activité déstabilisatrice de l'ARNm du VEGF ont été évaluées sur des cellules en culture. Ces protéines de fusion se sont révélées actives et nous avons évalué leur capacité à induire une diminution de la production du VEGF par injection directement dans un organe très vascularisé, la glande corticosurrénalienne.



**2. Article : “Protein Transduction Domain-mediated intracellular delivery of the TTP family member TIS11b/BRF1 downregulates VEGF expression in vitro and in vivo”**



**Protein Transduction Domain-mediated intracellular delivery of the TTP family member TIS11b/BRF1 downregulates VEGF expression in vitro and in vivo**

Séverine Planel<sup>1,2</sup>, Pierre Jalinot<sup>3</sup>, Jean-Jacques Feige<sup>1,2</sup> & Nadia Cherradi<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Unité 878, Grenoble, France ;

<sup>2</sup>Commissariat à l'Energie Atomique, Institut de Recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant, LAPV, Grenoble, France. <sup>3</sup>LBMC/UMR5239 CNRS, ENS Lyon, Lyon, France

Abbreviated title: TIS11b protein transduction downregulates VEGF expression

Address all correspondence and reprints request to:

Dr Nadia Cherradi, INSERM U878, LAPV, iRTSV, CEA-Grenoble

17, Rue des Martyrs, F-38054 Grenoble Cedex 9, France.

Phone: + 33 438 78 35 01

Fax: + 33 438 78 50 58

e-mail : [nadia.cherradi@cea.fr](mailto:nadia.cherradi@cea.fr)

Key words: VEGF; TIS11b; BRF1; ZFP36L1; Protein Transduction; mRNA stability; Adrenal Cortex

This work was supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM, U878), the Commissariat à l'Energie Atomique (iRTSV/LAPV), and the Cancéropole Rhône-Alpes. We are indebted to the Association pour la Recherche sur le Cancer and la Fondation pour la Recherche Médicale for their financial support to SP.



### **Abstract**

Vascular endothelial growth factor (VEGF) plays a critical role during normal embryonic angiogenesis and also in the pathological angiogenesis that occurs in a number of diseases, including cancer. Expression of VEGF is regulated through transcriptional and post-transcriptional mechanisms. We have previously shown that the zinc-finger protein TIS11b (also named BRF1 and ZFP36-L1) enhances VEGF mRNA decay through its interaction with two contiguous AU-rich elements (ARE) within VEGF 3'UTR. In the present study, we evaluate the possibility to develop a new anti-angiogenic strategy using the mRNA-destabilizing activity of TIS11b to decrease VEGF levels in living cells. To this end, we have cloned TIS11b cDNA in frame with the protein transduction domains (PTDs) Tat derived from HIV, the polyarginine peptides R7 or R9. These PTDs have been used to deliver a wide variety of cargo in cell culture and to treat preclinical models of human diseases. We report here that overexpression of Tat-, R7- and R9-TIS11b fusion proteins decreases VEGF mRNA 3'-UTR-mediated reporter gene activity as well as endogenous VEGF mRNA half-life and VEGF protein levels. Tat-, R7- and R9-TIS11b fusion proteins were subsequently expressed in bacterial cells and affinity-purified to homogeneity. Our data demonstrate that (1) Tat- and R9-TIS11b fusion proteins are efficiently internalized into living COS7 cells, as analyzed with confocal microscopy imaging, (2) addition of 100 nM of fusion proteins to COS7 cells decreases endogenous VEGF mRNA and protein levels and (3) most importantly, a single injection of R7- or R9-TIS11b fusion proteins into a high-VEGF-expressing tissue, here the mouse adrenal gland, decreases VEGF expression. Altogether, our results indicate that the use of VEGF mRNA-destabilizing activity of TIS11b to interfere with the development of angiogenesis-dependent pathologies such as cancer might be conceivable.



## Introduction

Vascular Endothelial Factor (VEGF) is a key regulator of physiological and pathological angiogenesis as shown by the severe phenotype resulting from the heterozygous ablation of the VEGF gene and the results from the use of VEGF antagonists in developmental studies (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996). Increased VEGF expression is associated with many angiogenesis-dependent pathologies such as cancer (Ferrara, 2004) and ocular diseases (Gariano et al., 2006). Therefore, intensive efforts have been undertaken over the past decade to develop therapeutic strategies to inhibit pathological angiogenesis. VEGF mediates numerous changes within the tumor vasculature, affecting endothelial cell proliferation, migration, invasion and survival, as well as vascular permeability. More recently, autocrine endothelial VEGF signaling has been found to be important in endothelial cell survival and homeostasis. Several approaches aimed at inhibiting VEGF signaling have been developed, including neutralization of the ligand or its receptors by antibodies, and blocking VEGF receptor activation and signaling with tyrosine kinase inhibitors (Ellis and Hicklin, 2008). There has been success in combining anti-angiogenic agents with conventional chemotherapy, such as the recent successful trials of the monoclonal anti-VEGF antibody bevacizumab with various chemotherapies for metastatic colorectal, renal, non-small-cell lung and metastatic breast cancer (Ellis and Hicklin, 2008). In mouse tumor models, siRNA-mediated silencing of VEGF has been reported to reduce tumor angiogenesis and tumor growth (Filleur et al., 2003; Kim et al., 2006; Takei et al., 2004).

VEGF expression is regulated by transcriptional and post-transcriptional mechanisms. Transcriptional activation through HIF-1 $\alpha$  dependent-mechanisms in response to hypoxic environment has been extensively studied (Forsythe et al., 1996; Levy et al., 1995; Shibata et al., 1998). At the post-transcriptional level, VEGF mRNA stability and translation are also controlled mechanisms (Cherradi et al., 2006; Ciais et al., 2004; Huez et al., 1998; Levy, 1998; Onesto et al., 2004). VEGF mRNA stability is regulated through the binding of stabilizing and destabilizing proteins to AU-rich elements (AREs) located in the 3'-

untranslated region (3'-UTR) of VEGF mRNA. In 2004, we first characterized TIS11b (TPA-Inducible-Sequence 11b) as a VEGF mRNA-destabilizing protein. The interaction between TIS11b and VEGF mRNA maps to a 75 bp sequence region containing two AU-rich elements within the 3'-UTR (Ciais et al., 2004). Subsequently, generation of TIS11b knock-out mice demonstrated that TIS11b is required for normal vascularisation (Bell et al., 2006).

TIS11b (also named BRF1, ERF1 or ZFP36L1) is a member of the TTP (TrisTetraProlin) family of proteins consisting of three CCCH tandem zinc-finger proteins expressed in all mammals (TTP also named TIS11 or ZFP36, TIS11b, and TIS11d also named BRF2 or ZFP36L2) and a fourth member present only in rodents (ZFP36L3). All four proteins are capable of binding and destabilizing several ARE-containing mRNAs including those encoding for several growth factors, inflammatory cytokines and proto-oncogenes. Gene knock-out (KO) studies have provided evidence for their unique role in vivo. Indeed, TTP KO mice develop a severe inflammatory syndrome (Carballo et al., 1998; Taylor et al., 1996) because the mRNAs encoding TNF $\alpha$ , GM-CSF, IL-2 and others are stabilized in TTP-KO mice (Carballo et al., 2000; Lai et al., 2006; Ogilvie et al., 2005). TIS11b/BRF1 KO mice develop chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality. TIS11b/BRF1 gene is critical for normal fetal-placental development (Stumpo et al., 2004). Mice with decreased levels of an amino-terminal truncated form of TIS11d exhibit female infertility and disrupted early embryonic development (Ramos et al., 2004). The physiological role of ZFP36L3 is unknown. TTP, the best characterized member of the family, enhances the decay of its targets by association to the mRNA decay machinery, including the 5'-to-3' exonuclease called Xrn1, the 3'-to-5' complex of exonucleases termed the exosome, the decapping complex and the CCR4 deadenylase (Lykke-Andersen and Wagner, 2005). Like TTP, TIS11b also associates with components of the mRNA decay machinery (Franks and Lykke-Andersen, 2007).

Protein transduction has emerged as a novel strategy for delivering biologically active macromolecules into cells in vivo (Green et al., 2003; Schwarze et al., 1999). Several protein transduction domains (PTDs) including the HIV-1 transactivator Tat, the *Drosophila* homeotic

transcription factor Antennapedia (Antp) and the herpes simplex virus type 1 VP22 protein are capable of crossing the plasma membrane and thereby of mediating intracellular delivery of heterologous proteins fused to them, in a concentration-dependent and receptor-independent manner (Chauhan et al., 2007; Elliott and O'Hare, 1997; Frankel and Pabo, 1988; Joliot et al., 1991). The mechanism of PTD-mediated cellular entry is still a matter of debate. However, most of the recent studies indicate that PTDs use various forms of endocytosis (Potocky et al., 2003; Richard et al., 2005; Richard et al., 2003). PTDs have been used to deliver a variety of cargo including proteins, peptides, and nucleic acids in vitro and to successfully treat several preclinical models of human diseases such as cancer and cerebral ischemia (Asoh and Ohta, 2008; Lindsay, 2002; Snyder and Dowdy, 2004). The identification of short basic peptide sequences from Tat that confer cellular uptake has led to the design of several PTDs (Futaki et al., 2001; Ho et al., 2001; Wender et al., 2000). The rate of cellular uptake has been found to strongly correlate to the number of arginine residues. This has led to the development of homopolymers of arginine which have been shown to transduce various cell types with higher efficiencies than the 11 amino-acids of the HIV Tat PTD.

In the present study, we hypothesized that fusion of TIS11b to a PTD would allow delivery of TIS11b into intact cells and downregulate VEGF mRNA, resulting in a decrease in VEGF protein levels. We engineered recombinant TIS11b fusion proteins (PTD-TIS11b) that contained either Tat-PTD or polyarginine-PTDs R7 and R9. Our results show that Tat-, R7 and R9-TIS11b are efficiently internalized into living cells. The uptake of R7-TIS11b or R9-TIS11b induced a marked decrease in VEGF mRNA and protein levels in vitro and in vivo, whereas Tat-TIS11b was less efficient. As impairing the levels of VEGF could inhibit tumour growth and metastasis, the use of the VEGF-destabilizing activity of TIS11b to interfere with the development of angiogenesis-dependent pathologies such as cancer is conceivable.

## Results

### **Overexpressed PTD-TIS11b fusion proteins decrease VEGF mRNA 3'-UTR-mediated luciferase activity**

A previous study using co-transfections of TIS11b construct and firefly luciferase cDNA cloned upstream of VEGF mRNA 3'-UTR (Luc-3'UTR construct) allowed us to demonstrate that VEGF mRNA 3'-UTR confers a TIS11b-mediated decrease in reporter gene activity, which was closely related to a decrease in luciferase transcript stability (Ciais et al., 2004). In order to determine whether the fusion of the PTDs Tat, R7 or R9 to TIS11b does not alter TIS11b function, we first analyzed the effect of each fusion protein on luciferase activity of Luc-3'UTR construct. COS7 cells were transiently transfected with increasing doses of either TIS11b, Tat-TIS11b, R7-TIS11b or R9-TIS11b cloned in the pTarget mammalian expression vector (Figure. 1A), and a fixed concentration of Luc-3'UTR. The expression level of each construct was assessed in COS7 cell lysates by western blot. Figure 1B shows that TIS11b was barely detectable in COS7 cells transfected with empty pTarget plasmid. Transfection of increasing amounts of TIS11b and TIS11b fusion-protein constructs increases TIS11b protein levels in a dose-dependant manner. Moreover, similar amounts of protein were detected for each construct when the same dose of plasmid was transfected, indicating that fusion of Tat, R7 or R9 PTDs to TIS11b does not alter TIS11b expression levels. We next determined the effect of Tat-TIS11b, R7-TIS11b and R9-TIS11b on luciferase activity of the Luc-3'UTR transcript. Figure 1C shows that luciferase activity was markedly decreased by TIS11b and PTD-TIS11b in a dose-dependent manner. With 25 ng of transfected plasmids, luciferase activity was  $33.6 \pm 6.5$  % (TIS11b),  $43.5 \pm 9.7$  % (Tat-TIS11),  $42.2 \pm 9$  % (R7-TIS11b), and  $46.5 \pm 5.6$  % (R9-TIS11b) of controls ( $p < 0.001$ ,  $n=3$ ). This decrease is also statistically significant at a dose as low as 1 ng of plasmid, when the expressed proteins are hardly detectable in COS7 protein lysates (Figure 1B). This result indicates that very low amounts of TIS11b or PTD-TIS11b are efficient in inhibiting VEGF mRNA 3'-UTR-mediated luciferase activity. In addition, the effect of TIS11b was not statistically different from the

effect of the fusion proteins PTD-TIS11b at all doses tested, suggesting that they were equally efficient in the inhibition of the reporter gene activity.

### **PTD-TIS11b fusion proteins enhance endogenous VEGF mRNA decay and impair VEGF protein production**

In order to investigate the effect of TIS11b and PTD-TIS11b proteins on endogenous VEGF mRNA stability, COS7 cells were transfected either with TIS11b, Tat-TIS11b, R7-TIS11b or R9-TIS11b constructs. 48 h later, VEGF mRNA decay was monitored by DRB chase experiments and Northern blot analysis (Figure 2A). As shown in Figure 2B (left panel), quantification of VEGF mRNA levels from 3 independent experiments revealed that overexpression of TIS11b, Tat-TIS11b, R7-TIS11b and R9-TIS11b triggered rapid VEGF mRNA decay in COS7 cells with a half-life of  $62 \pm 4$  min,  $56 \pm 3$  min,  $65 \pm 6$  min and  $71 \pm 5$  min, respectively, as compared to  $101 \pm 10$  min for control cells transfected with an empty plasmid. The right panel in Figure 2B shows that TIS11b, Tat-TIS11b, R7-TIS11b and R9-TIS11b fusion proteins decreased the steady state level of VEGF mRNA to  $61 \pm 10\%$ ,  $62 \pm 9\%$ ,  $43 \pm 6\%$  and  $52 \pm 5\%$  of control, respectively (quantification at time 0, 48 h after transfection prior to addition of DRB). These results prompted us to examine whether TIS11b- or PTD-TIS11b-mediated decreases in VEGF mRNA affected VEGF protein levels. ELISA analysis of culture medium from COS7 cells transfected with TIS11b- or PTD-TIS11b plasmids for 24 h revealed that TIS11b, Tat-TIS11b, R7-TIS11b and R9-TIS11b reduced VEGF secretion to  $47.9 \pm 1.9\%$ ,  $46.6 \pm 8.4\%$ ,  $54.4 \pm 7.6\%$ , and  $48.5 \pm 4.2\%$  of control, respectively (Figure 2C). These data indicated to us that TIS11b and PTD-TIS11b-induced decreases in VEGF mRNA stability are accompanied by a decrease in VEGF protein production.

### **Optimization of TIS11b and PTD-TIS11b protein expression and purification**

We constructed negative control Flag-TIS11b without PTD and Flag-PTD-TIS11b bacterial expression vectors as described in the Material and Methods section. Restriction digestion

analysis as well as DNA sequencing confirmed the sequence of the vectors (data not shown). Several problems with precipitation were experienced during the initial purifications of Flag-TIS11b and Flag-PTD-TIS11b proteins, which required further optimization of both expression and purification steps (data not shown). We observed optimal expression in LB medium in the presence of 0.1 mM IPTG at 30°C for 4 h. As it has been reported that zinc is required for maintaining the structural integrity of TIS11b family members (Cao, 2004), 100  $\mu$ M of ZnCl<sub>2</sub> were added at all steps of purification. An optimal solubilization of Flag-TIS11b and Flag-PTD-TIS11b proteins required the combination of 4M urea and 0.1 mg/ml lysosyme in lysis buffer, followed by several freeze/thaw cycles and sonication. Figure 3A illustrates the different steps of Flag-Tat-TIS11b purification on a Flag-affinity chromatography column. Purification of TIS11b, R7- and R9-TIS11b was achieved using the same procedure. SDS-PAGE analysis of the eluates identified homogeneous preparations for Flag-TIS11b and PTD-TIS11b proteins with expected molecular weights of 38 and 42 kDa respectively (Figure 3 B). It is worth mentioning that overexpression of TIS11b in bacteria yields a 38 kDa protein (deduced molecular weight from the amino-acid sequence) whereas overexpression in mammalian cells yields a 48 kDa protein, indicating post-translational modifications of TIS11b in mammals.

### **PTD-TIS11b fusion proteins are efficiently delivered into living cells**

Several studies reported that fixation techniques using methanol or paraformaldehyde cause artificial protein import during cell fixation and cannot be reliably used to investigate protein transduction (Richard et al., 2003). Therefore, internalization of purified Flag-TIS11b (negative control) and PTD-TIS11b proteins was examined in living cells. COS7 cells were incubated with 100 nM of Alexa 488-labeled Flag-TIS11b or PTD-TIS11b for 2 h, as described in Material and Methods. Alexa 594-conjugated wheat germ agglutinin was used to label cell membranes. Fluorescence microscopy analysis shows that very little staining was detected in COS7 cells incubated with Alexa-labeled Flag-TIS11b (Figure 4A). By contrast, we observed a significant uptake of Alexa-labeled R9-TIS11b, which indicates that R9 PTD is

efficient in delivering TIS11b to cell cytoplasm (Figure 4A). Quantification from 3 independent experiments revealed that approximately 10% of COS7 cells were labeled with Flag-TIS11b whereas 60 and 80% of COS7 cells were positive for cellular uptake of R9-TIS11b and Tat-TIS11b, respectively (data not shown). Additional evidence for successful PTD-TIS11b intracellular delivery was provided by confocal scanning microscopy (Figure 4B). Examination of fluorescent signals indicates that internalized Tat-TIS11b and R9-TIS11b were distributed throughout the cytoplasm with a punctuate appearance, indicative of localization in transport vesicles like endosomes (Figure 4B). Interestingly, even if the Tat peptide used in this study contained the putative nuclear localization signal GRKKR of Tat transactivator, no fluorescent signal was detected in the nucleus after 2 h of incubation. Deconvolution of the confocal microscopy images along the z axis confirmed that Tat-TIS11b and R9-TIS11b were indeed internalized in the COS7 cell cytoplasm (Figure 4C).

#### **PTD-TIS11b fusion proteins inhibits VEGF mRNA and protein expression in living cells**

We next evaluated the effect of Tat-, R7- or R9-TIS11b purified proteins on endogenous VEGF mRNA levels. COS7 cells were incubated with 100 nM of protein for 24 h and VEGF mRNA was analyzed by Northern Blot. Figure 5A shows that internalisation of Tat-, R7- and R9-TIS11b decreases VEGF mRNA steady state levels. Quantification of 2 independent experiments revealed that Tat-, R7- and R9-TIS11b reduced VEGF mRNA levels to  $63.3 \pm 10.1$  %,  $44.4 \pm 5.3$  % and  $49.8 \pm 3.1$  % of control level, respectively. Flag-TIS11b also had a discrete effect by itself on the basal expression of VEGF mRNA ( $80.4 \pm 9.6$  % of control level). We further investigated whether the PTD-TIS11b-induced decreases in VEGF mRNA was accompanied by decreases in VEGF protein production. As shown in Figure 5C, VEGF amounts in the culture medium from R7-TIS11b and R9-TIS11b-treated COS7 cells were significantly decreased to  $64.4 \pm 10.8$  % and  $63.03 \pm 14.1$  % of control cells ( $n=3$ ,  $p<0.05$ ). No significant effect of Tat-TIS11b on VEGF secretion was observed. This latter result is in contrast to the one obtained in transfection experiments which showed a marked inhibition of VEGF secretion in Tat-TIS11b transfected cells (Figure 2C). The above results led us to

choose either R7-TIS11b or R9-TIS11b fusion proteins to examine the effect of TIS11b delivery on VEGF expression in vivo.

**R9-TIS11b delivery into adrenocortical tissue shows a marked reduction in VEGF protein expression.**

The adrenal cortex is a steroid hormone-producing tissue and one of the most highly vascularised tissues in the organism. This organ expresses high levels of VEGF, even at the adult stage. To evaluate the bioactivity of R7- and R9-TIS11b on VEGF expression in vivo, the fusion proteins were injected in the adrenal gland of nude mice as described in the Material and Methods section. Immunohistochemical analysis of VEGF revealed a strong and uniform staining in the adrenal cortex of control mice (Figure 6A, M1 and M2 mice). The medulla was negative for VEGF protein staining (data not shown). 24 h after R9-TIS11b injection, a marked decrease in VEGF staining was observed throughout the entire zona fasciculata-reticularis of the adrenal cortex (Figure 6A, M3 and M4 mice). Some VEGF immunoreactivity was still detected in the zona glomerulosa, the outer part of the adrenal cortex. While the capillaries in the zona fasciculata-reticularis paralleled the columns of steroidogenic cells in control animals, the vascular network in R9-TIS11b treated animals appears discontinuous. In addition, the size of adrenocortical cell nuclei in R9-TIS11b treated gland was dramatically reduced. Similar results were obtained with R7-TIS11b (data not shown). In order to check whether R9-TIS11b-mediated decrease in VEGF protein expression in the adrenal cortex was correlated with VEGF mRNA levels, the expression of the different VEGF mRNA isoforms was analyzed by RT-PCR. We have previously shown that the isoforms of VEGF detected in the adrenal cortex correspond to splice variants VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub> and VEGF<sub>189</sub>, all of which the major isoforms represented were VEGF<sub>121</sub> and VEGF<sub>165</sub> (Vittet 2000). As shown in Figure 6B, R9-TIS11b injection downregulates the level of all isoforms of VEGF mRNA in the adrenal cortex within 24 h. This effect was even more pronounced 48 h after injection.

## Discussion

Vascular endothelial growth factor VEGF is a key mediator of angiogenesis in such diverse physiological and pathological processes as embryogenesis, female oestrus cycle, diabetic retinopathy and tumour development (Ferrara, 2004). The expression of the VEGF gene is controlled at many levels including transcription, mRNA stability and mRNA translation. A recent study from our group has shown for the first time that VEGF mRNA is a target of the TTP family member RNA-binding protein TIS11b in vitro and in intact cells (Ciais et al., 2004). TIS11b binds to VEGF mRNA through its 3'-untranslated region (3'-UTR) and destabilizes this mRNA. We also demonstrated that TIS11b is involved in hormone-regulated expression of VEGF in endocrine cells (Cherradi et al., 2006). Subsequently, VEGF protein was reported to be increased in TIS11b KO mice (Bell et al., 2006). Altogether, these data led us to hypothesize that TIS11b might represent a novel anti-angiogenic agent through its destabilizing activity on VEGF mRNA. As protein transduction peptides have been used to introduce many therapeutic proteins inside mammalian cells by allowing free trafficking through the membrane, we fused TIS11b to 3 different protein transduction domains, namely the HIV-1-derived peptide Tat and the polyarginines R7 or R9. Our work shows that PTD-mediated delivery of TIS11b not only downregulates VEGF mRNA and protein levels in intact cells but also decreases VEGF protein expression in a highly vascularised tissue in vivo.

We constructed TIS11b protein expression vectors in frame either with the PTD Tat, R7 or R9. As TIS11b is an RNA-binding protein, we first checked whether the fusion of the PTDs to TIS11b did not alter its destabilizing function on VEGF mRNA. Transfection experiments revealed that Tat-, as well as R7- and R9-TIS11b fusion proteins markedly inhibit VEGF mRNA 3'-UTR-regulated luciferase activity and were as efficient as TIS11b in decreasing endogenous VEGF mRNA half-life in COS7 cells. Importantly, PTD-TIS11b-mediated decrease of VEGF mRNA levels was associated to a 50 % similar decrease in VEGF protein synthesis and secretion by COS7 cells, indicating a direct coupling between VEGF mRNA stability and translation. These results led us to clone PTD-TIS11b sequences in a bacterial

expression vector to produce recombinant proteins. PTD-TIS11b proteins were subsequently purified to homogeneity by a Flag-affinity chromatography column. The major problems encountered during our production and purification procedures were insolubility and precipitation of the fusion proteins, confirming the difficulty of expressing and purifying TTP family members from various expression systems (Cao et al., 2008; Mahtani et al., 2001; Taylor et al., 1995; Worthington et al., 1996). We found that the solubility of PTD-TIS11b fusion proteins could be improved by lowering the expression temperature and optimizing the IPTG treatment (data not shown). In addition, an increased stability was observed in the presence of zinc chloride. As we aimed at targeting living cells, we could not use detergents such as SDS or Tween 20 that have been reported to increase solubility of TTP family members (Cao, 2004; Cao et al., 2003).

Rapid uptake of Tat- and R9-TIS11b into living COS7 cells was demonstrated by fluorescence and confocal laser scanning microscopy. It is worth mentioning that we have used low concentrations of purified fusion protein (100 nM), which may explain that only 60 and 80 % of COS7 cells were labeled with fluorescent R9-TIS11b and Tat-TIS11b, respectively. This observation is in contrast to previous studies showing that 100 % of the cells were transduced by micromolar concentrations of PTD fusion proteins (Duchardt et al., 2007; Nakase et al., 2004; Richard et al., 2003). Although the half-life of TIS11b has been reported to be rather short (3h) (Benjamin et al., 2006), PTD-TIS11b-induced decrease in VEGF protein levels was detected up to 24 h after their addition to COS7 cells. This observation is in agreement with previous studies showing that some Tat-fusion proteins are still active at least up to 24 h (Cai et al., 2006; Cao et al., 2002; Dietz et al., 2002). Controversial results about the mechanism of cell entry by PTDs have been reported (Leifert and Whitton, 2003). This process has been described to involve endocytosis or not. Recently, lipid-raft macropinocytosis, a specialized form of endocytosis, has been shown to be involved in Tat-fusion protein intracellular delivery. It has been suggested that the mechanism involved may depend on the nature of the protein associated with the PTD as well as on the concentration of the PTD-fusion protein used (Duchardt et al., 2007;

Tunnemann et al., 2006; Vitte and Jalinot, 2008). Our confocal laser microscopy analysis revealed a punctuate distribution of Tat- and R9-TIS11b fluorescent signals, suggesting an endocytic pathway. A pathway for polyarginine entry into mammalian cells has been recently suggested (Fuchs and Raines, 2004). R9-mediated delivery of molecules involves: (1) binding to cell surface heparane sulfates, (2) uptake by endocytosis, (3) release upon heparane sulphate degradation and (4) leakage from endocytic vesicles into the cytosol upon endosomal acidification. This scenario predicts that there are at least two major steps that could regulate the efficiency of TIS11b delivery to the cytosol. One is endocytosis and the other is leakage efficiency. Although Tat-mediated downregulation of VEGF mRNA and protein levels was as efficient as the one triggered by R7- and R9-TIS11b in transfection studies, our transduction experiments indicate that R7- as well as R9-mediated delivery of TIS11b into cells is more efficient in downregulating VEGF expression than Tat-TIS11b. Indeed, R7 and R9 PTDs induced a 50 % decrease in VEGF protein levels compared to a 20 % decrease with Tat PTD (Figure 5C). It is tempting to speculate that leakage efficiency of R9-TIS11b from endocytic vesicles is higher than that of Tat-TIS11b. Otherwise, the relatively modest effect of Tat-TIS11b may be due to incomplete renaturation within the cell or mislocalization of the protein. It is noteworthy that the R7- and R9-mediated 50 % decrease in VEGF expression is of a high significance since VEGF expression levels in mammalian cells are tightly regulated. Indeed, a 50% reduction of VEGF expression during embryogenesis, as observed in VEGF +/- heterozygous mice, results in lethality (Carmeliet et al., 1996; Ferrara et al., 1996).

As R9-TIS11b fusion protein was a potent inhibitor of VEGF expression in intact cells, we assessed its ability to inhibit VEGF expression *in vivo* by injecting R9-TIS11b into mice adrenal cortex. In this tissue, the rapid release of corticosteroids into the blood flow is enhanced by a dense vascular network which is hormonally-regulated (Thomas et al., 2004). Injection of R9-TIS11b in the adrenal gland induced a massive decrease in VEGF protein levels throughout the adrenal cortex 24 h following the injection. Importantly, the decrease in VEGF mRNA level was even more pronounced 48 h after injection (Figure 6B), indicating a

long-lasting effect of R9-TIS11b. One of the most interesting findings of this study is the homogeneity of R9-TIS11b-mediated decrease in VEGF protein across the whole section of the adrenal cortex that has been achieved with a single injection of a dose as low as 20 ng of fusion protein. Analysis of several sections of the same gland revealed that VEGF expression was reduced to the same extent throughout the tissue, indicating an efficient internalization of R9-TIS11b. Whether this observation results from adrenocortical cell-to-cell transfer of R9-TIS11b remains to be determined.

The identification of TIS11b as a regulator of VEGF mRNA degradation has suggested to us a novel strategy to interfere with the known deregulated VEGF mRNA turnover in many human diseases, including tumour growth and metastasis. Indeed, targeting tumour angiogenesis is a major focus of anti-cancer research. Besides targeting VEGF mRNA, TIS11b can also mediate decay of other ARE-containing mRNAs such as those of COX-2, the proto-oncogene c-fos, cyclins and the anti-apoptotic factor bcl-2, all of which have been reported to be abnormally stabilized in several human tumours (Benjamin and Moroni, 2007). Since several regulators relevant for oncogenic growth could be targets of TIS11b, one could speculate that TIS11b could have a broad spectrum of target mRNAs in tumour cells. TTP, the most studied member of TIS11b family, has been reported to act as a potent tumour suppressor when overexpressed in a v-H-ras-dependent mast cell tumour model (Stoecklin et al., 2003). More recently, Essafi-Benkhadir et al. reported that TTP overexpression decreases RasVal12-dependent VEGF expression and development of vascularised tumours in nude mice (Essafi-Benkhadir et al., 2007). While transfection experiments yield highly significant information concerning the emerging link between mRNA stability and cancer, inherent limitations of transgenic technologies impede their potential use in human disease therapies. Therefore, additional methods of administering intracellularly acting proteins are needed to allow *in vivo* studies. Our study shows that R9 PTD enables highly efficient delivery of TIS11b not only in intact cells but also *in vivo*, yielding a pronounced reduction in VEGF protein expression. A proof-of-concept animal investigation to determine whether R9-

TIS11b injection in pre-established tumours could suppress tumour growth in vivo is currently ongoing in our laboratory.

## Material and Methods

### Plasmid constructs

pEt15b plasmids containing either the Flag-Tat, the Flag-heptapeptide R7 or the Flag-nonapeptide R9 sequences were generated by one of us (P. Jalinot). All primers were purchased from Eurogentec (Seraing, Belgium). The DNA sequence of all constructs was verified by sequencing (Genome Express-Cogenics, Meylan, France). As a first step, human TIS11b cDNA was amplified by PCR from pTarget-TIS11b plasmid (Ciais et al., 2004) using the forward 5'-GGTACCACCACCGT-CGTGGTGTCTGCC-3' and the reverse 5'-GCGGCCGCTTAGTCATCTGAGATTGG-3' primers to replace the ATG codon of TIS11b by a KpnI restriction site and to add a NotI restriction site downstream of the Stop codon of TIS11b. TIS11b fragment was inserted in the bacterial expression vector pET15b between the KpnI and NotI restriction sites downstream of Flag-Tat, Flag-R7 or Flag-R9 PTDs to generate pET15b-Flag-PTD-TIS11b plasmids (Figure 1A). The Flag-PreScission sequence of pET15b was amplified by PCR using the forward 5'-GAC TCA CTA TAG GGG AAT TGT GAG CGG-3' and the reverse 5'-GGT ACC GCT ATG CGG GCC CTG AAA-3' primers to generate a Flag-PreScission fragment containing a KpnI restriction site in the 3' end. This fragment was inserted between NcoI and KpnI restriction sites upstream of TIS11b fragment to generate pET15b-Flag-TIS11b vector. Subsequently, Flag-PTD-TIS11b sequences were excised from pET15b vector with NcoI and NotI restriction enzymes. The 3'-recessed ends were filled-in using the Klenow fragment of DNA polymerase I and the Flag-PTD-TIS11b fragments were cloned into the T-overhangs of pTarget plasmid to generate the mammalian expression vectors Flag-PTD-TIS11b. The recombinant proteins are hereafter referred to as TIS11b (lacking the PTD), Tat-TIS11b, R7-TIS11b, and R9-TIS11b, all of which contain the

Flag tag. Plasmid pLuc-3'UTR contains the firefly luciferase cDNA cloned upstream of the rat VEGF 3'-UTR and downstream of the thymidine kinase (TK) promoter (Ciais et al., 2004). Plasmid pRL-TK encoding renilla luciferase was obtained from Promega Corp. (Charbonnières, France).

#### Transient Transfections and Dual Luciferase Activity Assay

COS7 cells were grown in DMEM medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/ml of penicillin and 100 µg/ml of streptomycin.  $1.5 \times 10^5$  cells were seeded in triplicate into 12 well-plates and transfected the day after, using lipofectamine (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. Various amounts of Flag-TIS11b, Flag-Tat-TIS11b, Flag-R7-TIS11b or Flag-R9-TIS11b pTarget plasmids were transfected in the absence or in the presence of 500 ng of pLuc-3'UTR and 25 ng of pRL-TK. Renilla and firefly luciferase activities were measured sequentially 24 h after transfection using the Dual-Luciferase reporter assay system (Promega Corp., Charbonnières, France) on a LUMAT LB 9507 luminometer (EGG-Berthold, Bad, Wildbad, Germany). Results are expressed as relative light units of firefly luciferase activity over relative light units of renilla luciferase activity to compensate for variations in transfection efficiency, and are represented as a percentage of the luciferase activity in control cells. Each transfection condition was performed in triplicate.

#### **SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis**

SDS-polyacrylamide gel electrophoresis was performed according to Laemmli (Laemmli, 1970). Total proteins extracts (10 µg/lane) were solubilized in sample buffer (60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2% SDS, 5% β-mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.01% bromophenol blue), boiled for 5 min and loaded onto a 12% SDS-PAGE minigel (Mini Protean II System, BioRad). Electrophoresis was performed at 150 V for 1 h.

### **Western blot analysis**

SDS-PAGE-resolved proteins were electrophoretically transferred onto a PVDF membrane as previously described (Towbin et al., 1979). Following transfer, the membrane was incubated in a blocking buffer (PBS buffer containing 0.1% Tween 20 and 5% non-fat dry milk) for 1 h at room temperature. The blots were probed sequentially with a mixture of antibodies to N-terminal and C-terminal peptide fragments (amino acids 49-63 and 296-308) of TIS11b protein (Cherradi 2006), monoclonal anti- $\beta$ -actin (Sigma, St Louis, MO), for 2 h in PBS containing 0.1% Tween. The membrane was thoroughly washed with the same buffer (3 x 10 min), then incubated for 1 hour with either horseradish peroxidase (HRP)-labelled goat anti-rabbit IgG (immunodetection of TIS11b) or HRP-labelled goat anti-mouse IgG (immunodetection of  $\beta$ -actin). The PVDF sheet was washed as above and the antigen-antibody complex revealed by Enhanced Chemiluminescence, using the Western blotting detection kit from Amersham Biosciences (Buckinghamshire, England) and BioMax Kodak films (Sigma, St Louis, MO).

### **Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

For VEGF protein measurement, COS7 cells were either transfected as stated in the "Transfections" section or incubated with 100 nM of purified recombinant TIS11b, Tat-TIS11b, R7-TIS11b, and R9-TIS11b proteins. Culture medium was collected after 24 h. VEGF content of the supernatants (splice variants VEGF-165 and VEGF-121) was measured according to commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Peprotech, Levallois Perret, France) using horseradish peroxidase detection in accordance with the manufacturer's instructions. 100  $\mu$ l of each sample were used for VEGF assay. The absorption was read at 405 and 650 nm (reference) in a microplate reader (Multiskan EX, Thermo Labsystems). In each assay, the recombinant human VEGF was used to generate the standard curve. Standards as well as samples were assayed as duplicate. The minimum limit of detection was 62.5 pg/ml.

### **Northern hybridization**

COS7 cells were either transfected as stated in the “Transfections” section or incubated with purified recombinant TIS11b, Tat-TIS11b, R7-TIS11b, and R9-TIS11b proteins. In experiments designed to determine VEGF mRNA half-life, the transcription inhibitor DRB (10 µg/ml) was added 48 h following transfection for various periods of time as indicated. Cells were washed with PBS and total RNA was extracted from a pool of triplicate samples using the RNeasy Mini kit (Qiagen, GmbH, Germany) according to the instructions of the manufacturer. 10 µg of RNA were size-fractionated on a 1% formaldehyde agarose gel, vacuum-transferred onto Hybond-N+ membranes (Amersham) and fixed by UV cross-linking. Northern blots were pre-hybridized in Rapid Hybridization Buffer (Amersham) at 65 C for 30 min. [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP labeled VEGF 3'UTR cDNA probe (2 x 10<sup>6</sup> cpm / ng DNA, Rediprime random primer labeling kit, Amersham) was then added and the incubation was continued for 2 h at 65 C. Blots were washed for 5 min and 15 min successively at room temperature in 2 x saline sodium citrate (SSC), 0.1% SDS, and then for 15 min in 1 x SSC, 0.1% SDS. The final wash was performed at 65 C for 15 min in 0.5 x SSC, 0.1% SDS. RNA-cDNA hybrids were visualized on phosphor screen (Molecular Dynamics) after a 12- to 24-h exposure period. Blots were stripped and reprobed with 18S cDNA probe to assess RNA loading.

### **Bacterial expression of PTD-TIS11b and TIS11b**

High expression BL21 (DE3) Escherichia Coli codon+-competent cells (Stratagen) were transformed with pET15b plasmids containing either Flag-TIS11b, Flag-Tat-TIS11b, Flag-R7-TIS11b or Flag-R9-TIS11b sequences (Figure 1A) and were grown in LB Broth medium. Conditions for protein expression were optimized by first inducing protein expression by various isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactopyranoside (IPTG) concentrations (0.1, 0.5 and 1 mM), then second by analyzing protein expression at various induction periods at 30 and 37 C. Optimum conditions for protein induction were obtained in the presence of 0.1 mM IPTG at 30 C for 4 h after allowing starter cultures to reach an optimal absorbance of 0.6. Bacterial

cell pellets were harvested by centrifugation (4000 x g at 4 C for 30 min). The pellets were resuspended with 50 mM Tris-HCl pH 7.4 buffer containing 500 mM NaCl, 2% Triton X-100, 4M urea and 100  $\mu$ M ZnCl<sub>2</sub>, then incubated for 5 min in the presence of 0.1 mg/ml lysozyme, and a protease inhibitor cocktail (Sigma). Cells were lysed by repeated 10 freeze/thawing cycles. Homogenates were further sonicated then centrifuged at 13000 x g for 10 min at 4 C. Supernatants were diluted to achieve concentrations of 150 mM NaCl and 1 M urea, and loaded onto an anti-Flag affinity column (Sigma). Filtrate was reloaded three times on the column. Then the column was washed with TBS and elution performed with 100 mM Glycine pH 3.5 in 1 M Tris-HCl pH 8. Purity of Flag-TIS11b and Flag-PTD-TIS11b proteins was examined by Coomassie blue staining following SDS-PAGE analysis. Protein concentration was determined using a Micro BCA protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL) using bovine serum albumin as a standard.

### **Preparation of green Alexa Fluor 488 dye-labeled proteins**

Purified Flag-TIS11b and Flag-PTD-TIS11b proteins were first dialyzed against PBS then labeled using the Alexa Fluor 488 Protein Labeling kit (Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions with slight modifications. An optimal labeling was obtained with a 4h-co-incubation of Alexa Fluor 488 with fusion proteins at room temperature. Labeled proteins were dialyzed against PBS overnight at 4 C to remove free dye. Flag-TIS11b- and Flag-PTD-TIS11b-labeled proteins were stored at 4 C and used within a week.

### **Protein internalization in living cells and confocal laser microscopy**

2 x 10<sup>4</sup> COS7 cells were plated on eight-chamber Lab-Tek Coverglass system (Nunc, France) and cultured overnight in DMEM medium containing 10% fetal calf serum, 100 U/ml of penicillin and 100  $\mu$ g/ml of streptomycin. The day after, medium was removed and DMEM containing 2% serum calf serum and 100 nM of Alexa 488-labeled proteins was added to cells for 2 hours at 37 C, followed by two 5 min-washes in PBS prior to the addition of Alexa Fluor 594 wheat germ agglutinin (Molecular Probes) for 10 min to label cell plasma

membrane. After two 5 min-final washes in PBS, cells were placed in DMEM without phenol red. Uptake and intracellular localization of labeled proteins were assessed by inverted fluorescence microscopy (Zeiss, Imager Z1) as well as laser confocal microscopy (Leica, TCS-SP2). For deconvolution fluorescence microscopy, image scans were acquired in series by CCD camera. All data sets were subjected to deconvolution and subsequently used for image reconstructions. Stacking each of the individual sections produces a 3-dimensional image on a 2-dimensional background, resulting in an image projection. In experiments designed to determine the effect of PTD-TIS11b fusion proteins on VEGF expression levels, COS7 cells were cultured for 24 h in 12-well plates ( $1.5 \times 10^5$  cells /well) as described in "Transfections" section. Purified fusion proteins were added at a final concentration of 100 nM in DMEM containing 2% serum calf serum and antibiotics for 24 h. At the end of the incubation period, the culture medium was collected to measure secreted VEGF and cells were lysed to isolate total RNA.

### **Internalization of PTD-TIS11b proteins in vivo**

Animal experiments were approved by the institutional guidelines and the European Community for the Use of Experimental Animals. 6-month-old female scid mice were purchased from Taconic (Germantown, New-York, USA) and maintained in the Animal Resources Center of our department. In vivo delivery of PTD-TIS11b to mice adrenal gland was done by injecting 5  $\mu$ l of 100 nM of either R7-TIS11b or R9-TIS11b in PBS buffer. Control mice were injected with 5  $\mu$ l of PBS or Flag-TIS11b. Mice were sacrificed after 24 to 48 h (n=3 in each group). Adrenal glands were collected carefully and either fixed overnight in 4% paraformaldehyde and embedded in paraffin, or processed for total RNA isolation.

### **Immunohistochemistry**

For VEGF immunodetection, 7- $\mu$ m-thick paraffin sections were deparaffinised, rehydrated and microwaved in 10mM citrate buffer pH 6 at 800 W for 2 x 5 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by incubating sections with 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in methanol for 20 min. Slides

were then sequentially incubated for 5 min in TBS buffer containing 1% Tween 20, for 20 min in TBS buffer containing 5% goat serum (DAKO A/S, Glostrup, Denmark) and 2% BSA, and for 1 h with 2.6 µg/ml of rabbit polyclonal anti-human VEGF antiserum which recognizes VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub> and VEGF<sub>189</sub> isoforms (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). After 2 washes of 5 min in TBS containing 0.1% Tween 20, sections were sequentially incubated for 1 h with biotinylated secondary antibodies and for 45 min with an avidin/biotinylated horseradish peroxidase complex (DAKO A/S). Peroxidase activity was revealed using diaminobenzidine tetrachloride as a chromogen (DAKO A/S). Sections were briefly counterstained with hematoxylin (Sigma) and mounted.

### **Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction**

Mouse Adrenal gland total RNA was extracted using the Qiagen RNeasy Mini kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. For semi-quantitative RT-PCR analysis of *VEGF* or *HPRT* gene expression, 1 µg of total RNA were reverse transcribed with ImProm II reverse transcriptase (Promega, France) and PCR amplified using Taq polymerase (QBiogen, Illkirch, France). Amplification of mouse VEGF mRNA isoforms was performed using the primers forward TGA AGT GAT CAA GTT CAT GGA CGT and reverse TCA CCG CCT TGG CTT GTC in the presence of 2% DMSO. The size of the amplified fragments was 534-bp for the minor VEGF transcript VEGF<sub>189</sub>, and 462-bp and 332-bp for the two major VEGF transcripts, VEGF<sub>165</sub> and VEGF<sub>121</sub>, respectively. The amplification conditions were as follows: 94 C for 5 min followed by 30 amplification cycles, each consisting of 94 C for 1 min, 59 C for 1 min, 72 C for 1 min, and 72 C for 5 min for final extension. The primers for HPRT amplification were as follows: 5'-GCCATCACATTGTAGCCCTCT-3' and 5'-TGCGACCTTGACCATCTTTGG-3'. This primer pair sequence amplifies a 305-bp fragment. The amplification conditions were as follows: 94 C for 5 min followed by 30 amplification cycles, each consisting of 94 C for 1 min, 51 C for 1 min, 72 C for 1 min, and 72 C for 5 min for final extension.

## Statistical analysis

Results are expressed as means  $\pm$  S.E.M. The mean values were compared by ANOVA using Dunnett's test. A value of  $p < 0.05$  was considered as statistically significant. Quantitation of autoradiograms was performed using phosphorimager and ImageQuant software.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Didier Grunwald (iRTSV, CEA-Grenoble) for giving us access to the laser confocal microscopy platform of our institute. We also thank Maryline Herbet and Michael Thomas for their assistance in the "in vivo" experiments and Jean-Luc Coll for helpful discussions.

## Bibliography

- Asoh, S., and Ohta, S.** (2008). PTD-mediated delivery of anti-cell death proteins/peptides and therapeutic enzymes. *Advanced drug delivery reviews* 60, 499-516.
- Bell, S.E., Sanchez, M.J., Spasic-Boskovic, O., Santalucia, T., Gambardella, L., Burton, G.J., Murphy, J.J., Norton, J.D., Clark, A.R., and Turner, M.** (2006). The RNA binding protein Zfp361 is required for normal vascularisation and post-transcriptionally regulates VEGF expression. *Dev Dyn* 235, 3144-3155.
- Benjamin, D., and Moroni, C.** (2007). mRNA stability and cancer: an emerging link? *Expert opinion on biological therapy* 7, 1515-1529.
- Benjamin, D., Schmidlin, M., Min, L., Gross, B., and Moroni, C.** (2006). BRF1 protein turnover and mRNA decay activity are regulated by protein kinase B at the same phosphorylation sites. *Molecular and cellular biology* 26, 9497-9507.
- Cai, S.R., Xu, G., Becker-Hapak, M., Ma, M., Dowdy, S.F., and McLeod, H.L.** (2006). The kinetics and tissue distribution of protein transduction in mice. *Eur J Pharm Sci* 27, 311-319.
- Cao, G., Pei, W., Ge, H., Liang, Q., Luo, Y., Sharp, F.R., Lu, A., Ran, R., Graham, S.H., and Chen, J.** (2002). In Vivo Delivery of a Bcl-xL Fusion Protein Containing the TAT Protein Transduction Domain Protects against Ischemic Brain Injury and Neuronal Apoptosis. *J Neurosci* 22, 5423-5431.
- Cao, H.** (2004). Expression, purification, and biochemical characterization of the antiinflammatory tristetraprolin: a zinc-dependent mRNA binding protein affected by posttranslational modifications. *Biochemistry* 43, 13724-13738.
- Cao, H., Dzineku, F., and Blakeshear, P.J.** (2003). Expression and purification of recombinant tristetraprolin that can bind to tumor necrosis factor-alpha mRNA and serve as a substrate for mitogen-activated protein kinases. *Archives of biochemistry and biophysics* 412, 106-120.
- Cao, H., Lin, R., Ghosh, S., Anderson, R.A., and Urban, J.F., Jr.** (2008). Production and characterization of ZFP36L1 antiserum against recombinant protein from Escherichia coli. *Biotechnology progress* 24, 326-333.
- Carballo, E., Lai, W.S., and Blakeshear, P.J.** (1998). Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science (New York, NY)* 281, 1001-1005.

- Carballo, E., Lai, W.S., and Blackshear, P.J.** (2000). Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood* 95, 1891-1899.
- Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoek, A., Harpal, K., Eberhardt, C., et al.** (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 380, 435-439.
- Chauhan, A., Tikoo, A., Kapur, A.K., and Singh, M.** (2007). The taming of the cell penetrating domain of the HIV Tat: myths and realities. *J Control Release* 117, 148-162.
- Cherradi, N., Lejczak, C., Desroches-Castan, A., and Feige, J.J.** (2006). Antagonistic functions of tetradecanoyl phorbol acetate-inducible-sequence 11b and HuR in the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid stability by adrenocorticotropin. *Molecular endocrinology* (Baltimore, Md) 20, 916-930.
- Ciais, D., Cherradi, N., Bailly, S., Grenier, E., Berra, E., Pouyssegur, J., Lamarre, J., and Feige, J.J.** (2004). Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. *Oncogene* 23, 8673-8680.
- Dietz, G.P., Kilic, E., and Bahr, M.** (2002). Inhibition of neuronal apoptosis in vitro and in vivo using TAT-mediated protein transduction. *Molecular and cellular neurosciences* 21, 29-37.
- Duchardt, F., Fotin-Mieczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., and Brock, R.** (2007). A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic* (Copenhagen, Denmark) 8, 848-866.
- Elliott, G., and O'Hare, P.** (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell* 88, 223-233.
- Ellis, L.M., and Hicklin, D.J.** (2008). VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nature reviews* 8, 579-591.
- Eskens, F.A.** (2004). Angiogenesis inhibitors in clinical development; where are we now and where are we going? *British journal of cancer* 90, 1-7.
- Essafi-Benkhadir, K., Onesto, C., Stebe, E., Moroni, C., and Pages, G.** (2007). Tristetraprolin inhibits Ras-dependent tumor vascularization by inducing vascular endothelial growth factor mRNA degradation. *Molecular biology of the cell* 18, 4648-4658.
- Ferrara, N.** (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews* 25, 581-611.
- Ferrara, N., Carver-Moore, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., O'Shea, K.S., Powell-Braxton, L., Hillan, K.J., and Moore, M.W.** (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-442.
- Filleur, S., Courtin, A., Ait-Si-Ali, S., Guglielmi, J., Merle, C., Harel-Bellan, A., Clezardin, P., and Cabon, F.** (2003). siRNA-mediated inhibition of vascular endothelial growth factor severely limits tumor resistance to antiangiogenic thrombospondin-1 and slows tumor vascularization and growth. *Cancer research* 63, 3919-3922.
- Forsythe, J.A., Jiang, B.H., Iyer, N.V., Agani, F., Leung, S.W., Koos, R.D., and Semenza, G.L.** (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and cellular biology* 16, 4604-4613.
- Frankel, A.D., and Pabo, C.O.** (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell* 55, 1189-1193.
- Franks, T.M., and Lykke-Andersen, J.** (2007). TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes & development* 21, 719-735.
- Fuchs, S.M., and Raines, R.T.** (2004). Pathway for polyarginine entry into mammalian cells. *Biochemistry* 43, 2438-2444.
- Futaki, S., Suzuki, T., Ohashi, W., Yagami, T., Tanaka, S., Ueda, K., and Sugiura, Y.** (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *The Journal of biological chemistry* 276, 5836-5840.
- Gariano, R.F., Hu, D., and Helms, J.** (2006). Expression of angiogenesis-related genes during retinal development. *Gene Expr Patterns* 6, 187-192.
- Green, I., Christison, R., Voyce, C.J., Bundell, K.R., and Lindsay, M.A.** (2003). Protein transduction domains: are they delivering? *Trends in pharmacological sciences* 24, 213-215.
- Ho, A., Schwarze, S.R., Mermelstein, S.J., Waksman, G., and Dowdy, S.F.** (2001). Synthetic protein transduction domains: enhanced transduction potential in vitro and in vivo. *Cancer research* 61, 474-477.

- Huez, I., Creancier, L., Audigier, S., Gensac, M.C., Prats, A.C., and Prats, H.** (1998). Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Molecular and cellular biology* 18, 6178-6190.
- Joliot, A., Pernelle, C., Deagostini-Bazin, H., and Prochiantz, A.** (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 1864-1868.
- Kim, W.J., Christensen, L.V., Jo, S., Yockman, J.W., Jeong, J.H., Kim, Y.H., and Kim, S.W.** (2006). Cholesteryl oligoarginine delivering vascular endothelial growth factor siRNA effectively inhibits tumor growth in colon adenocarcinoma. *Mol Ther* 14, 343-350.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lai, W.S., Parker, J.S., Grissom, S.F., Stumpo, D.J., and Blackshear, P.J.** (2006). Novel mRNA targets for tristetraprolin (TTP) identified by global analysis of stabilized transcripts in TTP-deficient fibroblasts. *Molecular and cellular biology* 26, 9196-9208.
- Leifert, J.A., and Whitton, J.L.** (2003). "Translocatory proteins" and "protein transduction domains": a critical analysis of their biological effects and the underlying mechanisms. *Mol Ther* 8, 13-20.
- Levy, A.P.** (1998). Hypoxic regulation of VEGF mRNA stability by RNA-binding proteins. *Trends in cardiovascular medicine* 8, 246-250.
- Levy, A.P., Levy, N.S., Wegner, S., and Goldberg, M.A.** (1995). Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 270, 13333-13340.
- Lindsay, M.A.** (2002). Peptide-mediated cell delivery: application in protein target validation. *Current opinion in pharmacology* 2, 587-594.
- Lykke-Andersen, J., and Wagner, E.** (2005). Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes & development* 19, 351-361.
- Mahtani, K.R., Brook, M., Dean, J.L., Sully, G., Saklatvala, J., and Clark, A.R.** (2001). Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Molecular and cellular biology* 21, 6461-6469.
- Nakase, I., Niwa, M., Takeuchi, T., Sonomura, K., Kawabata, N., Koike, Y., Takehashi, M., Tanaka, S., Ueda, K., Simpson, J.C., et al.** (2004). Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol Ther* 10, 1011-1022.
- Ogilvie, R.L., Abelson, M., Hau, H.H., Vlasova, I., Blackshear, P.J., and Bohjanen, P.R.** (2005). Tristetraprolin down-regulates IL-2 gene expression through AU-rich element-mediated mRNA decay. *J Immunol* 174, 953-961.
- Onesto, C., Berra, E., Grepin, R., and Pages, G.** (2004). Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *The Journal of biological chemistry* 279, 34217-34226.
- Potocky, T.B., Menon, A.K., and Gellman, S.H.** (2003). Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *The Journal of biological chemistry* 278, 50188-50194.
- Ramos, S.B., Stumpo, D.J., Kennington, E.A., Phillips, R.S., Bock, C.B., Ribeiro-Neto, F., and Blackshear, P.J.** (2004). The CCCH tandem zinc-finger protein Zfp3612 is crucial for female fertility and early embryonic development. *Development (Cambridge, England)* 131, 4883-4893.
- Richard, J.P., Melikov, K., Brooks, H., Prevot, P., Lebleu, B., and Chernomordik, L.V.** (2005). Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *The Journal of biological chemistry* 280, 15300-15306.
- Richard, J.P., Melikov, K., Vives, E., Ramos, C., Verbeure, B., Gait, M.J., Chernomordik, L.V., and Lebleu, B.** (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *The Journal of biological chemistry* 278, 585-590.
- Schwarze, S.R., Ho, A., Vocero-Akbani, A., and Dowdy, S.F.** (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science (New York, NY)* 285, 1569-1572.
- Shibata, T., Akiyama, N., Noda, M., Sasai, K., and Hiraoka, M.** (1998). Enhancement of gene expression under hypoxic conditions using fragments of the human vascular endothelial growth factor and the erythropoietin genes. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 42, 913-916.
- Snyder, E.L., and Dowdy, S.F.** (2004). Cell penetrating peptides in drug delivery. *Pharmaceutical research* 21, 389-393.

**Stoecklin, G., Gross, B., Ming, X.F., and Moroni, C.** (2003). A novel mechanism of tumor suppression by destabilizing AU-rich growth factor mRNA. *Oncogene* 22, 3554-3561.

**Stumpo, D.J., Byrd, N.A., Phillips, R.S., Ghosh, S., Maronpot, R.R., Castranio, T., Meyers, E.N., Mishina, Y., and Blackshear, P.J.** (2004). Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of Zfp36L1, a gene encoding a CCCH tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family. *Molecular and cellular biology* 24, 6445-6455.

**Takei, Y., Kadomatsu, K., Yuzawa, Y., Matsuo, S., and Muramatsu, T.** (2004). A small interfering RNA targeting vascular endothelial growth factor as cancer therapeutics. *Cancer research* 64, 3365-3370.

**Taylor, G.A., Carballo, E., Lee, D.M., Lai, W.S., Thompson, M.J., Patel, D.D., Schenkman, D.I., Gilkeson, G.S., Broxmeyer, H.E., Haynes, B.F., et al.** (1996). A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity* 4, 445-454.

**Taylor, G.A., Thompson, M.J., Lai, W.S., and Blackshear, P.J.** (1995). Phosphorylation of tristetraprolin, a potential zinc finger transcription factor, by mitogen stimulation in intact cells and by mitogen-activated protein kinase in vitro. *The Journal of biological chemistry* 270, 13341-13347.

**Thomas, M., Keramidas, M., Monchaux, E., and Feige, J.J.** (2004). Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. *Endocrinology* 145, 4320-4329.

**Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.** (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76, 4350-4354.

**Tunnemann, G., Martin, R.M., Haupt, S., Patsch, C., Edenhofer, F., and Cardoso, M.C.** (2006). Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *Faseb J* 20, 1775-1784.

**Vitte, A.L., and Jalinet, P.** (2008). Intracellular delivery of peptides via association with ubiquitin or SUMO-1 coupled to protein transduction domains. *BMC biotechnology* 8, 24.

**Wender, P.A., Mitchell, D.J., Pattabiraman, K., Pelkey, E.T., Steinman, L., and Rothbard, J.B.** (2000). The design, synthesis, and evaluation of molecules that enable or enhance cellular uptake: peptoid molecular transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13003-13008.

**Worthington, M.T., Amann, B.T., Nathans, D., and Berg, J.M.** (1996). Metal binding properties and secondary structure of the zinc-binding domain of Nup475. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13754-13759.



## Legends of the figures

**Figure 1: PTD-TIS11b constructs decrease VEGF mRNA 3'-UTR-mediated luciferase activity.** (A) Schematic representation of TIS11b fusion-proteins and amino-acid sequences of the PTDs studied. The PreScission site allows cleavage of the fusion protein by PreScission protease after purification to yield a fusion protein devoid of the Flag tag. However, as purified PTD-TIS11b proteins were not digested to a significant extent by the protease and the Flag tag did not alter TIS11b activity, we have used the full length Flag-PTD-TIS11b or Flag-TIS11b fusion proteins in our studies. (B) Western blot analysis of the expression levels of TIS11b and PTD-TIS11b constructs in COS7 cells, showing that TIS11b and the fusion proteins Tat-, R7- and R9-TIS11b are equally expressed at each dose of transfected plasmid. Transfection experiments were conducted as outlined in Material and Methods. Control cells refer to transfection with empty vector. COS7 cells were subsequently lysed in cell lysis buffer (Promega) and total protein extracts (10 µg) were analyzed by western blot as described in Material and Methods. The apparent molecular weight of TIS11b and PTD-TIS11b proteins (Tat-, R7- and R9-TIS11b) were 48 and 51 kDa, respectively. (C) Dose-dependence of the inhibitory effect of TIS11b and PTD-TIS11b on VEGF mRNA 3'-UTR-mediated luciferase activity. COS7 cells were transfected as described in Material and Methods. The pLuc-3'UTR construct contains the full-length 3'-UTR of rat VEGF mRNA (2201 bp) (Ciais et al., 2004). Results are expressed as relative light units of firefly luciferase activity over relative light units of renilla luciferase activity and are represented as a percentage of luciferase activity in control cells. Transfections were performed in triplicate and values are means ± S.E.M from four independent experiments. \*, \*\*, significantly different from control with  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively.

**Figure 2: PTD-TIS11b proteins decrease endogenous VEGF mRNA half-life and VEGF secretion by COS7 cells.** (A) COS7 cells were transfected in 12 well plates ( $1.5 \times 10^6$  cells/well) with 5 ng of either empty plasmid (control cells) or TIS11b or PTD-TIS11b plasmid

as described in Material and Methods. 48 h after transfection, DRB was added (10 µg/ml) and total RNA was extracted at the time points indicated and analyzed by Northern blot as described in Material and Methods. The membrane was hybridized to a radiolabeled VEGF 3'UTR probe and re-hybridized to 18S RNA probe for loading control. The two arrows indicate the two major species of VEGF mRNA detected in COS7 cells. (B) Left panel: measurement of VEGF mRNA half-life in COS7 cells transfected as described in (A). Quantification of the signal intensities was performed using phosphorimager. VEGF mRNA values were normalized to 18S RNA values and plotted as a percentage of the initial value against time. The data shown represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments performed in triplicate (\*, significantly different from control with  $p < 0.05$ ). VEGF mRNA half-lives were, respectively,  $101 \pm 10$  min,  $62 \pm 4$  min,  $56 \pm 3$  min,  $65 \pm 6$  min and  $71 \pm 5$  min for controls, TIS11b, Tat-TIS11b, R7-TIS11b and R9-TIS11b transfected cells. Right panel: Quantification of VEGF mRNA steady state levels at time 0 prior to addition of DRB, in COS7 cells transfected as described in (A). Quantification of Northern blots was performed as described above for the left panel. Each point represents the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments performed in triplicate (\*, \*\*, significantly different from control with  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively). (C) Dose-dependence of the inhibitory effect of TIS11b and PTD-TIS11b on VEGF protein levels. COS7 cells were transfected with increasing amounts of TIS11b and PTD-TIS11b as described in Material and Methods. 24 h after transfection, VEGF protein was measured in the culture medium by ELISA. VEGF protein values were normalized to total protein values and represented a percentage of VEGF protein level in control cells. Each point is the mean  $\pm$  SD of triplicate samples from an experiment representative of three similar experiments.

**Figure 3: SDS-PAGE analysis of the purification steps of TIS11b and PTD-TIS11b recombinant proteins from E. Coli.** (A) Tat-TIS11b was induced by IPTG in E. Coli, extracted and purified with an anti-Flag affinity column as described in the Material and Methods section. Eluted fusion protein was analyzed by SDS-PAGE and detected with

Commassie brilliant blue staining. Lane 1: protein molecular weight standards, Lane 2: non-induced E. Coli culture extract, Lane 3: induced E. Coli culture extract, Lane 4: filtrate of the anti-Flag affinity column, Lane 5: TBS buffer wash, Lane 6: eluate. The arrow indicates the position of the purified protein. (B) SDS-PAGE analysis of the 4 purified fusion proteins TIS11b, Tat-TIS11b, R7-TIS11b and R9-TIS11b. TIS11b migrates with an apparent molecular weight of about 38 kDa and PTD-TIS11b with an apparent molecular weight of 42 kDa. \*, degradation product of the proteins.

**Figure 4: Efficient uptake of purified PTD-TIS11b in living COS7 cells.** (A) COS7 cells grown on Lab-Tek culture dishes were incubated for 2 h at 37 C in the presence of 100 nM of Alexa 488-labeled TIS11b or R9-TIS11b (green fluorescence), and subsequently incubated with Alexa 594 wheat germ agglutinin (red fluorescence) for 10 min to label the plasma membrane as described in Material and Methods. Internalization of TIS11b or R9-TIS11b was visualized by fluorescence microscopy. (B) Laser confocal microscopy analysis of Alexa 488-labeled Tat- and R9-TIS11b uptake showing punctuate fluorescent signals in COS7 cells treated as mentioned in (A), Scale bars = 20  $\mu$ m. (C) Deconvolution fluorescence microscopy of R9-TIS11b in COS7 cells confirming an intracellular localization of the fusion protein. The analysis was performed along the x-y axes (central), the x-z axes (bottom) and the y-z axes (right). The white lines indicate the axes along which the deconvolution was performed. Note the fluorescent internal vesicles clearly visible along the z axis. Scale bars, 20  $\mu$ m.

**Figure 5: Transduction of PTD-TIS11b into COS7 cells downregulates VEGF mRNA and protein levels.** (A) COS7 cells were incubated in the absence (C: Control) or in the presence of 100 nM of TIS11b, Tat-TIS11b, R7-TIS11b or R9-TIS11b for 24 h as described in Material and Methods. Total RNA was extracted and analyzed by Northern blot. The membrane was hybridized to a radiolabeled VEGF 3'UTR probe and re-hybridized to 18S RNA probe for loading control. The two arrows indicate the two species of VEGF mRNA. (B)

Quantification of VEGF mRNA signal intensities. VEGF mRNA values were normalized to 18S RNA values and plotted as a percentage of VEGF mRNA level in control cells. Each point is the mean value  $\pm$  SD of two separate experiments. (C) Culture media of COS7 cells from the experiment described in (A) were analyzed by ELISA for VEGF protein content. VEGF protein values were normalized to total protein values and represented a percentage of VEGF protein level in control cells. The data shown represent the mean  $\pm$  SEM of 3 independent experiments performed in duplicate (\*, significantly different from control with  $p < 0.05$ ).

**Figure 6: Injection of PTD-TIS11b in mice adrenal gland decreases VEGF mRNA and protein levels in vivo.** (A) TIS11b (negative control) or R9-TIS11b fusion proteins (20 ng) were injected in mice adrenal gland as described in Material and Methods. Sections of adrenal glands were immunostained for VEGF using an antiserum which recognizes VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> and VEGF<sub>189</sub> isoforms. Immunoreactivity is indicated by brown staining. Sections were briefly counterstained with hematoxylin. The two upper pictures were obtained with adrenal glands from two control mice (M1, M2) and the 2 lower pictures with adrenal glands from two R9-TIS11b treated mice (M3, M4). Magnification (x 20). The brackets delineate the two major zones of the adrenal cortex. Data from one experiment are shown. Similar results were obtained in three independent experiments. (B) RT-PCR analysis of VEGF mRNA isoforms in mice adrenal glands injected with 5  $\mu$ l of phosphate buffer saline (Control) or 5  $\mu$ l (20 ng) of R9-TIS11b. Data from one experiment are shown. Similar results were obtained in two independent experiments.

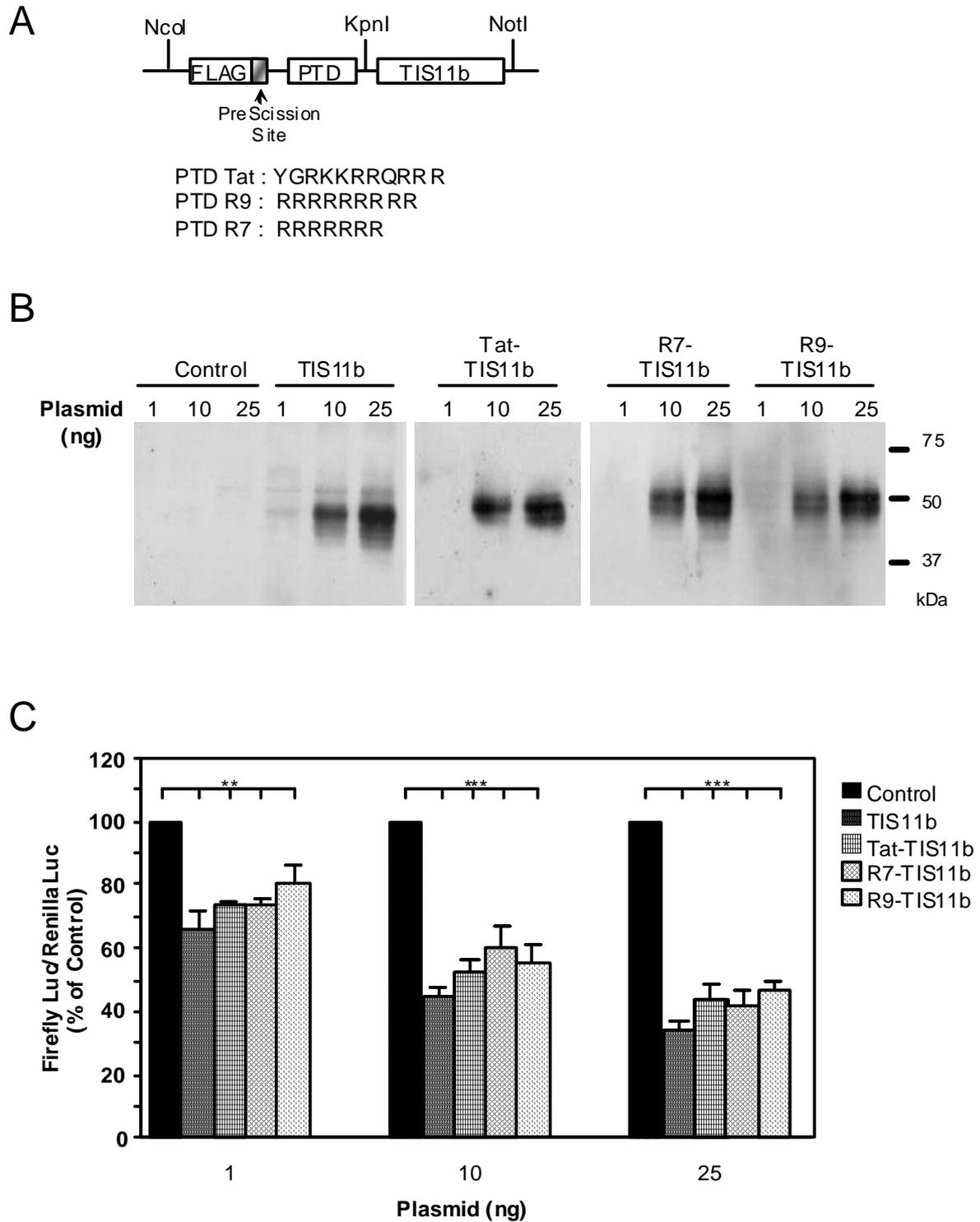


Figure 1

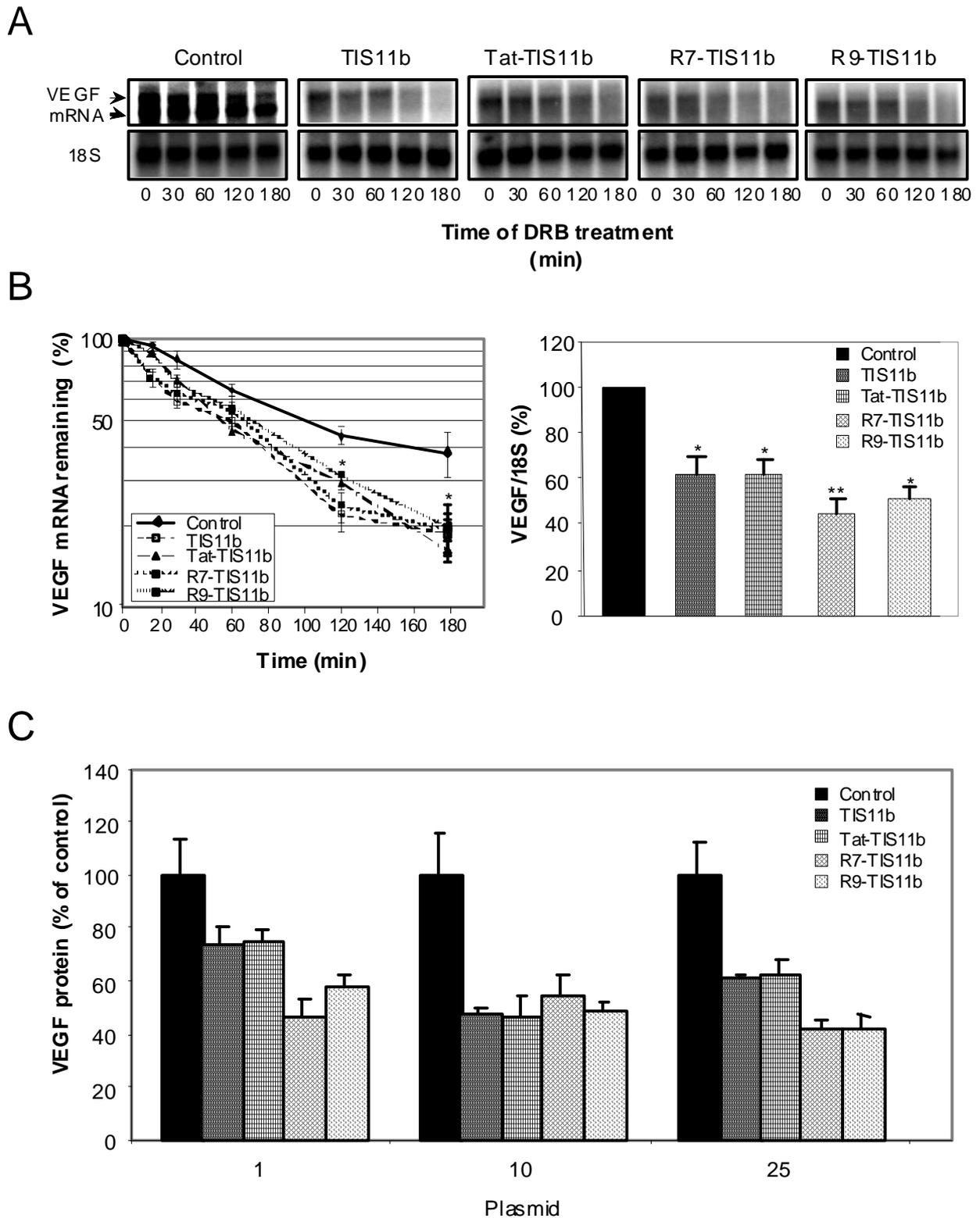


Figure 2

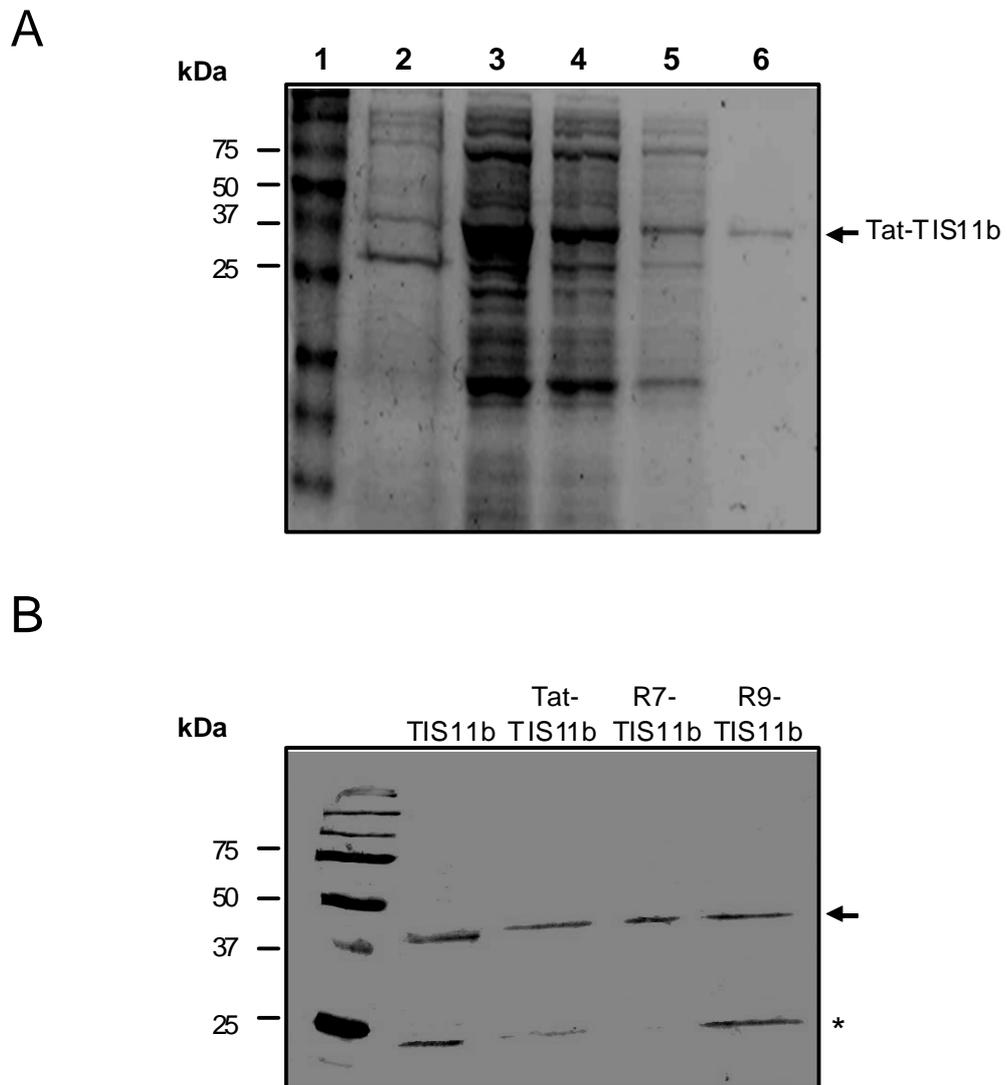


Figure 3

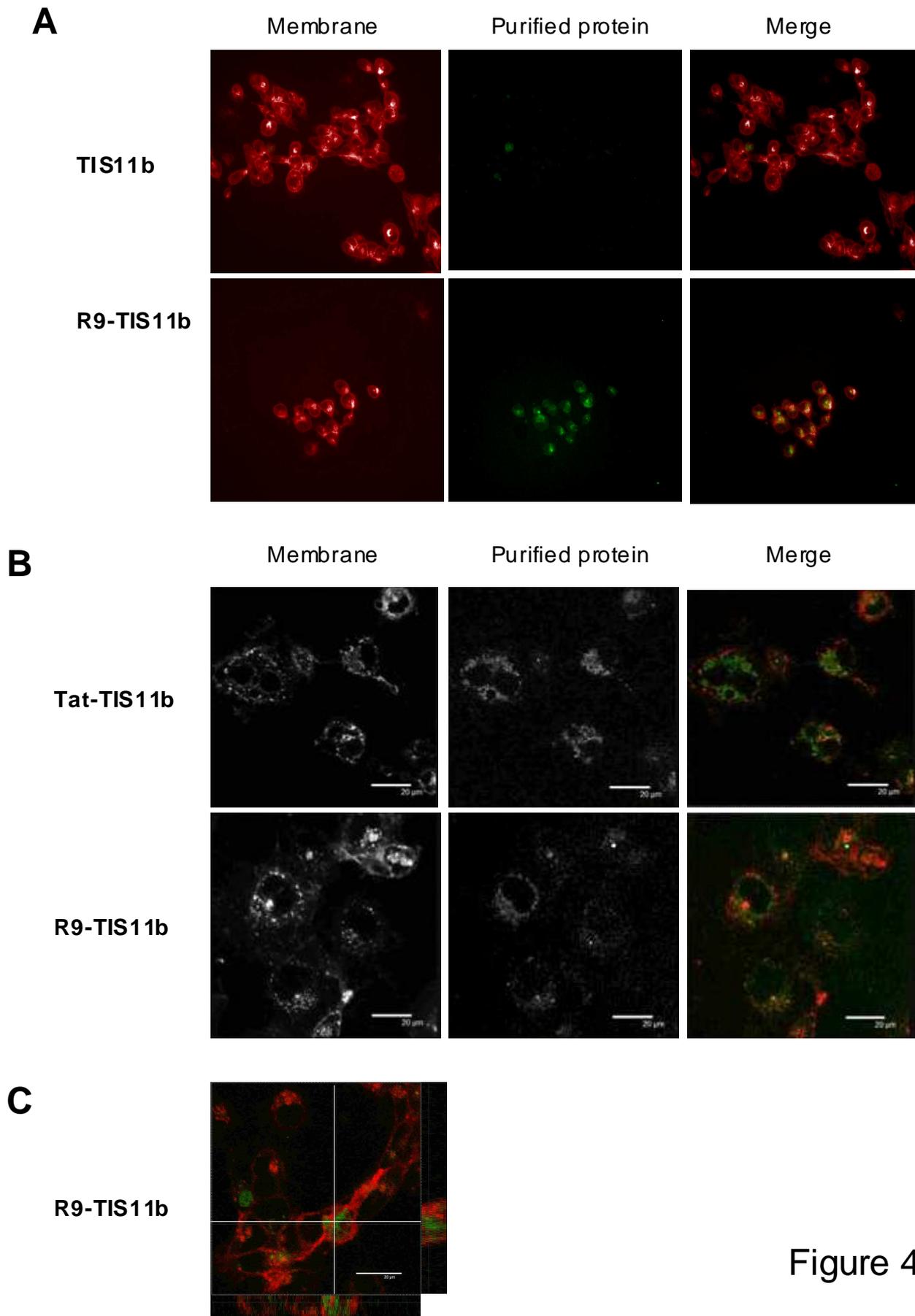
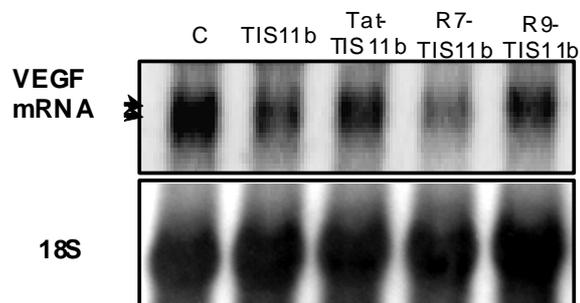
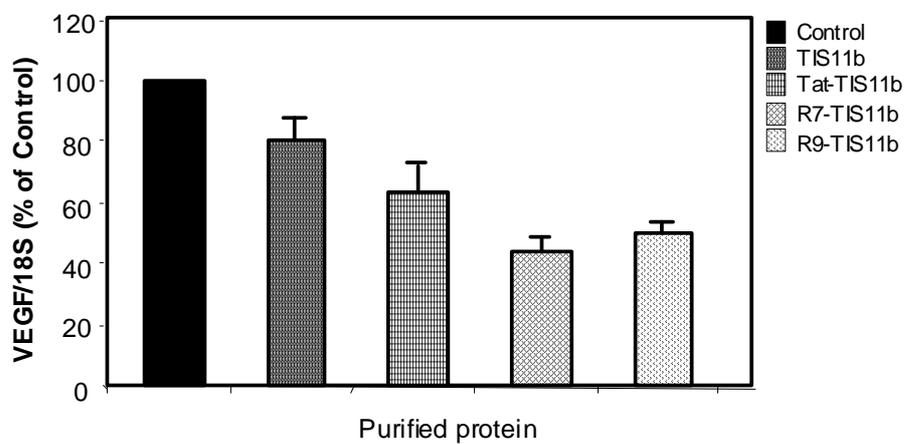


Figure 4

A



B



C

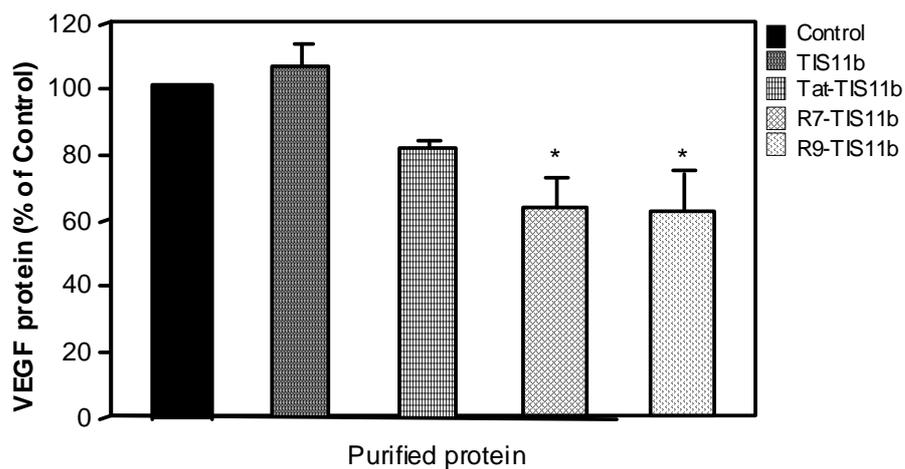


Figure 5

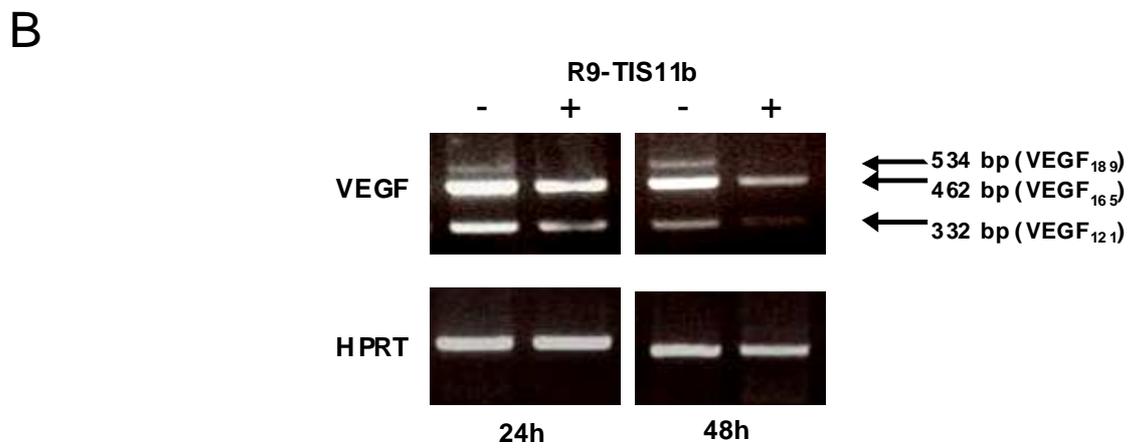
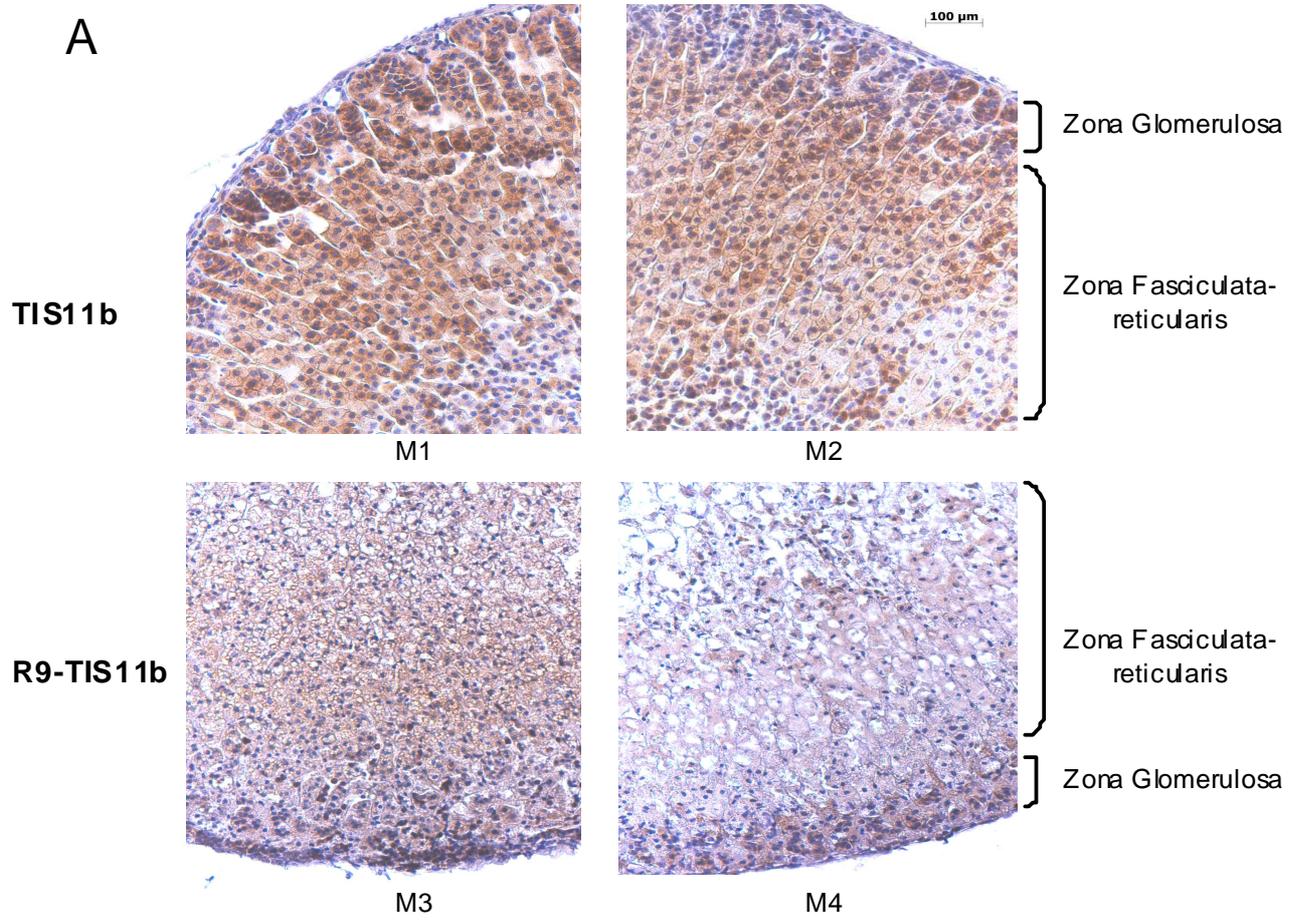


Figure 6





### 3. Résumé des résultats et discussion

Le but de ce travail était de tester l'hypothèse selon laquelle la protéine TIS11b, décrite pour sa capacité à déstabiliser les ARNm de certaines cytokines et notamment celui du VEGF, pourrait être utilisée pour diminuer la synthèse du VEGF par les cellules, et ainsi avoir une activité anti-angiogène, et pourquoi pas anti-tumorale. L'ARNm du VEGF étant intracellulaire, il est apparu nécessaire de vectoriser cette protéine afin de permettre son passage à travers les membranes. La stratégie qui a été choisie pour cela a consisté en l'utilisation de petits peptides : les PTD ou « protein transduction domain ». Divers PTD sont décrits dans la littérature et peuvent notamment provenir de facteurs de transcription viraux comme le PTD Tat, issu du VIH (Potocky *et coll.*, 2003), ou être des PTD synthétiques, modélisés à la suite des études de structure/activité des PTD connus (Mitchell *et coll.*, 2000). Dans notre étude, nous avons choisi d'utiliser le PTD Tat, ainsi que deux types de polyarginines, hepta- (R7) et nonapeptidiques (R9).

#### 3.1. Construction des protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b et évaluation de leur activité déstabilisatrice

La première étape de ce travail a donc été de construire une protéine de fusion comportant la séquence de la protéine TIS11b, en aval de la séquence du PTD Tat et des PTD R7 et R9 (figure 1A). La séquence de cette protéine de fusion PTD-TIS11b comporte également en amont le peptide Flag, permettant la purification de la protéine de fusion par une colonne d'affinité anti-Flag ainsi qu'un site de PréScission, permettant d'éliminer l'étiquette Flag une fois la protéine de fusion purifiée. Les différentes constructions Flag-PTD (Tat, R7 ou R9), permettant l'insertion de la séquence de TIS11b, nous ont été aimablement fournies par P. Jalinot (Vitte et Jalinot, 2008). Cette construction Flag-PTD-TIS11b a été réalisée dans deux types de plasmides, un plasmide d'expression procaryotique, permettant la production de la protéine de fusion et sa purification, et un plasmide d'expression eucaryotique, permettant l'évaluation de l'activité de ces protéines de fusion dans des cellules en culture (cf Matériel et Méthodes de l'article ci-joint p. 135).

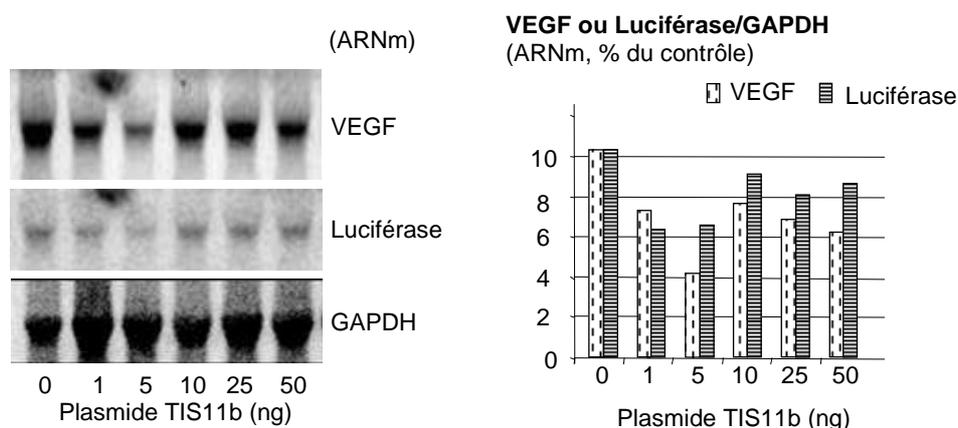
Nous avons ensuite vérifié que la fusion des PTD n'influençait pas l'activité de TIS11b. Pour cela, nous avons testé les activités de ces constructions dans un modèle d'évaluation de l'activité déstabilisatrice de TIS11b sur l'ARNm du VEGF (Chinn *et coll.*, 2002). Ce modèle utilise un plasmide codant pour un gène rapporteur luciférase cloné en amont de la région 3'UTR de l'ARNm du VEGF (plasmide Luc-3'UTR), qui est co-transfecté avec un plasmide

exprimant TIS11b ou les protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b dans des cellules en culture. Dans ce modèle, l'activité luciférase reflète la stabilité de l'ARNm du VEGF (Ciais *et coll.*, 2004). Ces tests d'activité ont été réalisés dans des cellules COS7, cette lignée n'exprimant pas ou très peu de TIS11b endogène qui pourrait interférer avec la protéine TIS11b surexprimée.

Après avoir vérifié, par Western blot, que les différentes constructions Flag-Tat-, -R7- ou -R9-TIS11b étaient exprimées de manière équivalente à TIS11b après transfection dans des cellules COS7 en culture (figure 1B, p. 151), leur activité sur le transcrit Luc-3'UTR a été évaluée (figure 1C, p. 151). Des valeurs croissantes de plasmides (1, 10 et 25 ng) exprimant TIS11b ou les protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b ont été co-transfectées avec le plasmide Luc-3'UTR. Les résultats montrent que TIS11b induit une diminution de l'activité luciférase de manière dépendante de la dose de plasmides co-transfectée, et que la présence du peptide Flag, ou des PTD, que ce soit Tat, R7 ou R9, ne modifie pas cette activité déstabilisatrice de l'ARNm du VEGF.

### 3.2. Activité déstabilisatrice de TIS11b et des protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b sur l'ARNm du VEGF endogène

Dans un deuxième temps, nous avons vérifié que la déstabilisation de l'ARNm du VEGF par TIS11b, observée par l'intermédiaire de l'activité luciférase (figure 1C, p. 151), était également observée sur l'ARNm endogène du VEGF. Les ARN totaux de cellules COS7 co-transfectées avec un plasmide d'expression de TIS11b et le plasmide Luc-3'UTR ont été purifiés et analysés par Northern blot (figure 7).



**Figure 7 : TIS11b diminue le taux d'ARNm du VEGF endogène.**

Le plasmide codant pour TIS11b a été co-transfecté à 1, 5, 10, 25 ou 50 ng dans des cellules COS7 avec le plasmide Luc-3'UTR pendant 48 h. Les ARN ont été purifiés puis analysés par Northern blot. Les sondes utilisées ciblent soit l'ARNm du VEGF endogène, soit l'ARNm de la luciférase. Le gène de référence utilisé est la GAPDH. Les signaux obtenus ont été quantifiés et sont reportés sur l'histogramme en pourcentage du contrôle.

Ces résultats montrent que TIS11b diminue la quantité d'ARNm du VEGF endogène de manière dépendante de la dose de plasmides co-transfectée, et similaire au transcrite luciférase/3'UTR du VEGF, validant ainsi la pertinence de notre modèle d'évaluation de l'activité de TIS11b. Par ailleurs, l'activité de TIS11b semble être biphasique, impliquant une fenêtre d'activité étroite de cette protéine. L'effet le plus marqué de TIS11b sur l'ARNm du VEGF apparaît à 5 ng de plasmide transfecté, puis devient moins important lorsqu'on augmente la quantité de plasmide. Ce phénomène est également observé en activité luciférase, mais pour des quantités de plasmides supérieures à 25 ng (données non montrées), suggérant un effet traductionnel sur le gène rapporteur entre 10 et 50 ng de plasmides. Cette activité biphasique inattendue a également été décrite pour la protéine HuR, qui dans certaines circonstances et notamment lors de sa surexpression dans des macrophages, peut avoir un effet négatif sur l'expression de cytokines, malgré ses propriétés de stabilisation des ARNm habituellement décrites (Katsanou *et coll.*, 2005). Pour cela, les expériences de demi-vie de l'ARNm du VEGF endogène ont été réalisées avec 5 ng de plasmides exprimant les protéines de fusion.

On peut également noter que contrairement à Lai *et coll.* qui ont montré que TTP induisait une diminution de la quantité et de la taille de l'ARNm du TNF-alpha due à une désadénylation (Lai *et coll.*, 2002), nous n'avons pas observé de changement de taille de l'ARNm.

Afin de déterminer l'effet de TIS11b et des protéines Flag-PTD-TIS11b sur la stabilité de l'ARNm du VEGF, des expériences de mesure de demi-vie ont été réalisées par transfection de 5 ng de plasmide TIS11b ou Flag-PTD-TIS11b dans les cellules COS7 en présence de 5,6-Dichloro- $\beta$ -D ribofuranosyl benzimidazole (DRB), un inhibiteur de la transcription (figure 2A, p. 152). Les résultats obtenus montrent que la demi-vie de l'ARNm du VEGF est diminuée lorsque la protéine TIS11b ou les protéines de fusion Flag-Tat-, R7- ou R9-TIS11b sont exprimées dans la cellule, et que cette diminution est peu différente pour TIS11b et les protéines de fusion. En effet, l'analyse de trois expériences indépendantes montre que les demi-vies de l'ARNm du VEGF mesurées en présence de TIS11b, Flag-Tat-, -R7- et -R9-TIS11b, sont respectivement de  $62 \pm 4$  min,  $56 \pm 3$  min,  $65 \pm 6$  min et  $71 \pm 5$  min, comparées à  $101 \pm 10$  min pour l'ARNm du VEGF dans les cellules contrôles. Ces résultats indiquent que les protéines de fusion déstabilisent l'ARNm du VEGF endogène.

Par ailleurs, la quantification du taux d'ARNm du VEGF 48 h post-transfection, avant l'addition de DRB (t=0), montre que TIS11b et les protéines de fusion induisent une diminution de la quantité d'ARNm du VEGF d'environ 40 %.

Nous avons ensuite évalué l'effet de la surexpression de TIS11b et des protéines Flag-PTD-TIS11b sur la protéine VEGF sécrétée dans le milieu de culture des cellules. TIS11b et les protéines Flag-PTD-TIS11b ont été transfectées dans des cellules COS7 et les milieux de culture ont été prélevés, puis la protéine VEGF a été dosée par la méthode ELISA après 24 h (figure 2B, p. 152). Nous avons montré que les protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b sont efficaces dans la déstabilisation de l'ARNm du VEGF et diminuent la production de protéine VEGF lorsqu'elles sont exprimées directement dans la cellule. Nous avons donc entrepris la production et la purification de ces protéines de fusion afin d'évaluer leur capacité d'internalisation, de déstabilisation de l'ARNm de VEGF et de diminution de la production de la protéine VEGF.

### **3.3. Production et purification des protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b**

Afin de produire et de purifier les protéines Flag-PTD-TIS11b, leur séquence a été insérée dans un plasmide d'expression procaryotique, pET15b. Une quatrième construction correspondant à la protéine de fusion Flag-TIS11b sans PTD a été réalisée afin de servir de témoin négatif pour les protéines de fusion purifiées. L'expression de ces quatre protéines Flag-TIS11b et Flag-Tat-, R7- et R9-TIS11b a été effectuée dans des bactéries BL21 DE3 codon+. Ces bactéries ont été choisies car cette souche est supplémentée en ARNt dont l'absence pourrait restreindre la synthèse de protéines hétérologues (utilisation de la séquence humaine de TIS11b). Les bactéries ont ensuite été lysées et les protéines de fusion ont été purifiées sur une colonne d'affinité anti-Flag (figure 3A, p. 153).

Des conditions de lyse bactérienne drastiques ont dû être employées pour permettre la purification des protéines de fusion. Le protocole choisi utilise une combinaison des méthodes de lyse bactérienne habituellement utilisées séparément. De plus, l'addition de zinc a été nécessaire à toutes les étapes afin de favoriser la stabilité de la protéine.

Il est important de noter que la mise au point de ces conditions de production et de purification a nécessité plus d'une année de travail et ne permet néanmoins que l'obtention d'une faible quantité de protéine, souvent difficilement compatible avec la réalisation de tests sur des cellules en cultures. Par ailleurs, une fois purifiée, la protéine est très instable (perte de 60 % en moins de 24 h à + 4°C comme à -20°C) et précipite à tout changement de conditions, de température, de tampons, ou lorsque sa concentration est trop élevée. Une méthode de re-solubilisation après précipitation, compatible avec une utilisation sur des cellules vivantes n'a toujours pas été définie pour le moment. Ces difficultés de production des protéines de la famille TIS11 ont été rapportés à plusieurs reprises dans la littérature,

par plusieurs équipes, et ont limité largement l'utilisation des protéines purifiées (Mahtani *et coll.*, 2001; Blackshear *et coll.*, 2003; Cao *et coll.*, 2003).

Par ailleurs, nous avons essayé au cours de la purification de digérer les protéines de fusion au niveau du site de PréScission en aval de l'étiquette Flag (figure 1A, p. 151) afin d'obtenir des protéines de fusion composées uniquement de la protéine TIS11b avec ou sans PTD, sans l'étiquette Flag. Cette digestion n'a pas pu être réalisée pour des raisons non expliquées. Ce phénomène a également été décrit par Cao *et coll.*, qui ont rapporté que leur protéine GST-TTP partiellement purifiée devenait insoluble et n'était pas digérée par la protéase PréScission (Cao *et coll.*, 2003). Néanmoins, la présence du peptide Flag ne modifie pas l'activité de TIS11b dans la déstabilisation de l'ARNm du VEGF (figure 1C, p. 151).

Les protéines de fusion Flag-TIS11b et Flag-PTD-TIS11b purifiées ont donc été utilisées pour des tests d'internalisation des protéines et des tests d'activité de déstabilisation de l'ARNm du VEGF et de diminution de la production de protéine VEGF par des cellules en culture. Les rendements de purification étant relativement faibles, et les protéines de fusion R7- et R9-TIS11b ayant montré des activités équivalentes sur les cellules COS7 en culture (figure 5, p. 155), l'une ou l'autre de ces protéines de fusion ont été utilisées indifféremment dans les tests d'internalisation et les tests *in vivo*.

### **3.4. Internalisation des protéines de fusion Flag-TIS11b et Flag-PTD-TIS11b**

Afin de visualiser les protéines de fusion, les protéines purifiées ont été marquées avec le fluorochrome Alexa Fluor 488 dont le spectre est très proche de celui de la fluorescéine. Ce fluorochrome se fixe sur les groupements amines primaires de la protéine cible pour former un conjugué stable. Le fluorochrome non fixé aux protéines est éliminé par dialyse. Les protéines de fusion ainsi marquées ont été incubées à une concentration de 100 nM pendant 2 h sur des cellules COS7 en culture. Les cellules ont ensuite été lavées pour éliminer les protéines de fusion non-internalisées et les membranes cellulaires ont été marquées à l'aide de l'Agglutinine de germe de blé conjuguée au fluorochrome Alexa Fluor 594 (Image-iT Live Plasma membrane and Nuclear labeling kit, Molecular Probes). Les cellules ont ensuite été analysées par microscopie à fluorescence et microscopie confocale (figure 4, p. 154).

Nos résultats ont montré qu'environ 80 % et 60 % des cellules étaient marquées par les protéines de fusion Tat-TIS11b et R9-TIS11b respectivement, contre environ 10 % des cellules incubées avec la protéine Flag-TIS11b sans PTD. Il est à noter que les cellules marquées par la protéine Flag-TIS11b sans PTD sont pour la plupart des cellules en apoptose, et montrent un marquage qui n'a pas le même aspect ponctiforme que celui

obtenu avec les autres protéines de fusion. Il est également possible qu'une faible proportion de TIS11b sans PTD ait été internalisée par une voie ne permettant pas d'activité biologique (figure 5, p. 155). Par ailleurs, contrairement à la plupart des études, nous n'observons pas 100 % de cellules marquées. Ce résultat est probablement dû à la concentration de protéines de fusion utilisée qui est de 100 nM alors que la plupart des études dans la littérature utilisent des concentrations de l'ordre du micromolaire, voire de la dizaine de micromolaire (Richard *et coll.*, 2003; Nakase *et coll.*, 2004; Duchardt *et coll.*, 2007). L'analyse des cellules marquées en microscopie confocale, a permis de montrer que les protéines de fusion étaient intracellulaires. L'aspect du marquage est cytoplasmique et plutôt ponctiforme, concordant avec une internalisation des protéines de fusion par endocytose. Il a en effet été décrit que la voie d'internalisation pouvait dépendre de la concentration en protéines de fusion et que notamment l'utilisation de concentrations inférieures au micromolaire induisait une internalisation par endocytose (Duchardt *et coll.*, 2007).

Nous avons donc montré que les protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b, Tat- et R9-TIS11b sont internalisées dans la cellule. Ceci nous a amené à évaluer leur activité déstabilisatrice de l'ARNm du VEGF ainsi que leur effet sur la production de protéine VEGF après internalisation.

### **3.5. Activité des protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b purifiées sur la stabilité de l'ARNm du VEGF et la production de la protéine VEGF**

Afin d'évaluer la capacité des protéines de fusion purifiées à déstabiliser l'ARNm du VEGF, 100 nM de protéine Flag-TIS11b, et Flag-Tat-, Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b ont été incubées avec des cellules COS7 en culture. Après 24 h, les ARN des cellules ont été purifiés et analysés par Northern blot (figure 5A, p. 155). Les milieux de culture ont été prélevés et la protéine VEGF a été dosée par la méthode ELISA dans ces milieux (figure 5B, p. 155).

Le signal obtenu par Northern blot a été quantifié, rapporté à la quantité d'ARN 18S et représenté en pourcentage du contrôle, ici du tampon seul. Il est intéressant de noter que la protéine de fusion Flag-TIS11b sans PTD diminue d'environ 20 % le taux d'ARNm du VEGF par rapport au contrôle, indiquant qu'une petite proportion de protéine est internalisée et est active biologiquement. Néanmoins cette activité est très inférieure aux activités des protéines de fusion Flag-PTD-TIS11b, i.e. 40 % d'inhibition pour Flag-Tat-TIS11b et 50 à 60 % pour Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b.

Le but de notre étude étant de voir si les protéines Flag-PTD-TIS11b sont internalisées et montrent une activité significative sur la stabilité de l'ARNm du VEGF, le milieu de culture

seul ou la protéine Flag-TIS11b sans PTD ont été utilisés indifféremment comme témoin négatif dans les tests ultérieurs.

La protéine VEGF a également été dosée dans les milieux de culture des cellules incubées en présence de protéines de fusion purifiées (figure 5B, p. 155). Les résultats montrent que l'effet des protéines de fusion observé sur l'ARNm du VEGF est en corrélation avec l'effet observé sur la protéine VEGF. Comme en ARNm, la protéine de fusion Flag-Tat-TIS11b montre une activité plus faible que les protéines de fusion Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b, et est plus active que la protéine de fusion Flag-TIS11b sans PTD d'environ 20 %. Les protéines de fusion Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b réduisent la production de protéine VEGF de 50 à 60 % par rapport à la protéine de fusion Flag-TIS11b sans PTD.

La demi-vie de la protéine TIS11b étant relativement courte (inférieure à 3 h, (Benjamin D *et coll.*, 2006)), il nous a semblé satisfaisant d'obtenir une diminution de 50 % de protéine VEGF après 24 h d'incubation avec les protéines de fusion.

Ces résultats encourageants nous ont amené à évaluer les capacités d'internalisation et d'inhibition de l'expression du VEGF par les protéines de fusion, *in vivo*. Nous avons choisi d'injecter les protéines de fusion Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b dans un organe très vascularisé, la glande surrénale, chez la souris. Des travaux menés au laboratoire ont montré que le cortex surrénal exprime un niveau élevé de VEGF, et constitue de ce fait, un modèle de choix pour le test de nos protéines de fusion. Les rendements de purification étant limitants et les protéines Flag-R7-TIS11b et Flag-R9-TIS11b ayant montré des activités similaires dans les cellules en culture (figure 5, p. 155), elles ont été utilisées indifféremment dans les tests *in vivo*. De plus, le milieu de culture ou la protéine Flag-TIS11b sans PTD, ont également été utilisés alternativement comme témoin négatif.

### **3.6. Effet des protéines de fusion Flag-R7- ou Flag-R9-TIS11b sur l'expression du VEGF dans la glande corticosurrénalienne**

Afin d'évaluer l'activité des protéines de fusion sur l'expression du VEGF, *in vivo*, nous avons injecté soit la protéine de fusion Flag-TIS11b soit la protéine de fusion Flag-R7-TIS11b, à 100 nM, dans une surrénale de souris. 24 h après l'injection, la glande a été prélevée, fixée et incluse en paraffine. Des coupes de 7  $\mu$ m ont été réalisées et marquées par immunohistochimie avec un anticorps anti-VEGF (figure 6A, p. 156).

Le choix de la concentration utilisée et du délai de prélèvement de la glande a été effectué en fonction des expériences précédentes d'incubation des protéines de fusion avec les

cellules en culture. L'injection de 100 nM de protéine de fusion Flag-R7-TIS11b a montré une diminution importante de l'expression du VEGF par rapport à une glande dans laquelle la protéine de fusion Flag-TIS11b a été injectée. De plus, cette diminution est homogène dans toute la glande, non seulement sur toute la surface de la coupe, mais également sur toutes les coupes observées, indiquant que la protéine de fusion Flag-R7-TIS11b diffuse de manière importante dans tout le tissu. De manière intéressante, l'injection de la protéine Flag-TIS11b montre une légère diminution d'expression du VEGF au niveau du point d'injection (données non montrées), confirmant qu'une faible quantité de protéine sans PTD est internalisée et biologiquement active, néanmoins, cet effet est très localisé, ne diffuse pas sur toute la surface de la coupe et est limité à quelques coupes de la glande.

Parallèlement à ce travail, nous avons également injecté 100 nM de protéine de fusion Flag-R9-TIS11b, versus du tampon seul, dans les surrénales de souris. Les glandes ont été prélevées soit 24 h soit 48 h après l'injection et leurs ARN ont été purifiés et analysés par RT-PCR avec des amorces amplifiant le VEGF rapporté à l'amplification du gène de ménage HPRT (figure 6B, p. 156). Nous avons pu observer par cette méthode que l'expression de l'ARNm du VEGF, était diminuée d'environ 50 % par l'injection de la protéine de fusion Flag-R9-TIS11b après 24 h. De plus, nous avons également pu observer que cette diminution était maintenue après 48 h.

**En conclusion**, nous avons pu montrer dans cette étude que 100 nM de protéines de fusion Flag-Tat-, Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b sont capables d'induire une diminution du taux d'ARNm du VEGF ainsi que de la production de la protéine VEGF, dans des cellules en culture après 24 h d'incubation. De plus, nous avons montré que les PTD polyargines R7 et R9 fusionnés à TIS11b sont plus efficaces que le PTD Tat dans l'inhibition de l'expression du VEGF. En effet, les protéines Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b ont montré une activité plus marquée que la protéine Flag-Tat-TIS11b, que ce soit pour la déstabilisation de l'ARNm de VEGF ou pour la production de la protéine VEGF, et ceci bien que la protéine Flag-Tat-TIS11b montre, dans les tests d'internalisation, un pourcentage de cellules marquées plus important que la protéine Flag-R9-TIS11b. Une des explications possibles de ce résultat pourrait impliquer la localisation intracellulaire induite par les PTD. En effet, le PTD Tat composé des acides aminés 47 à 57, est issu de la protéine Tat du virus HIV qui est un facteur de transcription dont la cible est nucléaire (Potocky *et coll.*, 2003). Il a été rapporté qu'un signal de localisation nucléaire (NLS), qui contribue à la localisation de Tat dans le noyau des cellules infectées où elle exerce sa fonction transactivatrice, est présent entre les acides aminés 47 et 57 de la protéine (Ruben *et coll.*, 1989). Le site majeur de dégradation

des ARNm étant le cytoplasme, ceci pourrait expliquer l'efficacité moindre de Flag-Tat-TIS11b par rapport à Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b. Une localisation nucléaire de protéines fusionnées aux polyarginines a également été décrite. Néanmoins celle-ci semble induite par de fortes concentrations de protéines de fusion (Duchardt *et coll.*, 2007).

Dans notre étude, il n'est pas possible de déterminer si la localisation subcellulaire de TIS11b fusionnée au PTD Tat est à l'origine de son défaut d'efficacité par rapport aux autres PTD. L'acquisition des images en microscopie à fluorescence ou confocale a été réalisée 2 h après le début de l'internalisation et l'activité sur la diminution de la production du VEGF a été mesurée 24 h après l'incubation. Les protéines de fusion n'ont donc probablement plus la même localisation subcellulaire. De plus, une acquisition d'image à 24 h ne permettrait pas de déterminer la localisation subcellulaire des protéines de fusion. La demi-vie courte de la protéine d'une part, réduirait le signal à un niveau inférieur au seuil de détection de la fluorescence, et d'autre part, engendrerait la détection de fluorochrome seul, ce qui pourrait induire en erreur quant à la localisation subcellulaire de la protéine de fusion marquée. Il a par ailleurs été décrit que la nature du fluorochrome pouvait influencer la voie d'internalisation ainsi que la localisation subcellulaire des protéines de fusion marquées (Morris *et coll.*, 2008).

Les protéines Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b ont induit une diminution de 50 % de la production de VEGF en 24 h. L'expression du VEGF est très finement régulée physiologiquement, et la délétion hétérozygote de son gène est létale (Carmeliet *et coll.*, 1996; Ferrara *et coll.*, 1996), indiquant une sensibilité importante de l'organisme au taux de VEGF, tout au moins au cours du développement embryonnaire (Dibbens *et coll.*, 2001). Par ailleurs, l'expression de VEGF semble avoir également un rôle prépondérant dans la survie des cellules endothéliales (Lee S *et coll.*, 2007). Le défaut de VEGF induit l'apoptose des cellules endothéliales ainsi qu'une régression de la vascularisation (Bergers et Benjamin, 2003; Lee S *et coll.*, 2007). La diminution de 50 % du taux de VEGF serait donc suffisante pour inhiber l'angiogenèse et éventuellement pour induire une régression de la vascularisation, et ceci par deux voies : d'une part, par diminution de la stimulation paracrine du VEGF sur les cellules endothéliales, et d'autre part, par l'apoptose des cellules endothéliales induite par la diminution de leur stimulation intracrine par le VEGF.

Par ailleurs, nos résultats ont été obtenus avec une concentration de 100 nM de protéine de fusion, concentration compatible avec une utilisation thérapeutique *in vivo*, et la diminution d'expression du VEGF est observée jusqu'à 48 h après une seule injection dans la glande surrénale.

L'ensemble de ces données indique donc que les protéines de fusion Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b sont de bons candidats pour réaliser des tests d'inhibition de croissance tumorale, *in vivo*, sur des tumeurs pré-établies.



2<sup>ème</sup> Partie :

Effet de TIS11b sur la croissance  
tumorale



## 1. Introduction

Les résultats décrits dans la 1<sup>ère</sup> partie, nous ont permis de démontrer que les protéines PTD-TIS11b sont internalisées dans les cellules, et sont efficaces dans la déstabilisation de l'ARNm du VEGF ainsi que dans l'inhibition de la production de la protéine VEGF par les cellules COS7 en culture. De plus, l'injection de ces protéines PTD-TIS11b purifiées dans un organe très vascularisé comme la glande surrénale, induit une diminution de la quantité de VEGF dans cet organe. Ces résultats encourageants nous ont incités à évaluer l'efficacité de TIS11b, in vivo, dans un modèle tumoral. Pour cela, deux stratégies ont été mises en place. La première a consisté à faire la preuve de concept de notre hypothèse d'utiliser TIS11b pour induire une diminution de la croissance tumorale, en établissant une lignée tumorale stable surexprimant TIS11b. La deuxième a consisté à injecter les protéines Flag-PTD-TIS11b directement dans des tumeurs pré-établies et à évaluer leur capacité à induire une régression de ces tumeurs.

Les tumeurs ont été générées à partir de la lignée cellulaire LL2 (Dus *et coll.*, 1985). Cette lignée tumorale dérive des cellules LLC (Lewis Lung Carcinoma) murines (Bertram et Janik, 1980) qui ont subi des passages in vivo, chez des souris C57BL6 (Dus *et coll.*, 1985). Notre choix s'est porté sur cette lignée cellulaire car, ces cellules, LL2 ou LLC, présentent l'avantage d'une part, de croître rapidement lorsqu'elles sont implantées chez des souris, et d'autre part, d'avoir une angiogenèse tumorale fortement dépendante du VEGF. Par ailleurs, elles présentent un taux d'expression basal de la protéine TIS11b très faible, limitant les interférences de la protéine endogène avec la protéine exogène.

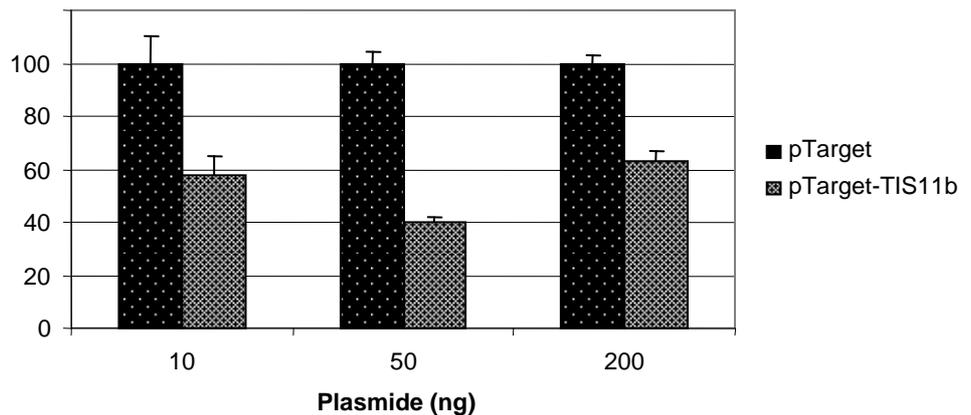
## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Effet de TIS11b sur la stabilité de l'ARNm du VEGF dans les cellules LL2

Afin d'évaluer l'effet de TIS11b in vivo dans un modèle tumoral, nous avons dans un premier temps généré une lignée tumorale stable de cellules LL2 surexprimant la protéine TIS11b. Notre première démarche a été de tester l'activité de TIS11b dans la déstabilisation de l'ARNm du VEGF dans ce type cellulaire. Les cellules LL2 ont été co-transfectées avec un

plasmide codant pour la protéine TIS11b et un plasmide codant pour le gène de la luciférase cloné en amont de la région 3'UTR de l'ARNm du VEGF (Luc-3'UTR). Comme indiqué précédemment, (Résultats, 1<sup>ère</sup> partie, 3.1, p. 159) l'activité luciférase reflète la stabilité de l'ARNm du VEGF (figure 8).

**Luciférase Firefly/Rénilla**  
(% du contrôle)



**Figure 8 : TIS11b diminue l'activité luciférase via le transcrit Luc-3'UTR dans des cellules LL2.**

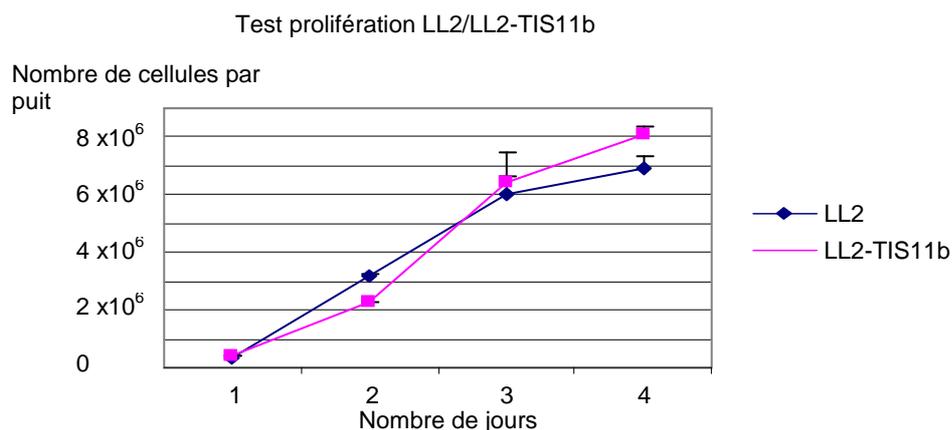
Les cellules LL2 ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour le gène luciférase cloné en amont de la région 3'UTR du VEGF et 10, 50 ou 200 ng de plasmide codant pour la protéine TIS11b. L'activité luciférase Firefly a été mesurée et rapportée à l'activité luciférase Rénilla (cf Matériel et méthodes 3.1, p. 181), utilisée comme contrôle de transfection.

La figure 8 montre que la surexpression de TIS11b dans les cellules LL2 en culture induit une diminution de l'activité luciférase via la région 3'UTR de l'ARNm du VEGF. Par ailleurs, on peut noter que cette activité déstabilisatrice de TIS11b est équivalente à celle que l'on observe à 10 ng de plasmide transfecté, dans des cellules COS7 en culture (cf l'article ci-joint, figure 1C, p.151). Néanmoins, une quantité de 50 ng de plasmide exprimant TIS11b est nécessaire pour obtenir 60 % d'inhibition de l'activité luciférase contre 25 ng dans des cellules COS7. On peut également remarquer, que dans les cellules LL2 comme dans les cellules COS7, l'effet inhibiteur de TIS11b est biphasique et diminue à 200 ng de plasmide exprimant TIS11b co-transfecté. Ces résultats suggèrent que la surexpression de TIS11b dans les cellules LL2 induit une diminution du taux de transcrit Luc-3'UTR similaire à celle que nous avons observée dans les cellules COS7. Nous avons donc entrepris d'établir une lignée cellulaire surexprimant TIS11b.

## 2.2. Prolifération des cellules LL2 et LL2-TIS11b in vitro

Le projet de départ était d'établir une lignée stable inductible, sous le contrôle d'un promoteur sensible à la tétracycline. Ce système nous permettait de stimuler l'expression de TIS11b non seulement au cours de la prise tumorale, mais également une fois la tumeur établie afin d'évaluer ainsi l'effet de TIS11b sur la régression des tumeurs. Nous avons pu obtenir deux lignées LL2 après transfection de plasmides rétroviraux comportant la séquence de TIS11b (cf Matériel et méthodes 3.2 et 3.3, p. 182). Cependant, aucune des deux lignées n'a montré d'expression de TIS11b dépendante de la tétracycline. La première ne surexprimait pas TIS11b et la seconde surexprimait TIS11b de manière stable mais non inductible (données non montrées). Ces deux lignées ainsi qu'une lignée supplémentaire comportant le plasmide rétroviral vide ont montré la même difficulté à être établies. La surexpression de TIS11b n'est donc pas délétère pour la cellule et ne peut pas expliquer l'obtention de ces clones. Nous avons néanmoins décidé de transplanter les cellules surexprimant TIS11b (LL2-TIS11b) in vivo, par voie sous cutanée chez la souris nude afin d'évaluer l'effet de la surexpression de TIS11b sur la croissance tumorale (cf Matériel et méthodes 3.5, p. 182).

Avant de transplanter ces cellules, nous avons vérifié que l'introduction du gène de TIS11b n'avait pas modifié les capacités de prolifération des cellules LL2-TIS11b. Pour cela, les cellules LL2 et LL2-TIS11b ont été cultivées en parallèle, puis trypsinées et comptées tous les jours pendant quatre jours consécutifs jusqu'à confluence (Figure 9).



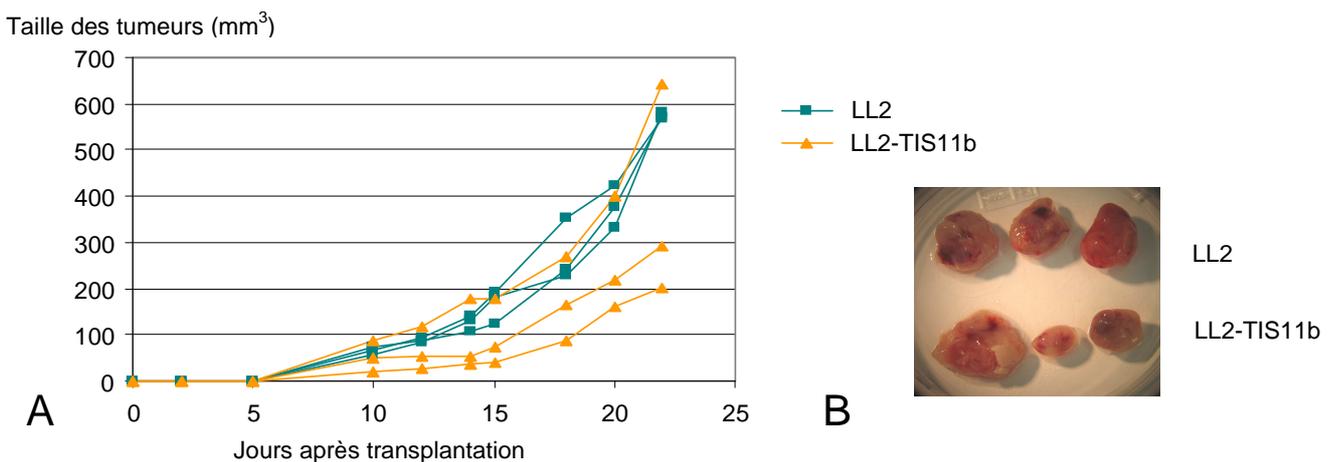
**Figure 9 : Les cellules LL2 et LL2-TIS11b prolifèrent de manière identique en culture.**

Les cellules LL2 et LL2-TIS11b ont été comptées et ensemencées parallèlement en duplicata. Les cellules ont été trypsinées et comptées à l'aide d'un compteur Coulter toutes les 24 h pendant 4 jours consécutifs jusqu'à confluence. La quantité de cellules représentée sur le graphique correspond à la moyenne des 2 puits (cf Matériel et méthodes 3.4, p. 182). (n=2).

Nous avons pu observer qu'il n'y avait pas de différence de prolifération entre les deux types cellulaires. Des cellules comportant le plasmide rétroviral vide avaient été générées afin de servir de témoin négatif. Cependant, ce type cellulaire a montré une capacité de prolifération in vitro très diminuée par rapport aux LL2 naïves et aux LL2-TIS11b (données non montrées), suggérant que les points d'insertion du rétrovirus ont probablement altéré un ou des gène(s) impliqué(s) dans la prolifération. Les cellules LL2 naïves ont donc été utilisées comme contrôle négatif dans les expériences in vivo. Par ailleurs, nous avons observé par Northern blot que le taux d'ARNm du VEGF endogène était plus faible dans les cellules LL2-TIS11b que dans les cellules LL2 (données non montrées).

### 2.3. Croissance tumorale des cellules LL2 et LL2-TIS11b chez la souris nude

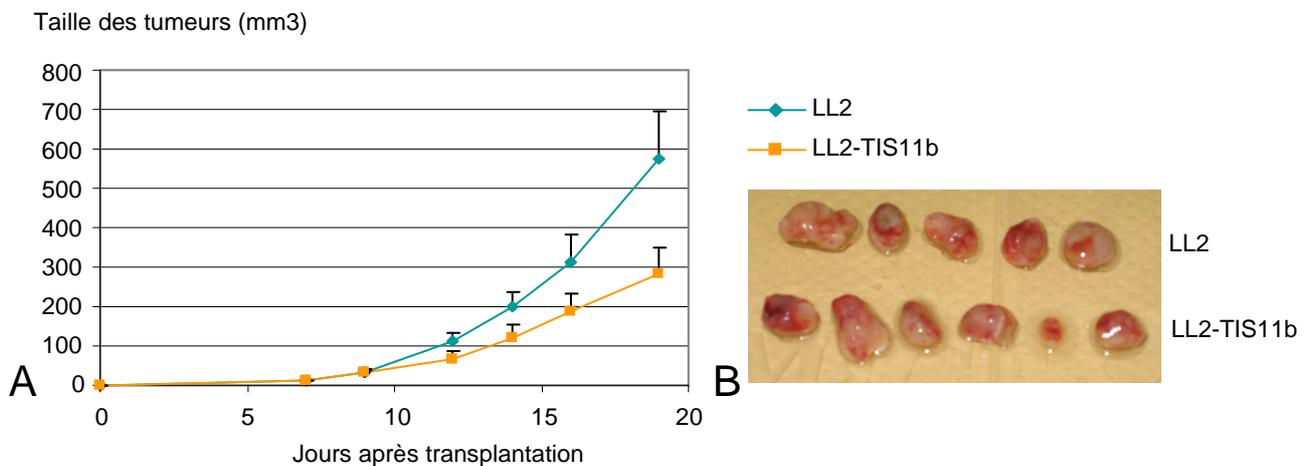
Les cellules LL2 et LL2-TIS11b ont été transplantées par voie sous cutanée chez la souris nude. Nous avons choisi d'utiliser des souris immuno-déficientes, bien que les cellules LL2 soient des cellules murines. En effet, la séquence de TIS11b utilisée est la séquence de la protéine humaine et nous avons souhaité nous affranchir d'une éventuelle réponse immunitaire dirigée contre la protéine surexprimée ou injectée (protéine purifiée Flag-PTD-TIS11b). Dans un premier temps, deux groupes de trois souris ont été utilisés. Les tumeurs ont été mesurées avec un pied à coulisse toutes les 48 h, pendant 21 jours, et le volume tumoral a été calculé et reporté en fonction des jours post-transplantation (figure 10).



**Figure 10 : TIS11b ralentit la croissance tumorale des cellules LL2.**

Un million de cellules LL2 ou LL2-TIS11b ont été transplantées dans 50  $\mu$ L de milieu DMEM, par voie sous-cutanée, chez trois souris nude. A) Les tumeurs ont été mesurées avec un pied à coulisse toutes les 48 h, le volume tumoral est calculé selon la formule  $L \times l \times h$  et reporté en  $\text{mm}^3$  pour chacune des souris. B) 21 jours après la transplantation, les tumeurs ont été prélevées et photographiées. Cette expérience est représentative de 2 expériences dans les mêmes conditions.

Cette expérience in vivo a montré des résultats encourageants. En effet, sur un groupe de 3 souris comportant des tumeurs LL2-TIS11b, seule une tumeur échappe à la diminution de croissance tumorale, et montre un volume plus important que celui des tumeurs du groupe témoin issues des cellules LL2 naïves. Les deux autres tumeurs LL2-TIS11b montrent un volume très inférieur (environ 30 et 50 %) des tumeurs LL2 témoins qui présentent des volumes tumoraux très homogènes. Cette expérience est représentative de 2 expériences effectuées dans les mêmes conditions. Dans la mesure où une tumeur du groupe LL2-TIS11b a échappé à la diminution de croissance tumorale dans chacune de ces expériences nous avons effectué une 3<sup>ème</sup> expérience comportant 6 souris par groupe, afin de réaliser des tests statistiques (figure 11).



**Figure 11 : Les tumeurs LL2-TIS11b croissent moins vite que les tumeurs LL2, néanmoins, les résultats sont moins marqués que précédemment.**

Un million de cellules LL2 ou LL2-TIS11b ont été transplantées dans 50  $\mu$ L de milieu DMEM, par voie cutanée chez la souris nude (n= 6 souris/ groupe). A) Les tumeurs ont été mesurées avec un pied à coulisse toutes les 48 h et le volume tumoral a été calculé selon la formule  $L \times l \times h$ . Les moyennes des volumes de six tumeurs par groupe ont été calculées et reportées en  $\text{mm}^3$ . B) 19 jours après la transplantation, les tumeurs ont été prélevées et photographiées.

Dans cette expérience, les tumeurs ont été prélevées 19 jours après transplantation, contre 21 jours dans les expériences précédentes. Deux raisons ont motivé ce choix. D'une part des signes de nécroses sont apparus sur différentes tumeurs des deux groupes, nous obligeant à sacrifier les animaux pour des raisons éthiques. Ainsi, dans le groupe LL2, les moyennes ont été réalisées avec 6 tumeurs jusqu'au 16<sup>ème</sup> jour, et avec 5 tumeurs le 19<sup>ème</sup> jour une tumeur de ce groupe comportant des signes importants de nécrose à J16. D'autre part, pour ces mêmes raisons éthiques, nous nous sommes fixé un seuil maximal de 1  $\text{cm}^3$  de volume tumoral, volume atteint en général dans les 20 à 22 jours après transplantation. Dans cette expérience, l'une des tumeurs a atteint 900  $\text{mm}^3$  à J19. Ces tumeurs doublent

presque en 24 h, toutes les tumeurs ont été prélevées au 19<sup>ème</sup> jour afin de les comparer entre elles.

Les tumeurs LL2-TIS11b ont montré une croissance inférieure aux tumeurs LL2. Néanmoins, les résultats de cette expérience sont moins marqués que ceux des expériences précédentes (figure 10). En effet, les mesures des volumes tumoraux ont montré des différences statistiquement significatives entre les deux groupes de tumeurs (figure 11A). Néanmoins, après prélèvement, il s'est avéré que les tumeurs du groupe LL2-TIS11b étaient plus développées vers l'intérieur de l'animal, formant un creux dans le péritoine sans l'envahir, d'une manière qui n'avait pas été observée dans les deux expériences précédentes. Une partie de la tumeur s'est trouvée masquée lors des mesures externes à l'aide du pied à coulisse. Les différences de taille observées (figure 11A) se sont révélées moins importantes lors de la comparaison directe des tumeurs par alignement (figure 11B). Ces résultats doivent donc être confirmés.

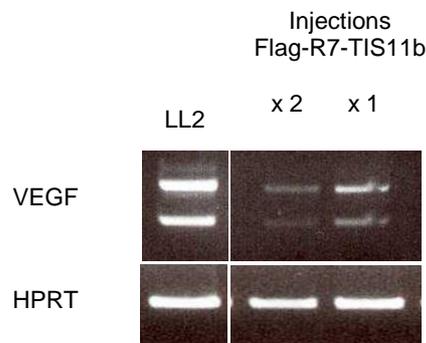
Par ailleurs, les ARNm des tumeurs obtenues ont été purifiés et analysés par RT-PCR semi-quantitative. Nous avons observé que la surexpression de TIS11b était maintenue dans les cellules LL2-TIS11b, y compris dans les tumeurs qui ont échappé au ralentissement de croissance (données non montrées). De façon surprenante, aucune différence d'expression du VEGF n'a pu être observée entre les deux groupes, ne permettant pas d'établir une corrélation entre l'expression du VEGF et les différences de croissance tumorale. De même, l'analyse de l'expression de la protéine VEGF par immunohistochimie sur des coupes de ces différentes tumeurs, n'a pas montré de différence d'expression significative entre les deux groupes de tumeurs.

**En conclusion**, la caractérisation de ces tumeurs devra être poursuivie. Il sera notamment nécessaire de réaliser un marquage des vaisseaux tumoraux avec un anticorps anti-CD31, afin d'évaluer l'impact de la surexpression de TIS11b sur la vascularisation.

#### **2.4. Effet de l'injection de protéines Flag-PTD-TIS11b sur la croissance tumorale de tumeurs pré-établies.**

Dans un deuxième temps, nous avons injecté les protéines purifiées Flag-PTD-TIS11b directement dans des tumeurs pré-établies. Ayant montré précédemment (Résultats, 1<sup>ère</sup>

partie, 3.6, p. 165) que l'injection de protéine de fusion purifiée Flag-R7- ou Flag-R9-TIS11b à 100 nM dans un organe très vascularisé comme la glande surrénale induisait une diminution importante du VEGF à 24 h, nous avons tout d'abord testé l'influence de l'injection de Flag-R7-TIS11b, à 100 nM dans la tumeur sur l'expression du VEGF par RT-PCR semi-quantitative. Pour cela, des tumeurs pré-établies, générées par transplantation sous-cutanée de cellules LL2 chez la souris nude, ont été injectées par voie intratumorale avec 100 nM de Flag-R7-TIS11b. La première tumeur a reçu une injection de protéine Flag-R7-TIS11b et a été prélevée 24 h après injection, et la deuxième tumeur a reçu deux injections de protéine de fusion à 24 h d'intervalle, et a été prélevée 24 h après la deuxième injection. Les ARN de ces tumeurs ont été purifiés et analysés par RT-PCR semi-quantitative (cf Matériel et Méthodes, 3.6 et 3.7, p. 183) (figure 12).



**Figure 12 : L'injection de 100 nM de protéine R7-TIS11b dans une tumeur pré-établie induit une diminution de l'expression de l'ARNm du VEGF.**

Un million de cellules LL2 ont été injectées, par voie sous cutanée chez la souris nude. Une fois les tumeurs établies, la protéine de fusion purifiée R7-TIS11b a été injectée, par voie intratumorale à 100 nM. La première tumeur a reçu une injection et a été prélevée après 24 h (injection Flag-R7-TIS11b x 1). La deuxième tumeur, a reçu deux injections à 24 h d'intervalle, puis a été prélevée 24 h après cette deuxième injection (injection Flag-R7-TIS11b x 2). Les ARN de ces tumeurs ont été purifiés et analysés par RT-PCR semi-quantitative avec des amorces amplifiant soit la séquence du gène HPRT, afin de normaliser les quantités d'ADNc utilisées, soit la séquence du VEGF (cf Matériel et méthodes 3.6 et 3.7, p. 183).

Nos résultats montrent que l'injection d'une dose de Flag-R7-TIS11b à 100 nM, par voie intratumorale, induit une diminution de l'expression de l'ARNm du VEGF, et qu'une deuxième injection de cette même protéine de fusion purifiée à 24 h d'intervalle, accentue cette diminution.

Le choix initial des intervalles d'injection de 24 h ou du moment d'initiation des injections, a été déterminé selon différents critères. D'une part, la demi-vie de TIS11b a été décrite comme étant relativement courte (inférieure à 3 h) (Benjamin D *et coll.*, 2006), ce qui

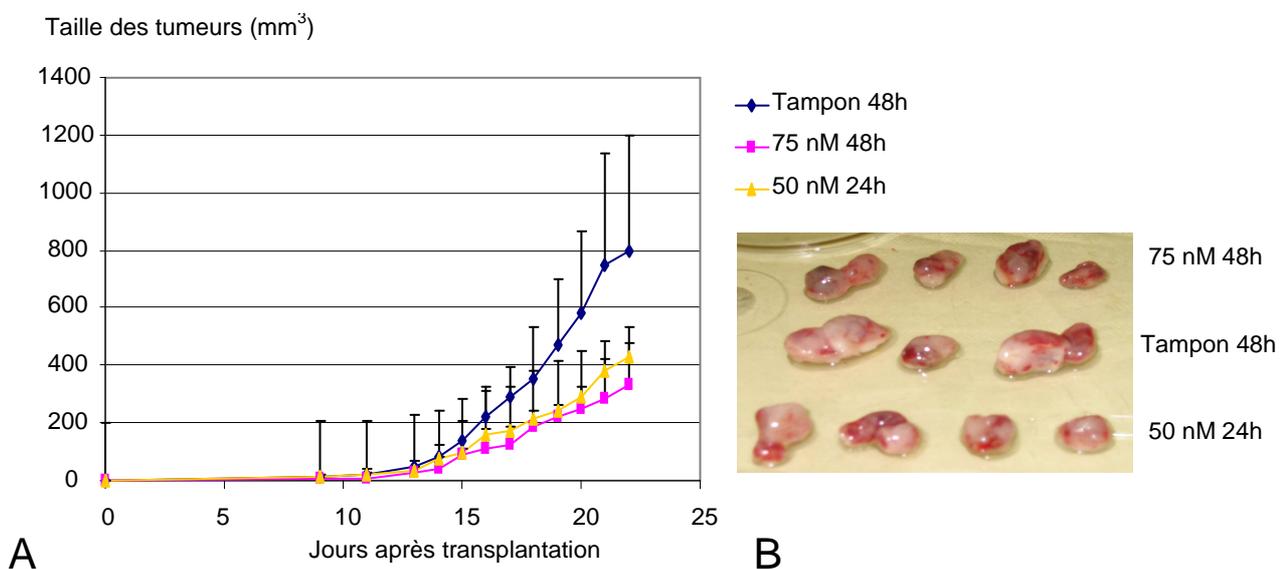
inciterait à des intervalles d'injection plutôt rapprochés. Cependant, nous avons montré précédemment que l'incubation de protéines de fusion purifiées avec des cellules COS7 en culture induit une diminution de 50 % de l'expression de la protéine VEGF après 24 h suggérant que les injections peuvent être au moins espacées de 24 h. De plus, nous avons également observé, que l'effet de l'injection de Flag-R9-TIS11b dans la glande surrénale, sur l'expression du VEGF, était maintenue à 48 h après injection, ce qui permettait les intervalles d'injection plus espacés. D'autre part, certaines tumeurs LL2-TIS11b n'ont pas montré d'inhibition de la croissance tumorale malgré la surexpression de TIS11b. De même, un essai d'injection de protéine de fusion dans une tumeur pré-établie d'un volume d'environ 300 mm<sup>3</sup> n'a montré aucun effet sur la croissance tumorale par rapport à une tumeur témoin recevant du tampon (PBS avec du tampon d'élution de la protéine) (données non montrées), la tumeur étant probablement déjà trop développée. Ces deux observations indiquent que certaines tumeurs LL2 sont capables d'échapper au ralentissement de croissance induit par TIS11b. Nous avons donc choisi de débiter les injections de protéines de fusion dès l'apparition de la tumeur (à partir de J7), voire avant son apparition (à J2), au site de transplantation des cellules.

Par ailleurs, n'ayant pas observé de différence d'activité entre Flag-R7-TIS11b ou Flag-R9-TIS11b sur les cellules en culture ou lors de l'injection dans la glande cortico-surrénalienne, nous avons utilisé Flag-R7-TIS11b dans les tests préliminaires et Flag-R9-TIS11b dans les études ultérieures.

Un test d'injection dans les tumeurs pré-établies, avant l'apparition des tumeurs à J2, de 100 nM de protéines Flag-R9-TIS11b toutes les 48 h n'ayant pas montré de résultats (données non montrées), des doses plus faibles, 50 et 75 nM de protéine Flag-R9-TIS11b ont été injectées, toutes les 24 h et 48 h respectivement. En effet, il a été décrit qu'un schéma d'injection métronomique, comportant de petites doses rapprochées, était plus efficace qu'un schéma d'injection constitué de doses fortes à des intervalles espacés (Browder *et coll.*, 2000). Ce dernier schéma d'administration favoriserait une prolifération accrue, ainsi qu'une repopulation des cellules cancéreuses entre deux traitements radio- ou chimiothérapeutiques, et serait responsable de nombreux échecs thérapeutiques (Kim JJ et Tannock, 2005). De la même manière dans notre étude, il se pourrait que l'expression du VEGF soit restaurée voire augmentée entre 2 injections de protéines de fusion par un processus compensatoire, et induise une prolifération des cellules tumorales ayant résisté ainsi qu'une sélection de cellules moins sensibles à l'hypoxie, de manière indirecte ou non, ce qui induirait un échappement de la tumeur au ralentissement de croissance. Cette technique de délivrer un traitement insuffisant *in vivo* pour sélectionner des cellules

résistantes a notamment été utilisée par Browder et coll. avec des cellules LL2, pour créer un modèle d'étude de résistance (Browder *et coll.*, 2000).

Pour ces différentes raisons, les injections de Flag-R9-TIS11b ont été réalisées à l'apparition des tumeurs, par voie intratumorale, à une concentration de 50 nM toutes les 24 h ou de à 75 nM toutes les 48 h. Le groupe témoin a reçu du tampon (PBS avec du tampon d'éluion de la protéine) toutes les 48 h. Les mesures des tumeurs ont été réalisées toutes les 24 h à l'aide d'un pied à coulisse quelque soit le protocole d'injection (figure 13).



**Figure 13 : L'injection de protéine purifiée Flag-R9-TIS11b à 75 nM toutes les 48 h ou 50 nM toutes les 24 h, dans des tumeurs pré-établies ralentit la croissance tumorale.**

Un million de cellules LL2 ont été injectées, par voie sous cutanée, chez la souris nude. 7 jours après la transplantation des cellules, les tumeurs commencent à apparaître et à être mesurées avec un pied à coulisse, toutes les 24 h. La protéine de fusion purifiée R9-TIS11b a été injectée par voie intratumorale à 50 nM toutes les 24 h ou 75 nM toutes les 48 h. Le groupe témoin a reçu du tampon toutes les 48 h. Chaque groupe comportait 4 souris. Les volumes des tumeurs ont été calculés selon la formule  $L \times l \times h$ , la moyenne des volumes des 4 tumeurs par groupe (3 pour le groupe témoin) a été calculée et reporté sur le graphique en mm<sup>3</sup>. Les tumeurs ont été prélevées 23 jours après la transplantation des cellules et photographiées (cf Matériel et méthodes 3.6, p. 183).

Les résultats obtenus lors de ce deuxième essai sont plus intéressants. L'injection de protéine de fusion purifiée Flag-R9-TIS11b à 75 nM toutes les 48 h ou à 50 nM toutes 24 h, par voie intra-tumorale dans une tumeur pré-établie, ralentit la croissance tumorale. De plus, il semblerait que l'injection de la protéine à 75 nM toutes les 48 h montre un effet plus important qu'à 50 nM toutes les 24 h.

La difficulté majeure dans l'interprétation de cette expérience, réside dans le fait que le groupe témoin de tumeurs présente une importante hétérogénéité de croissance tumorale,

allant du simple au double et induisant un écart type élevé, alors que les volumes tumoraux des autres groupes qui ont reçu de la protéine de fusion sont relativement homogènes. Ce phénomène avait déjà été observé avec le groupe témoin de tumeurs LL2 comparé au groupe de tumeurs LL2-TIS11b (cf figure 11, p. 175), indiquant que cette hétérogénéité n'est pas due à l'injection de tampon dans ces tumeurs.

Néanmoins, une diminution de croissance associée à l'injection de protéine Flag-R9-TIS11b a pu être observée quel que soit le protocole. Les injections ont été débutées après l'apparition de toutes les tumeurs, environ à J11 après transplantation, les tumeurs présentaient un volume moyen de 10 à 15 mm<sup>3</sup> et étaient toutes inférieures à 50 mm<sup>3</sup>, nous affranchissant probablement d'un éventuel échappement qui aurait eu lieu à un volume supérieur. Il est également important de noter que le volume de protéine injectée ne varie pas en fonction du volume de la tumeur. En effet, la pression intratumorale est telle qu'il est difficile d'injecter par cette voie un volume supérieur à 15 µL, et de l'augmenter avec la croissance tumorale. De plus, bien que les injections aient été effectuées toutes les 48 h pour le protocole utilisant 75 nM de protéine, les mesures ont été effectuées toutes les 24 h afin d'évaluer la pertinence du choix des intervalles entre deux injections. Nous avons remarqué en effet, que les tumeurs de ce groupe présentaient une croissance en dents de scie, avec un pallier à 24 h, et souvent une diminution du volume tumoral pour les 4 tumeurs du groupe puis une accélération de la croissance tumorale les 24 h suivantes, réintégrant les volumes tumoraux dans la courbe de croissance initiale voire la dépassant (données non montrées). Cependant, les 4 tumeurs ne sont pas synchrones, ce qui explique que cette croissance en dents de scie n'apparaisse pas ou peu sur le graphique représentant les moyennes des volumes tumoraux (figure 13). Ce phénomène n'apparaît pas ou très faiblement pour toutes les tumeurs du groupe injectées avec 50 nM de protéine toutes les 24 h, et n'a jamais été observé pour aucune des tumeurs du groupe témoin.

**En conclusion**, ces résultats préliminaires sont très encourageants, et le protocole de délivrance de la protéine de fusion R9-TIS11b dans une tumeur pré-établie mérite d'être affiné. Il serait donc intéressant de reproduire cette expérience avec une initiation des injections à l'apparition des tumeurs mais avec une concentration légèrement plus élevée que celle que nous avons utilisée i.e. 100 nM de protéine Flag-R9-TIS11b toutes les 48 h (au lieu de 75 nM) ou de 75 nM toutes les 24 h (au lieu de 50 nM), voire de 75 nM toutes les 36 h pour essayer de maintenir les volumes tumoraux dans les conditions qui permettent un ralentissement ou une diminution de la croissance tumorale. De plus, il est nécessaire

d'utiliser un nombre d'animaux plus important par groupe afin de minimiser les écarts observés pour le groupe témoin et obtenir un résultat statistiquement significatif.

Par ailleurs, il serait également intéressant de caractériser ces tumeurs et notamment d'évaluer l'expression du VEGF, la vascularisation tumorale et éventuellement le taux d'apoptose dans ces tumeurs, afin de déterminer les mécanismes conduisant à ce ralentissement de la croissance tumorale sous l'effet de la protéine de fusion Flag-R9-TIS11b. Nous envisageons également d'utiliser des cellules LL2 qui expriment le gène de la Luciférase et de mesurer cette bioluminescence par imagerie du petit animal afin de déterminer les volumes tumoraux. Cette technique nous permettrait d'être plus précis quant au volume tumoral global et de prendre en compte la présence d'éventuelles zones nécrotiques, ce qui n'est pas possible avec des mesures externes à l'aide d'un pied à coulisse.

### **3. Matériel et méthodes**

#### **3.1. Co-transfection et mesure de l'activité « Dual Luciferase »**

1,5 x 10<sup>5</sup> cellules LL2 ont étéensemencées dans des plaques 12 puits et cultivées dans du DMEM 4,5 g/L de glucose avec 10 % de sérum de veau fœtal, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg /mL de streptomycine. Après 24 h de culture 10, 50 ou 200 ng de plasmides pTarget vide (Proméga) ou pTarget-TIS11b ont été co-transfectés avec 500 ng de plasmide codant pour le gène de la luciférase Firefly cloné en amont de la région 3'UTR du VEGF (Luc-3'UTR) et 25 ng de plasmide codant pour la luciférase Rénilla (origine des plasmides décrite dans l'article ci-joint p. 135), avec de la Lipofectamine (Invitrogen) selon le protocole du fournisseur. 24 h après cette co-transfection, les cellules sont lysées et les activités des luciférases Firefly et Rénilla sont mesurées en utilisant le kit Dual-Luciferase reporter assay system (Proméga). La lecture est réalisée avec un luminomètre LUMAT LB 9507 (EGG-berthold, Bad, Wildbad, Germany). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (pTarget vide) du rapport luciférase Firefly/Rénilla. Chaque condition a été réalisée en triplicata.

### **3.2. Construction des plasmides rétroviraux**

Les plasmides rétroviraux utilisés proviennent du kit RevTet-On System (Clontech). Un premier plasmide (pRev-Tet-On) code pour le « reverse Tet repressor » qui permet la transcription en présence de doxycycline de la protéine encodée par le deuxième plasmide rétro-viral (pRev-TRE-TIS11b). La construction du plasmide pRev-TRE-TIS11b a été réalisée par l'insertion de la séquence de TIS11b entre les sites de restriction des enzymes BamH I et Sal I, à partir du plasmide pTarget-TIS11b.

### **3.3. Transfection des plasmides rétroviraux dans les cellules LL2**

Une première expérience d'infection des plasmides rétroviraux dans les cellules LL2 selon le protocole du fournisseur, ayant été infructueuse, ces plasmides ont été transfectés dans les cellules LL2 à l'aide d'un électroporateur (Nucleofector II, Amaxa) selon le protocole du fournisseur « Basic Nucleofection Protocol for Primary Mammalian Epithelial Cells » (2 µg de plasmides,  $1 \times 10^6$  de cellules, programme T16), incubées 48 h, puis sélectionnées avec 400 µg/mL d'hygromycine et 400 µg/mL de néomycine.

### **3.4. Tests de prolifération des cellules**

$7 \times 10^4$  cellules LL2 et LL2-TIS11b ont été comptées etensemencées parallèlement en duplicata dans des plaques 24 puits. Les cellules ont été trypsinées et comptées à l'aide d'un compteur Coulter toutes les 24 h pendant 4 jours consécutifs jusqu'à confluence. La quantité de cellules représentée sur le graphique correspond à la moyenne des 2 puits.

### **3.5. Transplantation des cellules par voie sous-cutanée**

Des souris nude femelles de 7 semaines ont été anesthésiées et identifiées.  $1 \times 10^6$  de cellules LL2 ou LL2-TIS11b dans 50 µL de DMEM ont été transplantée par voie sous-cutanée dans le bas du dos de ces souris. Les tumeurs commencent à apparaître 5 à 10 jours après transplantation et sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse toutes les 48 h. Le volume tumoral a été calculé selon la formule  $L \times l \times h$ . Les moyennes des volumes des tumeurs ont été calculées et reportées en  $\text{mm}^3$ . Les animaux ont été sacrifiés 19 à 21 jours

post-transplantation. Les tumeurs ont été prélevées et photographiées. Un volume tumoral maximal de 1 cm<sup>3</sup> a été respecté.

### **3.6. Injection des protéines Flag-R7- ou Flag-R9-TIS11b dans les tumeurs pré-établies**

Différentes concentrations (50 nM, 75 nM ou 100 nM) dans 15 µL de protéines Flag-R7- ou Flag-R9-TIS11b purifiées (purification décrite dans l'article ci-joint p. 138), ont été injectées dans les tumeurs LL2 pré-établies avant l'apparition à J2 ou à l'apparition de celles-ci, i.e. à J11 toutes les 24 h (50 ou 100 nM) ou 48 h (75 ou 100 nM), versus du tampon (mélange du tampon d'éluion des protéines purifiées et de PBS) toutes les 48 h. Les tumeurs ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse toutes les 24 h. Le volume tumoral a été calculé selon la formule  $L \times l \times h$ . Les moyennes des volumes des tumeurs ont été calculées et reportées en mm<sup>3</sup>. Les animaux ont été sacrifiés 23 jours post-transplantation. Les tumeurs ont été prélevées et photographiées. Un volume tumoral maximal de 1 cm<sup>3</sup> a été respecté.

### **3.7. Purification des ARNm et Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) semi quantitative**

Les ARN totaux de tumeurs ont été purifiés avec le kit RNeasy Mini kit (QIAGEN) selon le protocole du fournisseur. L'analyse semi-quantitative en RT-PCR semi-quantitative de l'expression du VEGF et de l'HPRT (hypoxantine phosphoribosyl transférase) a été réalisée selon le protocole décrit dans l'article ci-joint p.141.



## 3<sup>ème</sup> Partie :

# Phosphorylation de TIS11b par la protéine kinase A (PKA)



## 1. Introduction

Le VEGF est le facteur de croissance angiogène prépondérant dans la régulation de l'angiogenèse physiologique et pathologique (Ferrara et Davis-Smyth, 1997). Son expression est importante à la fois pour l'induction de nouveaux vaisseaux et pour le maintien d'une vascularisation fonctionnelle dans différents organes (Eremina *et coll.*, 2003; Lammert *et coll.*, 2003). Dans la glande surrénale, la vascularisation est maintenue par la régulation de l'expression du VEGF en réponse à l'hormone hypophysaire ACTH (Keramidas *et coll.*, 2004). Notre laboratoire a démontré que la stimulation de cellules corticosurréaliennes bovines (BAC) en culture primaire par l'ACTH, induisait une augmentation rapide et transitoire du taux d'ARNm du VEGF, avec un pic d'expression autour de 3 h après la stimulation (Chinn *et coll.*, 2002). Ce mécanisme est indépendant de la transcription. En effet, cette augmentation est également observée en présence de 5,6-Dichloro- $\beta$ -D ribofuranosyl benzimidazole (DRB), un puissant inhibiteur de la transcription. L'expression du VEGF est régulée à différents niveaux et notamment au niveau post-transcriptionnel par différentes protéines capables de se lier à la région 3'UTR de son ARNm et d'induire sa stabilisation, comme HuR (Levy NS *et coll.*, 1998), ou sa déstabilisation, comme TIS11b, que notre équipe a identifiée récemment. L'expression de TIS11b est également induite par l'ACTH mais de façon concomitante avec la phase de déstabilisation de l'ARNm du VEGF. Le rôle de TIS11b sur la déstabilisation de l'ARNm du VEGF a tout d'abord été suggéré par son effet déstabilisateur de l'ARNm d'un gène rapporteur, le gène de la luciférase, cloné en amont de la région 3'UTR du VEGF (Luc-3'UTR) dans des cellules NIH-3T3 en culture. L'interaction entre TIS11b et la région 3'UTR de l'ARNm du VEGF dans des cellules vivantes a par la suite été démontrée par la technique de CHIP (chromatin immunoprecipitation) (Ciais *et coll.*, 2004). Par ailleurs, l'extinction de l'expression de TIS11b par des ARN interférents dans des cellules BAC indique clairement que TIS11b participe au contrôle de l'expression du VEGF dans des conditions basales ainsi qu'en réponse à une stimulation par l'ACTH. Par la suite, il a également été démontré dans ce modèle, que l'ACTH induit une translocation de la protéine HuR, stabilisatrice des ARNm, du noyau vers le cytoplasme (Cherradi *et coll.*, 2006). L'inhibition de cette translocation ou la suppression de HuR dans les cellules corticosurréaliennes par interférence ARN bloque l'induction du taux d'ARNm du VEGF par l'ACTH. TIS11b et HuR ont des sites de liaison à l'ARNm du VEGF très proches. In vitro, les deux protéines se lient à la région 3'UTR du VEGF. Une surexpression de TIS11b inhibe l'induction de l'activité de la luciférase par la surexpression de HuR, via la région 3'UTR de

l'ARNm du VEGF. L'activité déstabilisatrice de TIS11b semble donc être prédominante sur l'activité stabilisatrice de HuR sur l'ARNm du VEGF, *in vitro*.

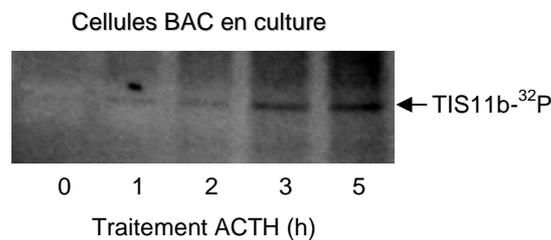
Dans les cellules corticosurréaliennes, l'ACTH stimule l'adényl cyclase via son récepteur spécifique couplé aux protéines G (MC2R) et active la voie de l'AMPc et de la PKA. Il a été montré que la forskoline, un activateur de l'adényl cyclase, est aussi puissante que l'ACTH pour induire l'augmentation du taux d'ARNm du VEGF ainsi que l'expression de TIS11b (Gaillard *et coll.*, 2000; Chinn *et coll.*, 2002). Les trois protéines de la famille TIS11 sont phosphorylées en réponse à de nombreux stimuli et certains de ces sites de phosphorylation semblent être importants pour les interactions avec d'autres protéines. A ce jour, la phosphorylation des membres de la famille TIS11 est corrélée à une inhibition de leur activité déstabilisatrice (Johnson *et coll.*, 2002; Schmidlin *et coll.*, 2004). Notamment, il a été décrit pour TTP, le prototype de la famille TIS11, que la MAPK-activated kinase 2 (MK2) régule à la fois son activité et son expression dans les macrophages en réponse à une stimulation par des lipopolysaccharides (LPS) (Hitti *et coll.*, 2006). MK2 induit l'expression de TTP de façon concomittante à celle des cytokines qu'elle va réguler par déstabilisation de leur ARNm. La phosphorylation de MK2 induit la phosphorylation de TTP et son accumulation sous forme inactive dans le cytoplasme. Les ARNm des cytokines cibles de TTP ne sont pas déstabilisés par TTP au cours de cette première phase d'induction de leur expression. Dans la deuxième phase, une importante quantité de TTP est prête à être activée dans le cytoplasme pour induire une déstabilisation des ARNm des cytokines inflammatoires, notamment du TNF-alpha, et moduler ainsi leur expression (Sun *et coll.*, 2007). Pour l'instant, seules la protéine kinase B (PKB) et MK2 ont été décrites capables de phosphoryler la protéine TIS11b (Schmidlin *et coll.*, 2004; Maitra *et coll.*, 2008). Très récemment la PKA a été rapportée capable de phosphoryler TTP *in vitro* (Cao et Lin, 2008). L'activation de la PKA induit également l'expression de TIS11b dans un modèle de cellules humaines « osteoblastes-like » en réponse à l'hormone parathyroïdienne, mais la phosphorylation de TIS11b par cette kinase n'a pas été documentée dans cette étude (Reppe *et coll.*, 2004).

Dans ce contexte, nous avons souhaité évaluer si la PKA pouvait être impliquée dans la régulation de l'activité déstabilisatrice de TIS11b en réponse à l'ACTH. Dans un premier temps, nous avons examiné l'état de phosphorylation de TIS11b dans les cellules corticosurréaliennes en culture stimulées par l'ACTH. Puis, nous avons évalué la phosphorylation de TIS11b par la PKA *in vitro*, et déterminé les sites potentiels de phosphorylation, au moyen de protéines mutées ponctuellement et de peptides synthétiques. Ces protéines TIS11b mutées ont ensuite été utilisées pour déterminer l'influence des phosphorylations par la PKA sur l'activité de TIS11b dans la déstabilisation des ARNm.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Phosphorylation de TIS11b dans les cellules BAC en culture en réponse à l'ACTH

Notre objectif était d'évaluer si la PKA était impliquée dans la phosphorylation de TIS11b dans les cellules BAC en réponse à l'ACTH. Les cellules BAC en culture primaire ont été stimulées pendant différents temps par l'hormone en présence de <sup>32</sup>P-orthophosphate (figure 14).



**Figure 14 : Phosphorylation de TIS11b dans les cellules BAC en culture en réponse à l'ACTH.**

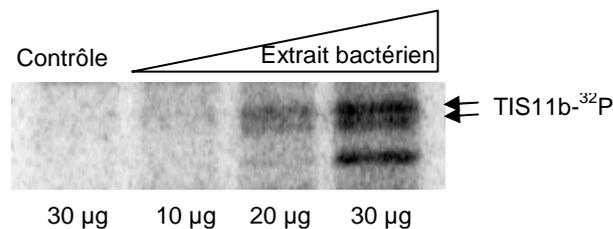
Les cellules BAC en culture sont stimulées par de l'ACTH en présence de <sup>32</sup>P-orthophosphate. Les cellules sont récupérées et lysées à différents temps. La protéine TIS11b est immuno-précipitée à partir des lysats cellulaires à l'aide d'anticorps spécifiques puis analysée par SDS-PAGE. La protéine marquée au <sup>32</sup>P-orthophosphate est révélée par autoradiographie (cf Matériel et méthodes 3.1, p. 201 et 3.6, p. 203).

Notre équipe a montré précédemment que l'ACTH induit l'expression de TIS11b dans des cellules BAC en culture (Chinn *et coll.*, 2002). L'induction des ARNm de TIS11b est transitoire avec un pic d'expression autour de 5-6 h après le début du traitement par l'ACTH. Nous avons donc choisi d'évaluer la phosphorylation de TIS11b à des temps courts, i.e. inférieurs à 4 h, afin de s'affranchir de l'augmentation de la quantité de protéine TIS11b et d'observer uniquement sa phosphorylation. Les résultats obtenus montrent que la phosphorylation de la protéine TIS11b est augmentée en réponse à une stimulation par l'ACTH (figure 14) et ceci dès 1 h, temps auquel la quantité de protéine synthétisée est constante (données non montrées). Par ailleurs, nous avons également observé que cette phosphorylation était inhibée en présence de H89, un inhibiteur de la PKA (données non montrées). Ces observations nous ont donc conduit à tester si la protéine TIS11b pouvait être phosphorylée directement par la PKA in vitro.

## 2.2. Phosphorylation de TIS11b par la PKA in vitro

La protéine de fusion GST-TIS11b recombinante a été exprimée dans des bactéries *E. coli* (Ciais *et coll.*, 2004), puis sa phosphorylation in vitro a été effectuée dans le lysat bactérien, en présence de la sous unité catalytique de la PKA (figure 15).

Phosphorylation in vitro par la PKA



**Figure 15 : Phosphorylation de TIS11b par la PKA in vitro.**

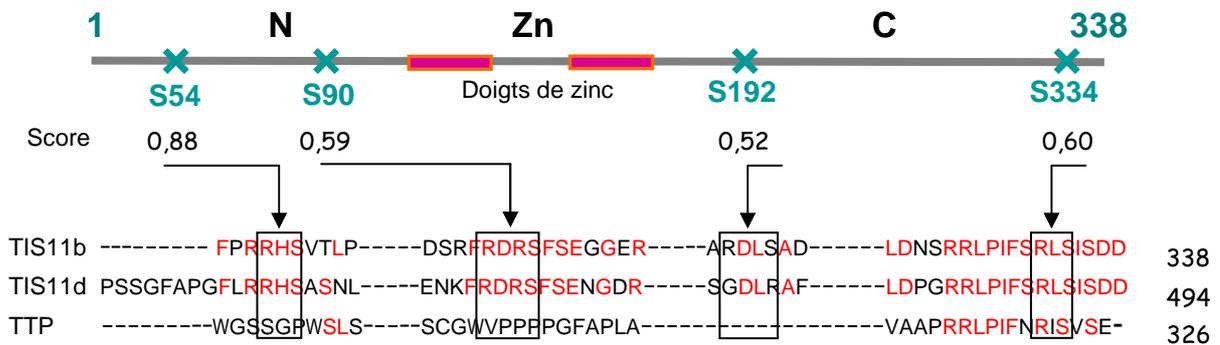
La protéine TIS11b a été clonée dans un plasmide d'expression procaryotique (pGEX) et exprimée dans des bactéries *E. coli*. Ces dernières ont été lysées et l'extrait bactérien a été incubé, à différentes concentrations, en présence de la sous unité catalytique de la PKA, et de gamma<sup>32</sup>P[ATP]. La protéine TIS11b a été isolée par immuno-précipitation au moyen d'un anticorps spécifique et analysée par SDS-PAGE, puis révélée par autoradiographie (cf Matériel et méthodes 3.2, p. 202 et 3.6, p. 203).

Nos résultats montrent pour la première fois, que la protéine TIS11b est phosphorylée par la PKA in vitro (figure 15). La protéine TIS11b a déjà été décrite comme étant une protéine phosphorylée par d'autres kinases, et notamment par la protéine kinase B (PKB), sur les sites 92 et 203 situés respectivement dans les régions N-terminale et C-terminale de la protéine (Schmidlin *et coll.*, 2004; Benjamin D *et coll.*, 2006). Afin de préciser les sites potentiels de phosphorylation de TIS11b par la PKA, nous avons effectué des analyses bio-informatiques de sa séquence ([http:// www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/](http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/)).

## 2.3. Identification des sites potentiels de phosphorylation par la PKA in silico

Dans cette étude, nous avons utilisé les sites internet d'analyse de phosphorylation des protéines « NetPhosK 1.0 et 2.0 ». Ces moteurs d'analyse prédisent, en fonction des sites consensus référencés pour chaque kinase, les sites potentiels de phosphorylation sérine ou

thréonine d'une protéine, et leur attribuent un score de probabilité de phosphorylation par cette kinase (figure 16).

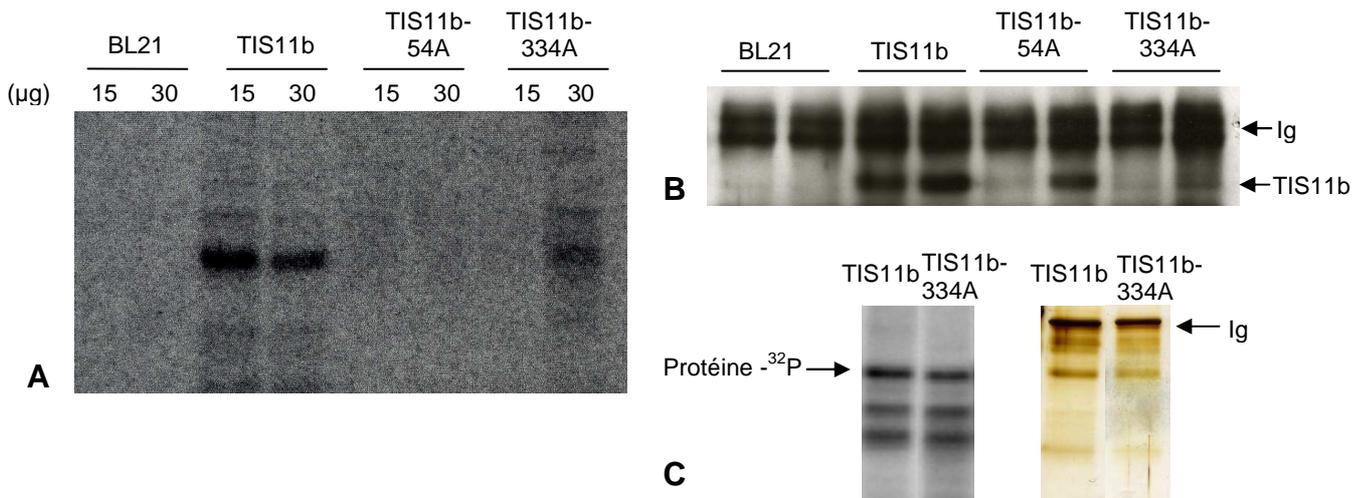


**Figure 16** : Détermination des sites potentiels de phosphorylation de TIS11b par la PKA par analyse bio-informatique utilisant le moteur NetPhosK 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosK/>).

Dans notre cas, quatre sérines ont été identifiées comme étant potentiellement phosphorylables par la PKA, mais aucune thréonine. Ces sérines sont situées dans des séquences consensus de phosphorylation par la PKA : RXS et RXXS. Les deux versions de ce moteur d'analyse 1.0 et 2.0 ont donné des résultats relativement proches. Dans les 2 cas, les sérines 54 et 334 semblent être les sites de phosphorylation les plus probables, avec la sérine 54 en tête dans la version 1.0 (figure 16) et la sérine 334 dans la version 2.0. La sérine 192 présente le score le moins élevé. Afin de déterminer laquelle/lesquelles de ces sérines est/sont impliquée(s) dans la phosphorylation de TIS11b par la PKA et éventuellement dans la régulation de son activité déstabilisatrice des ARNm, nous avons réalisé la construction de différents mutants de la protéine TIS11b par substitution des sérines 54 ou 334 en alanines, bloquant ainsi leur phosphorylation. Ces mutants appelés TIS11b-54A et TIS11b-334A respectivement, ont été réalisés par mutagenèse dirigée (cf Matériel et méthodes 3.4, p. 202).

#### 2.4. Phosphorylation in vitro des protéines TIS11b mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A par la PKA

Ces protéines TIS11b mutantes ont été exprimées dans des bactéries *E. coli* BL21. La phosphorylation de ces mutants in vitro par la PKA a été évaluée dans les lysats bactériens (figure 17).



**Figure 17 : Phosphorylation in vitro des protéines TIS11b mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A par la PKA.**

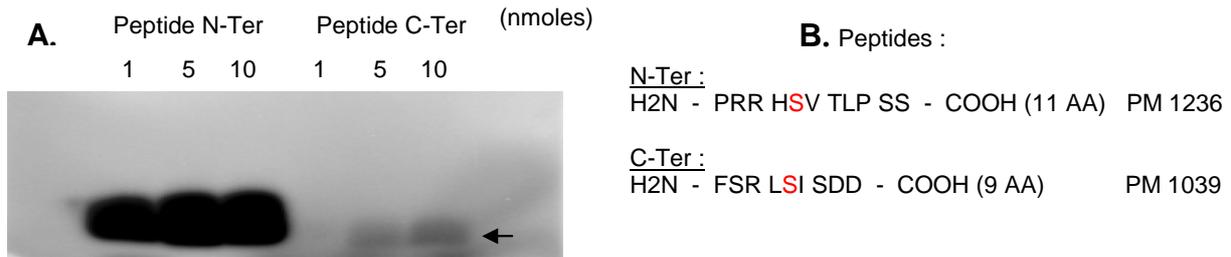
A) La protéine TIS11b et les mutants TIS11b-54A et TIS11b-334A ont été exprimés dans des bactéries BL21. Ces dernières ont été lysées et l'extrait bactérien a été incubé à différentes concentrations en présence de la sous unité catalytique de la PKA et de  $\gamma$ -<sup>32</sup>P[ATP]. Les protéines TIS11b, TIS11b-54A et TIS11b-334A ont été isolées par immuno-précipitation et analysées par SDS-PAGE. Les protéines marquées au  $\gamma$ -<sup>32</sup>P[ATP] ont été révélées par autoradiographie (cf Matériel et méthodes 3.2, p. 202 et 3.6, p. 203). B) Ce gel d'électrophorèse a également été transféré sur membrane et analysé par Western blot (cf Matériel et méthodes 3.9, p. 205). C) Les protéines TIS11b et TIS11b-334A ont été phosphorylées in vitro par la PKA et analysées par SDS-PAGE et autoradiographie puis coloration du gel correspondant à l'argent (cf Matériel et méthodes 3.2, p. 202 et 3.6, p. 203)

Ces résultats montrent que la présence d'une alanine en position 54 au lieu d'une sérine semble inhiber de manière importante la phosphorylation de TIS11b alors que celle en 334 ne semble pas diminuer cette phosphorylation. Ces données désigneraient donc la sérine 54 comme le site prépondérant de la phosphorylation de TIS11b par la PKA.

On peut également remarquer pour la protéine TIS11b non mutée que le signal de phosphorylation n'augmente pas avec la quantité de protéines utilisées dans ces conditions, suggérant des conditions saturantes pour l'enzyme ou la présence d'un inhibiteur dans le lysat.

## 2.5. Détermination du site de phosphorylation par la réalisation d'une carte peptidique

Afin de confirmer les résultats obtenus, nous avons testé la phosphorylation par la PKA in vitro de peptides relativement courts entourant les sérines 54 ou 334, faisant 11 et 9 acides aminés respectivement (figure 18A et 18B).



**Figure 18 : Phosphorylation in vitro des peptides N-Ter et C-Ter par la PKA.**

Aes peptides N-Ter et C-Ter, comportant respectivement 11 acides aminés dont la sérine 54 (en rouge) et 9 acides aminés dont la sérine 334 (en rouge), ont été incubés in vitro, à plusieurs concentrations 1, 5 et 10 nmol, en présence de la sous unité catalytique de la PKA et de gamma<sup>32</sup>P[ATP]. Les peptides ont été analysés par SDS-PAGE puis révélés par autoradiographie (cf Matériel et méthodes 3.2, p. 202 et 3.6, p. 203). B). Séquences des peptides utilisés, longueur en acides aminés (AA) et poids moléculaire (PM) en dalton.

La phosphorylation in vitro de ces deux peptides a montré que la sérine 54 était phosphorylée par la PKA, alors que le signal obtenu pour le peptide comportant la sérine 334 est très faible. Ces deux peptides ne sont pas tout à fait de la même taille, néanmoins, un nombre d'acides aminés minimum et identique a été respecté en amont des deux sérines cibles afin de ne pas perturber la reconnaissance par l'enzyme. Les résultats obtenus sont en accord avec ceux obtenus pour les protéines mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A et ont ainsi confirmé que le site de phosphorylation prépondérant de TIS11b par la PKA in vitro est la sérine 54 située dans la région N-terminale de la protéine.

Enfin, nous souhaitons déterminer si cette sérine phosphorylée in vitro correspond également au site de phosphorylation par la PKA en réponse à une stimulation par l'ACTH dans des cellules corticosurréaliennes en culture. Pour cela, nous projetons d'effectuer en parallèle une carte peptidique des deux peptides précédemment utilisés (figure 18B) et une carte peptidique de la protéine TIS11b immunoprécipitée à partir de cellules BAC en culture, stimulées par l'ACTH en présence de <sup>32</sup>P-orthophosphate. La comparaison de ces deux cartes peptidiques devrait permettre de répondre à cette question.

Afin de définir le rôle des différents domaines de TIS11b et des phosphorylations dans son activité déstabilisatrice de l'ARNm du VEGF, différents mutants de délétion de la protéine TIS11b ont été réalisés en supprimant la région C-terminale (TIS11b-NZn), la région N-terminale (TIS11b-ZnC) ou les deux (TIS11b-Zn). Ces protéines tronquées ainsi que TIS11b mutée en positions 54 ou 334 ont été utilisées dans des tests de transfection en présence d'un plasmide codant pour le gène de la luciférase clonée en amont de la région 3'-UTR du VEGF (Luc-3'UTR).

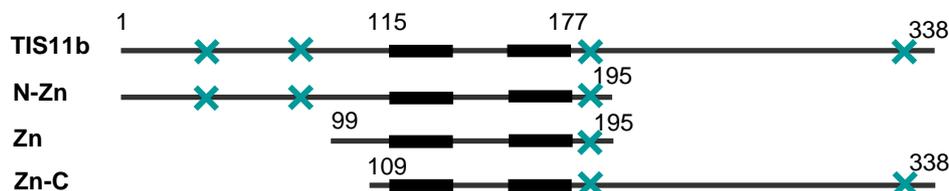
## 2.6. Effet des protéines TIS11b tronquées sur la stabilité de l'ARNm du VEGF

### 2.6.1. Construction des protéines TIS11b tronquées

La protéine TIS11b peut être subdivisée en 3 domaines : le domaine N-terminal, la structure à deux doigts de zinc et le domaine C-terminal. Toutes les protéines tronquées réalisées comportent le domaine à deux doigts de zinc (acides aminés 115 à 177), indispensable à l'activité de TIS11b. En effet, les doigts de zinc sont responsables de la liaison à l'ARNm et leur intégrité est nécessaire à l'activité déstabilisatrice des ARNm (Lai *et coll.*, 2002). Néanmoins, les doigts de zinc seuls ne sont pas suffisants pour induire la déstabilisation de l'ARNm du TNF-alpha. En effet, la troncation de la région N-terminale comme celle de la région C-terminale entraîne une diminution de l'activité de TTP (Rigby *et coll.*, 2005). Ces deux domaines activent la dégradation des ARNm. Nous avons donc préservé soit la partie N terminale de TIS11b associée au domaine à deux doigts de zinc (**TIS11b-NZn<sub>(1-195)</sub>**), soit la partie C terminale de TIS11b associée au domaine à deux doigts de zinc (**TIS11b-ZnC<sub>(109-339)</sub>**), soit uniquement le domaine à deux doigts de zinc (**TIS11b-Zn<sub>(99-195)</sub>**) (figure 19). De cette manière, la protéine tronquée TIS11b-NZn comporte les sites de phosphorylation potentiels par la PKA, localisés au niveau des sérines 54, 90 et 192. La partie C-terminale comporte les sites potentiels au niveau des sérines 192 et 334 (figure 19).

```

1  mtttlvsati fdlsevlckg nkmlnysaps  aggclldrka  vgtpagggfp  rrhsvtlpss
61  kfhqnqllss lkgepapals srdsrfrdrs  fseggerllp  tqkqpgggqv  nssryktelc
121 rpfeengack ygdkcqfahg ihelrsltrh  pkykotelcrt fhtigfcpyg prchfihnae
181 erralagard lsadrprlqh sfsfagfpsa  aataaatgll  dsptsitppp  ilsaddllgs
241 ptlpdgtntp fafssqelas lfapsmgllp  ggspttflfr  pmsesphmfd  sppspqdsls
301 dqegylssss sshsgsdspt  ldnsrrlpif  srlsisdd
    
```

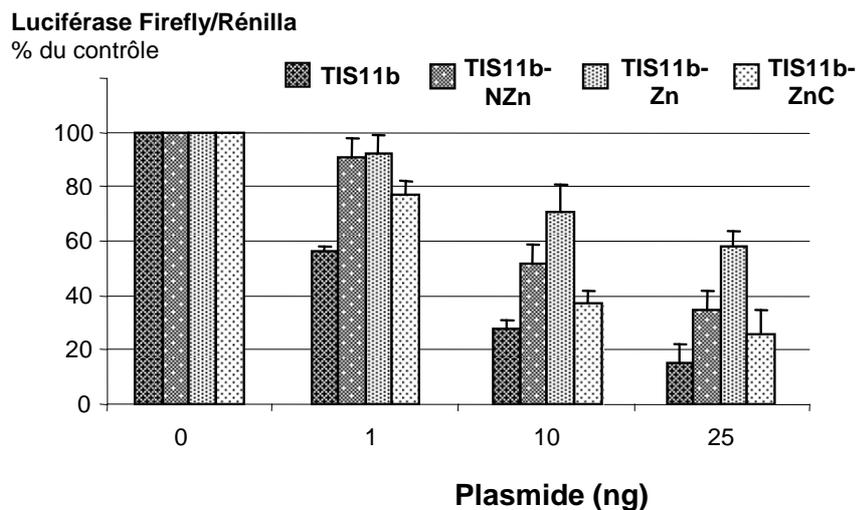


**Figure 19 : Séquence de la protéine TIS11b et construction des protéines TIS11b tronquées.**

La même technique a été utilisée pour ces trois constructions. Les fragments d'intérêt ont été amplifiés par PCR à partir du plasmide codant pour la protéine humaine totale. Par l'intermédiaire des amorces utilisées, ont été ajouté : soit un codon stop pour TIS11b-NZn (la séquence comporte le codon ATG de la protéine totale), soit un codon ATG et un codon stop pour TIS11b-Zn, soit un codon ATG pour TIS11b-ZnC (la séquence comporte le codon stop de la protéine totale) (cf Matériel et méthodes 3.4, p. 202). Les croix bleues correspondent aux sites potentiels de phosphorylation par la PKA (54, 90, 192 et 334).

## 2.6.2. Effet des protéines TIS11b tronquées sur la stabilité de l'ARNm du VEGF

Ces différentes constructions ont permis de déterminer la partie minimale active de TIS11b. Pour cela, les séquences de protéines tronquées TIS11b-NZn, TIS11b-Zn et TIS11b-ZnC ont été clonées dans un plasmide d'expression eucaryotique, pTarget (cf Matériel et méthodes 3.4, p. 202). Les plasmides codant pour les protéines TIS11b totale ou tronquées ont été co-transfectés dans des cellules COS7 avec le plasmide Luc-3'UTR. Un troisième plasmide codant pour le gène luciférase Rénilla sert de contrôle interne de transfection. Les cellules COS7 ont été choisies en raison de leur taux basal d'expression de TIS11b quasiment indétectable. L'activité luciférase Firefly a été mesurée et rapportée à l'activité luciférase Rénilla. Ce rapport reflète la stabilité de l'ARNm du VEGF (figure 20).



**Figure 20 : TIS11b totale diminue l'activité luciférase de manière plus importante que les protéines tronquées.**

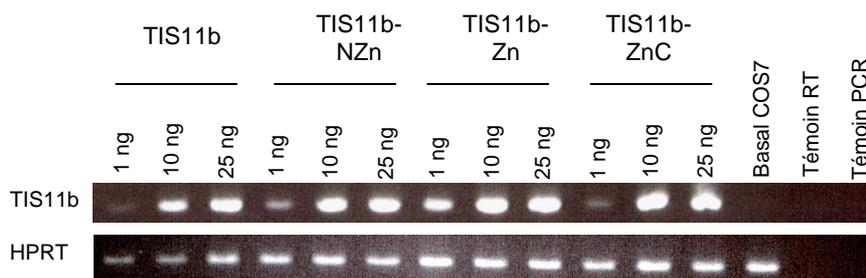
Des cellules COS7 ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour le gène luciférase cloné en amont de la région 3'UTR du VEGF et 1, 10 ou 25 ng de plasmides codant pour TIS11b totale ou tronquée TIS11b-NZn, TIS11b-Zn ou TIS11b-ZnC. L'activité luciférase Firefly a été mesurée et rapportée à l'activité luciférase Rénilla (cf Matériel et méthodes 3.7, p. 204).

La protéine totale montre une activité déstabilisatrice plus importante que les protéines tronquées à faible dose (1 ng). A des doses plus importantes (10 et 25 ng), la protéine tronquée TIS11b-ZnC montre également une activité déstabilisatrice importante bien que

légèrement inférieure à celle de TIS11b totale. Les protéines tronquées TIS11b-NZn et TIS11b-Zn montrent des activités déstabilisatrices très inférieures à celle de la protéine totale dans ce test quelque soit la dose. Des résultats similaires ont été mis en évidence lors de l'utilisation de fibroblastes 3T3.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que des tronctions similaires de la protéine TTP ont été réalisées (Lykke-Andersen et Wagner, 2005; Rigby *et coll.*, 2005). Ces différentes études, ont montré que de même que pour TIS11b, les doigts de zinc seuls montrent une activité déstabilisatrice très faible et que la délétion de la région N-terminale (TTP<sub>100-326</sub>) comme de la région C-terminale (TTP<sub>1-174</sub>) induit une déstabilisation de l'ARNm de la bêta-globine moins efficace que celle de la protéine totale (Lykke-Andersen et Wagner, 2005). Néanmoins, contrairement à TIS11b, la région N-terminale de TTP associée aux doigts de zinc semble plus efficace que la région C-terminale associée aux doigts de zinc. De manière intéressante, il a été décrit que le signal d'export nucléaire NES est localisé dans la partie N-terminale de TTP alors qu'il est situé dans la partie C-terminale de TIS11b et TIS11d (Murata *et coll.*, 2002; Phillips RS *et coll.*, 2002). La localisation subcellulaire de ces différentes protéines tronquées est peut-être en partie responsable de cette différence d'activité. Par ailleurs, il se pourrait que d'autres sites consensus ou fonctions de ces protéines dépendent de la partie N-terminale pour TTP et de la partie C-terminale pour TIS11b, ou inversement.

Afin de vérifier que l'activité déstabilisatrice observée était corrélée au niveau d'expression des protéines TIS11b tronquées, l'expression de ces protéines dans les cellules COS7 a été analysée par RT-PCR semi-quantitative (figure 21) et par Western blot (figure 22).

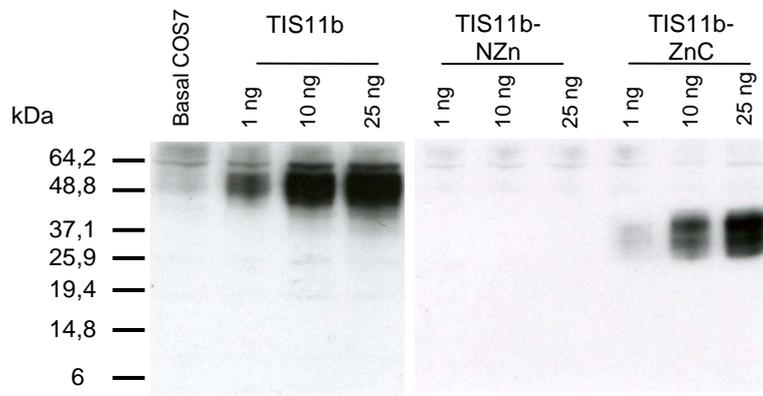


**Figure 21 : L'expression des protéines TIS11b totale ou tronquées est dépendante de la dose de plasmide transfectée et identique quelle que soit la construction.**

Les ARNm ont été purifiés à partir de duplicata des puits de culture cellulaire utilisés pour la lecture de l'activité luciférase. La quantité d'ADNc issus de ces ARNm a été normalisée par amplification par PCR du gène codant pour l'HPRT. L'amplification par PCR de TIS11b a été effectuée avec des amorces identiques pour toutes les protéines totale ou tronquées (hybridation à l'intérieur du domaine à deux doigts de zinc). La linéarité d'amplification a également été vérifiée pour le nombre de cycles d'amplification utilisés (cf Matériel et méthodes 3.8, p. 204).

Les résultats de RT-PCR semi-quantitative obtenus montrent une surexpression dépendante de la dose de plasmide transfectée des protéines totale et tronquées dans les cellules COS7. Aucune différence du taux d'expression n'a été observée dans ce test, confirmant que les différences d'activité déstabilisatrice observées pour les protéines TIS11b totale ou tronquées ne sont pas dues à des différences d'expression des constructions.

L'expression des protéines a également été testée par Western blot sur les mêmes échantillons. Les anticorps utilisés ont été générés à partir de peptides de la région N-terminale (acides aminés 49-63) ou C-terminale (acides aminés 296-308) de la protéine. Le domaine à deux doigts de zinc seul n'a donc pas pu être mis en évidence avec ces deux anticorps. Une surexpression dose-dépendante a été observée pour les protéines totale et TIS11b-ZnC (figure 22). L'expression de TIS11b-NZn n'a pas pu être détectée pour des raisons indéterminées, bien que les anticorps dirigés contre la région N-terminale reconnaissent la protéine totale. Différentes observations nous incitent à penser que la région N-terminale de TIS11b est impliquée dans la déstabilisation de la protéine. Néanmoins, la protéine tronquée TIS11b-NZn n'est pas détectée en Western blot quelque soit la quantité de plasmides transfectée alors qu'une activité significative est observée en luciférase (50 et 60 % d'inhibition pour 10 et 25 ng de plasmides, cf figure 20 p.195). Ce résultat serait donc principalement dû à un problème de détection de la protéine tronquée par l'anticorps.



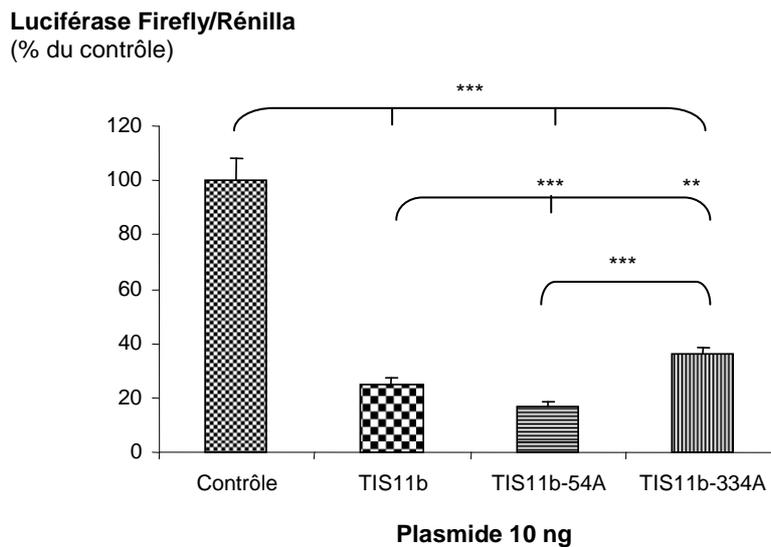
**Figure 22 : Mise en évidence d'une surexpression dose-dépendante de TIS11b totale et de TIS11b-ZnC par Western blot.**

10 µg de protéines ont été déposés pour chaque échantillon. La révélation des protéines a été effectuée avec un mélange 1 : 1 de deux anticorps, dirigés contre la région N-terminale et la région C-terminale respectivement (cf Matériel et méthodes 3.6, p. 203 et 3.9, p. 205).

N'ayant pas pu mettre en évidence la surexpression de protéines TIS11b-NZn et TIS11b-Zn, il nous est difficile de conclure sur l'activité déstabilisatrice réelle de ces deux protéines tronquées. Bien qu'aucune différence d'expression n'ait été observée en RT-PCR semi-quantitative, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse d'une différence de traduction des différentes constructions.

## 2.7. Effet des protéines mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A sur la stabilité de l'ARNm du VEGF des cellules COS7 en culture

De la même manière que pour les protéines tronquées, nous avons évalué l'activité déstabilisatrice des protéines TIS11b mutées TIS11b-54A et 334A. Ces différentes constructions ont été co-transfectées avec le plasmide Luc-3'UTR (figure 23).



**Figure 23 : Activité déstabilisatrice des protéines TIS11b mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A dans les cellules COS7.**

Des cellules COS7 ont été co-transfectées avec le plasmide Luc-3'UTR et 10 ng de plasmides codant pour TIS11b ou les mutants TIS11b-54A ou TIS11b-334A. L'activité luciférase Firefly a été mesurée et rapportée à l'activité luciférase Rénilla (cf Matériel et méthodes 3.7, p. 204). ce graphique représente la moyenne  $\pm$  SEM de 3 expériences indépendantes réalisées en triplicata (\*\* =  $p < 0.01$  et \*\*\* =  $p < 0.001$ )

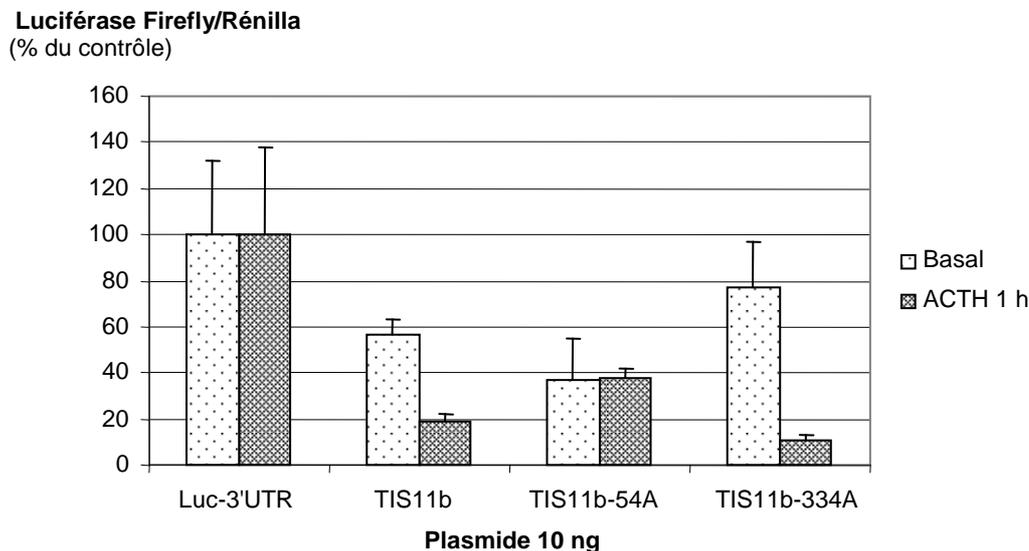
Dans les cellules COS7 en culture, les protéines TIS11b mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A montrent une activité significativement différente de celle de TIS11b sauvage sur la déstabilisation de l'ARNm du VEGF. En effet, la protéine TIS11b-54A, dont la mutation empêche la phosphorylation de la protéine sur ce site, montre une activité supérieure à celle de TIS11b sur la déstabilisation de l'ARNm du VEGF. Cette observation va dans le sens d'une phosphorylation de la sérine 54 inactivatrice de TIS11b et serait en accord avec une étude récente impliquant la MK2 dans la phosphorylation de ce site, ce qui n'est pas incompatible dans la mesure où le site consensus de la PKA (RRXS) est inclus dans le site consensus de MK2 (FXRRXS) (Maitra *et coll.*, 2008). Il a été décrit que la phosphorylation des membres de la famille TIS11 induit une inhibition de leur activité déstabilisatrice des ARNm (Johnson *et coll.*, 2002; Schmidlin *et coll.*, 2004). En ce qui concerne le site 334, la protéine TIS11b-334A montre une activité inférieure à celle de TIS11b non mutée. Ces

résultats suggèrent que la sérine 334 jouerait un rôle plutôt activateur de TIS11b dans la déstabilisation de l'ARNm du VEGF.

Par ailleurs, les différences observées, bien que significatives, ne sont pas très marquées. Les cellules COS7 avaient été choisies car elles expriment très peu de TIS11b, ce qui nous permettait de nous affranchir de l'effet de la protéine endogène. Cependant, les cellules COS7 sont issues du rein de singe et ne se prêtent pas à l'étude de la réponse à une stimulation hormonale comme l'ACTH. Nous avons donc décidé d'évaluer l'activité de ces protéines mutées dans des cellules BAC en culture.

## 2.8. Effet des protéines mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A sur la stabilité de l'ARNm du VEGF dans les cellules BAC en culture

Les plasmides codant pour la protéine TIS11b et les protéines mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A ont été co-transfectés avec un plasmide codant pour le gène de la luciférase cloné en amont de la région 3'UTR de l'ARNm du VEGF dans des cellules BAC en culture. Au terme de la période de transfection, les cellules ont été stimulées ou non par l'ACTH pendant 1 h. De la même manière que précédemment (cf figure 20, p. 195), l'activité luciférase a été mesurée et reflète la stabilité de l'ARNm du VEGF (figure 24).



**Figure 24 : Effet des protéines mutées TIS11b-54A et TIS11b-334A sur la stabilité de l'ARNm du VEGF dans les cellules BAC en réponse à l'ACTH.**

Cette expérience est représentative de trois expériences ayant donné des résultats similaires. Des cellules BAC ont été co-transfectées avec le plasmide Luc-3'UTR et 10 ng de plasmide codant pour TIS11b ou les mutants TIS11b-54A ou TIS11b-334A. Ce même test a été réalisé à l'état basal et sous stimulation par de l'ACTH. L'activité luciférase Firefly a été mesurée et rapportée à l'activité luciférase Rénilla (cf Matériel et méthodes 3.7, p. 204).

Ces résultats montrent que la stimulation des cellules BAC par l'ACTH pendant 1 h, temps au cours duquel l'hormone stabilise l'ARNm du VEGF endogène (Cherradi *et coll.*, 2006), n'a pas d'effet significatif sur l'activité luciférase du transcrit Luc-3'UTR en absence de protéines TIS11b transfectées. Deux hypothèses pourraient expliquer ce résultat. D'une part, l'activité de la protéine HuR endogène peut être masquée par la surexpression du transcrit Luc-3'UTR. D'autre part, il est envisageable que le transcrit Luc-3'UTR ne reproduise pas complètement les propriétés de l'ARNm du VEGF endogène en réponse à l'ACTH.

Par ailleurs, à l'état basal, les activités déstabilisatrices de l'ARNm du VEGF observées pour TIS11b, TIS11b-54A et TIS11b-334A sont similaires, quoiqu'un peu plus marquées, à celles observées dans les cellules COS7 (activité de TIS11b-54A supérieure à celle de TIS11b elle-même supérieure à celle de TIS11b-334A) (figure 23). Cependant, dans des conditions de stimulation par l'ACTH, ces variations ne sont pas renforcées mais inversées. De manière étonnante, l'activité déstabilisatrice de la protéine TIS11b surexprimée est augmentée d'un facteur 3 après stimulation par l'ACTH, contredisant ainsi notre hypothèse de base. Celle-ci proposait la combinaison de l'activité stabilisatrice de HuR avec une inhibition de l'activité déstabilisatrice de TIS11b, pour expliquer la stabilisation de l'ARNm du VEGF induite par une stimulation des cellules par l'ACTH. Il se pourrait donc que la stabilisation de l'ARNm du VEGF dans la première phase de stimulation par l'ACTH, soit uniquement due à l'activité stabilisatrice de HuR, et qu'à ce stade la protéine TIS11b ne soit pas suffisamment abondante pour contrecarrer l'effet de HuR. De plus, l'activité déstabilisatrice de la protéine TIS11b-54A est identique quelles que soient les conditions, basale ou de stimulation par l'ACTH. En revanche, cette activité est supérieure à celle de TIS11b dans les conditions basales, et inférieure dans des conditions de stimulation. Ces résultats seraient compatibles avec une augmentation de l'activité déstabilisatrice de TIS11b en réponse à une stimulation par l'ACTH. Par ailleurs, lorsque l'on mute la sérine 334 l'activité déstabilisatrice de TIS11b-334A est presque complètement inhibée, alors qu'après stimulation par l'ACTH, elle est fortement augmentée. Ces résultats iraient plutôt dans le sens d'une régulation inhibitrice de l'activité de TIS11b par la sérine 334.

Nos résultats inattendus suggèrent que l'ACTH régule l'activité de TIS11b par des mécanismes complexes qu'il nous reste à identifier. De plus, il est indispensable de déterminer si les variations d'activité des protéines mutantes observées à l'état basal sont dues à une régulation de l'activité déstabilisatrice de TIS11b ou à des différences d'expression induites par les mutations. Il est également indispensable de confirmer ces variations sur l'ARNm du VEGF endogène. Par ailleurs, il serait également intéressant d'effectuer des co-immunoprécipitations d'ARNm avec les protéines mutantes, en présence ou absence de stimulation par l'ACTH, afin de déterminer si les mutations effectuées

modifient la liaison à l'ARNm ou l'association de TIS11b à des protéines ou des complexes de la machinerie de dégradation des ARNm.

**En conclusion**, ces résultats préliminaires ouvrent des perspectives intéressantes quant à la caractérisation des sites de phosphorylation de TIS11b par la PKA. Cette étude constitue la première démonstration de l'implication de la PKA dans la phosphorylation de TIS11b *in vitro* et dans les cellules intactes. La modulation de l'activité déstabilisatrice de TIS11b par phosphorylation semble être un mécanisme complexe, dépendant du contexte cellulaire et probablement de la durée de stimulation des cellules. Il apparaît néanmoins, que TIS11b comporterait un domaine d'activation et un domaine d'inhibition susceptibles d'être régulés en réponse à une stimulation par l'ACTH. Les différents résultats que nous avons obtenus *in vitro* et *in vivo* désignent la sérine 54 comme le site de phosphorylation prépondérant de la PKA. Par ailleurs, bien que l'activation de la PKA soit la voie majeure de transduction du signal de l'ACTH, nous ne pouvons exclure l'activation d'autres kinases parallèlement à la PKA qui pourraient phosphoryler TIS11b, notamment sur le site 334. Il serait donc intéressant d'examiner le rôle potentiel de ces kinases dans la régulation de l'activité de TIS11b par l'ACTH en utilisant des inhibiteurs spécifiques. De plus, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour conclure quant aux régulations activatrice et inhibitrice de l'activité déstabilisatrice de TIS11b via les sérines 54 et 334.

### 3. Matériel et méthodes

#### 3.1. Phosphorylation de TIS11b dans les cellules BAC en culture en réponse à l'ACTH.

Des cultures primaires de cellules BAC ont été réalisées selon le protocole décrit par Cherradi et coll. (Cherradi *et coll.*, 2006). Les cellules ont étéensemencées dans des boîtes de Pétri de 10 cm de diamètre à raison de  $3 \times 10^6$  cellules par boîte dans un milieu F12 contenant 10 % de sérum de cheval et 2,5 % de sérum de veau fœtal et incubées à 37°C, 5 % de CO<sub>2</sub> (jour 1 ou J1). Le milieu de culture est renouvelé à J2 puis remplacé par du milieu F12 seul à J4 afin de dépriver les cellules. Le cinquième jour, i.e. 24 h après déprivation, les cellules sont stimulées par l'ACTH (10 nM) en présence de <sup>32</sup>P-orthophosphate (1 mCi). Les cellules sont récupérées et lysées à différents temps (0, 1, 2, 3 et 5 h). La protéine TIS11b est immuno-précipitée à partir des lysats cellulaires à l'aide d'anticorps spécifiques puis analysée par SDS-PAGE. La protéine marquée au <sup>32</sup>P-orthophosphate est révélée par autoradiographie.

### 3.2. Phosphorylation de TIS11b par la PKA in vitro à partir d'extrait bactérien

La séquence de TIS11b a été clonée dans un plasmide d'expression procaryotique (pGEX ou pET15b) et exprimée dans des bactéries E. coli BL21. L'expression de la protéine a été induite par 0,1 mM de l'isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG), pendant 2 h à 37°. Ces bactéries ont été lysées dans du PBS contenant 0,1 mg/mL de lysozyme par 10 cycles de congélation/décongélation. L'extrait bactérien obtenu a été incubé en présence de la sous unité catalytique de la PKA (1 µg), de gamma<sup>32</sup>P[ATP] (10 µCi), de 0,2 mM d'ATP froid et de 15 mM de MgCl<sub>2</sub> dans du Tris-HCl 50 mM pH 7,4 pendant 20 min à 30°C, dans un volume final de 50µL. Les échantillons ont été complétés à 500 µL avec du tampon RIPA (Phosphate de sodium 10 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton 1 %, déoxycholate de Na 1 %, SDS 0,1 %, PMSF 1 mM, aprotinine 1 µg/mL et leupeptine 1 µg/mL). Dans un premier temps, les interactions non spécifiques ont été éliminées par pré-incubation des échantillons avec 30 µL de protéine A-agarose pendant 1 h à +4°C. Après centrifugation, le surnageant a été prélevé puis incubé pendant 2 h à +4°C en présence d'anticorps spécifiques de la protéine TIS11b, puis à nouveau centrifugé. Après plusieurs lavage du culot dans le tampon RIPA, les protéines ont été analysées par SDS-PAGE et révélées par autoradiographie.

### 3.3. Phosphorylation des peptides par la PKA in vitro.

Les peptides ont été phosphorylés de la même manière que précédemment (cf ci-dessus). Ils ont été analysés par SDS-PAGE et révélés par autoradiographie.

### 3.4. Construction des plasmides.

**Plasmides codant pour les protéines TIS11b tronquées.** Le plasmide pTarget-TIS11b a été décrit dans l'article ci-joint p. 135. La même technique a été utilisée pour les constructions des protéines 3 tronquées : TIS11b-NZn, TIS11b-Zn et TIS11b-ZnC. Les fragments d'intérêt ont été amplifiés par PCR à partir du plasmide codant pour la protéine humaine totale pTarget-TIS11b. Par l'intermédiaire des amorces utilisées, ont été ajouté : soit un codon stop pour TIS11b-NZn (la séquence comporte le codon ATG de la protéine totale, amorces : 5'-CCA GAC AGG AGA GGC TGC G-3' et 5'-G ACG GTC AGC GGA GAG TCA CC-3', fragment de 671 bases), soit un codon ATG et un codon stop pour TIS11b-Zn (amorces 5'- ATG CCC ACC CAG AAG CAG CCC-3' et 5'-G ACG GTC AGC GGA GAG

TCA CC-3', fragment de 292 bases), soit un codon ATG pour TIS11b-ZnC (la séquence comporte le codon stop de la protéine totale, amorces : 5'-AT GGT CAA CTC CAG CCG CTA-3' et 5'-TGC AGG GTA GGG GCT GGA G-3', fragment de 740 bases). Ces séquences amplifiées ont ensuite été insérées dans pTarget (plasmide d'expression eucaryotique) entre les « T overhangs ».

**Plasmides codant pour les protéines TIS11b mutées.** Les plasmides codant pour les protéines TIS11b mutées : TIS11b-54A et TIS11b-334A ont été réalisés par mutagenèse dirigée sur les plasmides pTarget-TIS11b et pET15b-Flag-TIS11b (plasmide décrit précédemment cf l'article ci-joint p. 135) en utilisant le kit QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), selon le protocole du fournisseur. Les amorces suivantes ont été utilisées : 5'-CCC TCG GAG GCA CGC AGT CAC CCT GCC CAG C-3' pour la mutation de la sérine 54 en alanine et 5'-GCC CAT CTT CAG CAG ACT TGC CAT CTC AGA TGA CTA AGC GGC-3' pour la mutation de la sérine 334 en alanine.

**Plasmide Luc-3'UTR.** L'origine de ce plasmide a été décrite dans l'article ci-joint p. 135.

### 3.5. Synthèse et purification des protéines TIS11b sauvage ou mutées.

Les séquences correspondantes à TIS11b ou aux protéines mutées ont été clonées dans un plasmide d'expression procaryotique pET15b (cf Construction des plasmides ci dessus). Ce plasmide comporte une étiquette FLAG en amont des séquences des protéines TIS11b sauvage, TIS11b-54A et TIS11b-334A permettant de purifier les protéines d'intérêt sur colonne, avec un gel d'affinité anti-FLAG (protocole de purification et de lyse bactérienne décrit dans l'article p. 138). La synthèse protéique est induite par de l'IPTG 0,1 mM 4 h à 30°C, dans des bactéries BL21 (DE3) codon+. Ces bactéries ont été choisies car cette souche utilise le promoteur T7 (« DE3 ») et est supplémentée en ARN de transfert (ARNt) dont l'absence est susceptible de restreindre la synthèse de protéines hétérologues (utilisation de la séquence humaine de TIS11b).

### 3.6. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide a été effectuée selon le protocole décrit par Laemmli (1970). Les protéines immuno-précipitées ou les peptides ont été traités et déposés sur un mini-gel dénaturant à 12 % (pour les protéines) ou 20 % (pour les peptides) de polyacrylamide. L'électrophorèse a été réalisée à 150 v pendant 1 h. Le gel a ensuite été

révélé par autoradiographie ou coloré à l'argent selon le protocole suivant : le gel a été fixé dans un mélange de méthanol (25 %) et d'acides acétique (7 %) sur la nuit, puis réhydraté, incubé 1 min avec du thiosulfate de sodium (0.02 %), rincé à l'eau, incubé 30 min dans du nitrate d'argent (12.5 mM) et révélé par un mélange de carbonate de potassium (35 g/L) avec du thiosulfate de sodium (1.25 ‰) et du formaldéhyde (0.3 ‰).

### **3.7. Co-transfection et mesure de l'activité « Dual Luciferase »**

1,5 x 10<sup>5</sup> cellules COS7 ou BAC ont étéensemencées dans des plaques 12 puits et cultivées dans du DMEM 4,5 g/L de glucose (CO7) ou du F12 (BAC) avec 10 % de sérum de veau foetal, 100 U/mL de pénicilline et 100 µg /mL de streptomycine. Après 24 h de culture, 1, 10 ou 25 ng de plasmides pTarget vide, pTarget-TIS11b, pTarget-TIS11b-NZn, pTarget-TIS11b-Zn, pTarget-TIS11b-ZnC ou 10 ng de pTarget-TIS11b-54A ou pTarget-TIS11b-334A ont été co-transfectés dans ces cellules avec 500 ng de plasmide codant pour le gène de la luciférase Firefly cloné en amont de la région 3'UTR du VEGF (Luc-3'UTR) et 25 ng de plasmide codant pour la luciférase Rénilla, avec de la Lipofectamine (Invitrogen) selon le protocole du fournisseur. Les cellules COS7 ont été lysées 24 h post-transfection. Les cellules BAC ont été stimulées (ACTH) ou non (basal), pendant 1 h par 10 nM d'ACTH après 48 h de transfection, puis ont été lysées. Les activités des luciférases Firefly et Rénilla ont été mesurées en utilisant le kit Dual-Luciferase reporter assay system (Proméga). La lecture est réalisée avec un luminomètre LUMAT LB 9507 (EGG-berthold, Bad, Wildbad, Germany). Les résultats sont exprimés en pourcentage du contrôle (pTarget vide) du rapport luciférase Firefly/Rénilla. Chaque condition a été réalisée en triplicata.

### **3.8. Purification des ARNm et Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) semi quantitative**

Les ARN totaux des cellules COS7 co-transfectées ont été purifiés avec le kit RNeasy Mini kit (QIAGEN) selon le protocole du fournisseur. Pour l'analyse semi-quantitative en RT-PCR de l'expression de TIS11b sauvage ou tronquée et de l'HPRT (hypoxantine phosphoribosyl transférase) a été réalisée. 1 µg d'ARN total a été rétro-transcrit avec l'enzyme ImProm-II Reverse transcriptase (Proméga) puis amplifié avec la Taq polymérase (QBiogen). Les amorces 5'-CGG AGC TGT GCC GCC CCT TTG-3' et 5'-GGG CAC GGC GCT CTT CAG CGT TGT-3', amplifient un fragment de 200 bases, interne à la région comportant les deux doigts de zinc et ont donc été utilisées pour l'amplification des différentes constructions

issues de TIS11b, selon le programme 94°C 5 min, 28 x (94°C 1 min, 63°C 1 min, 72°C 1 min) et 72°C 5 min pour compléter l'élongation. Les amorces 5'-GCC ATC ACA TTG AGC CCT CT-3' et 5'-TGC GAC CTT GAC CAT CTT TGG-3' ont été utilisées pour amplifier un fragment de 305 bases de l'HPRT selon le programme : 94°C 5 min, 30 x (94°C 1 min, 51°C 1 min, 72°C 1 min) et 72°C 5 min pour compléter l'élongation. Les ADNc utilisés pour l'amplification de TIS11b ont été normalisés avec l'HPRT. La linéarité d'amplification a également été vérifiée pour le nombre de cycles d'amplification utilisés. La quantification des signaux obtenus a été réalisée avec un FluorImager.

### **3.9. Western blot**

Les protéines issues des lysats de cellules COS7 co-transfectées ont également été analysées par SDS-PAGE et Western blot (protocole décrit dans l'article p. 136). Des anticorps spécifiques générés à partir de peptides issus des régions N- (acides aminés 49-63) ou C-terminale (acides aminés 296-308) de la protéine TIS11b ont été utilisés ensemble (1 : 1) pour révéler les différentes constructions.



## 4<sup>ème</sup> Partie :

Effet de la protéine tronquée  
TIS11b-ZnC, fusionnée à  
l'Opicalcine, sur l'ARNm du VEGF



## 1. Introduction

Au cours de l'étude de la protéine TIS11b et de son effet biologique sur des cellules en culture ou in vivo, les obstacles principaux et récurrents auxquels nous avons été confrontés, ont résidé d'une part dans la difficulté à obtenir des quantités suffisantes de protéines de fusion purifiées et d'autre part dans l'instabilité importante des protéines de fusion, une fois la purification terminée (Résultats, 1<sup>ère</sup> partie, p. 162). Ces problèmes ont été évoqués à plusieurs reprises dans la littérature pour la protéine TTP limitant ainsi les études effectuées avec la protéine purifiée (Mahtani *et coll.*, 2001; Blackshear *et coll.*, 2003; Cao *et coll.*, 2003). Lors de la détermination de la partie minimale active de TIS11b et des expériences qui ont suivi (Résultats, 3<sup>ème</sup> partie, p. 195), nous avons pu constater d'une part, que la protéine tronquée de la partie N-terminale, TIS11b-ZnC présentait une activité déstabilisatrice de l'ARNm du VEGF peu différente de celle de la protéine totale, et d'autre part, que TIS11b-ZnC montrait des rendements de purification et une stabilité après purification, très supérieurs à la protéine TIS11b totale, rendant son utilisation beaucoup moins fastidieuse. Parallèlement à l'étude des protéines de fusion Flag-Tat-, Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b une collaboration avec l'équipe de Michel De Waard, également implantée au CEA de Grenoble, a été engagée. Cette équipe travaille sur la Maurocalcine et l'Opicalcine, deux peptides issus du venin de scorpion et ayant la propriété de traverser les membranes. Ces peptides présenteraient les mêmes caractéristiques que la plupart des PTD. Ils seraient ainsi des « cargos » potentiels de protéines (Esteve *et coll.*, 2005). Dans ce contexte, Michel De Waard nous a proposé de tester l'un d'eux, l'Opicalcine, dans notre modèle de protéine de fusion avec TIS11b. Nous avons choisi de fusionner l'Opicalcine à la protéine TIS11b tronquée TIS11b-ZnC.

L'Opicalcine (OCa) est un peptide d'une trentaine d'acides aminés issu du venin de scorpion. L'Opicalcine n'est pas ou très peu documentée par rapport à la Maurocalcine. Néanmoins, elle montre une homologie de séquence de 88 % avec celle-ci et possède les mêmes propriétés (Boisseau *et coll.*, 2006). Ce peptide a la propriété de se lier au récepteur de la Ryanodine situé au niveau du réticulum endoplasmique des cellules du muscle squelettique et de potentialiser l'ouverture des canaux calciques. C'est la capacité de ce peptide à traverser les membranes pour atteindre sa cible qui a incité l'équipe de Michel De Waard à étudier ses propriétés de pénétration intracellulaire. Tout comme de nombreux PTD, ce peptide est internalisé très rapidement (quelques minutes), par un mécanisme différent de l'endocytose qui ne nécessite pas d'énergie (Esteve *et coll.*, 2005).

Malgré des études de non-toxicité convaincantes, nous avons souhaité modifier ce peptide afin qu'il perde sa capacité de liaison au récepteur de la Ryanodine sans altérer ses

propriétés de pénétration intracellulaire. L'arginine en position 24 aurait un rôle prépondérant dans la capacité de liaison de l'OCa au récepteur de la Ryanodine (Esteve *et coll.*, 2005), en revanche son remplacement par un autre acide aminé de structure proche (glutamine) n'influencerait pas sa capacité de pénétration intracellulaire (M. De Waard, communication personnelle). L'OCa mutée 24 R→Q (OCaQ) a donc été générée, puis la séquence de ce peptide muté a été fusionnée à celle de TIS11b-ZnC (TIS11b-ZnC-OCaQ). Des tests d'activité de la déstabilisation de l'ARNm du VEGF ont été réalisés de la même manière que précédemment (cf article ci-joint p. 126).

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Construction de la protéine de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ

Dans un premier temps, nous avons modifié l'Opicalcine (OCa) afin de s'affranchir de son effet biologique. Sur les conseils de M. De Waard, nous avons effectué de la mutagenèse dirigée sur la séquence codant pour l'OCa afin de remplacer l'arginine en position 24 par une glutamine, et modifier l'OCa en OCa mutée 24 R→Q (OCaQ). Dans un deuxième temps, cette séquence modifiée a été fusionnée à la séquence de la protéine TIS11b tronquée TIS11b-ZnC, afin de créer la protéine de fusion Flag-TIS11b-ZnC-OCaQ (ou TIS11b-ZnC-OCaQ) (cf Matériel et Méthodes 3.1 et 3.2, p. 215) (figure 25).

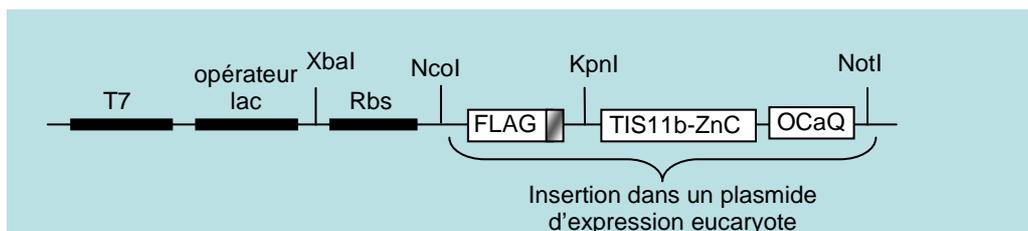


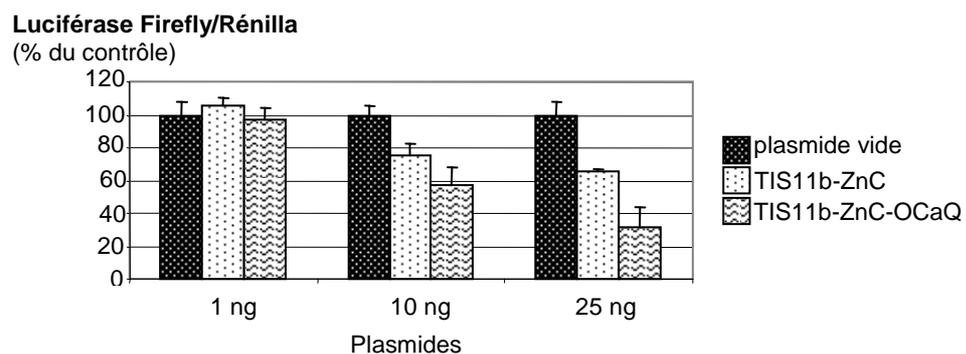
Figure 25 : Construction de la protéine de fusion Flag-TIS11b-ZnC-OCaQ.

De la même manière que précédemment (cf article ci-joint p. 135), la protéine de fusion Flag-TIS11b-ZnC-OCaQ a été clonée dans deux plasmides différents permettant son expression dans des cellules procaryotes, pour sa production et sa purification, et eucaryotes, pour tester son activité déstabilisatrice de l'ARNm du VEGF sur des cellules en culture. La séquence du peptide Flag a été rajoutée afin de permettre la purification de la protéine de

fusion TIS11b-ZnC-OCaQ sur une colonne comportant un gel d'affinité anti-Flag. On peut noter également que la séquence de la protéine tronquée TIS11b-ZnC a été rajoutée en amont du peptide OCaQ, alors que TIS11b totale avait été fusionnée en aval des PTD Tat, R7 et R9. Ce changement de position, a été décidé car l'OCa est un peptide normalement exprimé sous forme de pro-peptide et en constitue la région C-terminale. La présence d'une séquence en amont de l'Opicalcine n'empêche donc pas ses capacités de pénétration intracellulaire.

## 2.2. Effet de TIS11b-ZnC-OCaQ sur la stabilité de l'ARNm Luc-3'UTR du VEGF

Le clonage de la protéine de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ dans un plasmide d'expression eucaryote, nous a permis de vérifier que la présence de l'Opicalcine mutée en aval de la protéine tronquée TIS11b-ZnC n'avait pas d'influence sur l'activité luciférase via la région 3'UTR de l'ARNm du VEGF. Pour cela, nous avons co-transfecté, comme décrit précédemment (cf article ci-joint p. 126), le plasmide Luc-3'UTR avec un plasmide codant pour la protéine TIS11b-ZnC-OCaQ. L'activité déstabilisatrice de TIS11b-ZnC-OCaQ, évaluée par la mesure de l'activité luciférase, a été comparée à celle de TIS11b-ZnC (figure 26). Cette activité reflète la stabilité de l'ARNm du VEGF.



**Figure 26 : La protéine de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ diminue l'activité luciférase de manière dose-dépendante, et est plus efficace que la protéine TIS11b-ZnC.**

Des cellules Cos7 ont été co-transfectées avec un plasmide codant pour le gène luciférase cloné en amont de la région 3'UTR du VEGF et 1, 10 ou 25 ng de plasmides codant pour la protéine tronquée TIS11b-ZnC ou TIS11b-ZnC-OCaQ. L'activité luciférase Firefly a été mesurée et rapportée à l'activité luciférase Rénilla. Le protocole est décrit plus précisément dans le manuscrit ci-joint p. 136.

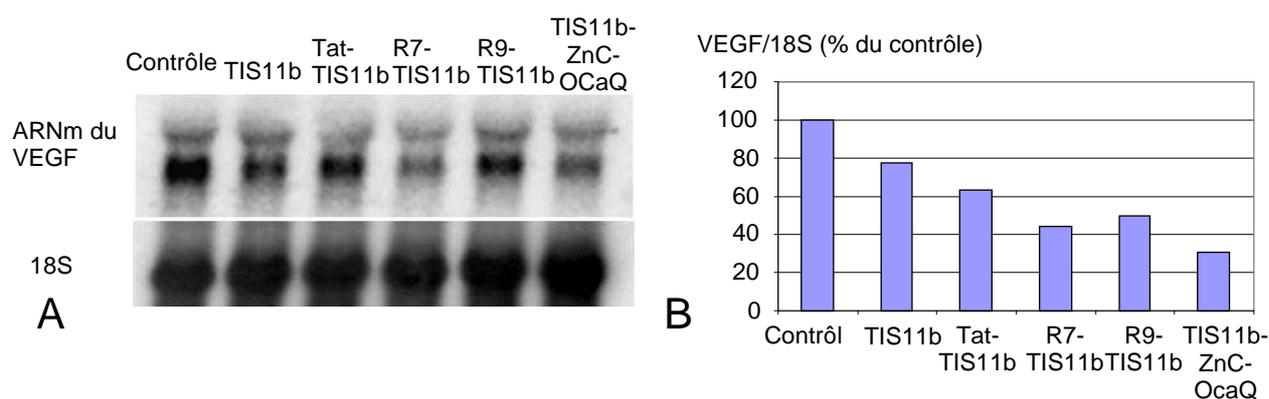
Les résultats montrent que la protéine tronquée TIS11b-ZnC-OCaQ est capable d'induire une diminution de l'activité luciférase et que cette diminution est dépendante de la dose de

plasmide co-transfectée. La fusion de l'OCaQ à TIS11b-ZnC n'empêche donc pas son activité de déstabilisation du transcrit Luc-3'UTR. Il apparaît également que la présence de l'OCaQ potentialise l'activité déstabilisatrice de TIS11b-ZnC. La protéine tronquée TIS11b-ZnC comporte les sites de localisation et d'export nucléaires lui permettant de naviguer entre le noyau et le cytoplasme (Phillips RS *et coll.*, 2002). Une explication possible de cet effet potentialisateur serait que l'Opicalcine, dont la cible est uniquement cytoplasmique (récepteur de la Ryanodine), favoriserait la localisation cytoplasmique de la protéine TIS11b-ZnC, où se déroule la déstabilisation des ARNm, augmentant ainsi l'activité de TIS11b-ZnC.

La protéine tronquée TIS11b-ZnC-OCaQ ayant montré une activité sur le transcrit Luc-3'UTR, nous avons évalué son activité sur l'ARNm du VEGF endogène après internalisation dans la cellule.

### 2.3. Effet de TIS11b-ZnC-OCaQ purifiée sur l'ARNm du VEGF endogène

Afin de vérifier que l'Opicalcine mutée était capable d'induire la pénétration de TIS11b-ZnC à l'intérieur de la cellule nous avons purifié puis testé la protéine de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ à une concentration de 100 nM sur des cellules COS7 en culture pendant 24 h. Les ARN de ces cellules ont été purifiés et analysés par Northern blot. L'activité de TIS11b-ZnC-OCaQ a été comparée à celle des autres protéines de fusion Tat-, R7- et R9-TIS11b totale sur le taux d'ARNm du VEGF endogène (figure 27).



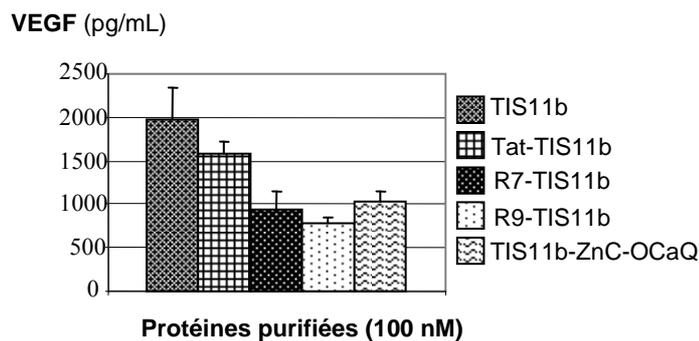
**Figure 27 : La protéine tronquée de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ induit une diminution du taux d'ARNm du VEGF plus marquée que les protéines de fusion comportant TIS11b totale.**

Les protéines de fusion purifiées TIS11b sans PTD, Tat-, R7-, R9-TIS11b ou TIS11b-ZnC-OCaQ ont été incubées à 100 nM avec des cellules COS7 pendant 24 h. A) Les ARN ont été purifiés puis analysés par Northern blot. Les sondes utilisées ciblent soit l'ARNm du VEGF endogène, soit l'ARN 18S, qui sert de référence (cf article ci-joint p. 138). B) Les signaux obtenus ont été quantifiés et sont reportés sur l'histogramme en pourcentage du contrôle (cf article ci-joint p. 142).

La figure 27 montre que la protéine tronquée de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ diminue le taux d'ARNm du VEGF endogène et que son activité est supérieure à celle des protéines de fusion Tat, R7- et R9-TIS11b. L'effet de TIS11b-ZnC-OCaQ purifiée sur l'ARNm du VEGF endogène est similaire à celui de la protéine TIS11b-ZnC-OCaQ surexprimée, sur le transcrite Luc-3'UTR (figure 26). Le mécanisme de cet effet potentialisateur de l'OCaQ sur l'activité déstabilisatrice de la protéine tronquée TIS11b-ZnC reste à élucider.

#### 2.4. Effet de TIS11b-ZnC-OCaQ purifiée sur l'expression de la protéine VEGF endogène.

L'activité de la protéine TIS11b-ZnC-OCaQ a également été évaluée sur l'expression de la protéine VEGF endogène par les cellules COS7 en culture (figure 28).



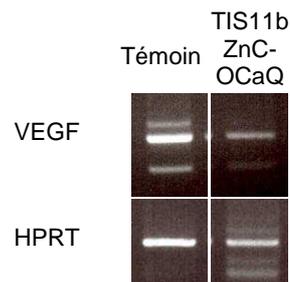
**Figure 28 : La protéine de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ induit une diminution de la protéine VEGF dans le milieu de culture.**

Les milieux de culture des cellules de l'expérience précédente (figure 27) ont été prélevés et la protéine VEGF a été dosée par la méthode ELISA (cf article ci-joint p. 137). Les moyennes de 3 puits ont été calculées et reportées sur le graphique.

Nos résultats montrent que la protéine tronquée TIS11b-ZnC-OCaQ induit une diminution de la production de protéine VEGF équivalente à celle des protéines de fusion R7- et R9-TIS11b totale. Ce résultat suggère que l'effet potentialisateur de l'OCaQ est plus marqué sur l'ARNm du VEGF que sur sa protéine.

## 2.5. Effet de TIS11b-ZnC-OCaQ sur l'expression du VEGF dans la glande corticosurrénalienne de souris

Afin d'évaluer l'activité de la protéine tronquée de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ in vivo nous avons injecté soit la protéine purifiée à 100 nM, soit du PBS, dans la glande surrénale d'une souris. 24 h après l'injection, la glande a été prélevée, et les ARN ont été purifiés puis analysés par RT-PCR (figure 29).



**Figure 29 : L'injection de la protéine de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ dans la glande surrénale induit une diminution de l'expression du VEGF après 24 h.**

100 nM de protéine tronquée de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ purifiée ont été injectés dans la glande corticosurrénalienne de souris. Les glandes surrénales témoins ont été injectées avec du tampon. Les glandes ont été prélevées 24 h après l'injection. Les ARN ont été purifiés et analysés par RT-PCR semi-quantitative, en amplifiant soit le VEGF, soit l'HPRT, qui permet de normaliser la quantité d'ADNc utilisée. Ce protocole est décrit plus précisément dans le manuscrit ci-joint p. 141.

De même que pour les protéines de fusion R7- et R9-TIS11b totale, l'injection dans la glande corticosurrénalienne de la protéine tronquée TIS11b-ZnC-OCaQ induit une diminution de l'expression du VEGF dans cet organe après 24 h (figure 29).

**En conclusion,** la protéine tronquée de fusion TIS11b-ZnC-OCaQ montre une activité de déstabilisation de l'ARNm du VEGF équivalente aux protéines de fusion R7- et R9-TIS11b totale, que ce soit en terme d'ARNm ou de protéine VEGF. Cet effet est observé après l'internalisation de TIS11b-ZnC-OCaQ purifiée dans des cellules COS7 en culture ainsi que dans la glande cortico-surrénalienne après injection de la protéine dans celle-ci. Dans la mesure où les rendements de purification et la stabilité de TIS11b-ZnC-OCaQ sont plus importants que ceux des protéines de fusion R7- et R9-TIS11b, TIS11b-ZnC-OCaQ est un

bon candidat pour des tests dans des modèles tumoraux, notamment dans des tests d'inhibition de croissance tumorale, par injection dans des tumeurs pré-établies.

### **3. Matériel et méthodes**

#### **3.1. Mutation de l'OCa en OCaQ :**

La mutation de l'Opicalcine en position 24, d'une arginine en glutamine, a été réalisée par mutagenèse dirigée en utilisant le kit QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis (Stratagene), selon le protocole du fournisseur. L'amorce suivante a été utilisée : 5'-TGT TGC AGC AAG AAA TGC AAA AGA CAA GGC ACG AAT CCA GAA A-3'. Le plasmide contenant la séquence de l'Opicalcine (sous forme de propeptide) nous a été fourni par M. De Waard.

#### **3.2. Construction de TIS11b-ZnC-OCaQ :**

La réalisation de la construction TIS11b-ZnC-OCaQ a été effectuée par la combinaison de plusieurs PCR. Tout d'abord, un fragment correspondant à la protéine tronquée ZnC a été amplifié avec des amorces sens comportant soit une séquence ATG (pour le clonage dans pTarget, plasmide d'expression eucaryotique, 5'-AT GGT CAA CTC CAG CCG CTA-3') soit pas de séquence ATG mais le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction KpnI (pour le clonage dans pET15b, plasmide d'expression procaryotique, 5'-GGTACC TCC AGC CGC TAC AAG ACG G-3') avec une amorce anti-sens correspondant à la fin de la séquence de TIS11b, supprimant le codon stop et ajoutant le début de la séquence de l'OCa (5'-AGA TGT GGC AAA CAA TCT CCG TCA TCT GAG ATG GAA AGT CTG CT-3'), selon le programme 94°C 5 min, 18 x (94°C 1 min, 65°C 1 min, 72°C 1 min) et 72°C 10 min pour compléter l'élongation. Cette PCR a été réalisée sur le plasmide pTarget-TIS11b dont l'origine a été décrite dans l'article ci-joint p. 135. Un deuxième fragment a été amplifié en utilisant une amorce sens calquée sur la séquence de l'amorce anti-sens précédente i.e. à la fin de la séquence de TIS11b, supprimant le codon stop et ajoutant le début de la séquence de l'OCa (5'- GAC TTT CCA TCT CAG ATG ACG GAG ATT GTT TGC CAC ATC TCA AGC -3'), avec une amorce anti-sens correspondant à la fin de la séquence de l'OCa avec son codon stop et le site de reconnaissance de l'enzyme de restriction NotI (5'- GCGCCGC TTA ACG GCA TCT CTT TTC TGG ATT -3', utilisée pour les deux plasmides d'expression), selon le programme 94°C 5 min, 20 x (94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min) et 72°C 5 min pour

compléter l'élongation. Une troisième PCR a été réalisée avec ces deux fragments, les amorces sens de la première PCR et l'amorce anti-sens de la deuxième, selon le programme 94°C 5 min, 25 x (94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min) et 72°C 10 min pour compléter l'élongation. Ces derniers fragments ont ensuite été insérés dans pTarget via les « T overhangs » ou dans pET15b, derrière la séquence Flag, entre les sites de restriction KpnI et NotI, en utilisant le plasmide pET15b-Flag-TIS11b dont la construction a été décrite dans l'article ci-joint p. 135.

# DISCUSSION ET CONCLUSION GENERALES



## Discussion et conclusion générales

Contrairement à TTP, le prototype des protéines de la famille TIS11, qui a été très étudié, peu de choses sont décrites à ce jour quant aux cibles physiologiques de TIS11b et à la régulation de son activité déstabilisatrice des ARNm. Notre laboratoire ayant démontré, pour la première fois le rôle de cette protéine dans la régulation de la stabilité de l'ARNm du VEGF en réponse à une stimulation par l'hormone hypophysaire ACTH (Chinn *et coll.*, 2002; Ciais *et coll.*, 2004; Cherradi *et coll.*, 2006), l'objectif de mon travail de thèse était de préciser les propriétés de TIS11b ainsi que d'évaluer la possibilité d'utiliser ses propriétés déstabilisatrices de l'ARNm du VEGF pour une thérapie anti-angiogène et anti-tumorale.

Ces différents travaux m'ont permis d'une part, de caractériser la fonction de la protéine TIS11b dans des cellules en culture, ainsi qu'*in vivo* dans un organe ou une tumeur pré-établie, et d'autre part, d'étudier la régulation de cette fonction avec la détermination de sa partie minimale active et l'étude de sa phosphorylation. L'étape limitante pour toutes ces études a été la difficulté à obtenir de la protéine de fusion purifiée en quantité suffisante et stable dans le temps.

Néanmoins, j'ai pu montrer que les protéines de fusion Flag-Tat-, Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b étaient capables d'induire, à une concentration de 100 nM dans des cellules COS7 en culture, une déstabilisation de l'ARNm du VEGF en corrélation avec une diminution de la production de protéine VEGF par ces cellules. Dans ces études, la protéine de fusion Flag-Tat-TIS11b s'est montré moins efficace que les protéines Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b, et ceci en dépit d'un pourcentage de cellules marquées plus élevé qu'avec les autres protéines Flag-PTD-TIS11b lors des tests d'internalisation. La capacité d'un PTD à internaliser une protéine qui lui est fusionnée ou de promouvoir son activité biologique, est fortement dépendante de la molécule transportée (Zavaglia *et coll.*, 2005). Un PTD ne peut pas être considéré comme un système universel d'internalisation de protéines et ses capacités d'internalisation ne suffisent pas à une activité biologique optimale. La faible activité de Flag-Tat-TIS11b est en effet, ici, indépendante de ses capacités d'internalisation, et pourrait être due à une localisation subcellulaire différente de celle des protéines de fusion comportant les PTD polyarginines.

Dans les études de détermination de la partie minimale active de TIS11b, j'ai montré que, bien que les deux régions N-terminale et C-terminale soient indispensables à une activité complète de TIS11b, comme cela avait été montré précédemment pour TTP (Rigby *et coll.*, 2005), la protéine tronquée TIS11b-ZnC est plus efficace que TIS11b-NZn dans la déstabilisation de l'ARNm du VEGF. De manière intéressante, l'inverse avait été décrit pour

TTP, avec la protéine tronquée TTP-NZn qui était la plus efficace dans ces études (Lai *et coll.*, 1999; Lykke-Andersen et Wagner, 2005; Rigby *et coll.*, 2005). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les protéines TTP et TIS11b comportent un NLS au niveau des deux doigts de zinc, mais un NES dans la région N-terminale pour TTP et C-terminale pour TIS11b, ce qui permettrait une localisation de TTP-NZn et TIS11b-ZnC dans le cytoplasme où a lieu la dégradation des ARNm. J'ai également montré que la protéine tronquée purifiée TIS11b-ZnC-OCaQ, est efficace dans la déstabilisation de l'ARNm du VEGF ainsi que dans la diminution de la production de la protéine VEGF, de manière équivalente aux protéines de fusion Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b, et ceci, bien que la protéine tronquée TIS11b-ZnC sans PTD soit moins efficace que la protéine totale TIS11b dans les tests de co-transfection. Comme pour la protéine de fusion Flag-Tat-TIS11b, ce phénomène est indépendant des capacités d'internalisation de l'Opicalcine puisque ce résultat est également observé dans les tests de co-transfection où la protéine de fusion est exprimée directement à l'intérieur de la cellule. Là encore, on peut évoquer l'hypothèse que l'activité de TIS11b totale ou tronquée TIS11b-ZnC soit favorisée par leur localisation subcellulaire, la cible de l'Opicalcine étant exclusivement cytoplasmique (Esteve *et coll.*, 2005). Par ailleurs, il se pourrait que ce soit la fusion à la partie C-terminale et non le fragment Opicalcine mutée qui soit à l'origine de la potentialisation des effets de la protéine tronquée. En effet, la fusion d'une séquence à la région C-terminale de TIS11b (et non N-terminale comme pour Tat, R7 et R9) pourrait être à l'origine d'une conformation tridimensionnelle favorisant l'activité de TIS11b.

Par ailleurs, j'ai également démontré que l'injection de ces protéines de fusion Flag-R7- ou Flag-R9-TIS11b dans une glande surrénale murine induit une diminution de la production de VEGF par la glande. De manière très intéressante, cette diminution était d'environ 50 % 24 h après l'injection et était maintenue après 48 h. De plus, la concentration de 100 nM utilisée pour obtenir ces effets est compatible avec une utilisation *in vivo* et renforce notre conviction que ces protéines de fusion sont de bons candidats pour des tests d'inhibition de croissance tumorale.

Les résultats obtenus dans les expériences *in vivo*, que ce soit avec les tumeurs surexprimant TIS11b ou avec les tumeurs pré-établies injectées avec des protéines de fusion, sont encourageants mais nécessitent des expériences supplémentaires.

Les cellules LL2-TIS11b ont montré un léger retard de croissance par rapport aux cellules LL2 qui doit être confirmé. Malgré ces résultats positifs, des tumeurs LL2-TIS11b échappent régulièrement à cette inhibition de croissance. Les tumeurs LL2-TIS11b qui présentent un ralentissement de croissance ainsi que celles qui échappent à ce ralentissement surexpriment toujours TIS11b, mais expriment un taux de VEGF, détecté par immunohistochimie sur des coupes des tumeurs, similaire à celui observé dans les tumeurs

LL2 (données non montrées) et ceci alors que les cellules LL2-TIS11b avant transplantation n'exprimaient pratiquement plus de VEGF. La restauration du taux d'expression du VEGF dans les tumeurs LL2-TIS11b n'est cependant pas incompatible avec le ralentissement de croissance tumorale observé dans ces tumeurs. En effet, une nouvelle sous-famille d'isoformes du VEGF, les isoformes xxxb, a été décrite (Woolard *et coll.*, 2004). Ces isoformes VEGFxxx seraient anti-angiogènes et exprimées dans les tissus normaux et les adénomes du colon, alors que la forme VEGFxxx serait exprimée majoritairement dans les carcinomes (Varey *et coll.*, 2008). Les anticorps et amorces de PCR utilisés pour détecter le VEGF dans nos tests ne discriminant pas les 2 isoformes, on pourrait expliquer l'expression du VEGF dans les tumeurs présentant un ralentissement de croissance tumorale par une expression de l'isoforme xxxb. Bien que la région 3'UTR de l'ARNm de ces deux sous familles d'isoformes, soit à priori identique au niveau des régions riches en AU et du TBE (TIS Binding element) et donc une cible de TIS11b, aucune étude n'a été réalisée à l'heure actuelle sur la région 3'UTR de ces isoformes xxxb et sa régulation par des protéines déstabilisatrices. Ces isoformes xxxb seraient notamment reconnues par le bevacizumab et constitueraient un des mécanismes de résistance aux traitements par cet anticorps.

L'injection régulière de protéine Flag-R7- ou Flag-R9-TIS11b par voie intra-tumorale (50 nM toutes les 24 h ou 75 nM toutes les 48 h) permet de maintenir la diminution de l'expression de VEGF par les tumeurs, et la croissance des tumeurs à l'intérieur de chaque groupe traité avec la protéine de fusion est relativement homogène et ne présente pas d'échappement au ralentissement de croissance. Bien que les différences de croissance tumorale avec le groupe témoin ne soient pas statistiquement significatives en raison des écart-types élevés de ce groupe, ces résultats sont très encourageants. De plus, il est possible que le type cellulaire choisi induise une minimisation des effets anti-VEGF et anti-angiogènes de la protéine TIS11b. En effet, des cellules dérivant des LL2 ont été récemment utilisées comme une lignée tumorale résistante aux traitements anti-VEGF spécifiquement (Shojaei *et coll.*, 2007). Il a été rapporté que la croissance de tumeurs dérivées d'une lignée de mélanome B16F1 ou de lymphome TIB6 est fortement inhibée par un traitement anti-VEGF alors que la croissance des tumeurs dérivées des LLC n'est inhibée que modestement et de façon transitoire. Il est envisageable que ces autres types cellulaires, moins sujets à induire des résistances anti-VEGF, permettraient de mettre en évidence un effet plus marqué de TIS11b. Une application pré-clinique intéressante consisterait en l'injection des protéines de fusion dans des tumeurs cortico-surréaliennes. En effet, les carcinomes surréaliens sont très fortement vascularisés. Une équipe de notre laboratoire étudie la carcinogenèse corticosurrénaliennne par implantation de cellules BAC modifiées sous la capsule rénale. L'injection de protéines de fusion dans la glande surrénale de souris ayant montré un effet

significatif sur l'expression de VEGF à 24 et 48 h, cette approche pourrait être évaluée dans ce modèle.

Par ailleurs, le mécanisme de résistance qui a été récemment décrit pour le bevacizumab implique le recrutement de cellules myéloïdes par la tumeur (Shojaei *et coll.*, 2007). Cette étude a montré que le mécanisme de résistance était dû à la sécrétion par les cellules myéloïdes recrutées, de facteurs pro-angiogènes différents du VEGF. Ces phénomènes de résistance pourraient être impliqués dans l'échappement de certaines tumeurs que nous avons générées à l'inhibition de croissance tumorale par TIS11b ou minimiser ses effets. Néanmoins, la protéine TIS11b est capable de déstabiliser diverses cytokines pro-inflammatoires dont certaines ont été décrites pour avoir un effet pro-angiogène, il serait donc intéressant d'évaluer si les niveaux d'expression de ces cytokines sont également régulés par TIS11b dans les tumeurs sensibles au traitement.

De plus, il a été décrit que le VEGF aurait un rôle intracrine sur la survie des cellules endothéliales (Lee S *et coll.*, 2007). A l'inverse du bevacizumab qui capture le VEGF extracellulaire les protéines Flag-PTD-TIS11b agissent à l'intérieur de la cellule sur l'ARNm du VEGF avant sa production. De ce fait, ces protéines peuvent également avoir un rôle sur la survie des cellules endothéliales. Cet effet serait combiné à l'effet anti-angiogène par inhibition de la stimulation de ces cellules endothéliales par voie paracrine. Ce double effet est possible dans notre modèle car d'une part, nous administrons les protéines de fusion par voie intra-tumorale, limitant les effets secondaires dans le reste de l'organisme, et d'autre part, les PTD s'internalisent dans tous les types cellulaires, i.e. à la fois dans les cellules tumorales et les cellules endothéliales.

A terme, une telle molécule nécessitera la mise en place d'une autre voie d'administration que la voie intra-tumorale, ainsi qu'un adressage spécifique dans la tumeur. Notamment, la possibilité d'utiliser le vecteur raft-RGD ciblant les intégrines  $\alpha\beta3$  des vaisseaux angiogéniques est envisagée. En effet, l'association de ce vecteur à la protéine TIS11b permettrait d'une part, de cibler les vaisseaux angiogènes tumoraux, via les intégrines  $\alpha\beta3$  et de favoriser l'effet inhibiteur de TIS11b sur la survie des cellules endothéliales en bloquant leur stimulation intracrine par le VEGF, et d'autre part, de bénéficier également de l'effet déstabilisateur des vaisseaux sanguins du motif RGD qui bloque les interactions cellules/cellules générées par les intégrines  $\alpha\beta3$  (Garanger *et coll.*, 2005). Au vu de nos résultats, il serait donc très intéressant de coupler la protéine tronquée TIS11b-ZnC-OCaQ, plus facile à produire, plus stable et ayant montré une efficacité similaire à la protéine totale dans l'inhibition de production du VEGF par la glande surrénalienne de souris, au Raft-RGD,

et d'évaluer l'efficacité de ce complexe dans un modèle expérimental de régression tumorale par voie systémique ou intra-péritonéale.



# BIBLIOGRAPHIE



- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ and Clarke MF.** (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (7): 3983-8.
- Albini A, Tosetti F, Benelli R and Noonan DM.** (2005). Tumor inflammatory angiogenesis and its chemoprevention. *Cancer Res.* 65: 10637-10641.
- Alitalo K, Tammela T and Petrova TV.** (2005). Lymphangiogenesis in development and human disease. *Nature.* 438 (7070): 946-53.
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J and Keshet E.** (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med.* 1 (10): 1024-8.
- Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Magner M and Isner JM.** (1999). Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res.* 85 (3): 221-8.
- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G and Isner JM.** (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 275 (5302): 964-7.
- Astriab-Fisher A, Sergueev D, Fisher M, Shaw BR and Juliano RL.** (2002). Conjugates of antisense oligonucleotides with the Tat and antennapedia cell-penetrating peptides: effects on cellular uptake, binding to target sequences, and biologic actions. *Pharm Res.* 19 (6): 744-54.
- Auguste P, Lemiere S, Larrieu-Lahargue F and Bikfalvi A.** (2005). Molecular mechanisms of tumor vascularization. *Crit Rev Oncol Hematol.* 54 (1): 53-61.
- Aumailley M, Gurrath M, Muller G, Calvete J, Timpl R and Kessler H.** (1991). Arg-Gly-Asp constrained within cyclic pentapeptides. Strong and selective inhibitors of cell adhesion to vitronectin and laminin fragment P1. *FEBS Lett.* 291 (1): 50-4.
- Baish JW and Jain RK.** (2000). Fractals and cancer. *Cancer Res.* 60 (14): 3683-8.
- Bakheet T, Frevel M, Williams BR, Greer W and Khabar KS.** (2001). ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res.* 29 (1): 246-54.
- Baldwin ME, Roufail S, Halford MM, Alitalo K, Stacker SA and Achen MG.** (2001). Multiple forms of mouse vascular endothelial growth factor-D are generated by RNA splicing and proteolysis. *J Biol Chem.* 276 (47): 44307-14.
- Bao S, Wu Q, Sathornsumetee S, Hao Y, Li Z, Hjelmeland AB, Shi Q, McLendon RE, Bigner DD and Rich JN.** (2006). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 66 (16): 7843-8.
- Barleon B, Sozzani S, Zhou D, Weich HA, Mantovani A and Marme D.** (1996). Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1. *Blood.* 87 (8): 3336-43.
- Barreau C, Paillard L and Osborne HB.** (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.* 33 (22): 7138-50.
- Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D and Harper SJ.** (2002). VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* 62 (14): 4123-31.
- Bell SE, Sanchez MJ, Spasic-Boskovic O, Santalucia T, Gambardella L, Burton GJ, Murphy JJ, Norton JD, Clark AR and Turner M.** (2006). The RNA binding protein Zfp3611 is required for normal vascularisation and post-transcriptionally regulates VEGF expression. *Dev Dyn.* 235 (11): 3144-55.
- Bellomo D, Headrick JP, Silins GU, Paterson CA, Thomas PS, Gartside M, Mould A, Cahill MM, Tonks ID, Grimmond SM, Townson S, Wells C, Little M, Cummings MC, Hayward NK and Kay GF.** (2000). Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ Res.* 86 (2): E29-35.
- Benjamin D, Schmidlin M, Min L, Gross B and Moroni C.** (2006). BRF1 protein turnover and mRNA decay activity are regulated by protein kinase B at the same phosphorylation sites. *Mol Cell Biol.* 26 (24): 9497-507.

- Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D and Keshet E.** (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest.* 103 (2): 159-65.
- Bergers G and Benjamin LE.** (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 3 (6): 401-10.
- Berra E, Benizri E, Ginouves A, Volmat V, Roux D and Pouyssegur J.** (2003). HIF prolyl-hydroxylase 2 is the key oxygen sensor setting low steady-state levels of HIF-1alpha in normoxia. *Embo J.* 22 (16): 4082-90.
- Bertram JS and Janik P.** (1980). Establishment of a cloned line of Lewis Lung Carcinoma cells adapted to cell culture. *Cancer Lett.* 11 (1): 63-73.
- Bigler SA, Deering RE and Brawer MK.** (1993). Comparison of microscopic vascularity in benign and malignant prostate tissue. *Hum Pathol.* 24 (2): 220-6.
- Binetruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B, Vassy R, Rouyre S, Kraemer M, Plouet J, Derbin C, Perret G and Mazie JC.** (2000). Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *Embo J.* 19 (7): 1525-33.
- Blackshear PJ.** (2002). Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochem Soc Trans.* 30 (Pt 6): 945-52.
- Blackshear PJ, Lai WS, Kennington EA, Brewer G, Wilson GM, Guan X and Zhou P.** (2003). Characteristics of the interaction of a synthetic human tristetraprolin tandem zinc finger peptide with AU-rich element-containing RNA substrates. *J Biol Chem.* 278 (22): 19947-55.
- Blaxall BC, Dwyer-Nield LD, Bauer AK, Bohlmeier TJ, Malkinson AM and Port JD.** (2000). Differential expression and localization of the mRNA binding proteins, AU-rich element mRNA binding protein (AUF1) and Hu antigen R (HuR), in neoplastic lung tissue. *Mol Carcinog.* 28 (2): 76-83.
- Boehm T, Folkman J, Browder T and O'Reilly MS.** (1997). Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature.* 390 (6658): 404-7.
- Boisseau S, Mabrouk K, Ram N, Garmy N, Collin V, Tadmouri A, Mikati M, Sabatier JM, Ronjat M, Fantini J and De Waard M.** (2006). Cell penetration properties of maurocalcine, a natural venom peptide active on the intracellular ryanodine receptor. *Biochim Biophys Acta.* 1758 (3): 308-19.
- Boockock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, Twentyman PR and Smith SK.** (1995). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 87 (7): 506-16.
- Brem S, Brem H, Folkman J, Finkelstein D and Patz A.** (1976). Prolonged tumor dormancy by prevention of neovascularization in the vitreous. *Cancer Res.* 36 (8): 2807-12.
- Brennan CM and Steitz JA.** (2001). HuR and mRNA stability. *Cell Mol Life Sci.* 58 (2): 266-77.
- Brewer BY, Malicka J, Blackshear PJ and Wilson GM.** (2004). RNA sequence elements required for high affinity binding by the zinc finger domain of tristetraprolin: conformational changes coupled to the bipartite nature of Au-rich MRNA-destabilizing motifs. *J Biol Chem.* 279 (27): 27870-7.
- Brewer G.** (1991). An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol.* 11 (5): 2460-6.
- Briata P, Ilengo C, Corte G, Moroni C, Rosenfeld MG, Chen CY and Gherzi R.** (2003). The Wnt/beta-catenin-->Pitx2 pathway controls the turnover of Pitx2 and other unstable mRNAs. *Mol Cell.* 12 (5): 1201-11.
- Bridges D and Moorhead GB.** (2004). 14-3-3 proteins: a number of functions for a numbered protein. *Sci STKE.* 2004 (242): re10.
- Brook M, Tchen CR, Santalucia T, McIlrath J, Arthur JS, Saklatvala J and Clark AR.** (2006). Posttranslational regulation of tristetraprolin subcellular localization and protein stability by p38 mitogen-activated protein kinase and extracellular signal-regulated kinase pathways. *Mol Cell Biol.* 26 (6): 2408-18.
- Brooks PC, Clark RA and Cheresh DA.** (1994). Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science.* 264 (5158): 569-71.

- Brooks SA, Connolly JE and Rigby WF.** (2004). The role of mRNA turnover in the regulation of tristetraprolin expression: evidence for an extracellular signal-regulated kinase-specific, AU-rich element-dependent, autoregulatory pathway. *J Immunol.* 172 (12): 7263-71.
- Browder T, Butterfield CE, Kraling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS and Folkman J.** (2000). Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res.* 60 (7): 1878-86.
- Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL and Schnitt SJ.** (1995). Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol.* 26 (1): 86-91.
- Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Dvorak HF and Senger DR.** (1993). Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am J Pathol.* 143 (5): 1255-62.
- Busse M, Schwarzburger M, Berger F, Hacker C and Munz B.** (2008). Strong induction of the Tis11B gene in myogenic differentiation. *Eur J Cell Biol.* 87 (1): 31-8.
- Cao H, Dzineku F and Blackshear PJ.** (2003). Expression and purification of recombinant tristetraprolin that can bind to tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA and serve as a substrate for mitogen-activated protein kinases. *Arch Biochem Biophys.* 412 (1): 106-20.
- Cao H and Lin R.** (2008). Phosphorylation of recombinant tristetraprolin in vitro. *Protein J.* 27 (3): 163-9.
- Carballo E, Cao H, Lai WS, Kennington EA, Campbell D and Blackshear PJ.** (2001). Decreased sensitivity of tristetraprolin-deficient cells to p38 inhibitors suggests the involvement of tristetraprolin in the p38 signaling pathway. *J Biol Chem.* 276 (45): 42580-7.
- Carballo E, Gilkeson GS and Blackshear PJ.** (1997). Bone marrow transplantation reproduces the tristetraprolin-deficiency syndrome in recombination activating gene-2 (-/-) mice. Evidence that monocyte/macrophage progenitors may be responsible for TNF $\alpha$  overproduction. *J Clin Invest.* 100 (5): 986-95.
- Carballo E, Lai WS and Blackshear PJ.** (1998). Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor- $\alpha$  production by tristetraprolin. *Science.* 281 (5379): 1001-5.
- Carballo E, Lai WS and Blackshear PJ.** (2000). Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood.* 95 (6): 1891-9.
- Carmeliet P.** (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nat Med.* 9 (6): 653-60.
- Carmeliet P and Collen D.** (1999). Role of vascular endothelial growth factor and vascular endothelial growth factor receptors in vascular development. *Curr Top Microbiol Immunol.* 237: 133-58.
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W and Nagy A.** (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature.* 380 (6573): 435-9.
- Carmeliet P and Jain RK.** (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature.* 407 (6801): 249-57.
- Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, Theilmeier G, Brusselmans K, Cornelissen I, Ehler E, Kakkar VV, Stalmans I, Mattot V, Perriard JC, Dewerchin M, Flameng W, Nagy A, Lupu F, Moons L, Collen D, D'Amore PA and Shima DT.** (1999). Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med.* 5 (5): 495-502.
- Carrick DM and Blackshear PJ.** (2007). Comparative expression of tristetraprolin (TTP) family member transcripts in normal human tissues and cancer cell lines. *Arch Biochem Biophys.* 462 (2): 278-85.
- Carrick DM, Lai WS and Blackshear PJ.** (2004). The tandem CCCH zinc finger protein tristetraprolin and its relevance to cytokine mRNA turnover and arthritis. *Arthritis Res Ther.* 6 (6): 248-64.
- Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G and Hanahan D.** (2005). Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors. *Cancer Cell.* 8: 299-309.

- Chan LW and Camphausen K.** (2003). Angiogenic tumor markers, antiangiogenic agents and radiation therapy. *Expert Rev Anticancer Ther.* 3 (3): 357-66.
- Chang YS, di Tomaso E, McDonald DM, Jones R, Jain RK and Munn LL.** (2000). Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97 (26): 14608-13.
- Charnock-Jones DS, Sharkey AM, Rajput-Williams J, Burch D, Schofield JP, Fountain SA, Boocock CA and Smith SK.** (1993). Identification and localization of alternately spliced mRNAs for vascular endothelial growth factor in human uterus and estrogen regulation in endometrial carcinoma cell lines. *Biol Reprod.* 48 (5): 1120-8.
- Chen CY, Gherzi R, Ong SE, Chan EL, Raijmakers R, Pruijn GJ, Stoecklin G, Moroni C, Mann M and Karin M.** (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell.* 107 (4): 451-64.
- Chen CY and Shyu AB.** (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.* 20 (11): 465-70.
- Cherradi N, Lejczak C, Desroches-Castan A and Feige JJ.** (2006). Antagonistic functions of tetradecanoyl phorbol acetate-inducible-sequence 11b and HuR in the hormonal regulation of vascular endothelial growth factor messenger ribonucleic acid stability by adrenocorticotropin. *Mol Endocrinol.* 20 (4): 916-30.
- Cherrington JM, Strawn LM and Shawver LK.** (2000). New paradigms for the treatment of cancer: the role of anti-angiogenesis agents. *Adv Cancer Res.* 79: 1-38.
- Cheung N, Wong MP, Yuen ST, Leung SY and Chung LP.** (1998). Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum Pathol.* 29 (9): 910-4.
- Chinn AM, Ciais D, Bailly S, Chambaz E, LaMarre J and Feige JJ.** (2002). Identification of two novel ACTH-responsive genes encoding manganese-dependent superoxide dismutase (SOD2) and the zinc finger protein TIS11b [tetradecanoyl phorbol acetate (TPA)-inducible sequence 11b]. *Mol Endocrinol.* 16 (6): 1417-27.
- Chrestensen CA, Schroeder MJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Pelo JW, Worthington MT and Sturgill TW.** (2004). MAPKAP kinase 2 phosphorylates tristetraprolin on in vivo sites including Ser178, a site required for 14-3-3 binding. *J Biol Chem.* 279 (11): 10176-84.
- Ciais D, Cherradi N, Bailly S, Grenier E, Berra E, Pouyssegur J, Lamarre J and Feige JJ.** (2004). Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. *Oncogene.* 23 (53): 8673-80.
- Claffey KP, Shih SC, Mullen A, Dziennis S, Cusick JL, Abrams KR, Lee SW and Detmar M.** (1998). Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell.* 9 (2): 469-81.
- Cleaver O and Melton DA.** (2003). Endothelial signaling during development. *Nat Med.* 9 (6): 661-8.
- Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ and Maxwell PH.** (2000). Hypoxia inducible factor- $\alpha$  binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *J Biol Chem.* 275 (33): 25733-41.
- Conn G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, Hope DA and Thomas KA.** (1990). Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87 (7): 2628-32.
- Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM and Feder J.** (1989). Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest.* 84 (5): 1470-8.
- Console S, Marty C, Garcia-Echeverria C, Schwendener R and Ballmer-Hofer K.** (2003). Antennapedia and HIV transactivator of transcription (TAT) "protein transduction domains" promote endocytosis of high molecular weight cargo upon binding to cell surface glycosaminoglycans. *J Biol Chem.* 278 (37): 35109-14.
- Coultas L, Chawengsaksophak K and Rossant J.** (2005). Endothelial cells and VEGF in vascular development. *Nature.* 438 (7070): 937-45.
- Cullinan-Bove K and Koos RD.** (1993). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology.* 133 (2): 829-37.

- Danen EH, Jansen KF, Van Kraats AA, Cornelissen IM, Ruiter DJ and Van Muijen GN.** (1995). Alpha v-integrins in human melanoma: gain of alpha v beta 3 and loss of alpha v beta 5 are related to tumor progression in situ but not to metastatic capacity of cell lines in nude mice. *Int J Cancer*. 61 (4): 491-6.
- de Fraipont F, El Atifi M, Gicquel C, Bertagna X, Chambaz EM and Feige JJ.** (2000). Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations. *J Clin Endocrinol Metab*. 85 (12): 4734-41.
- de Jong JS, van Diest PJ, van der Valk P and Baak JP.** (1998). Expression of growth factors, growth-inhibiting factors, and their receptors in invasive breast cancer. II: Correlations with proliferation and angiogenesis. *J Pathol*. 184 (1): 53-7.
- Derossi D, Calvet S, Trembleau A, Brunissen A, Chassaing G and Prochiantz A.** (1996). Cell internalization of the third helix of the Antennapedia homeodomain is receptor-independent. *J Biol Chem*. 271 (30): 18188-93.
- Derossi D, Joliot AH, Chassaing G and Prochiantz A.** (1994). The third helix of the Antennapedia homeodomain translocates through biological membranes. *J Biol Chem*. 269 (14): 10444-50.
- Dibbans JA, Polyak SW, Damert A, Risau W, Vadas MA and Goodall GJ.** (2001). Nucleotide sequence of the mouse VEGF 3'UTR and quantitative analysis of sites of polyadenylation. *Biochim Biophys Acta*. 1518 (1-2): 57-62.
- Dietz GP and Bahr M.** (2004). Delivery of bioactive molecules into the cell: the Trojan horse approach. *Mol Cell Neurosci*. 27 (2): 85-131.
- Dikov MM, Ohm JE, Ray N, Tchekneva EE, Burlison J, Moghanaki D, Nadaf S and Carbone DP.** (2005). Differential roles of vascular endothelial growth factor receptors 1 and 2 in dendritic cell differentiation. *J Immunol*. 174 (1): 215-22.
- Dome B, Hendrix MJ, Paku S, Tovari J and Timar J.** (2007). Alternative vascularization mechanisms in cancer: Pathology and therapeutic implications. *Am J Pathol*. 170 (1): 1-15.
- Dor Y, Porat R and Keshet E.** (2001). Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 280 (6): C1367-74.
- Dromi S, Frenkel V, Luk A, Traughber B, Angstadt M, Bur M, Poff J, Xie J, Libutti SK, Li KC and Wood BJ.** (2007). Pulsed-high intensity focused ultrasound and low temperature-sensitive liposomes for enhanced targeted drug delivery and antitumor effect. *Clin Cancer Res*. 13 (9): 2722-7.
- Duchardt F, Fotin-Mleczek M, Schwarz H, Fischer R and Brock R.** (2007). A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic*. 8 (7): 848-66.
- Durand S, Abadie P, Angeletti S and Genti-Raimondi S.** (2003). Identification of multiple differentially expressed messenger RNAs in normal and pathological trophoblast. *Placenta*. 24 (2-3): 209-18.
- Dus D, Budzynski W and Radzikowski C.** (1985). LL2 cell line derived from transplantable murine Lewis lung carcinoma--maintenance in vitro and growth characteristics. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 33 (6): 817-23.
- Dvorak HF, Nagy JA, Feng D, Brown LF and Dvorak AM.** (1999). Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol*. 237: 97-132.
- Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, Jia X and Kerbel RS.** (2004). A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma. *Mol Cancer Res*. 2 (6): 315-26.
- Ebos JM, Lee CR, Christensen JG, Mutsaers AJ and Kerbel RS.** (2007). Multiple circulating proangiogenic factors induced by sunitinib malate are tumor-independent and correlate with antitumor efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104 (43): 17069-74.
- Elliott G and O'Hare P.** (1997). Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*. 88 (2): 223-33.
- Ellis LM.** (2006). The role of neuropilins in cancer. *Mol Cancer Ther*. 5 (5): 1099-107.

- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ and Ratcliffe PJ.** (2001). *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 107 (1): 43-54.
- Eremina V, Sood M, Haigh J, Nagy A, Lajoie G, Ferrara N, Gerber HP, Kikkawa Y, Miner JH and Quaggin SE.** (2003). Glomerular-specific alterations of VEGF-A expression lead to distinct congenital and acquired renal diseases. *J Clin Invest*. 111 (5): 707-16.
- Eriksson A, Cao R, Pawliuk R, Berg SM, Tsang M, Zhou D, Fleet C, Tritsarlis K, Dissing S, Leboulch P and Cao Y.** (2002). Placenta growth factor-1 antagonizes VEGF-induced angiogenesis and tumor growth by the formation of functionally inactive PIGF-1/VEGF heterodimers. *Cancer Cell*. 1 (1): 99-108.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R and Bukowski RM.** (2007a). Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 356 (2): 125-34.
- Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A and Moore N.** (2007b). Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 370 (9605): 2103-11.
- Eskens FA and Verweij J.** (2006). The clinical toxicity profile of vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) targeting angiogenesis inhibitors; a review. *Eur J Cancer*. 42 (18): 3127-39.
- Essafi-Benkhadir K, Onesto C, Stebe E, Moroni C and Pages G.** (2007). Tristetraprolin inhibits Ras-dependent tumor vascularization by inducing vascular endothelial growth factor mRNA degradation. *Mol Biol Cell*. 18 (11): 4648-58.
- Esteve E, Mabrouk K, Dupuis A, Smida-Rezgui S, Altafaj X, Grunwald D, Platel JC, Andreotti N, Marty I, Sabatier JM, Ronjat M and De Waard M.** (2005). Transduction of the scorpion toxin maurocalcine into cells. Evidence that the toxin crosses the plasma membrane. *J Biol Chem*. 280 (13): 12833-9.
- Fairhurst AM, Connolly JE, Hintz KA, Goulding NJ, Rassias AJ, Yeager MP, Rigby W and Wallace PK.** (2003). Regulation and localization of endogenous human tristetraprolin. *Arthritis Res Ther*. 5 (4): R214-25.
- Faivre S, Demetri G, Sargent W and Raymond E.** (2007). Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov*. 6 (9): 734-745.
- Fan XC and Steitz JA.** (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *Embo J*. 17 (12): 3448-60.
- Fawell S, Seery J, Daikh Y, Moore C, Chen LL, Pepinsky B and Barsoum J.** (1994). Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91 (2): 664-8.
- Fechir M, Linker K, Pautz A, Hubrich T, Forstermann U, Rodriguez-Pascual F and Kleinert H.** (2005). Tristetraprolin regulates the expression of the human inducible nitric-oxide synthase gene. *Mol Pharmacol*. 67 (6): 2148-61.
- Fenger-Gron M, Fillman C, Norrild B and Lykke-Andersen J.** (2005). Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol Cell*. 20 (6): 905-15.
- Ferrara N.** (2002). VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2 (10): 795-803.
- Ferrara N.** (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 25 (4): 581-611.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ and Moore MW.** (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 380 (6573): 439-42.
- Ferrara N, Chen H, Davis-Smyth T, Gerber HP, Nguyen TN, Peers D, Chisholm V, Hillan KJ and Schwall RH.** (1998). Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat Med*. 4 (3): 336-40.

- Ferrara N and Davis-Smyth T.** (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev.* 18 (1): 4-25.
- Ferrara N and Henzel WJ.** (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 161 (2): 851-8.
- Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP and Novotny W.** (2004). Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 3 (5): 391-400.
- Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen JM, Dewerchin M, Collen D and Carmeliet P.** (2007). Anti-PlGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell.* 131 (3): 463-75.
- Fischer R, Kohler K, Fotin-Mieczek M and Brock R.** (2004). A stepwise dissection of the intracellular fate of cationic cell-penetrating peptides. *J Biol Chem.* 279 (13): 12625-35.
- Fittipaldi A, Ferrari A, Zoppe M, Arcangeli C, Pellegrini V, Beltram F and Giacca M.** (2003). Cell membrane lipid rafts mediate caveolar endocytosis of HIV-1 Tat fusion proteins. *J Biol Chem.* 278 (36): 34141-9.
- Flamme I, Frolich T and Risau W.** (1997). Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol.* 173 (2): 206-10.
- Folkman J.** (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 285: 1182-1186.
- Folkman J.** (1972). Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann Surg.* 175 (3): 409-16.
- Folkman J.** (1995). Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med.* 1 (1): 27-31.
- Folkman J and Hanahan D.** (1991). Switch to the angiogenic phenotype during tumorigenesis. *Princess Takamatsu Symp.* 22: 339-47.
- Fong GH, Rossant J, Gertsenstein M and Breitman ML.** (1995). Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium. *Nature.* 376 (6535): 66-70.
- Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD and Semenza GL.** (1996). Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol.* 16 (9): 4604-13.
- Frankel AD and Pabo CO.** (1988). Cellular uptake of the tat protein from human immunodeficiency virus. *Cell.* 55 (6): 1189-93.
- Franks TM and Lykke-Andersen J.** (2007). TTP and BRF proteins nucleate processing body formation to silence mRNAs with AU-rich elements. *Genes Dev.* 21 (6): 719-35.
- Freeman MR, Schneck FX, Gagnon ML, Corless C, Soker S, Niknejad K, Peoples GE and Klagsbrun M.** (1995). Peripheral blood T lymphocytes and lymphocytes infiltrating human cancers express vascular endothelial growth factor: a potential role for T cells in angiogenesis. *Cancer Res.* 55 (18): 4140-5.
- Fukumura D, Xavier R, Sugiura T, Chen Y, Park EC, Lu N, Selig M, Nielsen G, Taksir T, Jain RK and Seed B.** (1998). Tumor induction of VEGF promoter activity in stromal cells. *Cell.* 94 (6): 715-25.
- Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K and Sugiura Y.** (2001). Arginine-rich peptides. An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem.* 276 (8): 5836-40.
- Gabrilovich DI, Patterson S, Harvey JJ, Woods GM, Elsley W and Knight SC.** (1995). Defects in the function of dendritic cells in murine retroviral infection. *Adv Exp Med Biol.* 378: 469-72.
- Gaillard I, Keramidas M, Liakos P, Vilgrain I, Feige JJ and Vittet D.** (2000). ACTH-regulated expression of vascular endothelial growth factor in the adult bovine adrenal cortex: a possible role in the maintenance of the microvasculature. *J Cell Physiol.* 185 (2): 226-34.
- Garanger E, Boturyn D, Jin Z, Dumy P, Favrot MC and Coll JL.** (2005). New multifunctional molecular conjugate vector for targeting, imaging, and therapy of tumors. *Mol Ther.* 12 (6): 1168-75.
- Gerber HP and Ferrara N.** (2005). Pharmacology and pharmacodynamics of bevacizumab as monotherapy or in combination with cytotoxic therapy in preclinical studies. *Cancer Res.* 65 (3): 671-80.

- Gerber HP, Malik AK, Solar GP, Sherman D, Liang XH, Meng G, Hong K, Marsters JC and Ferrara N.** (2002). VEGF regulates haematopoietic stem cell survival by an internal autocrine loop mechanism. *Nature*. 417 (6892): 954-8.
- Gimbrone MA, Jr., Leapman SB, Cotran RS and Folkman J.** (1972). Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *J Exp Med*. 136 (2): 261-76.
- Gimenez-Bachs JM, Salinas-Sanchez AS, Sanchez-Sanchez F, Lorenzo-Romero JG, Donate-Moreno MJ, Pastor-Navarro H, Carrion-Lopez P, Escribano-Martinez J and Virseda-Rodriguez JA.** (2007). VHL protein alterations in sporadic renal cell carcinoma. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 19 (10): 784-9.
- Glade Bender J, Cooney EM, Kandel JJ and Yamashiro DJ.** (2004). Vascular remodeling and clinical resistance to antiangiogenic cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 7 (4-5): 289-300.
- Gladson CL and Cheresh DA.** (1991). Glioblastoma expression of vitronectin and the alpha v beta 3 integrin. Adhesion mechanism for transformed glial cells. *J Clin Invest*. 88 (6): 1924-32.
- Goldberg-Cohen I, Furneaux H and Levy AP.** (2002). A 40-bp RNA element that mediates stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by HuR. *J Biol Chem*. 277 (16): 13635-40.
- Gomperts M, Pascall JC and Brown KD.** (1990). The nucleotide sequence of a cDNA encoding an EGF-inducible gene indicates the existence of a new family of mitogen-induced genes. *Oncogene*. 5 (7): 1081-3.
- Gorski DH, Mauceri HJ, Salloum RM, Gately S, Hellman S, Beckett MA, Sukhatme VP, Soff GA, Kufe DW and Weichselbaum RR.** (1998). Potentiation of the antitumor effect of ionizing radiation by brief concomitant exposures to angiostatin. *Cancer Res*. 58 (24): 5686-9.
- Gospodarowicz D and Thakral KK.** (1978). Production a corpus luteum angiogenic factor responsible for proliferation of capillaries and neovascularization of the corpus luteum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 75 (2): 847-51.
- Gouble A, Grazide S, Meggetto F, Mercier P, Delsol G and Morello D.** (2002). A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNPd overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res*. 62 (5): 1489-95.
- Gump JM and Dowdy SF.** (2007). TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol Med*. 13 (10): 443-8.
- Gupta MK and Qin RY.** (2003). Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J Gastroenterol*. 9 (6): 1144-55.
- Haggstrom S, Lissbrant IF, Bergh A and Damber JE.** (1999). Testosterone induces vascular endothelial growth factor synthesis in the ventral prostate in castrated rats. *J Urol*. 161 (5): 1620-5.
- Hanahan D, Bergers G and Bergsland E.** (2000). Less is more, regularly: metronomic dosing of cytotoxic drugs can target tumor angiogenesis in mice. *J. Clin. Invest*. 105: 1045-1047.
- Hanahan D and Folkman J.** (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 86 (3): 353-64.
- Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, Jain RK and McDonald DM.** (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am J Pathol*. 156 (4): 1363-80.
- Hau HH, Walsh RJ, Ogilvie RL, Williams DA, Reilly CS and Bohjanen PR.** (2007). Tristetraprolin recruits functional mRNA decay complexes to ARE sequences. *J Cell Biochem*. 100 (6): 1477-92.
- Heikkila P, Arola J, Voutilainen R, Salmenkivi K, Kahri AI and Liu J.** (2000). Expression of vascular endothelial growth factor in human adrenals. *Endocr Res*. 26 (4): 867-71.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR and Seftor RE.** (2003a). Molecular plasticity of human melanoma cells. *Oncogene*. 22 (20): 3070-5.
- Hendrix MJ, Seftor EA, Hess AR and Seftor RE.** (2003b). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. *Nat Rev Cancer*. 3 (6): 411-21.
- Herschman HR, Kujubu DA, Fletcher BS, Ma Q, Varnum BC, Gilbert RS and Reddy ST.** (1994). The tis genes, primary response genes induced by growth factors and tumor promoters in 3T3 cells. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 47: 113-48.

- Hicklin DJ and Ellis LM.** (2005). Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* 23: 1-17.
- Hida K.** (2004). Tumor-associated endothelial cells with cytogenetic abnormalities. *Cancer Res.* 64: 8249-8255.
- Hitti E, Iakovleva T, Brook M, Deppenmeier S, Gruber AD, Radzioch D, Clark AR, Blackshear PJ, Kotlyarov A and Gaestel M.** (2006). Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Mol Cell Biol.* 26 (6): 2399-407.
- Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F, Roberts WG, Griffith L, Torchilin VP and Jain RK.** (1998). Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95 (8): 4607-12.
- Holash J, Wiegand SJ and Yancopoulos GD.** (1999). New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF. *Oncogene.* 18 (38): 5356-62.
- Holm T, Netzereab S, Hansen M, Langel U and Hallbrink M.** (2005). Uptake of cell-penetrating peptides in yeasts. *FEBS Lett.* 579 (23): 5217-22.
- Holmgren L, O'Reilly MS and Folkman J.** (1995). Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med.* 1 (2): 149-53.
- Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniowska K and Harris AL.** (1992). Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet.* 340 (8828): 1120-4.
- Hotchkiss RS, McConnell KW, Bullok K, Davis CG, Chang KC, Schwulst SJ, Dunne JC, Dietz GP, Bahr M, McDunn JE, Karl IE, Wagner TH, Cobb JP, Coopersmith CM and Piwnica-Worms D.** (2006). TAT-BH4 and TAT-Bcl-xL peptides protect against sepsis-induced lymphocyte apoptosis in vivo. *J Immunol.* 176 (9): 5471-7.
- Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B and Leung DW.** (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol.* 5 (12): 1806-14.
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J and Ferrara N.** (1992). Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 267 (36): 26031-7.
- Hudson BP, Martinez-Yamout MA, Dyson HJ and Wright PE.** (2004). Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d. *Nat Struct Mol Biol.* 11 (3): 257-64.
- Huez I, Bornes S, Bresson D, Creancier L and Prats H.** (2001). New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol Endocrinol.* 15 (12): 2197-210.
- Hurwitz H.** (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 350: 2335-2342.
- Ignatovich IA, Dizhe EB, Pavlotskaya AV, Akifiev BN, Burov SV, Orlov SV and Perevozchikov AP.** (2003). Complexes of plasmid DNA with basic domain 47-57 of the HIV-1 Tat protein are transferred to mammalian cells by endocytosis-mediated pathways. *J Biol Chem.* 278 (43): 42625-36.
- Iida K, Kawakami Y, Sone H, Suzuki H, Yatoh S, Isobe K, Takekoshi K and Yamada N.** (2002). Vascular endothelial growth factor gene expression in a retinal pigmented cell is up-regulated by glucose deprivation through 3' UTR. *Life Sci.* 71 (14): 1607-14.
- Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Amano S, Ogura Y, Hida T, Oguchi Y, Ambati J, Miller JW, Gragoudas ES, Ng YS, D'Amore PA, Shima DT and Adamis AP.** (2003). VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med.* 198 (3): 483-9.
- Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, Rosenfield K, Razvi S, Walsh K and Symes JF.** (1996). Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet.* 348 (9024): 370-4.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS and Kaelin WG, Jr.** (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. *Science.* 292 (5516): 464-8.

- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW and Ratcliffe PJ.** (2001). Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*. 292 (5516): 468-72.
- Jackson RS, 2nd, Cho YJ and Liang P.** (2006). TIS11D is a candidate pro-apoptotic p53 target gene. *Cell Cycle*. 5 (24): 2889-93.
- Jain RK.** (1988). Transvascular and interstitial transport in tumors. *Adv Exp Med Biol*. 242: 215-20.
- Jain RK.** (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 307 (5706): 58-62.
- Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS and Ferrara N.** (1993). Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology*. 133 (2): 848-59.
- Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, Altar CA and Ferrara N.** (1992). Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest*. 89 (1): 244-53.
- Jeltsch M, Kaipainen A, Joukov V, Meng X, Lakso M, Rauvala H, Swartz M, Fukumura D, Jain RK and Alitalo K.** (1997). Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*. 276 (5317): 1423-5.
- Jiang T, Olson ES, Nguyen QT, Roy M, Jennings PA and Tsien RY.** (2004). Tumor imaging by means of proteolytic activation of cell-penetrating peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101 (51): 17867-72.
- Jing Q, Huang S, Guth S, Zarubin T, Motoyama A, Chen J, Di Padova F, Lin SC, Gram H and Han J.** (2005). Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*. 120 (5): 623-34.
- Johnson BA and Blackwell TK.** (2002). Multiple tristetraprolin sequence domains required to induce apoptosis and modulate responses to TNF $\alpha$  through distinct pathways. *Oncogene*. 21 (27): 4237-46.
- Johnson BA, Stehn JR, Yaffe MB and Blackwell TK.** (2002). Cytoplasmic localization of tristetraprolin involves 14-3-3-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem*. 277 (20): 18029-36.
- Joliot A, Pernelle C, Deagostini-Bazin H and Prochiantz A.** (1991). Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88 (5): 1864-8.
- Joukov V.** (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J*. 15: 290-298.
- Kalluri R.** (2003). Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 3 (6): 422-33.
- Kaplan IM, Wadia JS and Dowdy SF.** (2005). Cationic TAT peptide transduction domain enters cells by macropinocytosis. *J Control Release*. 102 (1): 247-53.
- Katsanou V, Papadaki O, Milatos S, Blackshear PJ, Anderson P, Kollias G and Kontoyiannis DL.** (2005). HuR as a negative posttranscriptional modulator in inflammation. *Mol Cell*. 19 (6): 777-89.
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J and Connolly DT.** (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*. 246 (4935): 1309-12.
- Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE and Anderson P.** (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*. 169 (6): 871-84.
- Keene JD.** (1999). Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96 (1): 5-7.
- Keramidas M, Feige JJ and Thomas M.** (2004). Coordinated regression of adrenocortical endocrine and endothelial compartments under adrenocorticotropin deprivation. *Endocr Res*. 30 (4): 543-9.
- Kerbek RS.** (1997). A cancer therapy resistant to resistance. *Nature*. 390 (6658): 335-6.
- Kerbek RS.** (2000). Tumor angiogenesis: past, present and the near future. *Carcinogenesis*. 21 (3): 505-15.
- Kerbek RS.** (2008). Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 358 (19): 2039-49.

- Kerbel RS and Folkman J.** (2002). Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nature Rev. Cancer.* 2: 727-739.
- Kerbel RS, Yu J, Tran J, Man S, Vilorio-Petit A, Klement G, Coomber BL and Rak J.** (2001). Possible mechanisms of acquired resistance to anti-angiogenic drugs: implications for the use of combination therapy approaches. *Cancer Metastasis Rev.* 20 (1-2): 79-86.
- Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R and Ferrara N.** (1996). The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J Biol Chem.* 271 (13): 7788-95.
- Kim JJ and Tannock IF.** (2005). Repopulation of cancer cells during therapy: an important cause of treatment failure. *Nat Rev Cancer.* 5 (7): 516-25.
- Kim KJ, Li B, Houck K, Winer J and Ferrara N.** (1992). The vascular endothelial growth factor proteins: identification of biologically relevant regions by neutralizing monoclonal antibodies. *Growth Factors.* 7 (1): 53-64.
- Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS and Ferrara N.** (1993). Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature.* 362 (6423): 841-4.
- Koeller DM, Casey JL, Hentze MW, Gerhardt EM, Chan LN, Klausner RD and Harford JB.** (1989). A cytosolic protein binds to structural elements within the iron regulatory region of the transferrin receptor mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86 (10): 3574-8.
- Kondo S, Asano M, Matsuo K, Ohmori I and Suzuki H.** (1994). Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochim Biophys Acta.* 1221 (2): 211-4.
- Konopatskaya O, Churchill AJ, Harper SJ, Bates DO and Gardiner TA.** (2006). VEGF165b, an endogenous C-terminal splice variant of VEGF, inhibits retinal neovascularization in mice. *Mol Vis.* 12: 626-32.
- Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F and Kollias G.** (1999). Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity.* 10 (3): 387-98.
- Ku DD, Zaleski JK, Liu S and Brock TA.** (1993). Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am J Physiol.* 265 (2 Pt 2): H586-92.
- Kut C, Mac Gabhann F and Popel AS.** (2007). Where is VEGF in the body? A meta-analysis of VEGF distribution in cancer. *Br J Cancer.* 97 (7): 978-85.
- Kyriakides TR, Zhu YH, Smith LT, Bain SD, Yang Z, Lin MT, Danielson KG, Iozzo RV, LaMarca M, McKinney CE, Ginns EI and Bornstein P.** (1998). Mice that lack thrombospondin 2 display connective tissue abnormalities that are associated with disordered collagen fibrillogenesis, an increased vascular density, and a bleeding diathesis. *J Cell Biol.* 140 (2): 419-30.
- Lagnado CA, Brown CY and Goodall GJ.** (1994). AUUUUA is not sufficient to promote poly(A) shortening and degradation of an mRNA: the functional sequence within AU-rich elements may be UUAUUUA(U/A)(U/A). *Mol Cell Biol.* 14 (12): 7984-95.
- Lai WS and Blackshear PJ.** (2001). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: tristetraprolin-mediated AU-rich element-dependent mRNA degradation can occur in the absence of a poly(A) tail. *J Biol Chem.* 276 (25): 23144-54.
- Lai WS, Carballo E, Strum JR, Kennington EA, Phillips RS and Blackshear PJ.** (1999). Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol Cell Biol.* 19 (6): 4311-23.
- Lai WS, Carballo E, Thorn JM, Kennington EA and Blackshear PJ.** (2000). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to AU-rich elements and destabilization of mRNA. *J Biol Chem.* 275 (23): 17827-37.
- Lai WS, Carrick DM and Blackshear PJ.** (2005). Influence of nonameric AU-rich tristetraprolin-binding sites on mRNA deadenylation and turnover. *J Biol Chem.* 280 (40): 34365-77.

- Lai WS, Kennington EA and Blackshear PJ.** (2002). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs. *J Biol Chem.* 277 (11): 9606-13.
- Lai WS, Kennington EA and Blackshear PJ.** (2003). Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol Cell Biol.* 23 (11): 3798-812.
- Lai WS, Parker JS, Grissom SF, Stumpo DJ and Blackshear PJ.** (2006). Novel mRNA targets for tristetraprolin (TTP) identified by global analysis of stabilized transcripts in TTP-deficient fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 26 (24): 9196-208.
- Lai WS, Stumpo DJ and Blackshear PJ.** (1990). Rapid insulin-stimulated accumulation of an mRNA encoding a proline-rich protein. *J Biol Chem.* 265 (27): 16556-63.
- Lammert E, Gu G, McLaughlin M, Brown D, Brekken R, Murtaugh LC, Gerber HP, Ferrara N and Melton DA.** (2003). Role of VEGF-A in vascularization of pancreatic islets. *Curr Biol.* 13 (12): 1070-4.
- Lando D, Peet DJ, Whelan DA, Gorman JJ and Whitelaw ML.** (2002). Asparagine hydroxylation of the HIF transactivation domain a hypoxic switch. *Science.* 295 (5556): 858-61.
- Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, Minden M, Paterson B, Caligiuri MA and Dick JE.** (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 367 (6464): 645-8.
- Larcher F, Murillas R, Bolontrade M, Conti CJ and Jorcano JL.** (1998). VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. *Oncogene.* 17 (3): 303-11.
- LeCouter J, Lin R, Frantz G, Zhang Z, Hillan K and Ferrara N.** (2003). Mouse endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor: a distinct expression pattern from its human ortholog suggests different roles as a regulator of organ-specific angiogenesis. *Endocrinology.* 144 (6): 2606-16.
- Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, Ferrara N, Nagy A, Roos KP and Iruela-Arispe ML.** (2007). Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell.* 130 (4): 691-703.
- Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK and Avraham S.** (2007). Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med.* 4 (6): e186.
- Lee YH, Tokunaga T, Oshika Y, Suto R, Yanagisawa K, Tomisawa M, Fukuda H, Nakano H, Abe S, Tateishi A, Kijima H, Yamazaki H, Tamaoki N, Ueyama Y and Nakamura M.** (1999). Cell-retained isoforms of vascular endothelial growth factor (VEGF) are correlated with poor prognosis in osteosarcoma. *Eur J Cancer.* 35 (7): 1089-93.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV and Ferrara N.** (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science.* 246 (4935): 1306-9.
- Levy AP, Levy NS and Goldberg MA.** (1996). Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem.* 271 (5): 2746-53.
- Levy JR, Hannah S, Mooney RL, Hug V and Stevens W.** (1995). Sequence and functional characterization of the terminal exon of the human insulin receptor gene. *Biochim Biophys Acta.* 1263 (3): 253-7.
- Levy NS, Chung S, Furneaux H and Levy AP.** (1998). Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem.* 273 (11): 6417-23.
- Levy NS, Goldberg MA and Levy AP.** (1997). Sequencing of the human vascular endothelial growth factor (VEGF) 3' untranslated region (UTR): conservation of five hypoxia-inducible RNA-protein binding sites. *Biochim Biophys Acta.* 1352 (2): 167-73.
- Lewin M, Carlesso N, Tung CH, Tang XW, Cory D, Scadden DT and Weissleder R.** (2000). Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells. *Nat Biotechnol.* 18 (4): 410-4.
- Lewis C and Murdoch C.** (2005). Macrophage responses to hypoxia: implications for tumor progression and anti-cancer therapies. *Am J Pathol.* 167 (3): 627-35.

- Li J, Shen H, Himmel KL, Dupuy AJ, Largaespada DA, Nakamura T, Shaughnessy JD, Jr., Jenkins NA and Copeland NG.** (1999). Leukaemia disease genes: large-scale cloning and pathway predictions. *Nat Genet.* 23 (3): 348-53.
- Lin EY and Pollard JW.** (2007). Tumor-associated macrophages press the angiogenic switch in breast cancer. *Cancer Res.* 67 (11): 5064-6.
- Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR, 3rd, Parker R and Hannon GJ.** (2005). A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol.* 7 (12): 1261-6.
- Loflin P, Chen CY and Shyu AB.** (1999). Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the in vivo mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* 13 (14): 1884-97.
- Lu JY and Schneider RJ.** (2004). Tissue distribution of AU-rich mRNA-binding proteins involved in regulation of mRNA decay. *J Biol Chem.* 279 (13): 12974-9.
- Lundberg M, Wikstrom S and Johansson M.** (2003). Cell surface adherence and endocytosis of protein transduction domains. *Mol Ther.* 8 (1): 143-50.
- Lyden D.** (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nat. Med.* 7: 1194-1201.
- Lykke-Andersen J and Wagner E.** (2005). Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev.* 19 (3): 351-61.
- Ma WJ, Cheng S, Campbell C, Wright A and Furneaux H.** (1996). Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J Biol Chem.* 271 (14): 8144-51.
- Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F and Angeletti CA.** (1992). Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet.* 340 (8812): 145-6.
- Mae M, Myrberg H, Jiang Y, Paves H, Valkna A and Langel U.** (2005). Internalisation of cell-penetrating peptides into tobacco protoplasts. *Biochim Biophys Acta.* 1669 (2): 101-7.
- Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa M, Sawada T and Sowa M.** (1996). Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer.* 77 (5): 858-63.
- Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P and Persico MG.** (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88 (20): 9267-71.
- Mahtani KR, Brook M, Dean JL, Sully G, Saklatvala J and Clark AR.** (2001). Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Mol Cell Biol.* 21 (19): 6461-9.
- Maitra S, Chou CF, Lubner CA, Lee KY, Mann M and Chen CY.** (2008). The AU-rich element mRNA decay-promoting activity of BRF1 is regulated by mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2. *Rna.* 14 (5): 950-9.
- Makinen T, Veikkola T, Mustjoki S, Karpanen T, Catimel B, Nice EC, Wise L, Mercer A, Kowalski H, Kerjaschki D, Stacker SA, Achen MG and Alitalo K.** (2001). Isolated lymphatic endothelial cells transduce growth, survival and migratory signals via the VEGF-C/D receptor VEGFR-3. *Embo J.* 20 (17): 4762-73.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS and Hendrix MJ.** (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 155 (3): 739-52.
- Marderosian M, Sharma A, Funk AP, Vartanian R, Masri J, Jo OD and Gera JF.** (2006). Tristetraprolin regulates Cyclin D1 and c-Myc mRNA stability in response to rapamycin in an Akt-dependent manner via p38 MAPK signaling. *Oncogene.* 25 (47): 6277-90.
- Marx J.** (2003). Angiogenesis. A boost for tumor starvation. *Science.* 301: 452-454.
- Masson N, Willam C, Maxwell PH, Pugh CW and Ratcliffe PJ.** (2001). Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor-alpha chains activated by prolyl hydroxylation. *Embo J.* 20 (18): 5197-206.
- Matsumoto T and Claesson-Welsh L.** (2001). VEGF receptor signal transduction. *Sci STKE.* 2001 (112): RE21.

- Michel SL, Guerrierio AL and Berg JM.** (2003). Selective RNA binding by a single CCCH zinc-binding domain from Nup475 (Tristetraprolin). *Biochemistry*. 42 (16): 4626-30.
- Mignatti P, Mazziere R and Rifkin DB.** (1991). Expression of the urokinase receptor in vascular endothelial cells is stimulated by basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol*. 113 (5): 1193-201.
- Millauer B, Longhi MP, Plate KH, Shawver LK, Risau W, Ullrich A and Strawn LM.** (1996). Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res*. 56 (7): 1615-20.
- Miller-Kasprzak E and Jagodzinski PP.** (2008). 5-Aza-2'-deoxycytidine increases the expression of anti-angiogenic vascular endothelial growth factor 189b variant in human lung microvascular endothelial cells. *Biomed Pharmacother*. 62 (3): 158-63.
- Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, Shenkier T, Cella D and Davidson NE.** (2007). Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N Engl J Med*. 357 (26): 2666-76.
- Miller KD, Sweeney CJ and Sledge GW, Jr.** (2003). The Snark is a Boojum: the continuing problem of drug resistance in the antiangiogenic era. *Ann Oncol*. 14 (1): 20-8.
- Miquero L, Langille BL and Nagy A.** (2000). Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*. 127 (18): 3941-6.
- Mitchell DJ, Kim DT, Steinman L, Fathman CG and Rothbard JB.** (2000). Polyarginine enters cells more efficiently than other polycationic homopolymers. *J Pept Res*. 56 (5): 318-25.
- Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R and Orci L.** (1986). Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83 (19): 7297-301.
- Morris MC, Deshayes S, Heitz F and Divita G.** (2008). Cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Biol Cell*. 100 (4): 201-17.
- Moschos SA, Jones SW, Perry MM, Williams AE, Erjefalt JS, Turner JJ, Barnes PJ, Sproat BS, Gait MJ and Lindsay MA.** (2007). Lung delivery studies using siRNA conjugated to TAT(48-60) and penetratin reveal peptide induced reduction in gene expression and induction of innate immunity. *Bioconjug Chem*. 18 (5): 1450-9.
- Motzer RJ.** (2006). Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J. Clin. Oncol*. 24: 16-24.
- Mould AW, Greco SA, Cahill MM, Tonks ID, Bellomo D, Patterson C, Zournazi A, Nash A, Scotney P, Hayward NK and Kay GF.** (2005). Transgenic overexpression of vascular endothelial growth factor-B isoforms by endothelial cells potentiates postnatal vessel growth in vivo and in vitro. *Circ Res*. 97 (6): e60-70.
- Muller YA, Li B, Christinger HW, Wells JA, Cunningham BC and de Vos AM.** (1997). Vascular endothelial growth factor: crystal structure and functional mapping of the kinase domain receptor binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94 (14): 7192-7.
- Murata T, Morita N, Hikita K, Kiuchi K, Kiuchi K and Kaneda N.** (2005). Recruitment of mRNA-destabilizing protein TIS11 to stress granules is mediated by its zinc finger domain. *Exp Cell Res*. 303 (2): 287-99.
- Murata T, Yoshino Y, Morita N and Kaneda N.** (2002). Identification of nuclear import and export signals within the structure of the zinc finger protein TIS11. *Biochem Biophys Res Commun*. 293 (4): 1242-7.
- Muslin AJ and Xing H.** (2000). 14-3-3 proteins: regulation of subcellular localization by molecular interference. *Cell Signal*. 12 (11-12): 703-9.
- Nabors LB, Gillespie GY, Harkins L and King PH.** (2001). HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res*. 61 (5): 2154-61.
- Nagel F, Falkenburger BH, Tonges L, Kowsky S, Poppelmeyer C, Schulz JB, Bahr M and Dietz GP.** (2008). Tat-Hsp70 protects dopaminergic neurons in midbrain cultures and in the substantia nigra in models of Parkinson's disease. *J Neurochem*. 105 (3): 853-64.
- Nair AP, Hahn S, Banholzer R, Hirsch HH and Moroni C.** (1994). Cyclosporin A inhibits growth of autocrine tumour cell lines by destabilizing interleukin-3 mRNA. *Nature*. 369 (6477): 239-42.

- Nakase I, Niwa M, Takeuchi T, Sonomura K, Kawabata N, Koike Y, Takehashi M, Tanaka S, Ueda K, Simpson JC, Jones AT, Sugiura Y and Futaki S.** (2004). Cellular uptake of arginine-rich peptides: roles for macropinocytosis and actin rearrangement. *Mol Ther.* 10 (6): 1011-22.
- Nath A, Psooy K, Martin C, Knudsen B, Magnuson DS, Haughey N and Geiger JD.** (1996). Identification of a human immunodeficiency virus type 1 Tat epitope that is neuroexcitatory and neurotoxic. *J Virol.* 70 (3): 1475-80.
- Neininger A, Kontoyiannis D, Kotlyarov A, Winzen R, Eckert R, Volk HD, Holtmann H, Kollias G and Gaestel M.** (2002). MK2 targets AU-rich elements and regulates biosynthesis of tumor necrosis factor and interleukin-6 independently at different post-transcriptional levels. *J Biol Chem.* 277 (5): 3065-8.
- Nekhotiaeva N, Elmquist A, Rajarao GK, Hallbrink M, Langel U and Good L.** (2004). Cell entry and antimicrobial properties of eukaryotic cell-penetrating peptides. *Faseb J.* 18 (2): 394-6.
- Ng YS, Rohan R, Sunday ME, Demello DE and D'Amore PA.** (2001). Differential expression of VEGF isoforms in mouse during development and in the adult. *Dev Dyn.* 220 (2): 112-21.
- Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Hayashi Y, Yamashima T, Yamashita J and Yamamoto H.** (1995). Possible participation of autocrine and paracrine vascular endothelial growth factors in hypoxia-induced proliferation of endothelial cells and pericytes. *J Biol Chem.* 270 (47): 28316-24.
- Nozawa H, Chiu C and Hanahan D.** (2006). Infiltrating neutrophils mediate the initial angiogenic switch in a mouse model of multistage carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (33): 12493-8.
- Ogilvie RL, Abelson M, Hau HH, Vlasova I, Blackshear PJ and Bohjanen PR.** (2005). Tristetraprolin down-regulates IL-2 gene expression through AU-rich element-mediated mRNA decay. *J Immunol.* 174 (2): 953-61.
- Oliver G.** (2004). Lymphatic vasculature development. *Nature Rev. Immunol.* 4: 35-45.
- Oosthuysen B.** (2001). Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration. *Nature Genet.* 28: 131-138.
- Orimo A.** (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell.* 121: 335-348.
- Palanisamy V, Park NJ, Wang J and Wong DT.** (2008). AUF1 and HuR proteins stabilize interleukin-8 mRNA in human saliva. *J Dent Res.* 87 (8): 772-6.
- Parangi S, O'Reilly M, Christofori G, Holmgren L, Grosfeld J, Folkman J and Hanahan D.** (1996). Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93 (5): 2002-7.
- Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA and Ferrara N.** (1994). Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem.* 269 (41): 25646-54.
- Park JE, Keller GA and Ferrara N.** (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell.* 4 (12): 1317-26.
- Patel LN, Zaro JL and Shen WC.** (2007). Cell penetrating peptides: intracellular pathways and pharmaceutical perspectives. *Pharm Res.* 24 (11): 1977-92.
- Peng SS, Chen CY, Xu N and Shyu AB.** (1998). RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *Embo J.* 17 (12): 3461-70.
- Pepper MS.** (2001). Lymphangiogenesis and tumor metastasis: myth or reality? *Clin Cancer Res.* 7 (3): 462-8.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L and Montesano R.** (1992). Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 189 (2): 824-31.
- Pepper MS, Wasi S, Ferrara N, Orci L and Montesano R.** (1994). In vitro angiogenic and proteolytic properties of bovine lymphatic endothelial cells. *Exp Cell Res.* 210 (2): 298-305.
- Perez-Atayde AR, Sallan SE, Tedrow U, Connors S, Allred E and Folkman J.** (1997). Spectrum of tumor angiogenesis in the bone marrow of children with acute lymphoblastic leukemia. *Am J Pathol.* 150 (3): 815-21.

- Perrin RM, Konopatskaya O, Qiu Y, Harper S, Bates DO and Churchill AJ.** (2005). Diabetic retinopathy is associated with a switch in splicing from anti- to pro-angiogenic isoforms of vascular endothelial growth factor. *Diabetologia*. 48 (11): 2422-7.
- Perrot-Applanat M, Ancelin M, Buteau-Lozano H, Meduri G and Bausero P.** (2000). Ovarian steroids in endometrial angiogenesis. *Steroids*. 65 (10-11): 599-603.
- Peters BA.** (2005). Contribution of bone marrow-derived endothelial cells to human tumor vasculature. *Nature Med*. 11: 261-262.
- Peters KG, De Vries C and Williams LT.** (1993). Vascular endothelial growth factor receptor expression during embryogenesis and tissue repair suggests a role in endothelial differentiation and blood vessel growth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 (19): 8915-9.
- Petrovsky N and Harrison LC.** (1998). The chronobiology of human cytokine production. *Int Rev Immunol*. 16 (5-6): 635-49.
- Phillips GD, Stone AM, Jones BD, Schultz JC, Whitehead RA and Knighton DR.** (1994). Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo*. 8 (6): 961-5.
- Phillips RS, Ramos SB and Blackshear PJ.** (2002). Members of the tristetraprolin family of tandem CCCH zinc finger proteins exhibit CRM1-dependent nucleocytoplasmic shuttling. *J Biol Chem*. 277 (13): 11606-13.
- Plouet J, Schilling J and Gospodarowicz D.** (1989). Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *Embo J*. 8 (12): 3801-6.
- Pooga M, Soomets U, Hallbrink M, Valkna A, Saar K, Rezaei K, Kahl U, Hao JX, Xu XJ, Wiesenfeld-Hallin Z, Hokfelt T, Bartfai T and Langel U.** (1998). Cell penetrating PNA constructs regulate galanin receptor levels and modify pain transmission in vivo. *Nat Biotechnol*. 16 (9): 857-61.
- Potocky TB, Menon AK and Gellman SH.** (2003). Cytoplasmic and nuclear delivery of a TAT-derived peptide and a beta-peptide after endocytic uptake into HeLa cells. *J Biol Chem*. 278 (50): 50188-94.
- Prochiantz A.** (2000). Messenger proteins: homeoproteins, TAT and others. *Curr Opin Cell Biol*. 12 (4): 400-6.
- Pugh CW and Ratcliffe PJ.** (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med*. 9 (6): 677-84.
- Raghavan A, Robison RL, McNabb J, Miller CR, Williams DA and Bohjanen PR.** (2001). HuA and tristetraprolin are induced following T cell activation and display distinct but overlapping RNA binding specificities. *J Biol Chem*. 276 (51): 47958-65.
- Ramos SB, Stumpo DJ, Kennington EA, Phillips RS, Bock CB, Ribeiro-Neto F and Blackshear PJ.** (2004). The CCCH tandem zinc-finger protein Zfp3612 is crucial for female fertility and early embryonic development. *Development*. 131 (19): 4883-93.
- Reppe S, Olstad OK, Rian E, Gautvik VT, Gautvik KM and Jemtland R.** (2004). Butyrate response factor 1 is regulated by parathyroid hormone and bone morphogenetic protein-2 in osteoblastic cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 324 (1): 218-23.
- Richard JP, Melikov K, Brooks H, Prevot P, Lebleu B and Chernomordik LV.** (2005). Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem*. 280 (15): 15300-6.
- Richard JP, Melikov K, Vives E, Ramos C, Verbeure B, Gait MJ, Chernomordik LV and Lebleu B.** (2003). Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake. *J Biol Chem*. 278 (1): 585-90.
- Rigby WF, Roy K, Collins J, Rigby S, Connolly JE, Bloch DB and Brooks SA.** (2005). Structure/function analysis of tristetraprolin (TTP): p38 stress-activated protein kinase and lipopolysaccharide stimulation do not alter TTP function. *J Immunol*. 174 (12): 7883-93.
- Risau W and Flamme I.** (1995). Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 11: 73-91.
- Roberts WG and Palade GE.** (1995). Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci*. 108 ( Pt 6): 2369-79.

- Roisin A, Robin JP, Dereuddre-Bosquet N, Vitte AL, Dormont D, Clayette P and Jalinot P.** (2004). Inhibition of HIV-1 replication by cell-penetrating peptides binding Rev. *J Biol Chem.* 279 (10): 9208-14.
- Rosenbaum-Dekel Y, Fuchs A, Yakirevich E, Azriel A, Mazareb S, Resnick MB and Levi BZ.** (2005). Nuclear localization of long-VEGF is associated with hypoxia and tumor angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 332 (1): 271-8.
- Rothbard JB, Jessop TC, Lewis RS, Murray BA and Wender PA.** (2004). Role of membrane potential and hydrogen bonding in the mechanism of translocation of guanidinium-rich peptides into cells. *J Am Chem Soc.* 126 (31): 9506-7.
- Ruben S, Perkins A, Purcell R, Joung K, Sia R, Burghoff R, Haseltine WA and Rosen CA.** (1989). Structural and functional characterization of human immunodeficiency virus tat protein. *J Virol.* 63 (1): 1-8.
- Rusnati M, Tulipano G, Spillmann D, Tanghetti E, Oreste P, Zoppetti G, Giacca M and Presta M.** (1999). Multiple interactions of HIV-I Tat protein with size-defined heparin oligosaccharides. *J Biol Chem.* 274 (40): 28198-205.
- Sandler A, Gray R, Perry MC, Brahmer J, Schiller JH, Dowlati A, Lilienbaum R and Johnson DH.** (2006). Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med.* 355 (24): 2542-50.
- Sandler H and Stoecklin G.** (2008). Control of mRNA decay by phosphorylation of tristetraprolin. *Biochem Soc Trans.* 36 (Pt 3): 491-6.
- Sawaoka H, Dixon DA, Oates JA and Boutaud O.** (2003). Tristetraprolin binds to the 3'-untranslated region of cyclooxygenase-2 mRNA. A polyadenylation variant in a cancer cell line lacks the binding site. *J Biol Chem.* 278 (16): 13928-35.
- Schmidlin M, Lu M, Leuenberger SA, Stoecklin G, Mallaun M, Gross B, Gherzi R, Hess D, Hemmings BA and Moroni C.** (2004). The ARE-dependent mRNA-destabilizing activity of BRF1 is regulated by protein kinase B. *Embo J.* 23 (24): 4760-9.
- Schwarze SR and Dowdy SF.** (2000). In vivo protein transduction: intracellular delivery of biologically active proteins, compounds and DNA. *Trends Pharmacol Sci.* 21 (2): 45-8.
- Schwarze SR, Ho A, Vocero-Akbani A and Dowdy SF.** (1999). In vivo protein transduction: delivery of a biologically active protein into the mouse. *Science.* 285 (5433): 1569-72.
- Seftor EA, Meltzer PS, Schatteman GC, Gruman LM, Hess AR, Kirschmann DA, Seftor RE and Hendrix MJ.** (2002). Expression of multiple molecular phenotypes by aggressive melanoma tumor cells: role in vasculogenic mimicry. *Crit Rev Oncol Hematol.* 44 (1): 17-27.
- Seftor RE, Seftor EA, Kirschmann DA and Hendrix MJ.** (2002). Targeting the tumor microenvironment with chemically modified tetracyclines: inhibition of laminin 5 gamma2 chain promigratory fragments and vasculogenic mimicry. *Mol Cancer Ther.* 1 (13): 1173-9.
- Semenza GL.** (2003). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3 (10): 721-32.
- Senger DR, Perruzzi CA, Feder J and Dvorak HF.** (1986). A highly conserved vascular permeability factor secreted by a variety of human and rodent tumor cell lines. *Cancer Res.* 46 (11): 5629-32.
- Sethuraman VA and Bae YH.** (2007). TAT peptide-based micelle system for potential active targeting of anti-cancer agents to acidic solid tumors. *J Control Release.* 118 (2): 216-24.
- Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML and Schuh AC.** (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature.* 376 (6535): 62-6.
- Shaw G and Kamen R.** (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell.* 46 (5): 659-67.
- Shibagaki N and Udey MC.** (2002). Dendritic cells transduced with protein antigens induce cytotoxic lymphocytes and elicit antitumor immunity. *J Immunol.* 168 (5): 2393-401.
- Shibuya M and Claesson-Welsh L.** (2006). Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res.* 312 (5): 549-60.

- Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, Ng YS, Adamis AP and D'Amore PA.** (1996). The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. *J Biol Chem.* 271 (7): 3877-83.
- Shimada H, Ichikawa H, Nakamura S, Katsu R, Iwasa M, Kitabayashi I and Ohki M.** (2000). Analysis of genes under the downstream control of the t(8;21) fusion protein AML1-MTG8: overexpression of the TIS11b (ERF-1, cMG1) gene induces myeloid cell proliferation in response to G-CSF. *Blood.* 96 (2): 655-63.
- Shojaei F, Wu X, Malik AK, Zhong C, Baldwin ME, Schanz S, Fuh G, Gerber HP and Ferrara N.** (2007). Tumor refractoriness to anti-VEGF treatment is mediated by CD11b+Gr1+ myeloid cells. *Nat Biotechnol.* 25 (8): 911-20.
- Shweiki D, Itin A, Soffer D and Keshet E.** (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 359 (6398): 843-5.
- Siemann DW, Bibby MC, Dark GG, Dicker AP, Eskens FA, Horsman MR, Marme D and Lorusso PM.** (2005). Differentiation and definition of vascular-targeted therapies. *Clin Cancer Res.* 11 (2 Pt 1): 416-20.
- Snyder EL, Meade BR, Saenz CC and Dowdy SF.** (2004). Treatment of terminal peritoneal carcinomatosis by a transducible p53-activating peptide. *PLoS Biol.* 2 (2): E36.
- Stalmans I, Ng YS, Rohan R, Fruttiger M, Bouche A, Yuce A, Fujisawa H, Hermans B, Shani M, Jansen S, Hicklin D, Anderson DJ, Gardiner T, Hammes HP, Moons L, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P and D'Amore PA.** (2002). Arteriolar and venular patterning in retinas of mice selectively expressing VEGF isoforms. *J Clin Invest.* 109 (3): 327-36.
- Stoecklin G and Anderson P.** (2006). Posttranscriptional mechanisms regulating the inflammatory response. *Adv Immunol.* 89: 1-37.
- Stoecklin G, Colombi M, Raineri I, Leuenberger S, Mallaun M, Schmidlin M, Gross B, Lu M, Kitamura T and Moroni C.** (2002). Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover. *Embo J.* 21 (17): 4709-18.
- Stoecklin G, Gross B, Ming XF and Moroni C.** (2003). A novel mechanism of tumor suppression by destabilizing AU-rich growth factor mRNA. *Oncogene.* 22 (23): 3554-61.
- Stoecklin G, Stoeckle P, Lu M, Muehleemann O and Moroni C.** (2001). Cellular mutants define a common mRNA degradation pathway targeting cytokine AU-rich elements. *Rna.* 7 (11): 1578-88.
- Stoecklin G, Stubbs T, Kedersha N, Wax S, Rigby WF, Blackwell TK and Anderson P.** (2004). MK2-induced tristetraprolin:14-3-3 complexes prevent stress granule association and ARE-mRNA decay. *Embo J.* 23 (6): 1313-24.
- Stoecklin G, Tenenbaum SA, Mayo T, Chittur SV, George AD, Baroni TE, Blackshear PJ and Anderson P.** (2008). Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin. *J Biol Chem.* 283 (17): 11689-99.
- Storch KF, Lipan O, Leykin I, Viswanathan N, Davis FC, Wong WH and Weitz CJ.** (2002). Extensive and divergent circadian gene expression in liver and heart. *Nature.* 417 (6884): 78-83.
- Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA and Filvaroff EH.** (2002). Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99 (15): 9656-61.
- Streit M, Velasco P, Riccardi L, Spencer L, Brown LF, Janes L, Lange-Asschenfeldt B, Yano K, Hawighorst T, Iruela-Arispe L and Detmar M.** (2000). Thrombospondin-1 suppresses wound healing and granulation tissue formation in the skin of transgenic mice. *Embo J.* 19 (13): 3272-82.
- Streubel B, Chott A, Huber D, Exner M, Jager U, Wagner O and Schwarzinger I.** (2004). Lymphoma-specific genetic aberrations in microvascular endothelial cells in B-cell lymphomas. *N Engl J Med.* 351 (3): 250-9.
- Stumpo DJ, Byrd NA, Phillips RS, Ghosh S, Maronpot RR, Castranio T, Meyers EN, Mishina Y and Blackshear PJ.** (2004). Chorioallantoic fusion defects and embryonic lethality resulting from disruption of Zfp36L1, a gene encoding a CCCH tandem zinc finger protein of the Tristetraprolin family. *Mol Cell Biol.* 24 (14): 6445-55.

- Sun L, Stoecklin G, Van Way S, Hinkovska-Galcheva V, Guo RF, Anderson P and Shanley TP.** (2007). Tristetraprolin (TTP)-14-3-3 complex formation protects TTP from dephosphorylation by protein phosphatase 2a and stabilizes tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA. *J Biol Chem.* 282 (6): 3766-77.
- Suswam E, Li Y, Zhang X, Gillespie GY, Li X, Shacka JJ, Lu L, Zheng L and King PH.** (2008). Tristetraprolin down-regulates interleukin-8 and vascular endothelial growth factor in malignant glioma cells. *Cancer Res.* 68 (3): 674-82.
- Suzuki T, Futaki S, Niwa M, Tanaka S, Ueda K and Sugiura Y.** (2002). Possible existence of common internalization mechanisms among arginine-rich peptides. *J Biol Chem.* 277 (4): 2437-43.
- Sweeney CJ, Miller KD and Sledge GW, Jr.** (2003). Resistance in the anti-angiogenic era: nay-saying or a word of caution? *Trends Mol Med.* 9 (1): 24-9.
- Talvensaari-Mattila A, Paakko P and Turpeenniemi-Hujanen T.** (2003). Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) is associated with survival in breast carcinoma. *Br J Cancer.* 89 (7): 1270-5.
- Taylor GA, Thompson MJ, Lai WS and Blackshear PJ.** (1995). Phosphorylation of tristetraprolin, a potential zinc finger transcription factor, by mitogen stimulation in intact cells and by mitogen-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem.* 270 (22): 13341-7.
- Taylor GA, Thompson MJ, Lai WS and Blackshear PJ.** (1996). Mitogens stimulate the rapid nuclear to cytosolic translocation of tristetraprolin, a potential zinc-finger transcription factor. *Mol Endocrinol.* 10 (2): 140-6.
- Tchen CR, Brook M, Saklatvala J and Clark AR.** (2004). The stability of tristetraprolin mRNA is regulated by mitogen-activated protein kinase p38 and by tristetraprolin itself. *J Biol Chem.* 279 (31): 32393-400.
- Thoren PE, Persson D, Isakson P, Goksor M, Onfelt A and Norden B.** (2003). Uptake of analogs of penetratin, Tat(48-60) and oligoarginine in live cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 307 (1): 100-7.
- Toi M, Hoshina S, Takayanagi T and Tominaga T.** (1994). Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res.* 85 (10): 1045-9.
- Torchilin VP, Rammohan R, Weissig V and Levchenko TS.** (2001). TAT peptide on the surface of liposomes affords their efficient intracellular delivery even at low temperature and in the presence of metabolic inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98 (15): 8786-91.
- Tunnemann G, Martin RM, Haupt S, Patsch C, Edenhofer F and Cardoso MC.** (2006). Cargo-dependent mode of uptake and bioavailability of TAT-containing proteins and peptides in living cells. *Faseb J.* 20 (11): 1775-84.
- Tyagi M, Rusnati M, Presta M and Giacca M.** (2001). Internalization of HIV-1 tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 276 (5): 3254-61.
- Varey AH, Rennel ES, Qiu Y, Bevan HS, Perrin RM, Raffy S, Dixon AR, Paraskeva C, Zaccheo O, Hassan AB, Harper SJ and Bates DO.** (2008). VEGF 165 b, an antiangiogenic VEGF-A isoform, binds and inhibits bevacizumab treatment in experimental colorectal carcinoma: balance of pro- and antiangiogenic VEGF-A isoforms has implications for therapy. *Br J Cancer.* 98 (8): 1366-79.
- Varnum BC, Lim RW, Sukhatme VP and Herschman HR.** (1989). Nucleotide sequence of a cDNA encoding TIS11, a message induced in Swiss 3T3 cells by the tumor promoter tetradecanoyl phorbol acetate. *Oncogene.* 4 (1): 119-20.
- Varnum BC, Ma QF, Chi TH, Fletcher B and Herschman HR.** (1991). The TIS11 primary response gene is a member of a gene family that encodes proteins with a highly conserved sequence containing an unusual Cys-His repeat. *Mol Cell Biol.* 11 (3): 1754-8.
- Verheul HM and Pinedo HM.** (2007). Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat Rev Cancer.* 7 (6): 475-85.
- Viglietto G, Maglione D, Rambaldi M, Cerutti J, Romano A, Trapasso F, Fedele M, Ippolito P, Chiappetta G, Botti G and et al.** (1995). Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene.* 11 (8): 1569-79.

- Viglietto G, Romano A, Maglione D, Rambaldi M, Paoletti I, Lago CT, Califano D, Monaco C, Mineo A, Santelli G, Manzo G, Botti G, Chiappetta G and Persico MG.** (1996). Neovascularization in human germ cell tumors correlates with a marked increase in the expression of the vascular endothelial growth factor but not the placenta-derived growth factor. *Oncogene*. 13 (3): 577-87.
- Vincent T and Mechti N.** (2005). Extracellular matrix in bone marrow can mediate drug resistance in myeloma. *Leuk Lymphoma*. 46 (6): 803-11.
- Vitte AL and Jalinot P.** (2008). Intracellular delivery of peptides via association with ubiquitin or SUMO-1 coupled to protein transduction domains. *BMC Biotechnol*. 8: 24.
- Vives E, Brodin P and Lebleu B.** (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem*. 272 (25): 16010-7.
- Vives E, Schmidt J and Pelegrin A.** (2008). Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochim Biophys Acta*.
- Wakui S, Furusato M, Itoh T, Sasaki H, Akiyama A, Kinoshita I, Asano K, Tokuda T, Aizawa S and Ushigome S.** (1992). Tumour angiogenesis in prostatic carcinoma with and without bone marrow metastasis: a morphometric study. *J Pathol*. 168 (3): 257-62.
- Weidner N, Semple JP, Welch WR and Folkman J.** (1991). Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med*. 324 (1): 1-8.
- Wickham TJ, Carrion ME and Kovesdi I.** (1995). Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther*. 2 (10): 750-6.
- Willett CG, Boucher Y, di Tomaso E, Duda DG, Munn LL, Tong RT, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Kozin SV, Mino M, Cohen KS, Scadden DT, Hartford AC, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Chen HX, Shellito PC, Lauwers GY and Jain RK.** (2004). Direct evidence that the VEGF-specific antibody bevacizumab has antivasculature effects in human rectal cancer. *Nat Med*. 10 (2): 145-7.
- Willett CG, Boucher Y, Duda DG, di Tomaso E, Munn LL, Tong RT, Kozin SV, Petit L, Jain RK, Chung DC, Sahani DV, Kalva SP, Cohen KS, Scadden DT, Fischman AJ, Clark JW, Ryan DP, Zhu AX, Blaszkowsky LS, Shellito PC, Mino-Kenudson M and Lauwers GY.** (2005). Surrogate markers for antiangiogenic therapy and dose-limiting toxicities for bevacizumab with radiation and chemotherapy: continued experience of a phase I trial in rectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 23 (31): 8136-9.
- Wilusz CJ, Gao M, Jones CL, Wilusz J and Peltz SW.** (2001). Poly(A)-binding proteins regulate both mRNA deadenylation and decapping in yeast cytoplasmic extracts. *Rna*. 7 (10): 1416-24.
- Winzen R, Kracht M, Ritter B, Wilhelm A, Chen CY, Shyu AB, Muller M, Gaestel M, Resch K and Holtmann H.** (1999). The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *Embo J*. 18 (18): 4969-80.
- Winzen R, Thakur BK, Dittrich-Breiholz O, Shah M, Redich N, Dhamija S, Kracht M and Holtmann H.** (2007). Functional analysis of KSRP interaction with the AU-rich element of interleukin-8 and identification of inflammatory mRNA targets. *Mol Cell Biol*. 27 (23): 8388-400.
- Witte D, Thomas A, Ali N, Carlson N and Younes M.** (2002). Expression of the vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) and its ligand VEGF-C in human colorectal adenocarcinoma. *Anticancer Res*. 22 (3): 1463-6.
- Woolard J, Wang WY, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, Cui TG, Sugiono M, Waite E, Perrin R, Foster R, Digby-Bell J, Shields JD, Whittles CE, Mushens RE, Gillatt DA, Ziche M, Harper SJ and Bates DO.** (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*. 64 (21): 7822-35.
- Worthington MT, Pelo JW, Sachedina MA, Applegate JL, Arseneau KO and Pizarro TT.** (2002). RNA binding properties of the AU-rich element-binding recombinant Nup475/TIS11/tristetraprolin protein. *J Biol Chem*. 277 (50): 48558-64.
- Xu N, Chen CY and Shyu AB.** (2001). Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol Cell Biol*. 21 (20): 6960-71.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ and Holash J.** (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*. 407 (6801): 242-8.

- Yu H, Stasinopoulos S, Leedman P and Medcalf RL.** (2003). Inherent instability of plasminogen activator inhibitor type 2 mRNA is regulated by tristetraprolin. *J Biol Chem.* 278 (16): 13912-8.
- Yu JL, Rak JW, Coomber BL, Hicklin DJ and Kerbel RS.** (2002a). Effect of p53 status on tumor response to antiangiogenic therapy. *Science.* 295 (5559): 1526-8.
- Yu JL, Rak JW, Klement G and Kerbel RS.** (2002b). Vascular endothelial growth factor isoform expression as a determinant of blood vessel patterning in human melanoma xenografts. *Cancer Res.* 62 (6): 1838-46.
- Yuan A, Yu CJ, Kuo SH, Chen WJ, Lin FY, Luh KT, Yang PC and Lee YC.** (2001). Vascular endothelial growth factor 189 mRNA isoform expression specifically correlates with tumor angiogenesis, patient survival, and postoperative relapse in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 19 (2): 432-41.
- Zaro JL and Shen WC.** (2003). Quantitative comparison of membrane transduction and endocytosis of oligopeptides. *Biochem Biophys Res Commun.* 307 (2): 241-7.
- Zaro JL and Shen WC.** (2005). Evidence that membrane transduction of oligoarginine does not require vesicle formation. *Exp Cell Res.* 307 (1): 164-73.
- Zavaglia D, Lin EH, Guidetti M, Pluquet O, Hainaut P, Favrot MC and Coll JL.** (2005). Poor intercellular transport and absence of enhanced antiproliferative activity after non-viral gene transfer of VP22-P53 or P53-VP22 fusions into p53 null cell lines in vitro or in vivo. *J Gene Med.* 7 (7): 936-44.
- Zelzer E, Mamluk R, Ferrara N, Johnson RS, Schipani E and Olsen BR.** (2004). VEGFA is necessary for chondrocyte survival during bone development. *Development.* 131 (9): 2161-71.
- Zetter BR.** (1998). Angiogenesis and tumor metastasis. *Annu Rev Med.* 49: 407-24.
- Zhang HT, Scott PA, Morbidelli L, Peak S, Moore J, Turley H, Harris AL, Ziche M and Bicknell R.** (2000). The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br J Cancer.* 83 (1): 63-8.
- Zhu W, Brauchle MA, Di Padova F, Gram H, New L, Ono K, Downey JS and Han J.** (2001). Gene suppression by tristetraprolin and release by the p38 pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 281 (2): L499-508.
- Ziegler A, Nervi P, Durrenberger M and Seelig J.** (2005). The cationic cell-penetrating peptide CPP(TAT) derived from the HIV-1 protein TAT is rapidly transported into living fibroblasts: optical, biophysical, and metabolic evidence. *Biochemistry.* 44 (1): 138-48.
- Ziegler A and Seelig J.** (2004). Interaction of the protein transduction domain of HIV-1 TAT with heparan sulfate: binding mechanism and thermodynamic parameters. *Biophys J.* 86 (1 Pt 1): 254-63.
- Zubiaga AM, Belasco JG and Greenberg ME.** (1995). The nonamer UUAUUUAUU is the key AU-rich sequence motif that mediates mRNA degradation. *Mol Cell Biol.* 15 (4): 2219-30.
- Zygalaki E, Tsaroucha EG, Kaklamanis L and Lianidou ES.** (2007). Quantitative real-time reverse transcription PCR study of the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants and VEGF receptors (VEGFR-1 and VEGFR-2) in non small cell lung cancer. *Clin Chem.* 53 (8): 1433-9.



## Abstract

In 2002, our team showed that stimulation of primary bovine adrenocortical cells by adrenocorticotropic hormone ACTH leads to a transcription-independent increase in VEGF expression. ACTH-induced VEGF expression is post-transcriptionally regulated through mRNA stabilization/destabilization via AU-rich elements (ARE) located in 3'-untranslated region (3'UTR) of VEGF mRNA. We previously characterized TIS11b as a zinc finger protein that is induced by ACTH concomitantly with VEGF regulation. TIS11b is a member of a protein family known for destabilizing short-lived mRNAs via ARE sequences. TIS11b interaction with VEGF mRNA has been subsequently confirmed and the implicated site has been identified.

In this context, the **first aim** of my thesis was to evaluate the possibility to develop a new anti-angiogenic and anti-tumoral strategy using the mRNA-destabilizing ability of TIS11b in order to decrease VEGF levels in living tumor cells. To this end, TIS11b cDNA has been fused with PTDs (protein transduction domain, Tat derived from HIV, or the polyarginine peptides R7 and R9). PTDs allowed TIS11b to enter living cells and to intracellularly target VEGF mRNA. We report here that 100 nM of Flag-R7- and Flag-R9-TIS11b fusion proteins decrease VEGF mRNA level as well as VEGF protein level, by 40% after 24h in cultured cells. Moreover, we showed that a single injection of Flag-R9-TIS11b fusion protein into mouse adrenal glands decreases VEGF expression levels to 50% of control. Preliminary encouraging results of tumour growth inhibition were obtained with fusion protein injection into pre-established LL2 tumours in nude mice.

ACTH is a pituitary hormone that activates cAMP synthesis and the protein kinase A (PKA) pathway. The **second aim** of my thesis was to characterize PKA-induced TIS11b phosphorylation in response to ACTH and to study its effect on TIS11b-mediated VEGF mRNA decay. For the first time, our team demonstrated that PKA phosphorylates TIS11b on serine 54 in vitro. A second ACTH-induced phosphorylation site, probably PKA-independent, has been identified on TIS11b-serine 334. These observations open a new field of investigation about the regulation of TIS11b mRNA destabilizing activity by specific phosphorylations.

VEGF; TIS11b; BRF1; ZFP36L1; Protein Transduction; mRNA stability; Adrenal Cortex, phosphorylation

## Résumé

En 2002, notre équipe a montré que la stimulation de cellules primaires cortico-surréaliennes bovines en culture primaire par l'hormone hypophysaire ACTH induisait l'expression du VEGF de manière indépendante de sa transcription. En effet, en réponse à l'ACTH, l'expression du VEGF est régulée au niveau post-transcriptionnel par la stabilisation/déstabilisation de son transcrit via des séquences riches en AU (ARE) situées dans la région 3' non traduite (3'UTR) de son ARNm. Le laboratoire a mis en évidence une protéine, TIS11b, exprimée également en réponse à une stimulation des cellules par l'ACTH, mais de manière concomitante avec la phase de déstabilisation de l'ARNm du VEGF. TIS11b appartient à une famille de protéines déstabilisatrices des ARNm via les séquences ARE. L'interaction de TIS11b avec l'ARNm du VEGF a été confirmée par la suite, et le site de liaison de la protéine à l'ARNm a également été identifié.

Dans ce contexte, le **premier objectif** de ma thèse était d'évaluer la possibilité d'utiliser les propriétés déstabilisatrices de TIS11b sur l'ARNm du VEGF pour une thérapie anti-angiogène et anti-tumorale. Pour cela, la protéine a été vectorisée par la fusion de petits peptides ou PTD (protein transduction domain, Tat issu du VIH ou les polyarginines R7 et R9) lui permettant de traverser les membranes et d'atteindre sa cible intracellulaire, l'ARNm du VEGF. Nous avons pu montrer dans cette étude que 100 nM de protéines de fusion Flag-Tat-, Flag-R7- et Flag-R9-TIS11b sont capables d'induire une diminution du taux d'ARNm du VEGF ainsi que de la production de la protéine VEGF, dans des cellules en culture après 24 h d'incubation. De plus, nous avons pu montrer que l'injection de 100 nM de la protéine de fusion Flag-R9-TIS11b dans la glande corticosurrénaliene de souris, induisait une diminution d'environ 50 % de l'expression du VEGF par cette glande et que cette diminution était maintenue à 48 h. Des résultats préliminaires encourageants d'inhibition de croissance tumorale ont été obtenus avec l'injection de cette protéine de fusion dans des tumeurs pré-établies chez la souris nude, et doivent être confirmés.

L'ACTH étant une hormone qui active la voie de l'AMPC et de la protéine kinase A (PKA), le **deuxième objectif** de ma thèse était de caractériser la phosphorylation de TIS11b par la PKA en réponse à une stimulation par l'ACTH et d'étudier les conséquences de cette phosphorylation sur son activité déstabilisatrice des ARNm. Nous avons pu montrer pour la première fois, que la PKA phosphoryle la protéine TIS11b, in vitro, au niveau de la sérine 54. Un deuxième site de phosphorylation en réponse à une stimulation par l'ACTH, via probablement une autre kinase que la PKA, a été mis en évidence au niveau de la sérine 334. Il semblerait que la protéine TIS11b comporte un domaine d'activation et un domaine d'inhibition susceptibles d'être régulés en réponse à une stimulation par l'ACTH. L'attribution de ces domaines aux sérines 54 et 334 nécessite des expériences complémentaires.

VEGF; TIS11b; BRF1; ZFP36L1; transduction de protéines, stabilité d'ARNm, glande corticosurrénale, phosphorylation