

Rôle et mécanismes d'action des chimiokines CXCL4 et CXCL4L1 dans l'angiogenèse

Clotilde Billottet, Andreas Bikfalvi

Laboratoire de l'angiogenèse et du microenvironnement des cancers (LAMC), Inserm U1029 et Université de Bordeaux 1, Talence, France

c.billottet@angio.u-bordeaux1.fr

a.bikfalvi@angio.u-bordeaux1.fr

Le facteur plaquettaire 4 (PF4 ou CXCL4) appartient à la famille des chimiokines CXC dépourvues de séquence ELR (Glutamate-Leucine-Arginine). Il est essentiellement synthétisé par les mégacaryocytes et les plaquettes ; stocké dans des granules de sécrétion cytoplasmique, il est libéré de façon aiguë et massive lors de l'activation plaquettaire [1]. Le PF4 est présent en concentration élevée dans les sites de lésions, où il peut atteindre jusqu'à 25 µ/mL [2]. Il possède une forte affinité pour l'héparine et autres glycosaminoglycanes (GAG), ce qui a conduit à son isolement précoce par chromatographie d'affinité sur colonne d'héparine-sépharose et ainsi à son séquençage [3, 4]. Le PF4 joue un rôle important dans la régulation directe de plusieurs fonctions cellulaires telles que la thrombose [5, 6], la mégacaryocytopoïèse [7-9], la modulation immunitaire [10], l'angiogenèse [11], et l'athérosclérose [12]. La majorité de ces fonctions implique des interactions avec des GAG, mais certaines d'entre elles sont indépendantes des GAG. Par exemple, l'effet du PF4 sur le développement des plaques d'athérome est au moins partiellement dépendant des GAG, alors que celui sur l'angiogenèse implique, outre les GAG, la liaison directe avec des facteurs de croissance, l'activation de récepteurs de chimiokines ou celle des intégrines.

Une autre forme de PF4, nommée PF4V1 (CXCL4L1) a été décrite en 1989, mais ce n'est que récemment que l'attention s'est portée sur cette molécule [13-17]. PF4V1 a été isolée à partir des plaquettes humaines stimulées par la thrombine [14]. PF4V1 est une protéine codée par un gène variant non allélique de PF4 présent uniquement chez l'homme et le chimpanzé. Ainsi PF4 et PF4V1 sont codées par deux gènes différents, mais hautement homologues. PF4 et PF4V1 sont de puissants facteurs angio-

statiques, qui inhibent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. Ils diffèrent seulement de 4,3 % de leurs acides aminés dans leur séquence mature mais l'activité angiostatique de PF4V1 est 30 à 100 fois supérieure à celle de PF4 [14-17]. La protéine mature PF4V1 contient trois substitutions d'acides aminés dans la partie C-terminale, une région critique pour l'interaction de PF4 avec l'héparine [14]. Ces substitutions conduisent à une structure secondaire différente entraînant une plus faible affinité pour l'héparine. De plus, PF4 et PF4V1 présentent une divergence de 38 % d'acides aminés dans la région du peptide signal, conduisant à une localisation subcellulaire distincte et une sécrétion différente. Contrairement au PF4 qui est stocké et libéré lors de l'activation plaquettaire, PF4V1 est synthétisé de façon permanente et sécrété de façon constitutive [15].

PF4, PF4V1 et angiogenèse

L'angiogenèse joue un rôle important dans des processus physiologiques tels que l'embryogenèse et la cicatrisation, ainsi que dans la progression de diverses pathologies comme le cancer, la rétinopathie diabétique et certains troubles inflammatoires [18]. L'expansion de tumeurs solides et autres cancers dépend essentiellement de l'angiogenèse [19] faisant de la thérapie anti-angiogénique une stratégie pertinente pour le traitement du cancer [20]. Les chimiokines CXC sont des facteurs endogènes majeurs de l'angiogenèse. Dans cette famille, on retrouve aussi bien des facteurs pro-angiogéniques que des facteurs angiostatiques. PF4 a d'ailleurs été révélé comme l'un des premiers agents inhibiteurs de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* [21]. Au niveau moléculaire, l'angiogenèse est contrôlée par des facteurs

pro-angiogéniques, comme les facteurs de croissance (*Vascular Endothelial Growth Factor* [VEGF] ou *Fibroblast Growth Factor* 2 [FGF-2]), des molécules d'adhésion cellulaire et des intégrines [22-24]. La stimulation par des facteurs de croissance induit une augmentation de l'expression des intégrines dans les cellules endothéliales. La liaison de ces intégrines à divers ligands de la matrice extracellulaire favorise la prolifération et la migration des cellules endothéliales, ce qui contribue à la formation et à la maturation des vaisseaux sanguins [22, 23]. Les inhibiteurs de l'angiogenèse peuvent interférer avec ces différents événements pour exercer leur effet anti-angiogénique [20, 25]. Un peptide dérivé de la partie C-terminale de PF4 (PF4⁴⁷⁻⁷⁰) présente une puissante activité anti-angiogénique *in vitro* [21, 26, 27] et *in vivo* [27, 28] et inhibe la croissance de tumeurs variées [29-31] et la formation de métastases *in vivo* [32]. Le mécanisme sous-jacent de cette inhibition de la progression tumorale implique son action angiostatique sur la prolifération des cellules endothéliales et non pas sur celle des cellules tumorales [27, 28-30].

PF4V1 a été caractérisée comme un facteur plus puissant que le PF4 dans l'inhibition de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* [14]. PF4V1 inhibe le chimiotactisme des cellules endothéliales HMVEC *in vitro* à une concentration trente fois inférieure à celle de PF4, ainsi que l'angiogenèse induite par FGF-2 *in vivo* dans la cornée de rat. Dans différents modèles tumoraux (mélanome, adénocarcinome, carcinome pulmonaire), le traitement des souris par PF4V1 à des doses relativement faibles par rapport à celles de PF-4, entraîne une inhibition significative de la croissance tumorale et du développement de métastases [16]. Comme pour les protéines entières, un peptide dérivé de la partie C-terminale



de PF4V1 (PF4V1⁴⁷⁻⁷⁰) est plus efficace que PF4⁴⁷⁻⁷⁰ pour l'inhibition de l'angiogénèse *in vitro* et *in vivo* [17]. L'injection intratumorale de faibles doses de PF4V1⁴⁷⁻⁷⁰ inhibe la croissance du mélanome B16 chez la souris de façon plus importante que le PF4⁴⁷⁻⁷⁰. Cette activité anti-tumorale est principalement reliée à l'inhibition de l'angiogénèse (sans affecter la stabilité des vaisseaux sanguins) et à l'induction de l'apoptose du tissu tumoral B16 [17].

À la différence des effets anti-tumoraux décrits pour les protéines ou les peptides dérivés, le rôle endogène des PF4 et PF4V1 dans le développement tumoral n'a pas encore été démontré [33].

Les mécanismes d'action des récepteurs spécifiques de PF4 et de PF4V1 qui conditionnent leurs propriétés angiostatiques et antitumorales, ne sont pas encore complètement compris. Différents modes d'action ont été proposés. Ceux-ci comprennent : 1) une interaction directe avec des molécules pro-angiogéniques [34] ; 2) la compétition avec les chaînes d'héparanes sulfates nécessaires à la liaison du facteur de croissance sur son récepteur [35-37] ; 3) l'activation des récepteurs CXCR3 [38] ; 4) l'interaction avec les récepteurs LRP-1 [39] ou 5) la liaison aux intégrines [40].

Interaction avec les facteurs de croissance

Nous avons montré que PF4 est capable d'interagir directement avec des facteurs pro-angiogéniques tels que le FGF-2 et d'inhiber leur dimérisation, requise pour l'activation du récepteur [34-37]. Nous avons également étudié le domaine de liaison par lequel PF4 interagit avec le FGF-2. Par résonance magnétique nucléaire (RMN) nous avons pu mettre en évidence les interactions directes de la séquence C-terminale de PF4⁴⁷⁻⁷⁰ avec le FGF-2 et caractériser les résidus principalement impliqués dans la zone de contact. Les données de RMN ont montré une contribution majeure des propriétés hydrophobes de la région C-terminale du PF4. Plus précisément, l'interaction PF4/FGF-2 serait médiée par la tyrosine 60 et les résidus leucine et/ou isoleucine de la région C-terminale du PF4, en plus des contacts spécifiques établis par la région N-terminale du PF4 contenant la chaîne latérale cystéine (cystéines 10 et 12).

La question reste de savoir si cette interaction pourrait constituer la base de l'inhibition de l'activité biologique du FGF-2

mise en évidence dans différents essais [41]. Des études de liaison avec ¹²⁵I-FGF-2 dans les cellules endothéliales de capillaires bovins ont montré que l'inhibition de la liaison du FGF-2 à son récepteur était dépendante de la concentration en PF4. Cela est en accord avec l'inhibition de la prolifération des cellules endothéliales induite par le FGF-2 ainsi que celle de la migration et de la formation de tubes *in vitro* ou *ex vivo* avec le test de ring aortique chez le rat. De plus, il a été montré que PF4⁴⁷⁻⁷⁰ inhibe la signalisation induite par le FGF-2 et son internalisation [41]. L'ensemble de ces données renforce l'idée que PF4 inhibe l'activité biologique du FGF-2 en s'associant directement avec le facteur de croissance. Toutefois, ce mode d'action doit être affirmé avec prudence puisque d'autres molécules de liaison au PF4 ont été identifiées (voir ci-dessous). Un autre facteur de croissance capable d'interagir avec PF4 est le VEGF. Il a été montré que le VEGF¹⁶⁵, mais pas le VEGF¹²¹, est capable de se lier au PF4 [36]. Le domaine d'interaction avec le PF4 se situe entre l'acide aminé 121 et 165 et comporte une région qui présente une affinité pour les protéoglycanes. PF4 inhibe la prolifération des cellules endothéliales (HUVEC) induite par le VEGF¹⁶⁵ et de façon surprenante également celle induite par le VEGF¹²¹. Ces résultats indiquent qu'un autre mécanisme existe qui n'implique pas de concurrence pour les chaînes d'héparane sulfate mais qui interfère avec la voie de transduction induite par le VEGF. La possibilité que le VEGF possède des mécanismes d'action à la fois dépendants et indépendants de la liaison du facteur de croissance avec les chaînes d'héparane sulfate est renforcée par des études de signalisation [42]. L'inhibition du VEGF¹²¹ par le PF4 ne modifie pas l'activation du VEGFR2 et de la phospholipase C γ (PLC γ) contrairement au VEGF¹⁶⁵. Cependant, il inhibe la voie des MAP-kinases comprenant RAF1, MEK1/2 et ERK1/2, induite par les VEGF¹⁶⁵ et VEGF¹²¹.

Interaction avec les protéoglycanes

PF4 interagit avec une forte affinité avec les protéoglycanes tels que l'héparine, l'héparane sulfate et le sulfate de chondroïtine [3, 43]. PF4, comme les FGF, fait partie des protéines qui présentent la plus haute affinité de liaison à l'héparine. Les héparanes sulfates sont d'importants corécepteurs pour plusieurs facteurs de croissance tels que les FGF ou le TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) [44]. La liaison

des facteurs de croissance avec les héparanes sulfates a deux conséquences. Elle peut favoriser la concentration des facteurs de croissance à la surface cellulaire ou participer à l'activation des récepteurs en renforçant leur dimérisation [45]. Ce mécanisme a été notamment bien étudié pour les FGF [45]. Le PF4 est capable d'inhiber la liaison du FGF-2 à l'héparane sulfate et d'empêcher sa dimérisation [35]. Cela conduit à une baisse de la concentration du FGF-2 à la surface cellulaire et entrave donc la signalisation du FGF-2. La participation du chondroïtine sulfate dans l'activation des récepteurs des facteurs de croissance n'est pas bien établie à ce jour.

Comme les substitutions d'acides aminés de la partie C-terminale de PF4V1 réduisent ses propriétés de liaison à l'héparine par rapport à PF4 (Pro⁵⁸→Leu, Lys⁶⁶→Glu et Leu⁶⁷→His, pour PF4 et PF4V1 respectivement), la liaison avec les protéoglycanes, établie pour le PF4, n'est pas nécessaire à l'activité angiostatique du PF4V1. Afin de déterminer l'acide aminé responsable de la différence d'affinité pour les protéoglycanes, différentes protéines mutantes de PF4 ont été générées [46]. Nous avons montré que les protéines simples-mutantes GST-PF4 P58L, GST-PF4 K66E et doubles-mutantes GST-PF4 P58L/K66E ont des affinités pour l'héparine et les héparanes sulfates proches de celles de GST-PF4. En revanche, la substitution de la leucine 67 par une histidine dans les doubles mutants GST-PF4 P58L/L67H et GST-PF4 K66E/L67H modifie de façon très importante l'affinité des protéines pour les protéoglycanes. Ces doubles mutants ont des cinétiques d'affinité pour l'héparine similaires à celles de GST-PF4V1 et ne se lient plus aux chondroïtines sulfates, à la différence des simples mutants GST-PF4 P58L et GST-PF4 K66E. L'ensemble de ces données montre que la substitution de la leucine 67 par une histidine est responsable de l'importante perte d'affinité de PF4V1 pour les protéoglycanes membranaires. Cette substitution est essentielle pour l'augmentation de l'activité angiostatique du PF4V1 [46], possiblement via une meilleure diffusibilité et biodisponibilité par rapport au PF4.

Interaction avec les récepteurs de surface cellulaire

Un variant du récepteur couplé aux protéines G CXCR3, nommé CXCR3B, a été présenté comme le récepteur nouvel-

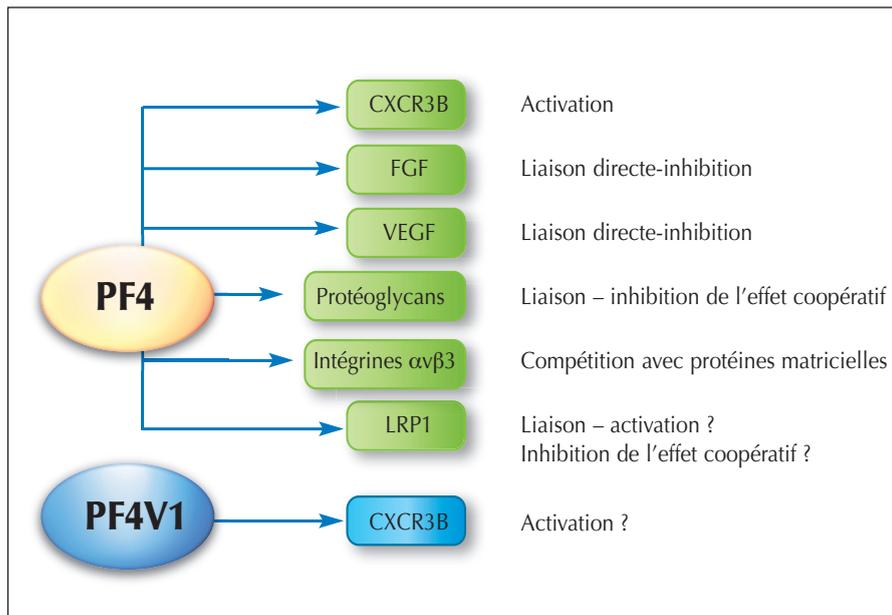


Figure 1. Résumé schématique des différents mécanismes d'action décrits pour PF4 et PF4V1.

lement identifié pour PF4 [38]. Cette interaction PF4/CXCR3B induit des événements de signalisation AMP cyclique-dépendants, qui conduisent à des modifications phénotypiques des cellules endothéliales exprimant CXCR3B et ainsi à l'inhibition de l'angiogenèse. Récemment, les voies de signalisation mises en jeu lors de l'activation de CXCR3B par PF4 ont été plus largement étudiées [47]. Dans les cellules HEK-293 exprimant CXCR3B, PF4 induit l'activation de la p38 (MAPK), mise en évidence par la phosphorylation de p38 (MAPK), MKK3/6 et MAPKAPK-2. Seule une induction modeste des MAPK (ERK ou JNK) a été observée lors de l'activation de CXCR3B. L'activation de p38 a également été observée lorsque les cellules endothéliales microvasculaires humaines sont stimulées avec le PF4. Ainsi, p38 semble être un effecteur en aval de l'activation des CXCR3B induite par le PF4. Toutefois, CXCR3B ne se trouve pas dans les cellules endothéliales bovines ou murines, et pourtant un effet inhibiteur similaire du PF4 a été observé sur ces cellules. Des études antérieures ont également montré qu'il n'y avait pas d'activation de CXCR3B dans des cellules endothéliales humaines stimulées par le PF4 [42]. Ainsi, plusieurs rapports contradictoires ont été publiés et le rôle exact de CXCR3B dans les propriétés angiostatiques du PF4 n'a pas encore été clairement établi. Récemment, il a également été montré que le médiateur de l'activité angiostati-

que et anti-tumorale du PF4V1 était CXCR3 [48]. L'injection d'anticorps anti-CXCR3 réduit de façon significative l'effet inhibiteur de PF4V1 sur la migration des cellules endothéliales et la formation de tube *in vitro*. *In vivo*, PF4V1 n'est plus capable de réduire la croissance tumorale (cancer du poumon, modèle Lewis) lorsqu'il est co-injecté avec des anticorps anti-CXCR3 ou dans des souris déficientes pour CXCR3 (souris CXCR3^{-/-}). L'absence d'activité antitumorale chez les souris traitées avec des anticorps anti-CXCR3 ou dans les souris CXCR3^{-/-} a conduit à un nombre plus élevé de cellules endothéliales et à plus de métastases dans les poumons.

Une autre molécule capable de se lier au PF4 est le récepteur d'endocytose *Low-density lipoprotein Receptor-related Protein-1* (LRP-1). LRP-1 est un récepteur multifonctionnel qui appartient à la famille des récepteurs des LDL (*Low-Density Lipoprotein*) et qui est présent au niveau vasculaire, notamment dans les cellules endothéliales et surtout dans les cellules musculaires lisses. Dans les cellules endothéliales et les mégacaryocytes une interaction de PF4 avec LRP-1 a été rapportée [39, 49]. LRP-1 a été décrit comme médiateur des effets du PF4 sur la mégacaryocytopoïèse [49]. PF4 est un régulateur négatif de la mégacaryocytopoïèse et le blocage de LRP1 par une protéine associée au récepteur (RAP, un antagoniste des récepteurs de la famille des LDL) ou

par des anticorps bloquants anti-LRP1 empêche l'inhibition de la formation des colonies mégacaryocytaires induite par le PF4. En utilisant des shRNA afin de réduire l'expression de LRP1, la formation de colonies de mégacaryocytes a été rétablie dans la moelle osseuse isolée de souris surexprimant le PF4 humain. La diminution de LRP1 par shRNA limite donc les effets du PF4 sur la mégacaryocytopoïèse. Dans les cellules endothéliales humaines (HUVEC), LRP-1 a été identifié comme le récepteur de surface cellulaire responsable des effets du PF4 sur l'expression de la E-sélectine, une molécule d'adhésion impliquée dans l'athérogenèse. PF4 est capable d'augmenter l'expression de la E-sélectine via l'activation de NF κ B. Cette augmentation de l'expression est diminuée en utilisant des anticorps bloquants anti-LRP-1 [39]. Récemment, il a également été montré que PF4 inhibe l'angiogenèse et la croissance des myélomes multiples en induisant l'apoptose des cellules tumorales [50]. Ces effets sont reliés à l'inhibition de la voie de signalisation anti-apoptotique STAT3. Après réduction de l'expression de LRP1 dans les cellules U266, les effets de PF4 sur STAT3 sont inhibés, suggérant que LRP-1 pourrait intervenir dans la voie de signalisation du PF4 dans les myélomes multiples. Cependant, aucune interaction entre LRP-1 et PF4 n'a été clairement démontrée et à ce jour il n'y a donc aucune preuve que LRP-1 soit un récepteur de PF4. LRP-1 pourrait agir en tant que corécepteur ou en aval de la voie de signalisation du PF4.

Interaction du PF4 avec les intégrines

Les intégrines constituent une famille de récepteurs impliqués de façon importante dans la régulation du processus angiogénique. Les intégrines sont des récepteurs d'adhésion essentiels pour les cellules endothéliales utilisées lors de l'angiogenèse en interagissant avec leur microenvironnement extracellulaire (MEC). Nous avons proposé un nouveau mécanisme pour les effets anti-angiogéniques de PF4, qui implique le ciblage direct des vaisseaux via les intégrines [40]. Nos données montrent que PF4 et PF4⁴⁷⁻⁷⁰ interagissent avec les intégrines $\alpha v \beta 3$ et dans une certaine mesure, avec les intégrines $\alpha v \beta 5$ et $\alpha 5 \beta 1$ à la surface des cellules endothéliales. Cette interaction est fonctionnellement importante puisqu'ainsi le PF4 module l'adhérence et la migration des cellules endothéliales, d'une manière

Pour le clinicien

La voie des chimiokines

Jacques Robert

Les chimiokines et leurs récepteurs

Les chimiokines (en anglais *chemokines*) constituent une classe de petites protéines de 8 à 15 kDa caractérisées par la présence de quatre cystéines et de deux ponts disulfure. Les deux premières cystéines sont soit consécutives (chimiokines CCL), soit séparées par un acide aminé (chimiokines CXCL) ; il existe en outre deux types plus rares (CX3CL et XCL). Les récepteurs des chimiokines sont des récepteurs couplés à des protéines G hétérotrimériques (GPCR) répartis en quatre sous-familles selon la structure des chimiokines qu'ils reconnaissent. La correspondance entre chimiokines et récepteurs est complexe ; les récepteurs sont désignés selon la même règle que les ligands (CCR, CXCR, XCR et CX3CR). Un total de 46 chimiokines susceptibles d'activer 18 récepteurs ont été identifiées.

Il existe pour cette voie de signalisation un caractère pléiotrope important, chaque chimiokine pouvant avoir de multiples effets intracellulaires, et une redondance élevée, chaque récepteur étant susceptible d'être activé par plusieurs ligands. Les chimiokines président aux migrations de nombreux types cellulaires, tout particulièrement les lymphocytes, par chimiotactisme, en attirant les cellules dotées des récepteurs correspondants. Les chimiokines sont des médiateurs de l'inflammation, les CXCL étant responsables du recrutement des neutrophiles et les CCL de celui des macrophages au niveau des sites inflammatoires. Il est important de noter que deux récepteurs de chimiokines, CXCR4 et CCR5, sont responsables de l'entrée du virus VIH dans les cellules T et les macrophages, contribuant ainsi de façon majeure à l'infection par ce virus. Les chimiokines exercent également des effets sur l'immunité et sur la migration des cellules tumorales.

Signalisation par les chimiokines

La signalisation induite par les chimiokines met en jeu des protéines G hétérotrimériques et des enzymes effecteurs, au premier rang desquels l'adénylate cyclase, la phospholipase C et les protéines d'échange GDP – GTP de petites protéines G. Les cibles ultimes de cette signalisation sont les protéines d'adhésion cellulaire et les protéines du cytosquelette impliquées dans la motilité cellulaire. Elles expliquent les phénomènes de chimiotactisme qui

sont mis en jeu par le couplage entre une chimiokine et son récepteur. Les chimiokines, sécrétées dans l'espace intercellulaire autour d'une cellule source, vont se lier aux récepteurs de cellules cibles circulantes comme les lymphocytes. Ces cellules vont pouvoir, à ce niveau, exercer les fonctions mises en jeu par l'activation du récepteur. Ce phénomène n'est pas exclusif des cellules du système immunitaire où il a été découvert en premier lieu : l'action des chimiokines s'exerce à de multiples niveaux : angiogenèse, développement, etc.

Chimiokines et pathologie

Les chimiokines sont associées à de nombreux phénomènes immunopathologiques, relevant de l'infectiologie, de la pneumologie ou de la rhumatologie. En oncologie, les chimiokines sont impliquées dans les phénomènes métastatiques. Un premier rôle des chimiokines exprimées, parfois fortement, par les cellules tumorales, est de recruter des lymphocytes et des macrophages au niveau de la tumeur, entretenant un état inflammatoire chronique. Une chimiokine impliquée dans le recrutement des macrophages est CCL5, appelée également RANTES (*Regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*). L'activation des macrophages entraîne la production de métalloprotéinases (MMP) dont l'activité est cruciale pour le développement des métastases car elles hydrolysent la matrice conjonctive du stroma tumoral. Une autre chimiokine tumorale, CXCL12 ou SDF1 (*Stromal cell-derived factor 1*), est capable de recruter des cellules endothéliales concourant au développement de nouveaux vaisseaux (angiogenèse), car les progéniteurs de ces cellules expriment le récepteur du SDF1, CXCR4. Les travaux de l'équipe d'Andreas Bikfalvi, présentés de façon détaillée dans l'article, concernent la chimiokine CXCL4 et son récepteur nouvellement identifié, CXCR3, qui jouent un rôle inhibiteur important de l'angiogenèse tumorale.

Un deuxième aspect concerne l'activité des chimiokines sur la motilité des cellules tumorales, grâce aux récepteurs de chimiokines qu'elles expriment souvent à un niveau élevé, comme CXCR4 et CCR7. L'activation de ces récepteurs leur permet de sécréter également des métalloprotéinases. Par ailleurs, la chimiokine CXCL12, qui reconnaît le récepteur CXCR4, est fortement exprimée dans le poumon, le foie et la moelle osseuse, ce qui suggère qu'elle puisse être responsable de la métastase

des cellules cancéreuses dans ces organes ; la chimiokine CCL21 ou ECL (*Efficient chemoattractant for lymphocytes*), qui est le ligand principal du récepteur CCR7, est en revanche fortement exprimée dans les ganglions lymphatiques et y attirerait les cellules cancéreuses.

Enfin, l'activation des récepteurs des chimiokines des cellules tumorales est susceptible de favoriser leur multiplication : les GPCR sont susceptibles d'activer la voie de la PI3 kinase et certains modules de la voie des MAP kinases.

Chimiokines et thérapeutique

Plusieurs laboratoires sont impliqués dans le développement de molécules dirigées soit contre les chimiokines elles-mêmes, soit contre leurs récepteurs. Cette recherche profite du fait que les chimiokines sont impliquées dans de nombreuses pathologies et intéressent donc plusieurs champs thérapeutiques. Toutefois, les difficultés liées à la redondance des diverses chimiokines et à leurs effets pléiotropes ralentissent un tel développement. Une première approche a consisté en la synthèse de peptides cycliques mimant la structure de la chimiokine CXCL12 et bloquant son récepteur, CXCR4. Ce développement a été initié en vue de traitements anti-VIH mais s'est poursuivi dans le domaine du cancer et plusieurs molécules sont actuellement en essai thérapeutique. Une deuxième approche est la recherche, par criblage de chimiothèques, de petites molécules inhibant les récepteurs de chimiokines, en particulier CXCR4, mais aussi CXCR1, CXCR2 et CXCR7. Ces molécules ont montré un intérêt en situation préclinique et devraient prochainement faire l'objet d'essais cliniques. Le ciblage des chimiokines elles-mêmes est envisageable avec des petites molécules capables de les piéger avant leur interaction avec un récepteur. Enfin, les réussites thérapeutiques nombreuses que connaissent les anticorps monoclonaux encouragent fortement la mise au point d'anticorps thérapeutiques dirigés, soit contre les chimiokines elles-mêmes, soit contre leurs récepteurs.

Références

- Allen SJ, et al. *Annu Rev Immunol* 2007 ; 25 : 787-820.
- Karnoub AE, Weinberg RA. *Breast Dis* 2006-2007 ; 26 : 75-85.
- Zlotnik A. *Int J Cancer* 2006 ; 119 : 2026-9.

intégrine-dépendante [40]. De plus, l'utilisation de PF4 soluble ou de PF4⁴⁷⁻⁷⁰ inhibe l'adhérence des cellules endothéliales et leur migration sur une matrice de fibronectine et de vitronectine. Nos données suggèrent que PF4 et PF4⁴⁷⁻⁷⁰ agissent comme des antagonistes des intégrines à leurs ligands matriciels, un mécanisme par lequel PF4 peut exercer son activité anti-angiogénique. Ainsi, PF4 peut entrer en compétition avec la fibronectine ou la vitronectine pour la liaison aux sites de liaison de son récepteur, $\alpha_v\beta_3$. Il est également possible que les intégrines $\alpha_v\beta_3$ puissent servir de récepteurs fonctionnels pour le PF4 pour transduire le signal anti-angiogénique. Dans ce contexte, PF4 peut agir comme un agoniste des signaux négatifs plutôt que comme antagoniste des signaux positifs. Par exemple, la tumstatine et l'endostatine, deux inhibiteurs endogènes de l'angiogénèse, sont capables d'interagir avec $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_3\beta_1$ et d'inhiber l'angiogénèse via l'inhibition de la PI3K (*Phosphatidylinositol 3-kinase*) et de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) [51, 52]. La modulation de la fonction des intégrines et de leur signalisation est un thème commun fonctionnel entre les différents inhibiteurs de l'angiogénèse [51-55]. En plus des inhibiteurs anti-angiogéniques qui interagissent directement avec les intégrines, il a été montré que le TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*) et l'IFN γ (interféron γ) perturbent la vascularisation tumorale *in vivo* en inhibant l'activation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [56]. Puisque les

intégrines sont surexprimées dans les cellules endothéliales angiogéniques, cela peut expliquer pourquoi le PF4 a tendance *in vivo* à cibler préférentiellement les vaisseaux sanguins angiogéniques [57, 58].

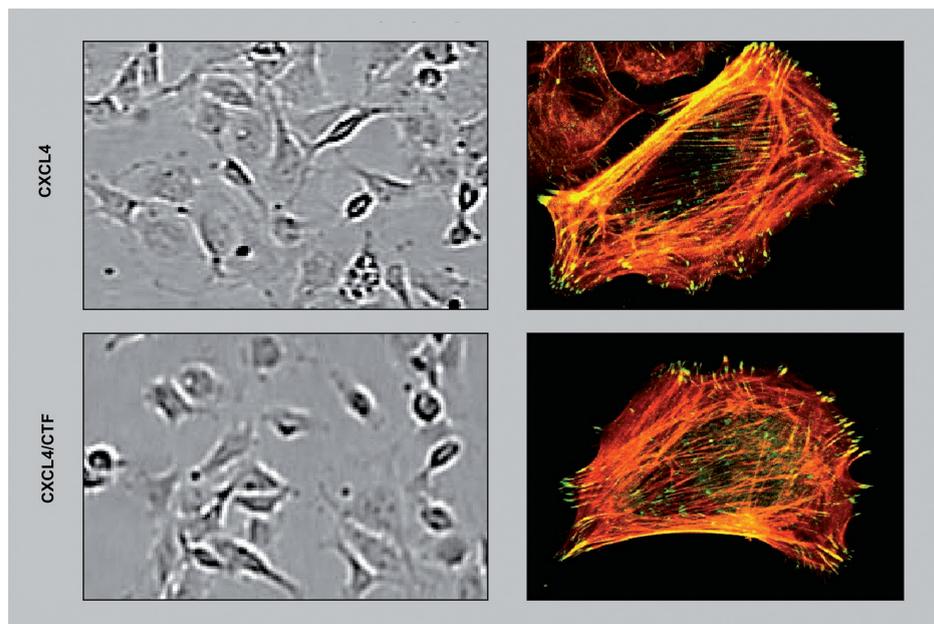
Le motif de séquence du PF4 que les intégrines reconnaissent n'est pas encore déterminé. PF4 et PF4⁴⁷⁻⁷⁰ interagissent directement avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ purifiée d'une manière spécifique [40], avec des affinités semblables aux molécules de la matrice. Malgré le fait que PF4 et PF4⁴⁷⁻⁷⁰ soient dépourvus d'une séquence RGD, nos données montrent que l'interaction de PF4 avec les intégrines est quand même RGD-dépendante [40]. De même, certains inhibiteurs de l'angiogénèse tels que l'endostatine [53], l'arrestène [54] et la tumstatine [51, 55] peuvent également se lier directement aux intégrines, en dépit du fait qu'ils n'ont pas de séquence RGD. L'interaction des intégrines avec PF4 est bloquée par le peptide RGD [40] indiquant que le PF4 interfère avec le même site de liaison aux RGD ou avec un site chevauchant celui des RGD dans les intégrines. PF4 et PF4⁴⁷⁻⁷⁰ contiennent tous deux la séquence NGR, connue pour interagir avec les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$ et $\alpha_5\beta_1$. Ainsi, il est possible que PF4 et PF4⁴⁷⁻⁷⁰ interagissent avec les intégrines via la séquence NGR, d'autant plus que le motif NGR est capable de cibler la vascularisation de la tumeur, et non pas l'endothélium normal.

Mécanisme général de l'activité anti-angiogénique des PF4 et PF4V1

Une vue d'ensemble des mécanismes anti-angiogéniques des PF4 et PF4V1 est présentée figure 1. PF4 et PF4V1 inhibent la néovascularisation *in vivo* par plusieurs mécanismes distincts, mais pas nécessairement exclusifs : interaction directe avec les molécules angiogéniques, liaison aux héparanes sulfates, activation de CXCR3, interaction avec LRP1 ou liaison directe aux intégrines. Ces différents mécanismes peuvent fonctionner en parallèle ou en coopération en fonction du site et/ou du type de vaisseaux qui subit l'angiogénèse.

Au cours de l'angiogénèse, PF4 peut être libérée à partir des granules de sécrétion cytoplasmique des plaquettes activées dans le voisinage de la paroi vasculaire de la lésion ou à partir d'autres cellules vasculaires. Il interagit avec les différentes molécules de liaison sur la surface des cellules endothéliales et induit une inhibition de l'angiogénèse. Quant au PF4V1, synthétisé continuellement, et sécrété de façon constitutive, il permet le maintien de l'homéostasie vasculaire et évite la prolifération des cellules endothéliales et une angiogénèse aberrante.

Les mécanismes spécifiques impliqués sont certainement dépendants du contexte et peuvent varier entre différentes pathologies ou organes.



© Aïdoudi S, et al. [40]



Remerciements : Le travail de l'équipe décrit dans cette revue a été soutenu par l'Institut National du Cancer (INCa), l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), l'Association de la Recherche sur le Cancer, La Ligue Nationale contre le Cancer (Comité Interdépartemental Aquitaine-Charentes) et le Conseil Régional d'Aquitaine. Une partie de ce texte est extraite de la revue « *Interaction of PF4 (CXCL4) with the vasculature: a role in atherosclerosis and angiogenesis* » par Aidoudi S & Bikfalvi A, publié dans *Thromb Haemost* 2010 ; 104 : 941-8.

Conflits d'intérêts : aucun.

Références

1. Levine SP, Wohl H. *J Biol Chem* 1976 ; 251 : 324-8.
2. Fukami MH, et al. *Hemostasis and thrombosis* 2001 : 561-73.
3. Stringer SE, Gallagher JT. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 20508-14.
4. Handin R, Cohen H. *J Biol Chem* 1976 ; 251 : 4273-82.
5. Kowalska MA, et al. *Thromb Res* 2010 ; 125 : 292-6.
6. Lambert M, et al. *Thromb Haemost* 2007 ; 97 : 722-9.
7. Maurer AM, et al. *Growth Factors* 2006 ; 24 : 242-52.
8. Gewirtz AM, et al. *Blood* 1995 ; 86 : 2559-67.
9. Aidoudi S, et al. *Br J Haematol* 1996 ; 94 : 443-8.
10. von Hundelshausen P, et al. *Thromb Haemost* 2007 ; 97 : 704-13.
11. Bikfalvi A. *Semin Thromb Hemost* 2004 ; 30 : 379-85.
12. Sachais BS. *Thromb Haemost* 2007 ; 98 : 1108-13.
13. Green C, et al. *Mol Cell Biol* 1989 ; 9 : 1445-51.
14. Struyf S, et al. *Circ Res* 2004 ; 95 : 855-7.
15. Lasagni L, et al. *Blood* 2007 ; 109 : 4127-34.
16. Struyf S, et al. *Cancer Res* 2007 ; 67 : 5940-8.
17. Vandercappellen J, et al. *Mol Cancer Res* 2010 ; 8 : 322-34.
18. Folkman J. *Nat Med* 1995 ; 1 : 27-31.
19. Folkman J. *N Engl J Med* 1971 ; 285 : 1182-6.
20. Folkman J. *Nat Rev Drug Discov* 2007 ; 6 : 273-86.
21. Maione TE, et al. *Science* 1990 ; 247 : 77-9.
22. Davis GE, Senger DR. *Circ Res* 2005 ; 97 : 1093-107.
23. De S, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 7589-94.
24. Hofer E, Schweighofer B. *Thromb Haemost* 2007 ; 97 : 355-63.
25. Desgrosellier JS, Cheresch DA. *Nat Rev Cancer* 2010 ; 10 : 9-22.
26. Jouan V, et al. *Blood* 1999 ; 94 : 984-93.
27. Hagedorn M, et al. *FASEB J* 2001 ; 15 : 550-2.
28. Sharpe RJ, et al. *J Natl Cancer Inst* 1990 ; 82 : 848-53.
29. Tanaka T, et al. *Nat Med* 1997 ; 3 : 437-42.
30. Maione TE, et al. *Cancer Res* 1991 ; 51 : 2077-83.
31. Bello L, et al. *Clin Cancer Res* 2002 ; 8 : 3539-48.
32. Kolber DL, et al. *J Natl Cancer Inst* 1995 ; 87 : 304-309.
33. Zhang C, et al. *Blood* 2001 ; 98 : 610-7.
34. Lozano RM, et al. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 35723-34.
35. Perollet C, et al. *Blood* 1998 ; 91 : 3289-99.
36. Gengrinovitch S, et al. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 15059-65.
37. Sato Y, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 ; 172 : 595-600.
38. Lasagni L, et al. *J Exp Med* 2003 ; 197 : 1537-49.
39. Yu G, et al. *Blood* 2005 ; 105 : 3545-51.
40. Aidoudi S, et al. *PLoS One* 2008 ; 3 : 2657-61.
41. Ragona L, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 ; 382 : 26-9.
42. Sulpice E, et al. *Eur J Biochem* 2004 ; 271 : 3310-8.
43. Stuckey JA, et al. *Proteins* 1992 ; 14 : 277-87.
44. Mulloy B, Rider CC. *Biochem Soc Trans* 2006 ; 34 : 409-13.
45. Ornitz DM. *Bioessays* 2000 ; 22 : 108-12.
46. Dubrac A, et al. *Blood* 2010 ; 116 : 4703-11.
47. Petrai I, et al. *Int J Biochem Cell Biol* 2008 ; 40 : 1764-74.
48. Struyf S, et al. *Blood* 2011 ; 117 : 480-8.
49. Lambert MP, et al. *Blood* 2009 ; 114 : 2290-8.
50. Liang P, et al. *Haematologica*. 2012 Aug 28. [Epub ahead of print]
51. Maeshima Y, et al. *Science* 2002 ; 295 : 140-3.
52. Wickstrom SA, et al. *Cancer Res* 2002 ; 62 : 5580-9.
53. Rehn M, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001 ; 98 : 1024-9.
54. Sudhakar A, et al. *J Clin Invest* 2005 ; 115 : 2801-10.
55. Sudhakar A, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003 ; 100 : 4766-71.
56. Rüegg C, et al. *Nat Med* 1998 ; 4 : 408-14.
57. Hansell P, et al. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1995 ; 269 : H829-36.
58. Borgström P, et al. *Anticancer Res* 1998 ; 18 : 4035-41.