

# Maturation protéolytique du pro-VEGF-C et du pro-VEGF-D par les proprotéines convertases

## Rôle dans l'angiogenèse, la lymphangiogenèse et la tumorigenèse

Abdel-Majid Khatib<sup>1</sup>, Serge Evrard<sup>2</sup>, Géraldine Siegfried<sup>1</sup>

1. Université de Bordeaux, LAMC, Inserm U1029, Pessac, France

2. Groupe digestif, Institut Bergonié, Université de Bordeaux, Bordeaux, France

<majid.khatib@inserm.fr >

### Les proprotéines convertases et la famille du VEGF

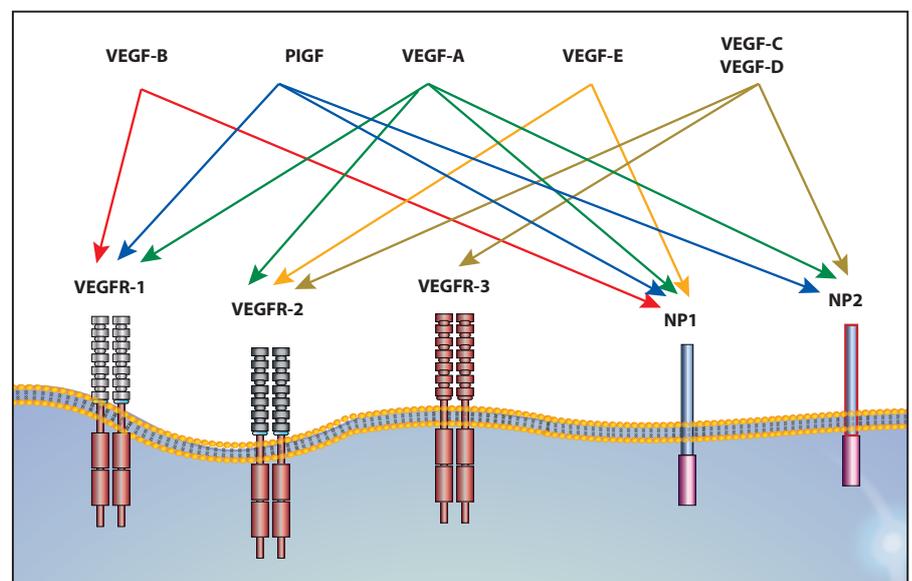
#### La famille du VEGF

Les VEGF constituent une famille de facteurs de croissance voisine de la famille des PDGF [1]. L'analyse de leur composition en acides aminés montre que tous les VEGF présentent un domaine très conservé appelé VHD (*VEGF homology domain*), ce domaine contenant les sites de liaison pour les récepteurs VEGF-R, pour l'héparine et pour la neuropiline (NP) [1] (*figure 1*). À ce jour, cinq isoformes de VEGF ont été identifiées chez les mammifères : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PIGF [1], ces facteurs de croissance ont des fonctions relativement spécifiques sur les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins et/ou lymphatiques par l'activation des récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2, et/ou VEGFR-3. Les corécepteurs NP influencent les effets de ces VEGF par leurs interactions avec leurs récepteurs (*figure 1*).

Les récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 sont exprimés principalement par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins, alors que l'expression du récepteur VEGFR-3 se limite à l'endothélium lymphatique. Le VEGF-A se lie à VEGFR-1 et VEGFR-2, tandis que le VEGF-B et PIGF sont des ligands sélectifs

de VEGFR-1 [2] (*figure 1*). Le VEGF-C et le VEGF-D sont des ligands spécifiques du récepteur VEGFR-3, mais peuvent également se lier à VEGFR-2 (*figure 1*). Ainsi, en fonction de leurs affinités pour les VEGFR-1 et R-2, les VEGF-A, -B et le PIGF exercent des activités angiogéniques, alors que les VEGF-C et -D sont principalement impliqués dans la formation de vaisseaux lymphatiques via l'activation de VEGFR-3 [3].

Au-delà de leur implication dans l'initiation, le développement et la maintenance du système vasculaire sanguin et lymphatique, les VEGF et VEGFR sont également impliqués dans divers processus pathologiques, y compris la progression tumorale et la dissémination métastatique. En effet, par l'activation de VEGFR-1 et de VEGFR-2 exprimés par les cellules endothéliales, le VEGF-A favorise la formation de nouveaux vaisseaux sanguins tumoraux et favorise ainsi la croissance de la tumeur. En revanche, le VEGF-C, en interagissant avec les VEGFR-3 et VEGFR-2, induit la formation des vaisseaux sanguins et lymphatiques tumoraux et



**Figure 1.** Représentation schématique des cinq facteurs de croissance VEGF (VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PIGF) et de leurs interactions avec les trois récepteurs à activité tyrosine kinase (VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3) et les deux corécepteurs de type neuropiline NP. Le VEGF-E, homologue viral de VEGF-A, active exclusivement VEGFR-2.

favorise ainsi la diffusion métastatique passive de cellules tumorales dans les ganglions lymphatiques régionaux. Une autre isoforme des VEGF, le VEGF-E, qui provient du parapoxvirus Orf et présente une forte homologie avec le VEGF-A, semble activer uniquement le VEGFR-2 (*figure 1*).

## Les proprotéines convertases (PC)

Les proprotéines convertases (PC) sont des protéases qui clivent des précurseurs de protéines au motif général (K/R)-(X)<sub>n</sub>-(K/R), où X représente n'importe quel acide aminé et n le nombre d'acides aminés et peut prendre les valeurs 0, 2, 4 ou 6. À ce jour, 7 PC ont été identifiées : PC1, PC2, furine, PC4, PC5, PC7 et PACE4 [4-6]. Parmi les substrats des PC, on trouve des facteurs de croissance, des facteurs de coagulation, des chaînes d'intégrines, des récepteurs et des métalloprotéases [4-6]. Des inhibiteurs de ces PC ont été identifiés, certains ont été développés, en particulier le dérivé de l' $\alpha_1$ -antitrypsine ( $\alpha_1$ -PDX), qui est un inhibiteur de toutes les convertases. Les pro-régions des convertases sont également de bons inhibiteurs ; leurs effets sont plus spécifiques de chaque PC [4-6] ; ces pro-régions correspondent aux 80 à 100 acides aminés du côté N-terminal de chaque PC [4-6].

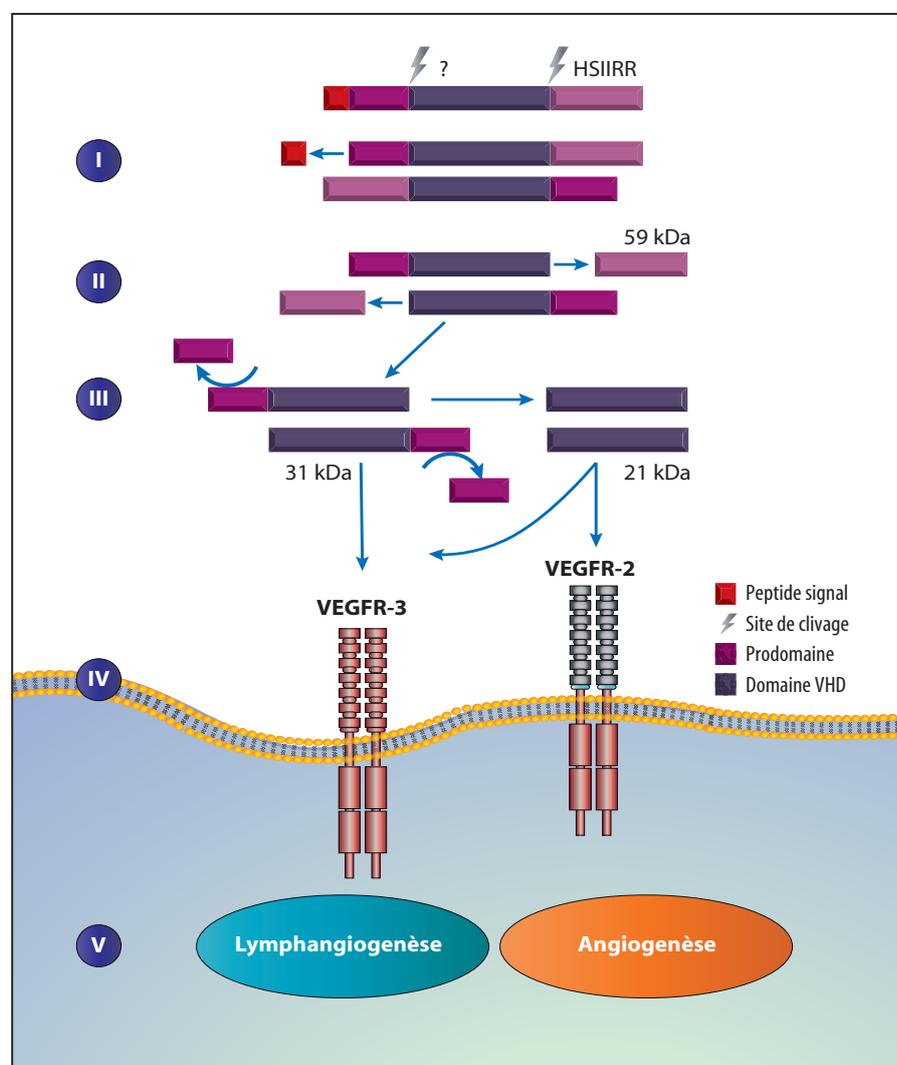
## Maturation du VEGF-C par les proprotéines convertases

Parmi les VEGF, seuls les précurseurs de pro-VEGF-C et pro-VEGF-D sont des substrats des proprotéines convertases. Après sa production et sa sécrétion sous forme de précurseur homodimère, le pro-VEGF-C est clivé au niveau du site HSIIRR<sup>227</sup>SL reconnu par les PC (*figure 2*). Ce clivage génère deux polypeptides : une forme de 31 kDa (côté N-terminal) et une forme de 29 kDa riche en cystéine (côté C-terminal) [7]. Par la suite, un clivage supplémentaire de la forme de 31 kDa génère un peptide de 21 kDa (*figure 2*). Le site de clivage HSIIRR<sup>227</sup>SL du VEGF-C correspond à un site universel pour les proprotéines convertases. Des expériences de transfection cellulaire et de digestion enzymatique ont démontré que seules les convertases furine, PC5

et PC7 clivent significativement le précurseur pro-VEGF-C [7]. De plus, la maturation du pro-VEGF-C est inhibée par les pro-régions de la furine (ppFurin), PC5 (ppPC5) et PACE4 (ppPACE4), et par les serpines  $\alpha_1$ -PDX [7]. Le clivage du pro-VEGF-C est également inhibé par des peptides synthétiques et par certaines molécules chimiques [8].

Le clivage intracellulaire du pro-VEGF-C n'est pas une condition préalable à sa sécrétion ; ainsi la forme pro-VEGF-C s'accumule dans les milieux de culture provenant de cellules déficientes en activité PC ou

des cellules exprimant des inhibiteurs des PC [7], ou encore des cellules exprimant un mutant non clivable de pro-VEGF-C généré par mutation du site de clivage des convertases (mutation de RR<sup>227</sup> en SS<sup>227</sup>). La forme de 31 kDa active spécifiquement le récepteur VEGFR-2 mais la conversion vers la forme de 21 kDa de VEGF-C augmente fortement l'affinité du VEGF-C pour le VEGFR-2 (*figure 2*) [9, 10]. L'inhibition du clivage de pro-VEGF-C inhibe la genèse de ces deux formes et bloque l'angiogenèse physiologique et pathologique.



**Figure 2.** Maturation protéolytique du pro-VEGF-C. La séquence en acides aminés du précurseur du VEGF-C contient un peptide signal, le domaine d'homologie de VEGF (VHD), un prodomaine N-terminal et un prodomaine C-terminal. Après synthèse, deux structures homodimères de VEGF-C s'associent pour former un dimère avec une configuration anti-parallèle (I, II). Par la suite, le clivage du peptide signal génère une forme de 31 kDa (II). Ce dernier peut être clivé par une protéase non identifiée (point d'interrogation) et générer une forme de 21 kDa (III). L'activation du VEGFR-2 induit la formation des vaisseaux sanguins et celle de VEGFR-3 (IV) induit la lymphangiogenèse (V).

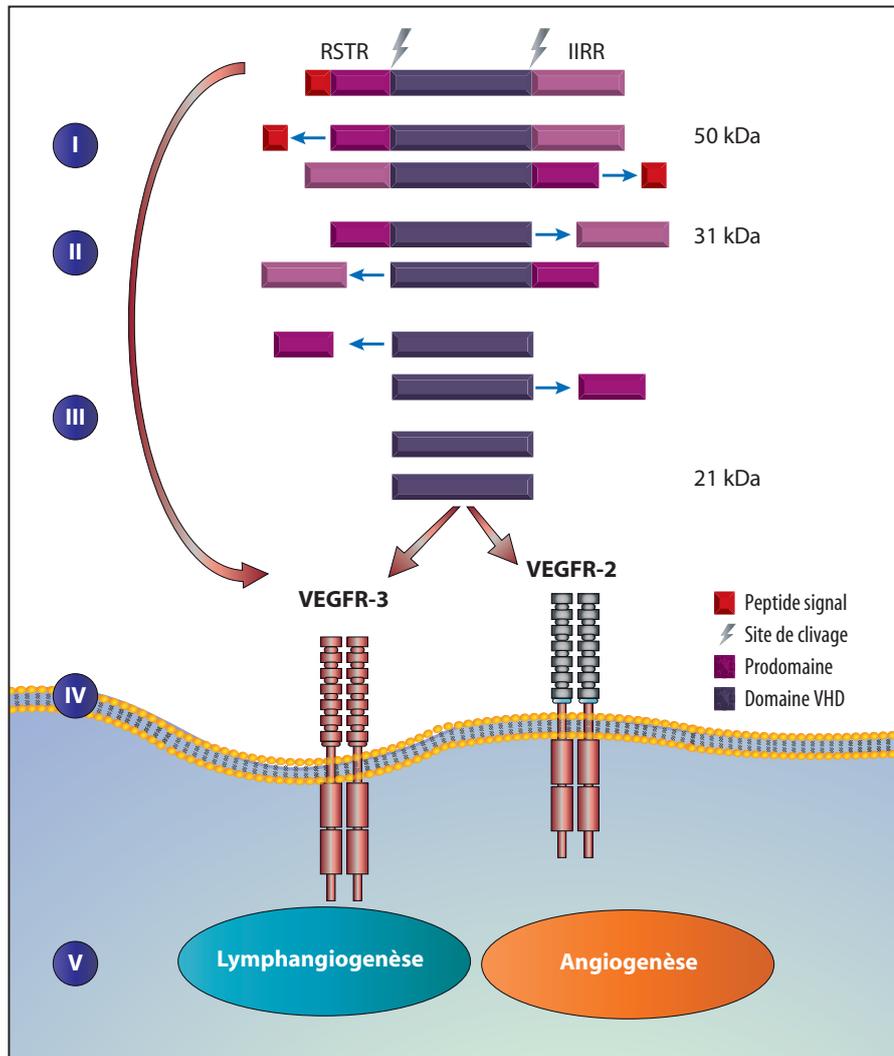


## Maturation du VEGF-C et angiogenèse physiologique : modèle de régénération de la nageoire chez le poisson zèbre

Après une lésion ou une amputation des nageoires, le processus de régénération chez le poisson zèbre commence avec la cicatrisation des plaies et la formation d'une masse de cellules progénitrices (blastème). Cette zone de croissance apicale présente une activité augmentée de migration et de prolifération cellulaire indispensable au remplacement des structures endommagées. L'utilisation de la souche transgénique

de poisson zèbre TG (Fli1: EGFP) qui exprime spécifiquement la protéine fluorescente EGFP dans ses cellules endothéliales [11] a permis de montrer que la régénération des vaisseaux sanguins commence rapidement après la lésion par la formation d'un plexus vasculaire. À ce stade, il n'y a pas de distinction claire entre la morphologie des artères et celle des veines néoformées. Au cours de la régénération, le remodelage vasculaire conduit progressivement à l'acquisition des caractéristiques morphologiques des artères et des veines. Ces processus sont associés à une augmentation de

l'expression de plusieurs gènes codant des molécules sécrétées qui induisent la prolifération et la migration cellulaires autour de la lésion [12, 13]. Parmi ces molécules, on retrouve divers facteurs de croissance, des métalloprotéases et des protéines de la matrice extracellulaire identifiées comme étant des substrats des convertases, y compris le VEGF-C [14]. Chez le poisson zèbre l'expression du VEGF-C est requise au cours du développement embryonnaire où il induit la vasculogenèse et l'angiogenèse [15]. Lors de la régénération de la nageoire caudale chez le poisson zèbre après amputation, l'expression du VEGF-C coïncide avec l'expression des convertases furine et PC5 [16]. L'expression de ces gènes augmente durant tout le processus de régénération des nageoires et diminue par la suite progressivement jusqu'à une expression normale lorsque la régénération des nageoires est complète. L'induction de l'expression du VEGF-C et de ses enzymes activatrices au cours des processus de régénération renforce le lien fonctionnel entre ces molécules [16]. Ainsi le pro-VEGF-C sécrété et accumulé est immédiatement maturé par la présence des PC dont la sécrétion est augmentée au cours de la régénération caudale. La corrélation temporelle entre l'expression du VEGF-C et de ses convertases a été également observée chez l'embryon de souris [16] suggérant un rôle des convertases dans la régulation des fonctions du VEGF-C au cours du développement embryonnaire. Pour étudier le rôle biologique de la maturation du pro-VEGF-C dans la formation des vaisseaux normaux, les effets d'un pro-VEGF-C non clivable par les PC par mutation [16] ont été évalués au cours de la régénération des nageoires de poisson zèbre. Alors que la surexpression de pro-VEGF-C de type sauvage dans la zone amputée de la nageoire n'induit aucun effet sur les processus de régénération, la surexpression du mutant non clivable du pro-VEGF-C dans les mêmes conditions inhibe la régénération des nageoires [16].



**Figure 3.** Maturation protéolytique du pro-VEGF-D. Deux chaînes du pro-VEGF-D s'associent pour former un dimère avec une configuration anti-parallèle (I). Le premier clivage par les PC génère une forme de 31 kDa (II). Le clivage au niveau du deuxième site génère une forme de 21 kDa (III). Tandis que le pro-VEGF-D active uniquement le VEGFR-3, la forme de 21 kDa est capable d'activer le VEGFR-2 et le VEGFR-3 (IV). L'activation du VEGFR-2 induit l'angiogenèse et l'activation de VEGFR-3 induit la lymphangiogenèse (V).

## Maturation du pro-VEGF-C dans l'angiogenèse tumorale et la lymphangiogenèse

Le VEGF-C et sa principale convertase, la furine, sont co-exprimés dans divers tissus comme le cœur, les poumons et les reins.

Au cours de la progression tumorale, l'expression de la furine est augmentée dans les micro-vaisseaux, suggérant la participation de cette PC dans la maturation de plusieurs membres de la famille PDGF/VEGF, y compris le VEGF-C [17, 18], participant ainsi à l'augmentation de facteurs angiogéniques matures et actifs. En effet, comme nous l'avons décrit lors de la maturation du pro-VEGF-C chez le poisson zèbre pendant la régénération des nageoires [16], la surexpression du pro-VEGF-C de type sauvage dans des cellules tumorales n'affecte pas significativement la capacité de ces cellules à induire la formation de tumeurs lorsque ces cellules sont inoculées chez la souris. En revanche, lorsque ces cellules tumorales surexpriment un mutant non clivable du VEGF-C, les tumeurs développées par les souris sont de taille réduite [7]. Les tumeurs développent des vaisseaux sanguins et lymphatiques en abondance lorsqu'elles dérivent de tumeurs de souris inoculées avec des cellules exprimant de façon stable le pro-VEGF-C de type sauvage [7]. En revanche, dans les tumeurs provenant de souris inoculées avec des cellules transfectées de façon stable par le mutant non clivable du pro-VEGF-C, le nombre de vaisseaux sanguins et lymphatiques est très diminué [7]. Cet effet anti-angiogénique du mutant du pro-VEGF-C semble être lié à sa capacité à déplacer efficacement, *in vivo*, le VEGF-C mature de ses récepteurs, VEGFR-2 et VEGFR-3. Ainsi, le mutant de pro-VEGF-C empêche l'activation des récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3 l'induction de leurs fonctions pro-angiogéniques (prolifération et migration cellulaires). En effet, des analyses *in vitro* ont montré que le mutant pro-VEGF-C est incapable d'induire l'activation de AKT et de ERK et d'induire la prolifération cellulaire [16]. Ainsi, il semblerait que la sécrétion du mutant pro-VEGF-C dans le microenvironnement de la nageoire du poisson zèbre en cours de régénération et dans la tumeur en développement, peut entrer en compétition avec le VEGF-C actif et/ou le VEGF-A produit localement par des cellules endothéliales et hématopoïétiques pour le même récepteur. Par la suite, cette compétition contrecarre l'action du VEGF-C en bloquant la formation des vaisseaux sanguins et lymphatiques nécessaires au remo-

delage des tissus au cours de l'angiogenèse physiologique (régénération des nageoires) et l'angiogenèse pathologique (croissance tumorale). Le VEGF-C peut également agir en synergie avec les différents membres de la famille des VEGF [19, 20], ce processus est crucial lors de la régénération des vaisseaux chez le poisson zèbre et au cours de l'angiogenèse tumorale [21, 22]. L'interaction entre VEGF-A et VEGF-C, par l'intermédiaire de VEGFR-2, suggère que ces facteurs angiogéniques peuvent entrer en compétition pour ce récepteur [20]. Le mutant pro-VEGF-C peut aussi empêcher l'interaction de VEGF-C et/ou de VEGF-A avec son récepteur, suggérant qu'il possède des caractéristiques de dominance négative. Il a été montré que la forme mature du facteur de croissance pro-NGF induit des voies de signalisation et des activités biologiques différentes de celles induites par son précurseur protéique [23] ; un mécanisme similaire pourrait être impliqué dans les actions différentes de pro-VEGF-C et VEGF-C au cours de la régénération caudale et de la progression tumorale.

### Maturation du VEGF-D par les proprotéines convertases

Des études de co-localisation tissulaire du VEGF-D et de la furine ont montré que ces deux molécules sont présentes à proximité des vaisseaux lymphatiques. D'autres études ont montré que les cellules inflammatoires situées dans cette région co-expriment également la furine et le VEGF-D. Dans l'endomètre humain, diverses cellules associées à l'épithélium luminal et au stroma semblent également co-exprimer la furine et le VEGF-D [24]. Ces co-localisations suggèrent un rôle de la furine dans la maturation et l'activation du pro-VEGF-D. La maturation du pro-VEGF-D (~50 kDa) se produit principalement dans l'environnement extracellulaire. Sécrété en tant que précurseur homodimère, le pro-VEGF-D subit deux clivages protéolytiques qui éliminent les propeptides *N*- et *C*-terminaux [24, 25] (*figure 3*). Le peptide de ~31 kDa correspond au propeptide *N*-terminal et au VHD, alors que le peptide de ~21 kDa correspond à la forme mature du VEGF-D [24]. L'élimination de ces deux propeptides augmente l'affinité du VEGF-D pour ses

récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3 [24, 25]. En effet, bien qu'actif sous forme de précurseur qui induit la lymphangiogenèse, le clivage du pro-VEGF-D génère un peptide capable d'induire à la fois l'angiogenèse et la lymphangiogenèse [24, 25] (*figure 6*). La mutation de VEGF-D au niveau des acides aminés R85 et R88 (du propeptide *N*-terminal) [25] et des acides aminés R204 et R205 (du propeptide *C*-terminal) (*figure 3*) génère un mutant pro-VEGF-D non clivable. Comme pour le pro-VEGF-C, le clivage de ce précurseur n'est pas nécessaire à sa sécrétion [24]. Cependant, la mutation du site de clivage du côté pro-peptide *N*-terminal est suffisante pour bloquer complètement le clivage du propeptide *N*-terminal ; cela suggère que la production de la forme mature de VEGF-D est un processus de clivage séquentiel ; ce processus existe également pour la maturation du PDGF-B, un autre membre de la famille des PDGF/VEGF [26]. D'autres études ont révélé que le pro-VEGF-D se lie au VEGFR-2 avec une affinité 17 000 fois plus faible que celle du VEGF-D ; cependant l'affinité du VEGF-D mature pour le VEGFR-3 est seulement ~18 fois plus élevée que celle du pro-VEGF-D [25, 27].

Des études *in vitro* ont montré que la maturation du pro-VEGF-D est médiée par la sérine-protéase plasmine [28] ; des études *in vivo* ont montré que ce clivage est principalement effectué par les proprotéines convertases [24]. Ainsi, l'utilisation de l'inhibiteur général des proprotéines convertases, le décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-chlorométhylcétone (dec-RVKR-CMK) [24], bloque la maturation du pro-VEGF-D au niveau des deux sites (RSTR88 et IIRR205) du pro-VEGF-D. L'utilisation de la lignée cellulaire LoVo de carcinome du côlon humain, qui présente une activité déficiente en convertases, a permis de montrer que ces cellules sont incapables de générer des formes matures de pro-VEGF-D. L'expression de la furine, du PC5 ou du PC7 dans ces cellules conduit à la maturation de ce précurseur. L'expression de la furine dans ces cellules induit une conversion complète de la forme 50 kDa du pro-VEGF-D en une forme mature de 21 kDa [24], et l'expression de PC5 aboutit à une conversion



partielle de pro-VEGF-D en forme mature (21 kDa) et en forme ~31 kDa, qui correspondent à la forme propeptide N-terminal et au VHD, respectivement. L'expression de PC7 dans ces cellules induit une conversion partielle de pro-VEGF-D en la forme de 31 kDa contenant le propeptide N-terminal et le VHD, mais pas à la forme de VEGF-D mature. Ces observations suggèrent que la furine et le PC5 peuvent favoriser le clivage N- et C-terminal du pro-VEGF-D et que le PC7 peut induire seulement le clivage du propeptide C-terminal [24].

## Synthèse et conclusions

Les deux facteurs pro-angiogéniques VEGF-C et VEGF-D ont le même arrangement structural ; ils impliquent furine, PC5 et/ou PC7 pour leur clivage et maturation, mais la ou les enzyme(s) qui clive(nt) le propeptide N-terminal de VEGF-C demeurent mal connue(s). Les VEGF-C et VEGF-D sont à la fois promoteurs de l'angiogenèse normale et tumorale et de la lymphangiogenèse. Des études cliniques ont montré que l'expression de VEGF-C et VEGF-D dans les cancers humains peut être corrélée avec la dissémination métastatique et inversement à la survie des patients. Cependant, l'implication du VEGF-D dans la formation des

métastases semble moins générale, ce qui suggère que son aptitude à promouvoir la dissémination métastatique par voie lymphatique dépend du type de tumeurs.

La contribution des PC dans l'activation du pro-VEGF-C et du pro-VEGF-D renforce l'idée de considérer l'utilisation des PC comme de nouvelles cibles en thérapie anticancéreuse. En effet, des études récentes utilisant des modèles animaux de cancer ont révélé l'existence d'une relation entre l'activité des convertases et la vascularisation dans les tumeurs. Ainsi, l'inhibition pharmacologique des PC dans un modèle de xénogreffe de tumeur a conduit à une diminution de l'incidence et de la taille des tumeurs, associée à une réduction de la vascularisation tumorale [29].

**Liens d'intérêts :** Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

1. McDonald NQ, Hendrickson WA. *Cell* 1993 ; 73 : 421-4.
2. Takahashi H, Shibuya M. *Clin Sci (Lond)* 2005 ; 109 : 227-41.
3. Tammela T, et al. *Cardiovasc Res* 2005 ; 65 : 550-63.
4. Seidah NG, Prat A. *Nat Rev Drug Discov* 2012 ; 11 : 367-83.
5. Creemers JW, Khatib AM. *Front Biosci* 2008 ; 13 : 4960-71.

6. Scamuffa N, et al. *FASEB J* 2006 ; 20 : 1954-63.
7. Siegfried G, et al. *J Clin Invest* 2003 ; 111 : 1723-32.
8. Basak A, et al. *PLoS One* 2009 ; 4 : e7700.
9. Pepper MS, et al. *Cell Tissue Res* 2003 ; 314 : 167-77.
10. Petrova TV, et al. *Exp Cell Res* 1999 ; 253 : 117-20.
11. Raghunath M, et al. *Biochem Biophys Res Commun* 2009 ; 378 : 766-71.
12. Akimenko MA, et al. *Dev Dyn* 2003 ; 226 : 190-201.
13. Johnson SL, Bennett P. *Methods Cell Biol* 1999 ; 9 : 301-11.
14. Lien CL, et al. *PLoS Biol* 2006 ; e260.
15. Ober EA, et al. *EMBO Rep* 2004 ; 5 : 78-84.
16. Khatib AM, et al. *PLoS One* 2010 ; 5 : e11438.
17. Siegfried G, et al. *Cancer Res* 2003 ; 63 : 1458-63.
18. Joukov V, et al. *EMBO J* 1997 ; 16 : 3898-911.
19. Pepper MS, et al. *J Cell Physiol* 1998 ; 177 : 439-52.
20. Lymboussaki A, et al. *Circ Res* 1999 ; 85 : 992-9.
21. Covassin LD, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006 ; 103 : 6554-9.
22. Poss KD, et al. *Dev Biol* 2000 ; 222 : 347-58.
23. Lee R, et al. *Science* 2001 ; 294 : 1945-8.
24. McColl BK, et al. *FASEB J* 2007 ; 21 : 1088-98.
25. Stackner SA, et al. *J Biol Chem* 1999 ; 274 : 32127-36.
26. Siegfried G, et al. *Oncogene* 2005 ; 24 : 6925-35.
27. Achen MG, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 548-53.
28. McColl BK, et al. *J Exp Med* 2003 ; 198 : 863-8.
29. Scamuffa N, et al. *J Clin Invest* 2008 ; 118 : 352-63.