N° d'ordre :

Université Paris XIII – Léonard De Vinci

U.F.R. Santé Médecine et Biologie Humaine

THESE

Pour obtenir le grade de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 13

Discipline : Biologie moléculaire et cellulaire

Présentée et soutenue publiquement par :

Loïc MAILLARD

Le 15 décembre 2014

Implication du domaine intracellulaire du syndécane-4 dans l'angiogenèse et le recrutement monocytaire induits par la chimiokine RANTES/CCL5

Ecole doctorale : Institut Galilée

Unité de Recherche : Inserm U1148, Laboratory for Vascular Translational Science

Equipe : Bio-ingénierie Cardiovasculaire

Groupe : Biothérapies et Glycoconjugués

Directrice de thèse : Dr. Angela SUTTON

JURY

Dr. Patricia ROUSSELLE

Pr. Fabrice ALLAIN

Dr. Carole AMANT

Pr. Dominique LEDOUX

Pr. Nathalie CHARNAUX

Dr. Angela SUTTON

Rapporteur Rapporteur Examinateur Examinateur Examinateur Directrice de thèse

Remerciements

Tout d'abord je tiens à remercier les membres de mon jury d'avoir accepté de juger mes travaux de recherche. Je remercie particulièrement mes rapporteurs, le Dr. Patricia Rousselle et le Pr. Fabrice Allain pour leur temps passé à la lecture de mon manuscrit. Je remercie également le Dr. Carole Amant et le Pr. Dominique Ledoux pour examiner mon travail de recherche.

Je remercie le Dr. Jean-Baptiste Michel pour m'avoir accueilli au sein de l'unité Inserm U698 Hémostase-Bio-ingénierie-Remodelage Cardiovasculaire dès 2010.

Je remercie également le Dr. Didier Letourneur pour m'avoir permis de commencer mes travaux de recherche dans son équipe de Bio-ingénierie Cardiovasculaire puis de continuer mes activités de recherche au sein de l'unité Inserm U1148 Laboratory for Vascular Translational Science.

Je remercie particulièrement le Pr. Nathalie Charnaux pour m'avoir accueilli au sein du groupe Biothérapies et Glycoconjugués depuis mon stage de première année de master en 2010. Je la remercie pour m'avoir permis d'entrer dans le monde de la recherche et de m'avoir fait découvrir la recherche internationale en me permettant d'effectuer à deux reprises un stage de recherche au Japon durant ma deuxième et troisième année de thèse. Je la remercie également pour ses précieux conseils et sa disponibilité.

Je remercie bien évidemment ma directrice de thèse, le Dr. Angela Sutton, de m'avoir fait confiance après mon stage de deuxième année de master pour m'avoir proposé de continuer en thèse. Je la remercie également pour son soutien et son aide pendant toute la période que j'ai passé dans ce laboratoire. Sa disponibilité et sa sympathie m'ont permis d'effectuer ma thèse dans de bonnes conditions. Je la remercie également pour les vidéoconférences que nous avons effectuées lors de mes séjours au Japon, ce qui m'a permis de parler français quelques heures par semaine.

Je tiens à remercier le Dr. Hanna Hlawaty pour m'avoir fait entrer dans le laboratoire pour mon stage de première année de master. Je la remercie pour son aide, son soutien et sa sympathie tout au long de ma période passée dans ce laboratoire. Je la remercie également pour nous avoir mis en contact avec le laboratoire japonais, c'est grâce à elle que la collaboration a commencé. Je la remercie pour tous les bons moments passés ensemble que ce soit à Bobigny ou au Japon. Je remercie également l'ensemble de l'équipe de Bobigny, le Pr. Olivier Oudar, le Dr. Erwan Guyot, le Dr. Christelle Laguillier-Morizot, le Dr. Benjamin Richard, le Pr. Véronique Eder et plus particulièrement Oualid Haddad pour son aide technique, administrative et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier les anciens membres du laboratoire pour les bons moments passés ensemble et pour leur aide. Le Dr. Nadine Suffee qui a commencé le travail sur l'angiogenèse induite par RANTES/CCL5. Je pense également au Dr. Faten Charni avec qui m'a soutenu lors de mon stage de deuxième année de master lorsque les résultats se faisaient attendre. Je remercie le Dr. Véronique Friand et le Dr. Fanny Chmilewsky qui ont commencé la construction des plasmides que j'ai utilisés lors de ma thèse.

Je remercie les différents étudiants passés au sein du laboratoire Latifa Gadi, Widdy Bartis, Batia Patcher, Laëtitia Bey et Wided Chaalali pour leurs différents stages avec qui nous nous sommes bien amusés au laboratoire et en dehors. Je pense particulièrement aux deux étudiantes qui ont travaillé sur le même sujet que moi, à savoir Emeline Desbois avec nos playlists Disney, je lui souhaite bon courage pour sa future carrière d'assistante de recherche clinique et Sana Bakhouche à qui je souhaite bonne chance avec sa petite fille et ses élèves au Qatar.

J'ai une pensé pour les doctorants actuels au laboratoire avec qui j'ai passé de bon moments et leur souhaite bon courage. La fin de thèse arrive vite alors bon courage à Sophie Vo, Nicolas Marinval et Amena Butt qui vient d'arriver. Je souhaite bon courage également à Hadjer Mamoune qui vient de nous rejoindre pour son stage de deuxième année de master. Je remercie aussi Dorian Foissy-Robin, on a passé beaucoup de bons moments ensemble et je lui souhaite bon courage pour la préparation des TP.

Je remercie le Pr. Naoaki Saito pour son invitation à deux reprises au sein de son laboratoire à Kobe au Japon, il m'a permis d'avancer dans mon travail de recherche mais également d'enrichir ma culture japonaise. Je remercie le Dr. Takehiko Ueyama pour son aide technique et son humour. Je n'oublierais pas leur gentillesse et la cuisine japonaise qu'ils m'ont fait découvrir, principalement le bœuf de Kobe, un régal. Je remercie l'ensemble du laboratoire pour leur accueil et leur gentillesse, principalement le Dr. Naoko Adachi, le Dr. Toshihiko Shirafuji et le Dr. Shigefumi Morioka. J'ai une pensé pour le Dr. Taiji Ishii et le Dr. Megumi Sakuma et cette soirée inoubliable au karaoké et surtout le Dr. Yuzuru Ninoyu qui m'a énormément instruit sur les facettes de la culture japonaise et sans oublier la découverte des sources d'eau chaude.

Je remercie une nouvelle fois toute l'équipe de Bobigny et de Kobe, ce fut un véritable plaisir de travailler avec vous tous.

Pour finir, je tiens à remercier ma femme Nathalie Nguyen, qui m'a soutenu tout au long de mon doctorat et qui a continué à me soutenir malgré la distance qui nous a séparés pendant quatre long mois. Sans son soutien et son appui cette thèse n'aurait pas été possible. Je lui dédicace cette thèse.

Table des matières

Remerciements	2
Table des matières	5
Table des figures	9
Liste des abréviations	
Avant-propos	
Introduction	
I. Angiogenèse	
1. Généralités	20
A. Structure d'un vaisseau sanguin	
B. Vasculogenèse, artériogenèse ou angiogenèse ?	
2. Angiogenèse physiologique	27
A. L'angiogenèse, deux mécanismes	
a. Invagination	
b. Bourgeonnement	
i. Initiation et expansion	
ii. Tubulogenèse et maturation	
B. Facteurs de croissance angiogéniques	
a. VEGF	
b. PDGF	
c. FGF	
3. Angiogenèse pathologique	40
A. Cancer	
a. Généralités	
b. Angiogenèse et développement cancéreux	
B. Athérosclérose	
a. Première cause de mortalité mondiale	
b. Structure de la plaque d'athérome	
c. Angiogenèse et athérosclérose	
4. Thérapies angiogéniques	50
A. Thérapies anti-angiogéniques	
B. Thérapies pro-angiogéniques	53

11.		Chi	miok	ines	57
	1.	C	Cytol	kine chimio-attractante	57
		A.	Str	ucture	57
		В.	De	ux cystéines, quatre familles de chimiokines	58
	2.	F	Réce	pteurs aux Chimiokines	59
		A.	Ré	cepteurs classiques RCPG	59
		а		Sept domaines transmembranaires	59
		b). (Classe A et protéines G	60
			i.	RCPG de classe A	60
			ii.	Protéines G	63
		С	. 1	Désensibilisation et régulation	64
		Β.	Les	GAG	67
		а		Structure	67
		b). 9	Sulfaté ou non	68
		С	. I	Réservoir à chimiokines ou co-Récepteur fonctionnel	70
		d	l. I	Protéoglycanes	71
			i.	Protéoglycanes matriciels	71
			ii.	Protéoglycanes membranaires	72
			iii.	La famille des syndécanes	73
		C.	Le	Syndécane-4	75
		а	. I	nteractions	75
			i.	Relation avec le milieu extracellulaire	75
			ii.	Oligomérisation dans la membrane	78
			iii.	Domaine intracellulaire	78
		b). 9	Signalisation intracellulaire	79
		С	. I	Rôles	81
			i.	Co-récepteur fonctionnel	81
			ii.	Développement embryonnaire	82
			iii.	Inflammation et réparation tissulaire	83
			iv.	Angiogenèse et cancer	84
			v.	Autres pathologies	85
	3.	F	lôles	des chimiokines	85
		A.	Dé	veloppement embryonnaire	85
		В.	Inf	ammation et Recrutement cellulaire	86

	а	. Mécanisme du recrutement des leucocytes	86
	b	. Devenir dans le tissu	92
(C.	Réparation tissulaire	94
	D.	Angiogenèse et cancer	95
4.	R	égulation du niveau d'expression et de l'activité des chimiokines	97
	A.	Régulation génique	97
I	Β.	Régulation protéique	98
5.	R	ANTES/CCL5	99
	A.	Généralités	99
l	B.	Structure	100
(C.	Rôles	102
	а	. Inflammation et recrutement cellulaire	103
	b	. Réparation tissulaire	105
	C	Cancer et angiogenèse	105
	d	. Infections virales	109
	D.	Thérapies ciblant RANTES/CCL5	110
III.	В	ut du projet	112
Résulta	ts		. 114
Résulta Part I	i ts I : In	volvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis	114 115
Résulta Part I 1.	n ts I : In A	nvolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis article 1 : RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan4-P	114 115 ΚCα
Résulta Part I 1. sig	ts I : In A gnal	avolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis article 1 : RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan4-P ing pathway	114 115 ΚCα 116
Résulta Part I 1. sig	n ts I : In A gnal A.	avolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis article 1 : RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan4-P ing pathway Complementary article data	114 115 ΚCα 116
Résulta Part I 1. sig	i ts I : In A gnal A. a	avolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis article 1 : RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan4-P ing pathway Complementary article data EGFP tag in C-terminal do not disturb SDC-4 function	114 115 KCα 116 127
Résulta Part I 1. sig	i ts I : In A gnal A. a b	avolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis article 1 : RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan4-P ing pathway Complementary article data . EGFP tag in C-terminal do not disturb SDC-4 function . SDC-4-EGFP mutants are expressed at the cell membrane	114 115 ΚCα 116 127 127 128
Résulta Part I 1. sig	ts I : Ir A gnal A. a b c.	avolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis article 1 : RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan4-P ing pathway Complementary article data EGFP tag in C-terminal do not disturb SDC-4 function SDC-4-EGFP mutants are expressed at the cell membrane SDC-4-EGFP mutants are sulfated	114 115 ΚCα 116 127 127 128 128
Résulta Part I 1. sig	ts I : In A gnal A. a b c. d	avolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis article 1 : RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan4-P ing pathway Complementary article data EGFP tag in C-terminal do not disturb SDC-4 function SDC-4-EGFP mutants are expressed at the cell membrane SDC-4-EGFP mutants are sulfated	114 115 ΚCα 116 127 127 128 129 131
Résulta Part I 1. sig	its A gnal A. a b c. d e b	avolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis article 1 : RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan4-P ing pathway Complementary article data EGFP tag in C-terminal do not disturb SDC-4 function SDC-4-EGFP mutants are expressed at the cell membrane SDC-4-EGFP mutants are sulfated SDC-4-EGFP mutants are sulfated SDC-4-EGFP are glycosylated RANTES/CCL5-induced wound healing migration and transwell invasion are mediat y SDC-4 intracellular domain	114 115 ΚCα 116 127 127 128 129 131 ced
Résulta Part I 1. sig	tts A gnal A. a b c d c d f. ir	avolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis article 1 : RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan4-P ing pathway Complementary article data EGFP tag in C-terminal do not disturb SDC-4 function SDC-4-EGFP mutants are expressed at the cell membrane SDC-4-EGFP mutants are sulfated SDC-4-EGFP mutants are sulfated SDC-4-EGFP are glycosylated RANTES/CCL5-induced wound healing migration and transwell invasion are mediat y SDC-4 intracellular domain RANTES/CCL5-induced PKC-α membrane translocation is mediated by SDC-4	114 115 KCα 116 127 127 128 129 131 ed 132
Résulta Part I 1. sig	ts A gnal A. a b c d c b f. f. s	avolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis	114 115 KCa 116 127 127 128 129 131 ed 132 135 136
Résulta Part I 1. sig	ts A gnal A. a b c d e b f. ir S A.	avolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis article 1 : RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan4-P ing pathway Complementary article data EGFP tag in C-terminal do not disturb SDC-4 function SDC-4-EGFP mutants are expressed at the cell membrane SDC-4-EGFP mutants are sulfated SDC-4-EGFP are glycosylated RANTES/CCL5-induced wound healing migration and transwell invasion are mediat y SDC-4 intracellular domain RANTES/CCL5-induced PKC-α membrane translocation is mediated by SDC-4 htracellular domain SDC-4-RANTES/CCL5 axis induces intracellular signaling	114 115 KCa 116 127 127 128 129 131 ed 132 135 136
Résulta Part I 1. sig	its A gnal A. a b c. d c. d f. f. S A. a	avolvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis	114 115 KCα 116 127 127 128 129 131 ed 132 135 136 136 s

В	. R/	ANTES/CCL5 GAG-binding sequence is necessary for its biological effects
	a.	RANTES/CCL5-induced angiogenesis is mediated by RANTES/CCL5 GAG-binding
	sequ	ience
	b.	RANTES/CCL5-induced PKC- α and PKC- δ activation are mediated by RANTES/CCL5
	GAG	i-binding sequence
Part 2	: Invo	olvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced monocyte recruitment
1.	Arti	cle 2 : RANTES/CCL5 mediated-monocyte recruitment depend on the syndecan-
4 si	gnalir	ng pathway168
Discussio	on	
Perspect	ives	
Bibliogra	phie.	
Annexes		
Matér	iels et	t Méthodes
Comm	iunica	itions
Autre	public	cation

Table des figures

Figure 1 : Structure d'un vaisseau sanguin20
Figure 2 : Composition de l'adventice22
Figure 3 : Vasculogenèse24
Figure 4 : Artériogenèse
Figure 5 : Angiogenèse par invagination
Figure 6 : Angiogenèse par bourgeonnement29
Figure 7 : Initiation du bourgeon angiogénique31
Figure 8 : Maturation du nouveau vaisseau sanguin
Figure 9 : Système VEGF-VEGFR
Figure 10 : Signalisation du VEGFR235
Figure 11 : Système PDGF-PDGFR 36
Figure 12 : Implication du PDGF dans le cancer37
Figure 13 : Signalisation du complexe FGF-FGFR 39
Figure 14 : Origine des cellules endothéliales tumorales42
Figure 15 : Stress mécanique et plaque d'athérome45
Figure 16 : Infiltration monocytaire dans le développement de la plaque d'athérome 47
Figure 17 : Facteurs de déstabilisation de la plaque d'athérome
Figure 18 : Angiogenèse dans la plaque d'athérome50
Figure 19 : Classes de chimiokines et récepteur classique57
Figure 20 : Système chimiokine-RCPG61
Figure 21 : Sites d'interaction chimiokine-RCPG62
Figure 22 : Signalisation intracellulaire des protéines G63
Figure 23 : Désensibilisation du RCPG par la voie GRK/arrestine65
Figure 24 : Récepteurs atypiques 67
Figure 25 : Structure des GAG 68
Figure 26 : Voie de synthèse des GAG à chaînes HS69
Figure 27 : La famille des syndécanes74
Figure 28 : Sites de clivage protéolytiques des domaines extracellulaires des SDC-1 et SDC-4

Figure 29 : Interaction intracellulaire du SDC-4	79
Figure 30 : Signalisation intracellulaire SDC-4 dépendante induite par le FGF-2	80
Figure 31 : Internalisation du complexe FGF-2/FGFR par le SDC-4	82
Figure 32 : Etapes du recrutement leucocytaire	87
Figure 33 : Signalisation intracellulaire dans le recrutement leucocytaire	89
Figure 34 : Rôle de l'état de phosphorylation de la VE-cadhérine dans le recrutement leucocytaire	91
Figure 35 : Transmigration transendothéliale	92
Figure 36 : Implication des monocytes dans le développement de la plaque d'athérome	94
Figure 37 : Implication des chimiokines dans la réparation musculaire	95
Figure 38 : Promoteur de RANTES/CCL5	00
Figure 39 : Structure tridimensionnelle de la chimiokine RANTES/CCL51	01
Figure 40 : Interaction de RANTES/CCL5 avec ses récepteurs1	02
Figure 41 : Implication de RANTES/CCL5 dans la progression tumorale1	07
Figure 42 : But du projet1	13
Figure 43 : Functionality of EGFP-SDC-4 construct1	28
Figure 44 : Membrane expression of EGFP-SDC-4 mutated construct1	29
Figure 45 : Membrane expression of HS-chains for EGFP-SDC-4 mutated construct1	30
Figure 46 : EXT-1 and EXT-2 expression for EGFP-SDC-4 overexpressed cells1	31
Figure 47 : Over or restore SDC-4 expression on transfected HUV-EC-Cs transwell migration	ı .32
Figure 48 : Wound healing migration and transwell invasion of transfected HUV-EC-Cs 1	34
Figure 49 : Localization of PKC- α in EGFP-SDC4 mutants co-transfected HUV-EC-Cs	35
Figure 50 : SDC-4 mediates RANTES/CCL5-induced angiogenesis1	36
Figure 51 : Adhesion of transfected cells1	38
Figure 52 : Inhibitors toxicity in transfected cells1	39
Figure 53 : Signaling pathway invoved in adhesion of SDC-4 transfected cells	40
Figure 54 : Signaling pathway involved in migration of transfected cells	42
Figure 55 : Signaling pathway involved in vascular tube formation of transfected cells 1	44
Figure 56 : Influence of calcium on RANTES/CCL5-induced PKC- α membrane translocation1	47
Figure 57 : Influence of CCR1 and CCR5 on RANTES/CCL5-induced PKC-α membrane translocation	49
Figure 58 : PKC-α and PKC-δ system in SDC-4 activation1	50

Figure 59 : Localization of PKC- δ in EGFP-SDC4 co-transfected cells
Figure 60 : Balance between PKC- α and PKC- δ in EGFP-SDC4 co-transfected cells154
Figure 61 : Heparan sulfate chains in adhesion of SDC-4 transfected cells
Figure 62 : Heparan sulfate chains in migration of transfected cells
Figure 63 : Cell morphology during cell migration159
Figure 64 : Heparan sulfate chains in EGFP-SDC-4 transfected cells morphology160
Figure 65 : Heparan sulfate chains in vascular tube formation of transfected cells
Figure 66 : Heparan sulfate chains in RANTES/CCL5-induced PKC-α membrane translocation
Figure 67 : Heparan sulfate chains in RANTES/CCL5-induced PKC-δ membrane translocation
Figure 68 : Signalisation intracellulaire du SDC-4 en réponse au FGF-2
Figure 69 : Mécanisme d'activation de la PKC-α199
Figure 70 : Syndécane-4 et cytosquelette203
Figure 71 : Les étapes du recrutement monocytaire 208
Figure 72 : Contrôle de la transmigration monocytaire par la VE-cadhérine
Figure 73 : Mécanisme hypothétique de l'implication de l'axe RANTES/CCL5-SDC-4 dans le
recrutement monocytaire

Liste des abréviations

 $\alpha 4\beta 1/VLA4$: Very Late Antigen 4 $\alpha L\beta 2/LFA-1$: Lymphocyte Function-associate Antigen 1 $\alpha M\beta 2/MAC-1$: Macrophage-1 antigen 3Ala : Lysine 45 et Arginines 44 et 47 du domaine de fixation aux GAG de RANTES/CCL5 mutés en Alanines A198del : Alanine 198 du domaine intracellulaire du syndécane-4 délétée AC : Adénylate Cyclase ADAM-10 : A Disintegrin And Metalloproteinases domain-containing protein-10 AMPc : Adénosine Monophosphate Ang-1 : Angiopoïétine-1 AP-2 : Adaptor-related Protein complex 2 ApoE : Apolipoprotéine E ARE : AU-Rich sequence Element ARNm : ARN messager ATP : Adénosine Triphosphate Bid : BH3-interacting domain death agonist BLC/CXCL13 : B Lymphocyte Chemoattractant/CXCL13 BRAK/CXCL14 : Breast And Kidney-expressed chemokine/CXCL14 C : domaine Conservé intracellulaire du syndécane CASK : Calcium/calmodulin-dependent Serine protein Kinase CBP/p300 : Cyclic AMP response element Binding Protein/p300 CCX-CKR : Chemocentryx Chemokine Receptor cdc42 : cell division cycle 42 CS : Chondroïtine Sulfate CSH : Cellule Souche Hématopoïétique DAG : Diacylglycérol DARC : Duffy Antigen Receptor for Chemokines Dlg1 : Drosophila disc large tumor suppressor-1 DII-4 : Delta-like ligand-4 Dock180 : Dedicator of cytokinesis 180 DS: Dermatane Sulfate

- E-cdk2 : E-cyclin-dependent kinase 2
- EGR-1 : Early Growth Response-1
- EG-VEGF : Endocrine Gland-VEGF
- ELMO1 : Engulfment and cell Motility protein 1
- ELR : Glutamine-Leucine-Arginine
- eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase
- Erk 1/2 : Extracellular signal-regulated kinase 1/2
- EXT : Exostosine
- FAK : Focal Adhesion Kinase
- FGF-2 : basic Fibroblast Growth Factor
- FRS2 : FGFR Substrat 2
- GAG : Glycosaminoglycane
- GPI : Glycosylphosphatidylinositol
- GRK : Kinase couplée au RCPG
- GRO- α /CXCL1 : Melanoma Growth stimulating activity- α /CXCL1
- HeLa : cellules de tumeur du col utérin
- HGF : Hepatocyte Growth Factor
- HIF : Hypoxia-Inductible transcription Factor
- Hp : Héparine
- HS : Héparane Sulfate
- Huh7, HepG2, Hep3B : cellules de carcinoma hépatocellulaire
- HUV-EC-C : Human Umbilical Vein-Endothelial Cell
- ICAM-1 : Intracellular Adhesion Molecule-1
- IGF : Insuline-like Growth Factor
- IL : Interleukine
- $INF-\gamma$: Interferon- γ
- IP3 : Inositol triphosphate
- I-TAC/CXCL11 : Interferon-inductible T-cell A Chemoattractant
- JAG-1 : Jagged-1
- JAK2 : Janus Kinase 2
- JAM : Junctional Adhesion Molecule
- JNK/SAPK : c-Jun N-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase
- KS : Kératane Sulfate

L188QQ : Acides aminés tyrosine 188 et lysines 189 et 190 du domaine intracellulaire du syndécane-4 mutée en Leucine et Glutamines.

- LDL : Low Density Protein
- LPS : Lipopolysaccharide
- MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
- MCP-1/CCL2 : Monocyte Chimioattractant Protein-1/CCL2
- MEC : Matrice Extracellulaire
- miARN : micro ARN
- MIP-1 β /CCL4 : Macrophage Inflammatory Protein-1 β /CCL4
- MM6 : Mono Mac 6
- MMP : Métalloprotéase Matricielle
- mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
- mTORC2 : mTOR Complex 2
- NAP-2/CXCL7 : Neutrophil-Activating Peptide-2/CXCL7
- NDST : N-Déacétylase/N-Sulfotransférase
- NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells
- NF-IL6 : Nuclear Factor of Interleukin-6
- NFκB : Nuclear Factor kappa B
- NK : Natural Killer
- Nrarp : Notch-regulated ankyrin-repeat protein
- oxLDL-C : oxydated Low Density Lipoprotein-cholesterol
- PAK1 : p21 Protein Activated Kinase 1
- PAMP : Pathogen-Associated Molecular Patterns
- PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
- PDK1 : Phosphoinositide-Dependent Kinase 1
- Pdx1 : Pancreatic and duodenal homeobox 1
- PDZ: PSD95-Dlg1-Zo1
- PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
- PF-4/CXCL4 : Platelet Factor-4
- PGE2 : Prostaglandine E2
- PGHS : Protéoglycane à chaînes Héparanes Sulfates
- PH : Pleckstrin Homology
- PI3K : Phosphoinositide-3 Kinase
- PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate

- PKA : Protéine Kinase A
- PKC : Protéine Kinase C
- PKD : Protéine Kinase D
- PLC- γ : Phospholipase C- γ
- PIGF : Placental-Growth Factor
- PP1 : Protein Phosphatase 1
- $\mathsf{PPAR}\alpha:\mathsf{Peroxisome}\;\mathsf{Proliferator}\mathsf{-}\mathsf{Activated}\;\mathsf{Receptor}\;\alpha$
- **PRR** : Pattern-Recognition Receptors
- PSD95 : Post-Synaptic Density protein 95
- PSGL1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand 1
- PTP1B : Protein Tyrosine Phophatase 1B
- Pyk2 : Protein tyrosine kinase 2
- R47E : Arginine 47 du domaine de fixation aux GAG de RANTES/CCL5 muté en Acide glutamique
- Rac1 : Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
- RANTES/CCL5 : Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted/CCL5
- Ras : Rat sarcoma
- RCPG : Récepteur à sept domaines transmembranaires Couplé aux Protéines G
- RFLAT-1 : RANTES/CCL5 Factor of Late Activated T lymphocytes-1
- RGS : Regulator of G-protein Signaling
- RGTA[®] : ReGeneraTing Agent
- RhoG : Ras homolog family member G
- RhoGDI-1 : Rho protein GDP Dissociation Inhibitor-1
- S179A : Sérine 179 du domaine intracellulaire du syndécane-4 mutée en Alanine
- SCY2/XCL2: Small inducible Cytokine subfamily C, member 2/XCL2
- SDC-4 : Syndécane-4
- SDF-1/CXCL12 : Stromal Derived Factor-1/CXCL12
- SH2 : Src-Homology 2
- SLC/CCL21 : Secondary Lymphoid-tissue Chemokine/CCL21
- SLRP : Small Leucine-Rich Proteoglycan
- SR-A1 : Scavenger Receptor-A1
- SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
- Src : Schmidt-Ruppin A-2 avian sarcoma
- SR-PSOX/CXCL16 : Scavenger Receptor for Phosphatidylserine and ox-LDL/CXCL16
- STAT : Signal Transduced and Activator of Transcription

- TAM : Macrophages Associés aux Tumeurs
- $\mathsf{TGF}\text{-}\beta$: Transforming Growth Factor- β
- T_H1 : lymphocytes T Helper 1
- Tie-1 : Tyrosine kinase immunoglobulin-like and EGF-like domains 1
- $TNF-\alpha$: Tumor Necrosis Factor- α
- Treg : lymphocytes T régulateurs
- u-PA : urokinase de type Activateur du Plasminogène
- V : domaine Variable intracellulaire du syndécane
- VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule-1
- VE-cadhérine : Vascular Endothelial cell cadherin
- VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
- VHC : Virus de l'Hépatite C
- VHS-1 : Virus de l'Herpes Simplex-1
- VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
- VRS : Virus Respiratoire Syncytial
- Wnt : Wingless integration site
- Zo1 : Zonula occludens-1

Avant-propos

L'athérosclérose est la cause de 17 millions de décès dans le monde en 2012, en faisant la première cause de mortalité mondiale (World Health Organization, 2014). L'athérosclérose est une maladie qui touche la paroi des vaisseaux sanguins et elle est à l'origine de troubles cardiovasculaire tels que les infarctus du myocarde et les accidents vasculaires cérébraux. Elle se caractérise par une infiltration de monocytes et de cholestérol dans l'espace sous-endothélial provoquant la formation d'une plaque d'athérome. Cette plaque réduit le flux sanguin et induit la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques. La néoangiogenèse, en augmentant l'infiltration cellulaire, tend à favoriser la rupture de la plaque d'athérome (Silvestre-Roig et al., 2014).

L'angiogenèse est un processus en plusieurs étapes. Les cellules endothéliales sont activées par des facteurs pro-angiogéniques tel que le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) (Ribatti and Crivellato, 2012) et vont migrer vers un gradient de cytokines chimioattractantes, les chimiokines, telle que Stromal-Derived Factor-1 SDF-1/CXCL12 (Kryczek et al., 2005; Chen et al., 2006).

Les chimiokines peuvent interagir avec les cellules par l'intermédiaire de récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés aux protéines G (RCPG) et de protéoglycanes à chaînes héparanes sulfates (PGHS) (Chung, 2013). Les PGHS sont constitué d'une protéine sur laquelle sont greffés un ou plusieurs glycosaminoglycanes (GAG). Les syndécanes (SDC) sont des PGHS transmembranaires (Couchman, 2010). Il a été montré que le basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2) (Horowitz et al., 2002) et la prostaglandine E2 (PGE2) (Corti et al., 2013) favorisent l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* par l'intermédiaire d'une signalisation intracellulaire dépendante du SDC-4.

Notre laboratoire a montré que RANTES/CCL5 exerçait un effet proangiogénique de manière GAG-dépendante *in vitro* sur des Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUV-EC-Cs) et *in vivo* dans un modèle de délivrance sous-cutanée chez le rat (Suffee et al., 2012). Lors de l'athérosclérose, la chimiokine RANTES/CCL5 est retrouvée surexprimée au niveau de la plaque d'athérome (Li et al., 2012; Malaud et al., 2014). De plus, il a été montré que la chimiokine RANTES/CCL5 favorisait le recrutement leucocytaire de manière GAG-dépendante (Baltus et al., 2003) et au sein de la plaque d'athérome, favorisant ainsi son expansion (Koenen et al., 2009).

Etant donné le rôle de RANTES/CCL5 dans l'angiogenèse et dans le recrutement leucocytaire, nous nous sommes intéressés à l'implication du SDC-4 dans les effets biologiques induits par RANTES/CCL5. La surexpression transitoire de mutants intracellulaires du SDC-4 par des HUV-EC-Cs nous a permis d'analyser l'implication de la Protéine Kinase C- α (PKC- α), du Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) ou des protéines à domaine Post-Synaptic Density protein 95 (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor-1 (Dgl1), Zonula occludens-1 (Zo1) (PDZ) dans les effets biologiques induits par RANTES/CCL5.

Nos résultats montrent que le SDC-4 régule l'angiogenèse et le recrutement monocytaire induits par RANTES/CCL5 *via* son domaine intracellulaire.

La surexpression du SDC-4 par les cellules endothéliales potentialise plusieurs effets cellulaires du processus angiogénique induits par RANTES/CCL5 *in vitro* (adhérence, étalement, migration, invasion, formation de réseaux vasculaires). Par ailleurs, le SDC-4 favorise également le recrutement monocytaire induit par RANTES/CCL5 *in vitro* (arrêt de monocytes dans un modèle statique ou sous flux laminaire).

L'activation constitutive de la PKC- α induite par le mutant S179A-SDC-4 entraîne une augmentation de l'angiogenèse et du recrutement monocytaire de manière indépendante de RANTES/CCL5. La stimulation par RANTES/CCL5 de ces cellules accroit d'autant plus l'angiogenèse et le recrutement monocytaire.

Les cellules surexprimant les mutants intracellulaires du SDC-4 incapables de fixer le PIP2 (L188QQ-SDC-4) ou les protéines à domaine PDZ (A198del-SDC-4) présentent un défaut d'induction par RANTES/CCL5 de l'angiogenèse ou du recrutement monocytaire.

Introduction

I. Angiogenèse

- 1. Généralités
 - A. Structure d'un vaisseau sanguin

Le système vasculaire est composé d'un système artériel et d'un système veineux. Il va permettre d'apporter aux tissus un flux sanguin riche en nutriments et en oxygène par l'intermédiaire du système artériel et évacuer les déchets cellulaires et le CO_2 via le système veineux. La paroi des vaisseaux sanguins peut être divisée en trois couches tissulaires, l'intima, la média et l'adventice (Figure 1).





Le vaisseau sanguin est divisé en trois couches tissulaires, l'intima constitué d'une monocouche de cellules endothéliales, la média constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses et l'adventice vascularisée et innervé constitué de fibroblastes, cellules immunitaires et matrice extracellulaire (Martinez-Lemus, 2012).

L'intima, ou tunique interne, correspond à la couche interne de la paroi vasculaire. Elle est constituée d'une couche de cellules endothéliales en contact direct avec le sang et les cellules circulantes. Le flux sanguin entraîne un arrangement du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales dans le sens du flux entraînant une polarisation des cellules endothéliales et permettant une perfusion optimale. Les cellules endothéliales sont assemblées les unes aux autres par l'intermédiaire de jonctions stables rendant ainsi l'endothélium résistant aux pressions et aux forces de cisaillements engendrées par la circulation sanguine. La morphologie des cellules endothéliales est différente suivant la localisation des vaisseaux sanguins (tissu rénal, pulmonaire...) suggérant un rôle important du phénotype endothéliale dans le passage de cellules et molécules à travers l'endothélium (Garlanda and Dejana, 1997).

Dans un état quiescent, l'endothélium forme ainsi une barrière semi-perméable pour le transport de petites molécules solubles, peptides et protéines. Une fois activé par différents facteurs (perturbation du flux sanguin, infection, contexte inflammatoire), l'endothélium participe au passage de cellules immunitaires vers le tissu par un mécanisme de diapédèse. La diapédèse correspond au passage des cellules immunitaires circulantes à travers l'endothélium afin d'atteindre le tissu (Martinez-Lemus, 2012).

Afin d'assurer un débit sanguin optimal, l'endothélium sécrète des facteurs de croissances vaso-actifs tels que le Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ou le basic Fibroblast Growth Factor (FGF-2) régulant le tonus vasculaire. L'endothélium est polarisé, la face luminale (en contact avec le sang) n'a pas la même composition membranaire que la face basale (reposant sur une lame basale). L'endothélium présente à sa surface de nombreuses molécules d'adhérence de type intégrine, cadhérine, sélectine, protéoglycanes permettant d'une part la reconnaissance de molécules et cellules circulantes du côté luminal et d'autre part un ancrage à la membrane basale. L'endothélium permet une stabilité du vaisseau sanguin par l'intermédiaire d'interactions entre les intégrines et protéoglycanes des cellules endothéliales et la lame basale riche en fibronectine, laminine et collagène (Martinez-Lemus, 2012).

La média est composée de plusieurs couches de péricytes pour les capillaires ou de cellules musculaires lisses pour les gros vaisseaux permettant de préserver la structure des vaisseaux sanguins. Le nombre de couches de cellules dépend du diamètre du vaisseau. Chaque couche de cellule repose sur une lame basale (collagène type IV, fibronectine) et sur des fibres élastiques. L'association entre la Matrice Extracellulaire (MEC) et les cellules musculaires lisses est impliquée dans la participation de ces cellules contractiles à la vasomotricité du vaisseau et ainsi à la pression du flux sanguin (Martinez-Lemus, 2012).

L'adventice, ou tunique externe, constituée de fibroblastes, de cellules immunitaires et progénitrices, de fibres élastiques et de collagène, assure la protection et l'élasticité du vaisseau sanguin. Elle est adjacente à la média et est en contact avec le tissu conjonctif, composé de protéines de la matrice extracellulaire (Stenmark et al., 2013).

Pour les gros vaisseaux sanguins (artères et veines de diamètre supérieur à 0.5 mm), il existe une vascularisation des cellules de la paroi du vaisseau sanguin par un réseau de capillaires présents dans le tissu conjonctif, le *vasa vasorum*. Ces capillaires sont uniquement composés d'une monocouche de cellules endothéliales entourées d'une lame basale et de fibroblastes. Il existe également dans l'adventice une innervation de la couche de la média par le système nerveux sympathique contrôlant la contraction ou la relaxation du vaisseau et régulant ainsi le flux sanguin. Lors d'un stress environnemental du vaisseau sanguin (stimulus hormonal, inflammatoire, hypoxie...), les cellules résidentes de l'adventice sont les premières à répondre aux stimuli. Elles vont proliférer, produire et sécréter des facteurs protéiques tels que l'angiotensine-2, le Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) et le (TGF- β) (Stenmark et al., 2013) (Figure 2).



Figure 2 : Composition de l'adventice

L'adventice est la tunique la plus externe des vaisseaux sanguins. Elle est composée de fibroblastes, cellules immunitaires (cellules dendritiques, macrophages) et matrice extracellulaire. Elle permet une vascularisation du vaisseau sanguin par le *vasa vasorum* et une innervation par le système nerveux adrénergique (Stenmark et al., 2013).

B. Vasculogenèse, artériogenèse ou angiogenèse?

La formation des vaisseaux sanguins implique trois mécanismes, la vasculogenèse, l'artériogenèse et l'angiogenèse.

Vasculogenèse

La vasculogenèse est présente principalement pendant le développement embryonnaire. Elle correspond à la formation des vaisseaux sanguins à partir du mésoderme. A partir du stade embryonnaire 6.5, des précurseurs mésodermiques vont se différencier en cellules hémangioblastiques puis soit en cellules hématopoïétiques (futures cellules sanguines) soit en angioblastes en formant un îlot sanguin. Les angioblastes sont les précurseurs endothéliaux qui vont former les vaisseaux sanguins. La présence du Vascular Endothelial Growth Factor-A (VEGF-A) et du FGF-2 va permettre l'activation des voies de signalisation Sonic Hedgehog et Notch par les angioblastes, entraînant ainsi leur différenciation en cellules endothéliales jointes entre elles par des jonctions serrées. Le plexus vasculaire primitif forme ainsi une lumière interne et le nouveau vaisseau sanguin formé devient mature par le recrutement de péricytes et la formation d'une lame basale. Par la suite, le vaisseau sanguin présentera un phénotype capillaire, veineux ou artériel (Patel-Hett and D'Amore, 2011) (Figure 3).

Il existe une vasculogenèse chez l'adulte lors du recrutement de cellules progénitrices endothéliales et de leur différenciation pour former un nouveau vaisseau sanguin. Après une ischémie ou un dommage tissulaire, les cellules progénitrices endothéliales vont être principalement recrutées sur le tissu lésé depuis la moelle osseuse ou la circulation sanguine (Balaji et al., 2013).



Figure 3 : Vasculogenèse

Les cellules mésodermiques vont se différencier en hémangioblastes puis en cellules hématopoïétiques ou en angioblastes. La présence de VEGF-A et de FGF-2 permet la différenciation des angioblastes en cellules endothéliales, formant une lumière interne contenant les cellules hématopoïétiques différenciées en cellules sanguines. La maturation du nouveau vaisseau sanguin comprend plusieurs stades. L'adhérence des cellules endothéliales entre elles par l'existence de jonction serrées est suivie d'un recrutement de cellules de soutien (péricytes) et de la formation de la membrane basale (Patel-Hett and D'Amore, 2011).

Artériogenèse

L'artériogenèse permet l'augmentation de calibre et la maturation des vaisseaux sanguins lors du développement embryonnaire par recrutement de cellules musculaires lisses et de péricytes.

Chez l'adulte, l'artériogenèse va avoir lieu lors d'une obstruction artérielle pour permettre la maturation d'un vaisseau sanguin périphérique préexistant pour qu'il puisse prendre le relais du flux sanguin obstrué. Le vaisseau sanguin périphérique va recevoir un débit sanguin plus élevé, des modifications de sa paroi sont nécessaires afin qu'il puisse résister au débit sanguin. Les cellules de l'intima prolifèrent, permettant d'augmenter le diamètre du vaisseau sanguin. Les cellules de la média (cellules musculaires lisses, péricytes) prolifèrent, augmentant le nombre de couches cellulaires, permettant au vaisseau sanguin de résister au flux sanguin plus important (Heil and Schaper, 2004) (Figure 4).

Lorsqu'une artère est bouchée, le flux sanguin va être dévié vers une artériole adjacente en amont de l'obstruction. L'augmentation de pression et de flux sanguin va

accroître les forces de cisaillements exercées sur l'endothélium de l'artériole. L'endothélium, sollicité par ces forces de cisaillements, va être activé par l'ouverture de canaux ioniques et l'entrée de calcium dans les cellules endothéliales. L'endothélium va sécréter des médiateurs de l'inflammation comme la chimiokine Monocyte Chimioattractant Protein-1 (MCP-1/CCL2), qui va permettre le recrutement de monocytes sur l'endothélium et qui vont se différencier en macrophages. L'endothélium sécrète également le Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) et du VEGF qui vont permettre l'expression de molécules d'adhérence telles que des sélectines et les Intracellular Adhesion Molecule-1 et -2 (ICAM-1 et -2) et Vascular Cell Adhesion Molecule-1 (VCAM-1). Les monocytes/macrophages vont sécréter des Métalloprotéases Matricielles (MMP) et l'urokinase de type Activateur du Plasminogène (u-PA) qui vont permettre les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales (Heil and Schaper, 2004).

Suite à l'infiltration monocytaire, l'artériogenèse nécessite d'une part une forte prolifération de cellules endothéliales, musculaires lisses et fibroblastes, régulée par la sécrétion de FGF par l'endothélium et d'autre part la dégradation de la matrice extracellulaire par les MMP-1, MMP-2, MMP-3 et MMP-9. Les mastocytes participent au recrutement des monocytes par sécrétion de MCP1/CCL2 et TNF- α . Ils stimulent également la prolifération des cellules par sécrétion de FGF-2, TGF- β et MMP (Heil and Schaper, 2004).





Lors d'une obstruction d'une artère, le flux sanguin va être dévié vers une artériole en amont (1). Pour supporter l'augmentation du flux sanguin, l'artériole va augmenter son calibre par prolifération des cellules endothéliales (EC) et musculaires lisses vasculaires (vSMC) nécessitant un remodelage matriciel (2) (Roca and Adams, 2007).

<u>Angiogenèse</u>

L'angiogenèse est la formation d'un nouveau vaisseau sanguin à partir d'un vaisseau sanguin préexistant. On la retrouve dans les stades tardifs du développement embryonnaire (vascularisation des organes, mise en place du système cardiovasculaire). Chez l'adulte, l'angiogenèse est nécessaire pour le maintien des fonctions physiologiques des tissus (cycle menstruel chez la femme, réparation tissulaire, formation de vaisseaux collatéraux).

Il existe une balance entre des facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques dans l'organisme régulant les vaisseaux sanguins. Lors d'un déséquilibre, de nouveaux vaisseaux sanguins peuvent se former par un mécanisme d'invagination ou de bourgeonnement.

2. Angiogenèse physiologique

A. L'angiogenèse, deux mécanismes

Lorsque la balance penche en faveur des facteurs pro-angiogénique, les cellules endothéliales vont former un nouveau vaisseau sanguin. En fonction de l'origine des facteurs pro-angiogéniques, l'angiogenèse aura lieu par invagination lors d'une variation du flux sanguin ou par bourgeonnement lors d'une sécrétion de facteurs angiogéniques d'un tissus hypoxié.

a. Invagination

Le mécanisme d'angiogenèse par invagination est moins connu que le mécanisme d'angiogenèse par bourgeonnement. C'est un mécanisme rapide qui est causé par une modification du flux sanguin dans les petits capillaires. L'invagination se déroule en 4 étapes. La variation du flux sanguin entraine la formation d'une zone de contact entre les deux parois opposées du vaisseau sanguin. Il s'en suit une réorganisation des jonctions intercellulaires. Une invagination a lieu depuis la paroi supérieure et la paroi inférieure du vaisseau sanguin. Les deux invaginations vont se rejoindre au centre du vaisseau sanguin, individualisant en deux capillaires le vaisseau sanguin. Pour finir, des myofibroblastes, péricytes et fibres de collagène stabilisent le capillaire ainsi formé (Ribatti and Djonov, 2012) (Figure 5).

Les cellules endothéliales activées par une variation du flux sanguin sécrètent localement du VEGF et du PDGF qui participent au recrutement des myofibroblastes et péricytes. Les fibroblastes vont sécréter des protéases pour digérer la lame basale et individualiser deux capillaires (Ribatti and Djonov, 2012).



Figure 5 : Angiogenèse par invagination

Lors d'une variation du flux sanguin (a, a'), les deux parois du vaisseau sanguin vont se rapprocher (b) en modifiant la lame basale (BM, b') jusqu'à entrer en contact (c, c'). L'espace formé au niveau de la zone de contact (d) va être envahie par des fibroblastes (Fb), péricytes (Pr) et collagène (Co) pour stabiliser le nouveau vaisseau sanguin (d') (Ribatti and Djonov, 2012).

b. Bourgeonnement

Contrairement à l'angiogenèse par invagination, l'angiogenèse par bourgeonnement se produit suite à la présence de facteurs pro-angiogéniques sécrétés lors d'une hypoxie ou d'une inflammation.

C'est un mécanisme plus lent en plusieurs étapes qui nécessite la maturation et le remodelage du nouveau vaisseau sanguin (Figure 6).



Figure 6 : Angiogenèse par bourgeonnement

Suite à une stimulation pro-angiogénique, les cellules endothéliales et les péricytes/cellules musculaires lisses vont se désolidariser et former un bourgeon. Les cellules endothéliales vont migrer et proliférer en direction d'un gradient de concentration de facteurs pro-angiogéniques. Les cellules endothéliales vont ensuite former une lumière et le nouveau vaisseau sanguin sera mature une fois qu'il sera stabilisé par le recrutement de péricytes/cellules musculaires lisses et la formation d'une lame basale (Clapp et al., 2009).

i. Initiation et expansion

A l'état quiescent, les cellules endothéliales reposent sur la lame basale qui doit être dégradée avant toute initiation d'angiogenèse. L'endothélium, activé par un facteur proangiogénique, sécrète localement les MMP-2 et MMP-9 qui dégradent la matrice extracellulaire et libèrent des facteurs pro-angiogéniques séquestrés dans la matrice. Parmi ces facteurs, on retrouve le VEGF qui va entraîner la sécrétion de l'angiotensine-2 par les cellules endothéliales ce qui permet le détachement des péricytes et des cellules musculaires lisses de la lame basale.

L'initiation du bourgeonnement va débuter par acquisition par les cellules endothéliales d'un phénotype « cellule initiatrice » (cellule de tête, très migratrice mais peu proliférative) ou « cellule élongatrice » (cellule de tige, peu migratrice mais très proliférative) par remodelage du cytosquelette. Les cellules peuvent passer d'un phénotype à l'autre en fonction d'une balance entre des facteurs pro-angiogéniques d'une part (VEGF, interaction de Delta-like ligand-4 (Dll-4) avec Notch-1) et anti-prolifératifs d'autre part (interaction de Jagged-1 (JAG-1) avec Notch-1). A la fin de l'élongation, les cellules vont retrouver leur phénotype de cellules endothéliales quiescentes. Les cellules de tête vont initier la formation du vaisseau sanguin et migrer vers un gradient de facteurs pro-angiogéniques (principalement le VEGF) alors que les cellules de tige vont proliférer et allonger le vaisseau sanguin (Ribatti and Crivellato, 2012).

La voie Notch va jouer un rôle crucial dans la détermination du phénotype des cellules endothéliales et dans la formation du nouveau vaisseau sanguin. L'activation ou l'inhibition de la voie Notch se fait par contact de deux cellules adjacentes. Les cellules de tête vont fortement exprimer le ligand DII-4, le PDGF-B, et les récepteurs VEGFR-2 et VEGFR-3. L'interaction du VEGF avec le VEGFR-2 va entrainer une expression de Dll-4 à la membrane. Les cellules de tige expriment le récepteur transmembranaire Notch-1 et Notch-4. Le ligand Dll-4 exprimé à la surface des cellules de tête va interagir avec le récepteur Notch-1 des cellules de tige, ce qui va activer la voie Notch des cellules de tige. La voie Notch va entraîner une inhibition de la formation des filopodes, stimuler la prolifération et entraîner l'expression du ligand transmembranaire du récepteur Notch-1, JAG-1, par les cellules de tige. JAG-1 exprimé par les cellules de tige va interagir avec Notch-1 exprimé par les cellules de tête et inhiber sa signalisation, ce qui permet aux cellules de tête de former des filopodes par les voies Rat sarcoma (Ras)-related C3 botulinum toxin substrate 1 (Rac1) et cell division cycle 42 (cdc42) et de migrer sans proliférer. Les deux types de cellules endothéliales vont interagir entre elles afin de réguler leur phénotype. Les cellules de tête interagissent avec les cellules de tige stabilisant leur phénotype prolifératif et les cellules de tige vont stabiliser le phénotype migratoire des cellules de tête. Notch-regulated ankyrinrepeat protein (Nrarp) est activé dans les cellules de tige par la voie Notch et induit la voie Wingless integration site (Wnt) qui stabilise le vaisseau nouvellement formé. Lorsque la migration des cellules de têtes s'arrête, les jonctions entre les cellules endothéliales deviennent plus stables à l'aide de la Vascular Endothelial cell cadherin (VE-cadhérine) (Ribatti and Crivellato, 2012) (Figure 7).



Figure 7 : Initiation du bourgeon angiogénique

Suite à une stimulation pro-angiogénique, les cellules endothéliales forment un bourgeon angiogénique et acquièrent un phénotype particulier. Les cellules de tête ont un phénotype migratoire et expriment DII-4, VEGFR-2, VEGFR-3. Les cellules de tige présentent un phénotype prolifératif et expriment Notch-1, Notch-4, Nrarp, JAG-1, VEGFR-1. Les cellules endothéliales migrent et prolifèrent vers un gradient de facteurs pro-angiogéniques (VEGF-A, chimiokines) formant ainsi un nouveau vaisseau sanguin (Ribatti and Crivellato, 2012).

ii. Tubulogenèse et maturation

La formation de la lumière du nouveau vaisseau sanguin (tubulogenèse) se fait par un effet de répulsion entre les protéoglycanes chargés négativement exprimés à la surface apicale des cellules endothéliales (future face luminale). Le VEGF-A participe également à la formation de la lumière du vaisseau sanguin. Cet effet de répulsion correspond à l'initiation de la formation de la lumière du vaisseau mais n'est pas suffisant pour obtenir et maintenir un flux sanguin. Après formation de la lumière, le flux sanguin entraîne des forces de cisaillement sur l'endothélium permettant un réarrangement du cytosquelette d'actine et l'élargissement du vaisseau. La matrice extracellulaire, et notamment la fibronectine, joue également un rôle dans l'élargissement du vaisseau sanguin en servant de soutien aux cellules endothéliales (Ribatti and Crivellato, 2012).

La stabilisation et la maturation du vaisseau sanguin vont être effectives par le recrutement de cellules murales, dont les péricytes, autour des cellules endothéliales. Le PDGF-B sécrété par les cellules endothéliales permet alors la migration et la prolifération des péricytes et leur recrutement via le récepteur PDGFR- β 1. L'interaction des récepteurs Tyrosine kinase immunoglobulin-like and EGF-like domains 1 (Tie-1) et Tie-2 des cellules endothéliales avec l'Angiopoïétine-1 (Ang-1) des péricytes va favoriser la stabilisation du vaisseau nouvellement formé. En condition d'hypoxie, les cellules endothéliales sécrètent l'Ang-2, un antagoniste de l'angiopoïétine-1, ce qui a pour effet d'inhiber Tie-2. Les cellules murales formant la paroi du vaisseau sanguin se dissocient ainsi des cellules endothéliales (Takakura, 2011; Ribatti and Crivellato, 2012). Les cellules endothéliales musculaires lisses vasculaires par l'intermédiaire des récepteurs au TGF- β de type I et II (Jakobsson and van Meeteren, 2013) (Figure 8).



Figure 8 : Maturation du nouveau vaisseau sanguin

Pour obtenir un vaisseau sanguin mature, les cellules endothéliales sécrètent du PDGF-B pour recruter des péricytes via leur PDGFR- β (a). Les péricytes sécrètent l'angiopoïétine 1 (Ang-1) permettant l'activation de Tie-1 et Tie-2 par les cellules endothéliales et une association entre les deux types cellulaires et une stabilisation du nouveau vaisseau sanguin. En cas d'hypoxie, les cellules endothéliales sécrètent l'Ang-2 entraînant la dissociation des péricytes (b) (Gaengel et al., 2009).

B. Facteurs de croissance angiogéniques a. VEGF

La famille du Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) est composée de plusieurs glycoprotéines sécrétées, les VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, VEGF-b, l'Endocrine Gland-VEGF (EG-VEGF) et le Placental-Growth Factor (PIGF). Le VEGF-B est

impliqué dans le développement du muscle cardiaque. Les VEGF-C et VEGF-D sont principalement impliqués dans le développement du système lymphatique. Le VEGF-b provient d'un épissage alternatif du gène du VEGF-A et a un rôle anti-angiogénique. L'EG-VEGF est une isoforme spécifique des glandes endocrines. Le PIGF est impliqué dans l'angiogenèse en association avec le VEGF-A.

Le VEGF-A est la protéine majoritairement exprimée dans les tissus. Il existe 9 isoformes de 121 à 206 acides aminés et les quatre principales isoformes sont les VEGF-A 121, 165, 189 et 206, ce chiffre étant associé au nombre d'acides aminés les constituant. Le VEGF-A peut se fixer à des Protéoglycanes à chaînes Héparanes Sulfates (PGHS) présents dans la MEC et les isoformes 189 et 206 ont une plus forte affinité pour les PGHS que les isoformes 165 et 121 (Patel-Hett and D'Amore, 2011).

Les trois récepteurs classiques pour les VEGF, les récepteurs VEGFR-1/Flt-1, VEGFR-2/KDR et VEGFR-3/Flt-4, sont associés à des co-récepteurs glycoprotéiques neuropiline-1 et neuropiline-2. Ce sont des récepteurs membranaires à domaines « tyrosine kinase » dans la partie intracellulaire, responsable de la signalisation intracellulaire et à domaines « immunoglobuline » dans la partie extracellulaire, responsable de la fixation des VEGF. Le VEGFR-1 reconnait les VEGF-A, VEGF-B et PIGF. Le VEGFR-2 reconnait les VEGF-A, VEGF-E, VEGF-F, VEGF-b et les formes clivées des VEGF-C et VEGF-D. Le VEGFR-3 lie les formes non clivées des VEGF-C et VEGF-D (Patel-Hett and D'Amore, 2011) (Figure 9).





Les VEGFR sont des récepteurs transmembranaires à domaines « tyrosine kinase » intracellulaires et « immunoglobuline » extracellulaires. Les VEGFR-1 et VEGFR-2 sont couplés aux neuropiline-1 (NRP-1) et neuropiline-2 (NRP-2) alors que le VEGFR-3 est couplé à la neuropiline-2. Le VEGFR-2 reconnait le plus de VEGF (six) alors que les VEGFR-1 et VEGFR-3 ne reconnaissent que trois (VEGF-A, VEGF-B, PIGF) et deux (VEGF-C, VEGF-D) ligands respectivement (Patel-Hett and D'Amore, 2011).

La fixation du VEGF à son récepteur entraîne la dimérisation du récepteur, l'autophosphorylation des récepteurs par l'activation des domaines tyrosines kinases puis une signalisation intracellulaire. Bien que le VEGF-A présente une affinité plus importante pour le VEGFR-1 que le VEGFR-2, le VEGFR-2 a une plus forte activité kinase. L'activation du VEGFR-2 joue un rôle central dans la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales. Le rôle du VEGFR-2 dans ces effets cellulaires passe par l'activation de voies de signalisation impliquant la Phospholipase C-y (PLC-y) qui induit l'activation des Protéines Kinase C (PKC) activant d'une part la voie des Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) et d'autre par les Protéines Kinase D (PKD). La MAPK active ensuite le Nuclear Factor of Activated T-cells (NFAT) impliqué dans la prolifération cellulaire et la PKD active le facteur de transcription Early Growth Response-1 (EGR-1) impliqué dans la prolifération et la migration. Le VEGFR-2 est impliqué dans la migration cellulaire par activation des voies cdc42 et Schmidt-Ruppin A-2 avian sarcoma (Src) et par réarrangement du cytosquelette (Focal Adhesion Kinase (FAK), paxilline). Le VEGFR-2 a également un rôle dans la survie des cellules endothéliales par activation de la voie Phosphoinositide-3 Kinase (PI3K) (Patel-Hett and D'Amore, 2011) (Figure 10).



Figure 10 : Signalisation du VEGFR2

Le VEGFR-2 joue un rôle central dans la survie (PI3K), migration (Src, PKD, cdc42, FAK) et prolifération (PKC, MAPK) des cellules endothéliales (Patel-Hett and D'Amore, 2011).

b. PDGF

La famille du Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) est composée de 4 membres sécrétés, les PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C et PDGF-D. Inactifs sous forme de monomères, ils deviennent actifs en formant des homodimères (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC et PDGF-DD) ou hétérodimères (PDGF-AB). Le PDGF-A et PDGF-C sont sécrétés par les cellules épithéliales, musculaires et progéniteurs neuronaux, le PDGF-B est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires, mégacaryocytes et neurones et le PDGF-D par les fibroblastes et les cellules musculaires lisses (Andrae et al., 2008).

Les récepteurs au PDGF sont des récepteurs à domaines « tyrosine kinase ». Le récepteur PDGFR- α reconnait toutes les formes de PDGF sauf le PDGF-D et le récepteur PDGFR- β reconnait uniquement les PDGF-B et PDGF-D. Le VEGF-A peut se fixer aux deux formes du récepteur. Le domaine carboxy-terminal (C-ter) des PDGF est riche en acides aminés basiques, impliqués dans l'interaction des PDGF avec les Glycosaminoglycanes (GAG) à chaînes Héparanes Sulfates (HS). Le PDGF-BB sécrété par les cellules endothéliales reste ainsi concentré à la membrane des cellules endothéliales et dans la matrice extracellulaire

proche permettant de former un gradient d'attraction pour le recrutement de péricytes (Andrae et al., 2008; Heldin and Lennartsson, 2013) (Figure 11).





Les PDGFR sont des récepteurs transmembranaires à domaines « tyrosine kinase ». Le PDGFR- α reconnait tous les PDGF sauf le PDGF-D alors que le PDGFR- β ne reconnait que les PDGF-B et PDGF-D et l'hétérodimère PDGF- $\alpha\beta$ reconnait les PDGF-B et l'hétérodimèe PDGF-AB (Heldin and Lennartsson, 2013).

La fixation du dimère de PDGF va entrainer la dimérisation du récepteur (PDGFR- $\alpha\alpha$, PDGFR- $\alpha\beta$ ou PDGFR- $\beta\beta$), l'autophosphorylation des récepteurs par l'activation des domaines « tyrosine kinase » puis une signalisation intracellulaire (PLC- γ , PI3K, MAPK-Ras). L'activation de la voie PI3K-Akt par le PDGF est impliquée dans la réorganisation du cytosquelette, la migration, la prolifération et la survie des cellules. L'activation de la voie MAPK-Ras est plutôt impliquée dans la prolifération. L'activation de la voie PLC- γ et PKC- α induit la prolifération et la migration des cellules ainsi que le recyclage du récepteur. Les différentes isoformes du PDGF jouent un rôle important dans le développement embryonnaire et la formation de nombreux organes (Andrae et al., 2008; Heldin and Lennartsson, 2013).

Le PDGF-BB sécrété par les cellules endothéliales permet le recrutement des péricytes et des cellules musculaires lisses vasculaires au niveau du nouveau vaisseau sanguin formé par l'intermédiaire du PDGFR- β . Le PDGFR- β joue également un rôle dans la différenciation des précurseurs endothéliaux en cellules endothéliales. Après une blessure, le PDGF permet une cicatrisation plus rapide par l'activation des fibroblastes, cellules musculaires lisses, neutrophiles et macrophages exprimant ses récepteurs PDGFR et la
production par ces cellules de composants de la matrice extracellulaire. Les différents PDGF (et en particulier les PDGF-A et PDGF-B) sont retrouvés dans les plaques d'athérome, favorisant la prolifération des cellules musculaires lisses et leur infiltration de la média à l'intima.

Les PDGF ont un rôle important dans le développement tumoral. Les PDGF-A et PDGF-B vont participer à la survie des cellules tumorales. Les PDGF-A et PDGF-C vont favoriser le recrutement de fibroblastes au niveau de la tumeur pour la stabiliser. Les PDGF-B et PDGF-D vont favoriser l'angiogenèse tumorale pour alimenter la tumeur et permettre la dissémination par métastases (Andrae et al., 2008; Heldin and Lennartsson, 2013) (Figure 12).





Les différentes formes du PDGF sont impliquées dans la progression tumorale. Les formes A et C favorisent le recrutement de fibroblastes qui vont stimuler la croissance tumorale par sécrétion de FGF-2, FGF-7 et SDF-1/CXCL12, l'angiogenèse tumorale par sécrétion de VEGF, l'invasion et la formation de métastases par sécrétion de RANTES/CCL5. Les formes B et D favorisent l'angiogenèse tumorale. Les formes A et B stimulent de façon autocrine les cellules tumorales (Andrae et al., 2008).

c. FGF

La famille du FGF se compose de 18 membres sécrétés, les hormone-like FGF (FGF-19, FGF-21 et FGF-23) et les FGF classiques (FGF-1 à FGF-10, FGF-16 à FGF-18 et FGF-20), les autres membres de la famille du FGF étant intracellulaires. Il existe 5 récepteurs classiques pour les FGF (FGFR), les 4 premiers sont des récepteurs à tyrosine kinase avec 3 domaines IgG extracellulaires et 9 domaines « tyrosine kinase » intracellulaires. Le FGFR-5 n'a pas de domaine « tyrosine kinase ». Le FGF peut également se lier, avec une affinité de l'ordre du nanomolaire aux protéoglycanes à chaînes héparanes sulfates au niveau de la membrane cellulaire ou dans la matrice extracellulaire (Cochran et al., 2009; Brooks et al., 2012).

La fixation du FGF aux chaînes héparanes sulfates des PGHS permet sa protection contre les enzymes protéolytiques, sa séquestration dans la matrice extracellulaire, et pour les PGHS membranaires sa présentation aux récepteurs classiques FGFR. Il a été décrit que la liaison du FGF à un PGHS membranaire, le Syndécane-4 (SDC-4), induisait une signalisation intracellulaire dépendante du SDC-4 (Goetz and Mohammadi, 2013).

La formation d'une complexe FGF-PGHS-FGFR entraine une dimérisation du récepteur au FGF, l'autophosphorylation des domaines à tyrosine kinase puis une signalisation intracellulaire liée à une activation de la PLC- γ , PI3K, FGFR Substrat 2 (FRS2) et Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT). Le FGFR active la voie de la PLC- γ , entraînant une augmentation du calcium intracellulaire et l'activation de la PKC induisant la migration des cellules. L'activation du FRS2 entraine d'une part la voie Ras-MAPK permettant la prolifération des cellules et d'autre part la voie PI3K-Akt favorisant la survie cellulaire (Goetz and Mohammadi, 2013). Il existe également une signalisation induite par le FGF-2 passant par l'activation du facteur de transcription STAT-5 (Yang et al., 2009) (Figure 13).





L'activation du FGFR par le FGF est impliquée dans la prolifération (voie MAPK, a), la survie (voie PI3K, b) et la migration (voie PLC- γ , c) cellulaire (Goetz and Mohammadi, 2013).

Le FGF-2 stimule l'expression du VEGF par les cellules endothéliales et stromales entrainant une néoangiogenèse. Le FGF-2 stimule l'expression du PDGFR- β par les cellules endothéliales et musculaires lisses vasculaires, les rendant plus sensibles au PDGF-BB et augmentant leur stabilisation du vaisseau sanguin. Le FGF-2 joue également un rôle dans l'artériogenèse en stimulant l'expression de la chimiokine MCP-1/CCL2 et du VEGF par les cellules musculaires lisses et les fibroblastes, nécessaires au mécanisme d'artériogenèse (Murakami and Simons, 2008).

Le FGF-2 peut se fixer aux chaînes héparanes sulfates du syndécane-4 et induire une signalisation intracellulaire indépendamment du FGFR en entrainant une migration cellulaire. Cette signalisation passe par un recrutement de la PKC- α à la membrane entraînant son activation, c'est-à-dire son activité de phosphorylation, puis une cascade de signalisation passant par la voie Ras homolog family member G (RhoG) et Rac1 favorisant la migration, puis par l'activation de la voie Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (Erk 1/2), nécessaire à la prolifération (Elfenbein and Simons, 2013).

3. Angiogenèse pathologique

Bien que l'angiogenèse soit importante d'un point de vue physiologique lors du développement ou du processus de cicatrisation d'une blessure, il peut arriver que l'angiogenèse soit impliquée dans des processus pathologiques tels que les cancers ou l'athérosclérose. En 2012, plus de 25 millions de personnes sont décédées des suites d'une de ces pathologies (Forman et al., 2014; World Health Organization, 2014). L'angiogenèse est une étape clé dans le développement des cancers (croissance, dissémination (Benazzi et al., 2014)) et de l'athérosclérose (croissance, déstabilisation de la plaque d'athérome (Sluimer and Daemen, 2009)). Comprendre le mécanisme d'action de l'angiogenèse pathologique permettant de la réguler est une nécessité de santé publique.

A. Cancer a. Généralités

Le cancer regroupe un nombre important de maladies sans distinction d'organe ou tissu touché. En 2012, il y a eu 14,1 millions de nouveaux patients diagnostiqués d'un cancer et 8,2 millions de décès dans le monde (dont 1,59 millions dus au cancer du poumon) (Forman et al., 2014).

L'Organisation Mondiale de la Santé définit le cancer comme toute maladie causée par la prolifération rapide et non contrôlée de cellules d'un organe. Le regroupement en amas de ces cellules cancéreuses correspond à la tumeur primaire. Les cellules cancéreuses peuvent coloniser d'autres organes en s'infiltrant dans la circulation sanguine, causant des métastases.

b. Angiogenèse et développement cancéreux

Pour survivre, les cellules ont besoin d'un apport en nutriment et en oxygène, provenant de la circulation sanguine. Au fur et à mesure que la tumeur grossit, les cellules tumorales présentes au sein de la tumeur vont avoir de plus en plus de difficultés à s'approvisionner en nutriments et en oxygène. Le manque d'oxygène se résulte en un environnement hypoxique favorise alors une néoangiogenèse tumorale. La vascularisation de la tumeur a également un rôle dans sa dissémination. En effet, des cellules tumorales se dissocient de la tumeur et migrent vers le vaisseau sanguin par un phénomène d'invasion. La cellule tumorale passe dans la circulation sanguine, colonise d'autres tissus et forme des métastases.

La structure du vaisseau sanguin est anormale. L'intima, correspondant à une couche de cellules endothéliales jointives n'est pas correctement étanche. Les cellules endothéliales tumorales proliférant trop vite n'ont pas le temps de sécréter une lame basale correcte ni de former une barrière étanche entre le sang et le tissu. Les péricytes, indispensables à la maturation et à la stabilisation des vaisseaux sanguins sont absents ou très peu présents des vaisseaux sanguins tumoraux, ce qui peut expliquer la fragilité de ces nouveaux vaisseaux sanguins, responsable d'hémorragies intra-tumorales (Baluk et al., 2005).

Pour pallier à l'environnement hypoxique, les cellules tumorales vont sécréter des facteurs de croissance (FGF-2 par exemple) et des cytokines pro-angiogéniques. Les cellules inflammatoires environnantes (leucocytes, Macrophages Associés aux Tumeurs (TAM), plaquettes) vont sécréter des facteurs pro-angiogéniques (FGF, PDGF, EGF, IGF, Stromal Derived Factor-1 (SDF-1/CXCL12)) pour stimuler les cellules de la paroi d'un vaisseau sanguin environnant (endothéliales, musculaires lisses) mais également des protéases (MMP-2, MMP-9) pour dégrader la matrice extracellulaire. L'hypoxie va entrainer l'expression de chimiokines pro-angiogéniques (MCP-1/CCL2, Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES/CCL5), SDF-1/CXCL12) par les TAM. De cette façon, un nouveau vaisseau sanguin se forme et vascularise la tumeur (Benazzi et al., 2014).

Les cellules endothéliales tumorales sont de deux types en fonction de leur origine. Pour une vascularisation par angiogenèse, les cellules endothéliales normales deviendraient tumorales après reprogrammation par l'environnement tumoral *via* une signalisation paracrine alors que par vasculogenèse, les cellules endothéliales tumorales proviendraient plutôt de la différenciation de cellules progénitrices (Bussolati et al., 2011) (Figure 14).

Les cellules endothéliales tumorales sont stimulées de manière autocrine par sécrétion du VEGF-D et de l'angiopoïétine-1 de façon continue et expression des récepteurs à leur surface. La voie PI3K/Akt est également activée de façon constitutive ce qui confère aux cellules endothéliales tumorales une résistance à l'apoptose et un phénotype proangiogénique. Les cellules tumorales relarguent dans l'environnement des vésicules transportant de l'information sous forme de protéines, récepteurs membranaires, lipides, ARN messagers (ARNm), micro ARN (miARN). Ces microvésicules peuvent entrer dans des cellules cibles, notamment les cellules endothéliales, et les transformer en cellules tumorales (Bussolati et al., 2011).



Figure 14 : Origine des cellules endothéliales tumorales

Les cellules endothéliales tumorales (TEC) ont deux origines suivant le mécanisme de formation des nouveaux vaisseaux sanguins. Les cellules endothéliales normales sont reprogrammées en cellules endothéliales tumorales par l'environnement tumoral lors d'une angiogenèse alors que pour une vasculogenèse, les cellules endothéliales tumorales proviennent de la différenciation de cellules progénitrices (Bussolati et al., 2011).

B. Athérosclérose

a. Première cause de mortalité mondiale

L'athérosclérose est la principale cause de mortalité mondiale. Elle est en effet à l'origine de nombreux troubles cardiaques tels que les infarctus du myocarde, les arrêts vasculaires cérébraux ou les ischémies qui ont représenté plus de 17 millions de décès en 2012 dans le monde (World Health Organization, 2014).

b. Structure de la plaque d'athérome

L'athérosclérose correspond à un épaississement sous-endothélial de l'intima d'un vaisseau sanguin (correspondant à une plaque d'athérome), diminuant la lumière artérielle et entrainant une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments aux tissus en aval. Cette plaque est formée par une infiltration de cellules immunitaires, musculaires lisses et de lipides. La formation des plaques d'athérome n'a pas lieu dans toute l'artère mais plutôt dans des zones privilégiées (bifurcations, branchements, coudes) où on retrouve une variation de la vitesse du flux sanguin et des forces de cisaillement (Frueh et al., 2013).

La physiopathologie de l'athérosclérose implique une première étape, précédent la plaque d'athérome constituée, qu'on nomme les stries lipidiques. Elles correspondent à une accumulation de lipides et de cellules spumeuses. Les cellules spumeuses correspondent à des macrophages et des cellules musculaires lisses qui ont internalisé au niveau de l'endothélium du cholestérol lié à la Low Density Protein (LDL) qui peut être oxydé. Au centre de ces stries lipidiques, les cellules spumeuses et les lipides forment un cœur lipidique recouvert d'une chape fibreuse composée de cellules musculaires lisses et riche en matrice extracellulaire, notamment en collagène (Hansson, 2005; Chaabane et al., 2014).

La modification des forces de cisaillement exercées sur l'endothélium va l'activer par l'intermédiaire de nombreux mécano-senseurs (cytosquelette, glycocalix, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1)) qui vont induire l'expression de molécules d'adhérence (E-sélectine, ICAM-1, VCAM-1) ce qui va permettre le recrutement de cellules immunitaires (monocytes, cellules dendritiques, lymphocytes T, mastocytes). L'activation de l'endothélium va aussi entrainer une infiltration et une rétention de lipides, principalement du cholestérol lié au LDL. Le changement de stress mécanique va également permettre l'expression de chimiokines, dont MCP-1/CCL2 et RANTES/CCL5, qui va former un gradient de chimioattraction et attirer d'autant plus les cellules circulantes par interaction avec les Récepteurs à sept domaines transmembranaires Couplés aux Protéines G (RCPG) spécifiques des chimiokines, exprimés à la surface des leucocytes (Frueh et al., 2013). Le recrutement leucocytaire nécessite plusieurs étapes, un arrêt par roulement sur l'endothélium, un étalement et une diapédèse. Les monocytes vont transmigrer à travers l'endothélium grâce, entre autres, à un gradient de chimio-attraction (MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 et Fractalkine/CX₃CL1) formé par les cellules endothéliales, macrophages et cellules musculaires lisses de la plaque. L'expression de VCAM-1 et PECAM-1 par les cellules endothéliales participent également à la transmigration des monocytes. Une fois dans la plaque d'athérome, les monocytes se différencient en macrophages. Les macrophages peuvent internaliser du LDL-cholestérol par l'intermédiaire de nombreux récepteurs, principalement les récepteurs CD3 et Scavenger Receptor-A1 (SR-A1). Ce processus permet la clairance du cholestérol mais lorsqu'il est dérégulé, l'accumulation de cholestérol dans le macrophage devient trop importante et les macrophages se différencient en cellules spumeuses remplies de lipides. La structure incomplète des micro-vaisseaux nouvellement formés à partir du *vasa vasorum* favorise aussi la transmigration des monocytes dans la plaque d'athérome (Moore et al., 2013; Seneviratne et al., 2013) (Figures 15 et 16).



Figure 15 : Stress mécanique et plaque d'athérome

Une perturbation du flux sanguin entraîne l'activation des cellules endothéliales par l'intermédiaire de récepteurs mécano-senseurs. Cela stimule l'expression de molécules d'adhérence et de molécules pro-inflammatoires permettant l'infiltration de LDL-cholestérol et de monocytes qui vont se différencier en macrophages puis en cellules spumeuses (A). L'augmentation de la taille de la plaque par recrutement de cellules immunitaires forme un cœur nécrotique, provoque des hémorragies intraplaque et diminue le diamètre de la lumière de l'artère. Pour stabiliser la plaque d'athérome, des cellules musculaires lisses sont recrutées pour former une chape fibreuse (B). Le contexte très inflammatoire et la diminution de la lumière artérielle entrainent une augmentation des forces de cisaillement sur la chape fibreuse et un risque de rupture de la plaque d'athérome. Un thrombus peut alors se former causant un arrêt du flux sanguin (C) (Seneviratne et al., 2013).

L'expansion du cœur nécrotique est principalement causée par la mort des macrophages/cellules spumeuses et des cellules musculaires lisses. Le cœur nécrotique est composé de lipides, de cellules apoptotiques et de facteurs protéolytiques. L'apoptose des cellules musculaires lisses, mais également des cellules endothéliales, est induite par la sécrétion de facteurs inflammatoires pro-apoptotiques tels que le TNF-α par les lymphocytes cytotoxiques CD8+ qui ont infiltré la plaque d'athérome. La sécrétion de la MMP-7 participe à l'apoptose des cellules musculaires lisses en clivant le domaine extracellulaire de la Ncadhérine. En effet, la N-cadhérine permet l'activation de la voie Akt essentielle dans la survie cellulaire, et la N-cadhérine clivée n'active plus la voie Akt, induisant l'apoptose des cellules. La dégradation de la matrice extracellulaire libère certains facteurs proapoptotiques (collagène clivé) qui vont induire l'apoptose des cellules musculaires lisses. La mort des macrophages joue un rôle important dans le développement de la plaque d'athérome. En effet, dans les stades précoces de l'athérosclérose, la mort des macrophages sera bénéfique en ralentissant l'expansion de la plaque d'athérome alors que dans les stades plus tardifs les macrophages apoptotiques vont alimenter le cœur nécrotique et déstabiliser la plaque. Les forces de cisaillement vont entraîner l'expression du ligand Fas, impliqué dans l'apoptose des cellules spumeuses. La trop forte concentration en lipides des cellules spumeuses dérégule le mécanisme d'apoptose et entraîne une mort des cellules plutôt par nécrose, ce qui entraîne un relargage de leur contenu cytoplasmique dans la plaque d'athérome (facteurs tissulaire, lipides) participant à l'augmentation du cœur nécrotique (Moore et al., 2013; Seneviratne et al., 2013; Silvestre-Roig et al., 2014).



<u>Figure 16</u> : Infiltration monocytaire dans le développement de la plaque d'athérome L'infiltration des monocytes au sein de la plaque d'athérome se produit grâce à l'augmentation de l'expression de molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1) et de facteurs pro-inflammatoire (GRO- α /CXCL1, RANTES/CCL5) à la surface de l'endothélium qui vont interagir avec les molécules d'adhérence (LFA-1, PSGL1, VLA-4) ou les récepteurs aux chimiokines (CCR1, CCR5) des leucocytes. Une fois dans la plaque, ils vont se différencier en macrophages ou cellules dendritiques (DC), capter du LDL-cholestérol et se différencier en cellule spumeuse si la phagocytose de lipides est trop importante. Les macrophages/cellules spumeuses vont sécréter de nombreux facteurs proinflammatoires aggravant le recrutement leucocytaire (Moore et al., 2013).

La rupture de la plaque d'athérome a lieu lorsque la chape fibreuse se dégrade. La rupture de la plaque entraîne une thrombose par agrégation plaquettaire ce qui obstrue l'artère. Suivant l'artère touchée, l'obstruction cause un infarctus du myocarde, un accident vasculaire cérébral ou une ischémie. L'apoptose des cellules musculaires lisses, le changement des forces de cisaillement exercées sur la chape fibreuse, la production de cytokines inflammatoires, protéases, molécules vaso-actives par les cellules immunitaires sont autant de facteurs qui vont déstabiliser la plaque d'athérome. La mort des cellules musculaires lisses va d'une part augmenter le cœur nécrotique au sein de la plaque et d'autre part diminuer la production de collagène. L'augmentation de la taille de la plaque d'athérome provoque un changement dans les forces de cisaillement exercées sur la paroi du vaisseau sanguin, ce qui provoque une augmentation de l'activité de protéases (MMP-2, MMP-8, MMP-9, MMP-12) impliquées dans le remodelage de la matrice extracellulaire. Ces protéases vont entrainer un amincissement de la chape fibreuse et une déstabilisation de la

plaque d'athérome. L'angiogenèse au sein de la plaque d'athérome participe également à la déstabilisation de la plaque (Hansson, 2005; Moore et al., 2013; Seneviratne et al., 2013; Silvestre-Roig et al., 2014) (Figure 17).



Figure 17 : Facteurs de déstabilisation de la plaque d'athérome

Lorsque la chape fibreuse se rompt, le contenu de la plaque d'athérome (facteurs proinflammatoires, pro-apoptotiques, lipides, cellules) se déverse dans la circulation sanguine. L'apoptose des cellules musculaires lisses, l'infiltration leucocytaire et les MMP entraînent une augmentation du cœur nécrotique et un amincissement de la chape fibreuse. Le stress oxydant et des facteurs pro-angiogéniques favorisent l'angiogenèse intra-plaque dont la paroi est déstabilisée par les cellules immunitaires augmentant ainsi le risque d'hémorragie. Tous ces facteurs déstabilisent la plaque d'athérome, favorisant sa rupture. (Silvestre-Roig et al., 2014).

c. Angiogenèse et athérosclérose

L'adventice d'une paroi artérielle saine contient un réseau de micro-vaisseaux sanguins, le *vasa vasorum*. Dans l'athérosclérose, le réseau de vaisseaux sanguins se développe jusque dans la média, dans l'intima et dans la plaque d'athérome. Dans la carotide athéromateuse, le diamètre des micro-vaisseaux peut être compris entre 2 et 200 μ m et la densité de vaisseaux entre 20 et 20 000 μ m². Entre janvier 1987 et août 2008, 38

études cliniques analysant l'angiogenèse dans l'athérosclérose ont été publiées. La diversité de la quantification de l'angiogenèse ne permet pas de normaliser les données mais il en ressort que l'angiogenèse est impliquée dans la progression de l'athérosclérose et la vulnérabilité de la plaque d'athérome. L'utilisation de différents modèles animaux a permis de montrer une implication de l'angiogenèse dans l'initiation, la progression et/ou la rupture de la plaque d'athérome. Bien que l'implication de l'angiogenèse ne soit pas la même dans les différentes études, l'angiogenèse semble bien être une étape clé dans l'athérosclérose (Sluimer and Daemen, 2009; Silvestre-Roig et al., 2014).

Le risque de rupture de la plaque d'athérome est associé avec une fine chape fibreuse, un large cœur lipidique, un environnement inflammatoire, une angiogenèse et une hémorragie intra-plaque. La variation du flux sanguin, causée par une diminution de la lumière du vaisseau sanguin athéromateux peut également jouer sur la stabilité de la plaque et une augmentation trop forte des forces de pression et de cisaillement sur la chape fibreuse peut entraîner sa rupture. La formation des micro-vaisseaux au sein de la plaque d'athérome ressemble à l'angiogenèse tumorale, c'est-à-dire, une angiogenèse rapide, avec un manque d'intégrité dans la paroi endothéliale, un défaut dans la structure murale de soutien du vaisseau, entraînant une infiltration de leucocytes et de lipoprotéines dans la plaque d'athérome et un risque accru d'hémorragie intra-plaque (Sluimer and Daemen, 2009; Silvestre-Roig et al., 2014) (Figure 18).

L'hypoxie peut entraîner une angiogenèse au sein de la plaque. L'accumulation de cellules (inflammatoires, spumeuses, musculaires) augmente le besoin en oxygène alors que l'augmentation de la taille de la plaque correspond à une plus grande distance entre les cellules de la plaque et la circulation sanguine de l'aorte qui apporte l'oxygène. Ceci provoque une zone d'hypoxie au centre de la plaque, où se trouvent les cellules et stimule l'angiogenèse à partir des vaisseaux sanguins du vasa vasorum (Sluimer and Daemen, 2009). L'hypoxie va activer la voie de l'Hypoxia-Inductible transcription Factor (HIF), et principalement HIF-1 α , dans les différents type cellulaires présents (cellules endothéliales, musculaires lisses, spumeuses, macrophages). Selon le type cellulaire, HIF-1 va augmenter l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse (VEGF, FGF-2, PDGF-B), le métabolisme des lipides (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α (PPAR α)), la dégradation de la matrice extracellulaire (MMP-2), l'apoptose (BH3-interacting domain death agonist (Bid)), l'inflammation (MCP-1/CCL2, VCAM-1) (Sluimer and Daemen, 2009). L'inflammation va également jouer un rôle dans la régulation de l'angiogenèse au sein de la plaque d'athérome. Le TNF- α , l'interleukine-6 (IL-6) et l'IL-1 β vont augmenter l'expression du VEGF par l'intermédiaire des voies Nuclear Factor kappa B (NFκB), STAT-3 et Erk-MAPK (Sluimer and Daemen, 2009).



Figure 18 : Angiogenèse dans la plaque d'athérome

L'accumulation de cellules dans la plaque d'athérome nécessite un approvisionnement en oxygène et nutriments plus important depuis le *vasa vasorum*. L'angiogenèse induite par les cellules de la plaque est trop rapide ne permettant pas aux cellules endothéliales de former des jonctions serrées, entraînant une perméabilité de l'endothélium. Ceci conduit à une infiltration de LDL-cholesterol, cellules immunitaires et à des hémorragies ayant pour conséquence la croissance et la déstabilisation de la plaque (Doyle and Caplice, 2007).

4. Thérapies angiogéniques

L'angiogenèse est suractivée dans de nombreuses pathologies tels que le cancer (survie, croissance, dissémination) et l'athérosclérose (croissance, déstabilisation de la plaque) ou au contraire déficiente dans l'ischémie (perte d'oxygénation du tissu). Cibler la formation des vaisseaux sanguins, que ce soit la favoriser avec des thérapies proangiogéniques ou la prévenir avec des thérapies anti-angiogéniques, pourrait permettre de proposer un traitement pour de nombreuses maladies.

A. Thérapies anti-angiogéniques

La principale cible des traitements anti-angiogéniques sont les tumeurs pour limiter leur croissance et leur propagation par invasion et formation de métastases.

Une thérapie utilisée actuellement cible le VEGF-A par l'utilisation d'un anticorps neutralisant anti-VEGF-A, le bevacizumab (Avastin[®]). Le bevacizumab est utilisé en association avec une chimiothérapie ou des cytokines pour le traitement des cancers colorectaux, pulmonaires à non petites cellules et rénaux. Il est utilisé en monothérapie pour le traitement des glioblastomes. L'aflibercept (Zaltrap[®], Eleya[®]), récepteur soluble composé d'une partie du domaine extracellulaire des VEGFR1 et VEGFR2, neutralise le VEGF-A, le VEGF-B et le PIGF après fixation. Il est utilisé en combinaison avec une chimiothérapie contre le cancer métastatique colorectal (Benazzi et al., 2014; De Falco, 2014).

Plusieurs thérapies ciblent les différents récepteurs de facteurs de croissances proangiogéniques (VEGF, PDGF, FGF, EGF) en inhibant leur fonction tyrosine kinase. Le sorafenib (Nexavar[®], VEGFR, PDGFR, FGFR1) est utilisé contre le cancer colorectal et le carcinome hépatocellulaire ; le sunitinib (Sutent[®], VEGFR, PDGFR) contre les cancers colorectaux métastatiques, gastro-intestinaux et pancréatiques neuroendocriniens ; le pazopanib (Votrient[®], VEGFR, PDGFR) contre le cancer rénal métastatique et les sarcomes ; l'axitinib (Inlyta[®], VEGFR, PDGFR) pour le cancer rénal avancé ; le vandetanib (Caprelsa[®], VEGFR, EGFR) et le cabozantinib (Cometriq[®], VEGFR2) contre le cancer thyroïdien médullaire ; le regorafenib (Stivarga[®], VEGFR, PDGFR, FGFR) contre le cancer colorectal metastatique et gastrointestinal (Benazzi et al., 2014; De Falco, 2014).

Plusieurs essais cliniques ayant pour objectif de proposer de nouvelles thérapies ciblant l'angiogenèse sont en cours. Elles ciblent le VEGF ou ses récepteurs, tel que le ramucirumab qui cible les VEGFR-1 et VEGFR-2. Actuellement en phase 3, il a montré une survie accrue des patients (18% de taux de survie au bout de 12 mois pour les patients traités avec le ramucirumab et 11% pour ceux traités avec le placébo) atteints d'un cancer gastrique métastatique. Des essais cliniques ayant d'autres cibles telles que les intégrines sont en cours. Les intégrines sont essentielles dans l'adhérence des cellules (tumorales et endothéliales), les neutraliser pourrait permettre à la fois de réduire l'angiogenèse mais aussi de désolidariser les cellules tumorales de la tumeur primaire, risquant la formation de métastases. Le velociximab, qui est un anticorps ciblant l'intégrine $\alpha5\beta1$, est en phase 2 (De Falco, 2014).

Il existe deux problèmes majeurs aux thérapies anti-angiogéniques, d'une part, la présence éventuelle d'effets secondaires et d'autre part, un effet délétère du traitement. La majorité de ces thérapies provoquent des atteintes gastro-intestinales (douleurs abdominales, diarrhées, nausées, vomissements) ou coronaires (maux de tête, hypertension chez 11% des patients traités avec le bevacizumab). Dans certains cas, le bevacizumab provoque des perforations gastro-intestinales, des hémorragies et des thromboses artérielles et veineuses.

Concernant l'effet délétère de la thérapie, dans les stades avancés du cancer, il est observé une forte croissance de la tumeur après une période de décroissance. Cela arrive grâce à la forte expression de facteurs pro-angiogéniques autres que le VEGF (PIGF, FGF, PDGF, chimiokines). Une angiogenèse tumorale VEGF-indépendante se met alors en place pour subvenir aux besoins nutritifs de la tumeur d'où l'intérêt de développer des thérapies ciblant plusieurs effecteurs pro-angiogéniques. Un autre effet de la thérapie antiangiogénique pro-hypoxique est qu'elle pourrait favoriser la prolifération de cellules tumorales exprimant une protéine pro-apoptotique p53 inactive. De ce fait, la p53 n'induirait plus l'apoptose des cellules tumorales en hypoxie, permettant la sur-prolifération des cellules tumorales résistantes à l'hypoxie et la croissance tumorale. L'hypoxie favorise la prolifération et la survie de cellules cancéreuses progénitrices. Les thérapies antiangiogéniques, favorisant le contexte hypoxique, pourraient accélérer la progression de la tumeur et la formation de métastases par stimulation des cellules cancéreuses progénitrices. Les thérapies anti-angiogéniques contre les cancers pourraient avoir un effet inverse en stimulant la croissance et la dissémination des tumeurs. En effet, en éliminant les cellules tumorales dépendantes du facteur de croissance ciblé (VEGF par exemple) et/ou dépendantes d'un apport en oxygène, elles permettraient la croissance d'autres populations de cellules tumorales indépendante du facteur de croissance (dépendante du PDGF par exemple) et/ou résistantes à l'hypoxie (p53 muté par exemple) (Benazzi et al., 2014; De Falco, 2014).

Une autre cible des traitements anti-angiogéniques sont les maladies inflammatoires comme l'athérosclérose car les vaisseaux sanguins déstabilisent la plaque d'athérome et entraînent des hémorragies intra-plaque par rupture de la plaque et une occlusion artérielle par embolie. Des études ont montré que l'utilisation d'un inhibiteur des VEGFR chez la souris déficiente en Apolipoprotéine E (ApoE, modèle de souris athéromateux) augmente la taille de la plaque d'athérome sans la rendre plus vulnérable et n'a pas d'effet sur les cytokines pro-inflammatoires (Interferon- γ (INF- γ), IL-10, TNF- α) ni sur le recrutement de cellules immunitaires (Winnik et al., 2013). Bien que le traitement de lapins avec des stents recouverts de bevacizumab (anti-VEGF-A) réduise la taille et la vascularisation des plaques d'athérome (Stefanadis et al., 2007), cet agent anti-angiogénique, ainsi que d'autres (sorafenib anti-VEGFR, PDGFR, FGFR-1 ; thalidomide anti-VEGF, FGF-2), augmentent le risque d'incident cardiaque (infarctus du myocarde, arrêt vasculaire cérébral) (Ranpura et al., 2010; Carneiro et al., 2011).

B. Thérapies pro-angiogéniques

L'objectif des thérapies pro-angiogéniques est de rétablir l'apport en oxygène à un tissu ischémié ou en hypoxie en favorisant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Afin de favoriser la vascularisation, l'administration des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF, Hepatocyte Growth Factor (HGF)) a été étudiée et proposée suivant plusieurs voies de délivrance.

L'injection intraveineuse de VEGF recombinant humain chez des patients présentant une coronaropathie aigüe s'est révélée non concluante. Bien que sûre et tolérée, la thérapie n'a pas montré d'effets bénéfiques (Henry et al., 2003). L'absence d'effets bénéfiques pourrait être liée à une dégradation du VEGF dans la circulation sanguine, d'où la nécessité d'élaborer des méthodes de délivrance plus efficaces.

La thérapie génique consistant à administrer un gène codant pour un facteur proangiogénique a été effectuée en injection intramusculaire avec des plasmides codant pour le VEGF-A (patients diabétiques atteints d'une ischémie du membre), le FGF-1 (patients atteints d'ulcères du membre) et l'HGF (patients atteints d'ulcère ischémique du membre). Malgré la bonne tolérance immunitaire et la faible toxicité, l'efficacité de la thérapie est relativement faible. En effet, malgré une augmentation de la vascularisation, l'amputation n'a pu être évitée. Cela pourrait être causé par une faible efficacité de transfection.

Pour augmenter l'efficacité de transfection, des tests ont été effectués avec des vecteurs rétroviraux codant pour le VEGF-A montrant une forte efficacité de transfection mais associée à un risque de réponse immunitaire et une toxicité accrue (Shimamura et al., 2014). Une étude menée sur 10 ans a analysé les bienfaits de l'administration du VEGF-A au niveau des membres inférieurs en utilisant une thérapie génique plasmidique ou adénovirale. Quelque soit le vecteur utilisé, la thérapie n'a pas augmenté le risque de cancer, de diabète, rétinopathie ou néphropathie ce qui suggère que les deux vecteurs sont relativement bien tolérés. Par contre, la thérapie n'a pas augmenté la vascularisation du membre inférieur et n'a ni réduit le nombre d'amputation ni amélioré la claudication. Les

auteurs en ont conclu que la thérapie génique utilisant le VEGF est sûre et sans effets secondaires mais n'améliore pas l'oxygénation du membre (Muona et al., 2012).

Une voie pour les thérapies pro-angiogéniques consiste en la thérapie cellulaire à l'aide de cellules progénitrices endothéliales. Le principe est d'extraire les progéniteurs endothéliaux du patient (moelle osseuse, sang), de les cultiver *in vitro* avec ou sans facteurs pro-angiogéniques pour obtenir un nombre suffisant de cellules et de les réimplanter sur le site ischémié ou lésé (Balaji et al., 2013). L'injection de cellules souches mésenchymateuses dans le myocarde chez le lapin ayant subi un infarctus améliore les fonctions cardiaques. Les cellules souches se différencient en cellules vasculaires et musculaires exprimant des facteurs pro-angiogéniques, dont le VEGF, entraînant une vascularisation autour de la zone ayant subi l'infarctus, une réparation du muscle, ainsi qu'une diminution de la fibrose (Rahbarghazi et al., 2014).

Une autre étude a utilisé une combinaison de cellules dendritiques immatures et de cellules souches progénitrices en les prélevant directement depuis le sang de patients. La population de progéniteurs endothéliaux dans le sang étant relativement faible, les auteurs ont utilisé les cellules dendritiques immatures pour augmenter la proportion de progéniteurs endothéliaux. Les cellules dendritiques ont été activées par des facteurs anti-inflammatoires et pro-angiogéniques. Elles ont ensuite stimulé la différenciation des cellules souches progénitrices en cellules souches endothéliales permettant d'obtenir 50% de progéniteurs endothéliaux en une journée dans la population sanguine prélevé. L'injection intramusculaire de ces progéniteurs endothéliaux dans des souris immunodéficientes ayant subi une ischémie de la patte permet une meilleure vascularisation au niveau du site d'injection et de la lésion. Le prélèvement de 250 millilitres de sang suffirait pour obtenir un nombre de cellules nécessaire au rétablissement du flux sanguin (Porat et al., 2014).

Dans la circulation sanguine, les facteurs de croissance (demi-vie du VEGF-A de 30 minutes), cytokines et chimiokines (demi-vie d'environ 2 heures) sont rapidement dégradés (Keeley et al., 2011; Lee et al., 2011). Les glycosaminoglycanes (GAG) sulfatés, qui sont des polysaccharides, peuvent fixer ces différentes protéines. En plus de leur effet protecteur contre la dégradation protéolytique des protéines, les GAG peuvent moduler l'activité biologique de ces protéines soit en les empêchant d'interagir avec les cellules en les séquestrant dans la matrice extracellulaire, soit en les présentant à leurs récepteurs s'ils sont solubles ou membranaires (Simon Davis and Parish, 2013).

Les ReGeneraTing Agent (RGTA[®]) sont des mimétiques de GAG synthétiques. Dérivés de dextrane, ils possèdent des groupements sulfatés pour mimer les GAG à chaînes HS. Le mimétique OTR4120 (carboxyméthyl-dextran sulfate de 77kDa) favorise l'angiogenèse *in vivo* et *in vitro* en fixant le VEGF-A et en le présentant à ses récepteurs VEGFR-1 et VEGFR-2 (Rouet et al., 2005).

Le fucoïdane est un mimétique de GAG naturel isolé d'algues brunes. C'est un polysaccharide sulfaté, composé d'une répétition d'un disaccharide de fucose substitué de groupements sulfate ou d'acide uronique. Son hétérogénéité structurale le rend difficile à synthétiser mais il est possible de le fractionner et de purifier une large variété de fucoïdanes. Bien que le fucoïdane puisse réguler l'angiogenèse, son effet reste contradictoire. Certaines études montrent qu'il a un effet anti-angiogénique (inhibition de la migration, de la tubulogenèse de cellules endothéliales in vitro, inhibition de l'angiogenèse induite par implantation de cellules tumorales in vivo) (Ustyuzhanina et al., 2014). L'effet pro-angiogénique du fucoïdane de bas poids moléculaire a été montré in vitro et in vivo en favorisant l'angiogenèse induite par le FGF-2. Il semblerait que le fucoïdane de haut poids moléculaire (supérieur à 30 kDa) soit anti-angiogénique alors que le fucoïdane de bas poids moléculaire (inférieur à 15 kDa) soit pro-angiogénique (Ustyuzhanina et al., 2014). Notre laboratoire a montré que le fucoïdane de bas poids moléculaire diminue l'hyperplasie intimale in vivo. In vitro, le fucoïdane stimule la migration et l'invasion des cellules endothéliales par augmentation de la protéase MMP-2 et a l'effet opposé sur les cellules musculaires lisses (Hlawaty et al., 2011). La détermination de la structure exacte du fucoïdane nécessaire pour son effet pro-angiogénique ou anti-angiogénique sera une étape indispensable avant toute perspective thérapeutique.

Une méthode complémentaire dans les thérapies pro-angiogéniques pourrait être l'utilisation de biomatériaux. Les biomatériaux peuvent être naturels ou synthétiques, leur rôle serait de concentrer les facteurs ou cellules exogènes pro-angiogéniques au niveau du site lésé pour permettre une protection contre la dégradation et une délivrance prolongée locale. Le biomatériau peut aussi permettre une délivrance séquentielle dans le cas de biomatériaux avec plusieurs facteurs pro-angiogéniques.

Les hydrogels sont des biomatériaux biodégradables composés d'eau et d'un polymère qui peut être chargé ou non. L'avantage est qu'ils sont bien tolérés par l'organisme et ils peuvent être utilisés sous différentes formes. Il a été testé de nombreux biomatériaux cellularisés différentes en terme de forme (bille, pastille, tubes), de composition (collagène, fibrine, gélatine, acide hyaluronique, polyethylene glycol, dextran seul ou en association), de cellules (cellules endothéliales, progéniteurs endothéliaux, cellules souches mésenchymateuses, pluripotentes, embryonnaires seules ou en association) ou de facteurs pro-angiogéniques (VEGF-A, PDGF-BB, SDF-1/CXCL12 seul ou en association (Martino et al., 2011; Prokoph et al., 2012; Song et al., 2014)). Afin que les cellules puissent adhérer et entamer le processus angiogénique, il a été développé des biomatériaux contenant des peptides arginine-glycine-asparagine (RGD) permettant une fixation des intégrines cellulaires. Etant donné l'importance du remodelage matriciel dans l'angiogenèse, il a été développé des biomatériaux contenant des sites sensibles à la dégradation par les MMP, afin de permettre un remodelage du biomatériau et un processus angiogénique facilité (libération des facteurs pro-angiogéniques fixés au biomatériau, création d'un espace dans le biomatériau facilitant la migration des cellules) (Park and Gerecht, 2014).

Un biomatériau composé d'acide hyaluronique, de peptides RGD et de sites sensibles aux MMP a été supplémenté de cellules souches vasculaires. Après implantation dans des souris, les cellules souches vasculaires se sont différenciées en cellules endothéliales et péricytes et ont formé de nouveaux vaisseaux sanguins qui se sont reliés au système vasculaire de la souris (Kusuma et al., 2013).

II. Chimiokines

1. Cytokine chimio-attractante A. Structure

Les chimiokines sont des protéines de faible poids moléculaire (8-12 kDa) appartenant à la super famille des cytokines et ayant la particularité d'être chimioattractantes. La famille des chimiokine se compose de 47 protéines, toutes sécrétées à l'exception de la fractalkine/CX₃CL1 et du Scavenger Receptor for Phosphatidylserine and ox-LDL/CXCL16 (SR-PSOX/CXCL16) qui peuvent être sécrétées et membranaires. Les chimiokines sont classées en quatre familles en fonction de la disposition de deux cystéines conservées dans le domaine N-terminal, formant des ponts disulfures avec deux autres cystéines importantes pour la conformation tridimensionnelle de la chimiokine (Wang et al., 2013) (Figure 19).



Figure 19 : Classes de chimiokines et récepteur classique

Les chimiokines sont réparties en quatre familles suivant l'arrangement des cystéines conservées dans le domaine N-terminal. La famille C n'a qu'une cystéine. La famille CC possède les deux cystéines conservées adjacentes. Pour la famille CXC, un acide aminé sépare les deux cystéines conservées. Du coté N-terminal, les chimiokines de la famille CXC peuvent présenter un motif composé des acides aminés acide glutamique, leucine et arginine (ELR). La famille CX₃C possède trois acides aminés entre les deux cystéines. Le récepteur classique des chimiokines (GPCR) est un récepteur à 7 domaines transmembranaires couplé à une protéine G trimérique ($\alpha\beta\gamma$) présentant des domaines N-terminal extracellulaire et C-terminal intracellulaire (Rainczuk et al., 2012).

Les chimiokines sont sécrétées dans le milieu extracellulaire sous forme de monomère mais l'oligomérisation des chimiokines est importante pour certains de leurs effets biologiques et elle est favorisée par la liaison des chimiokines aux glycosaminoglycanes (GAG). Bien qu'in vitro les formes monomériques de MCP-1/CCL2, Macrophage Inflammatory Protein- 1β /CCL4 (MIP- 1β /CCL4) ou RANTES/CCL5 soient capables d'induire la migration de monocytes ou de cellules épithéliales, leur efficacité à recruter des leucocytes est largement diminuée dans des modèles animaux tel que chez la souris (Salanga and Handel, 2011). L'oligomérisation de RANTES/CCL5 est nécessaire à l'arrêt de monocytes sur des cellules endothéliales par l'intermédiaire de son récepteur CCR1 monocytaire alors que des formes dimérique et monomérique sont suffisantes pour l'étalement et la transmigration de monocytes par l'intermédiaire de son récepteur CCR5 monocytaire (Baltus et al., 2003). Bien que la forme monomérique de IL-8/CXCL8 soit suffisante pour induire le recrutement de neutrophiles, la forme dimérique est bien plus efficace (Das et al., 2010). L'oligomérisation des chimiokines peut également réguler négativement certains effets biologiques, une forme dimérisée de SDF-1/CXCL12 qui se fixe à son récepteur CXCR4 induit une augmentation du calcium intracellulaire mais perd l'effet chimio-attractant contrairement à la forme monomérique de SDF-1/CXCL12 (Veldkamp et al., 2008).

B. Deux cystéines, quatre familles de chimiokines

L'arrangement des cystéines conservées permet de classer les chimiokines en quatre familles, les XC, CC, CXC et CX3C chimiokines. Les chimiokines sont nommées suivant leur classe suivie d'un L pour ligand puis du numéro de la chimiokine (par exemple RANTES/CCL5). Pour les Récepteurs classiques à sept domaines transmembranaires Couplés aux Protéines G (RCPG) des chimiokines le L est remplacé par un R (par exemple CCR5) (Figure 19).

La famille des XC-chimiokines ne comporte que deux membres (lymphotactine/XCL1 et Small inducible Cytokine subfamily C, member 2 (SCY2/XCL2) portant une seule cystéine N-terminale (la première cystéine conservée et la troisième cystéine étant manquantes). Elles ont un rôle des le recrutement de cellules dendritiques et semblent importantes dans l'établissement d'une réponse immunitaire cytotoxique (prolifération, différenciation de lymphocytes T cytotoxiques) et dans la tolérance du soi (Lei and Takahama, 2012; Zlotnik and Yoshie, 2012). Il a été montré que ces deux chimiokines ont un rôle dans la migration et la prolifération des cellules épithéliales de carcinome ovarien (Kim et al., 2012).

La famille des CC-chimiokines est composée de 28 chimiokines (dont MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5) portant les deux premières cystéines conservées adjacentes sans acide aminé entre ces cystéines (Zlotnik and Yoshie, 2012). Ce sont des médiateurs de l'inflammation dans de nombreuses maladies telles que les cancers (dont MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5), la polyarthrite rhumatoïde (dont MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5) ou l'athérosclérose (dont MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5) par le recrutement de cellules inflammatoires (monocytes, lymphocytes, cellules dendritiques, Natural Killer (NK), polynucléaires éosinophiles, basophiles) (Singh et al., 2011; White et al., 2013).

La famille des CXC-chimiokines comporte 16 chimiokines portant un acide aminé entre les deux premières cystéines conservées. On peut distinguer deux sous-familles, les CXC-chimiokine ELR+, portant un motif Glutamine-Leucine-Arginine (ELR) entre la première cystéine et le domaine N-terminal et les CXC-chimiokines ELR- sans motif ELR. Les CXCchimiokines ELR+ ont un rôle angiogénique alors que les CXC-chimiokine ELR- ont plutôt un rôle angiostatique, à l'exception de SDF-1/CXCL12 qui est ELR- et pro-angiogénique par recrutement des précurseurs endothéliaux, via l'activation du récepteur CXCR4. Les ELR+ auront tendance à recruter des neutrophiles alors que les ELR- vont recruter des cellules immunitaires anti-tumorales telles que les monocytes, lymphocytes T, cellules dendritiques, NK (Rainczuk et al., 2012; Zlotnik and Yoshie, 2012).

La famille des CX₃C-chimiokines ne comporte qu'un seul membre, la fractalkine/CX₃CL1. Elle possède trois acides aminés entre les deux premières cystéines conservées et est transmembranaire. Le clivage du domaine mucine par les protéines A Disintegrin And Metalloproteinases domain-containing protein-10 (ADAM-10) ou ADAM-17 permet de libérer la chimiokine dans le milieu extracellulaire. Elle a des propriétés d'adhérence quand elle est liée à la membrane et permet le recrutement de monocytes et lymphocytes T (Ludwig and Weber, 2007).

Les récepteurs classiques des chimiokines sont des Récepteurs Couplés aux Protéines G (RCPG) à 7 domaines transmembranaires avec un domaine N-terminal extracellulaire et un domaine C-terminal intracellulaire. Les RCPG sont des monomères de 300 à 1200 acides aminés représentant la majorité des récepteurs membranaires des cellules (Chung, 2013).

Les RCPG sont ancrés dans la membrane plasmique par 7 domaines transmembranaires en hélice α disposés en cercle et reliés entre eux par 3 boucles extracellulaires (E1, E2, E3) et 3 boucles intracellulaire (I1, I2, I3). Le séquence du domaine Nterminal extracellulaire est variable d'un récepteur à l'autre mais contient des tyrosines sulfatées impliquées dans l'interaction avec les ligands. Le domaine N-terminal peut comporter jusqu'à 600 acides aminés mais les récepteurs des chimiokines ont un domaine N-terminal très court de moins de 50 acides aminés. La présence de cystéines permet de former des ponts disulfures entre la boucle E1 et E2 mais également entre le fragment Nterminal et la boucle E3. Les ponts disulfures permettent une meilleure stabilité du récepteur et de la liaison du ligand au récepteur (Rajagopalan and Rajarathnam, 2006). Le côté C-terminal intracellulaire est également court et a une importance dans la liaison avec la protéine G trimérique. L'interaction de la sous-unité α de la protéine G avec le RCPG va avoir lieu au niveau du domaine C-terminal et d'une boucle intracellulaire qui peut être différente en fonction du récepteur, par l1 pour le récepteur rhosdopsine, l2 pour le récepteur muscarinique M3 ou I3 pour le récepteur adrénergique α -2 (Chung, 2013) (Figures 19 et 21).

Il a été décrit environ 800 RCPG chez l'homme et beaucoup sont impliqués dans des pathologies telles que les maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, psychiatriques, les cancers ou encore les infections. Les RCPG sont divisés en 5 familles selon leur séquence en acides aminés et leurs ligands, la classe A de type rhodopsin, la classe B de type sécrétine, la classe C de type métabotropique de glutamate et phéromones, la classe D de type Vomeronasal (V1R et V3R) et la classe E de type frizzled/Taste (T2R) (Gao et al., 2013).

b. Classe A et protéines G i. RCPG de classe A

Les récepteurs auxquels peuvent se fixer les chimiokines sont des RCPG appartenant à la classe A. Ils sont classés de la même manière que les chimiokines (XC, CC, CXC, CX3C) en fonction des ligands qui s'y fixent. Il existe 18 RCPG couplés à la protéine Gai qui permettent une activité chimiotactique et 6 RCPG atypiques (CCRL1, CCRL2, D6, CXCR7 et Duffy Antigen Receptor for Chemokines (DARC), Chemocentryx Chemokine Receptor (CCX-CKR)) qui sont non chimiotactiques ou impliqués dans le recyclage des chimiokines. En effet, les RCPG atypiques peuvent fixer des chimiokines mais n'induisent pas de signalisation intracellulaire et peuvent internaliser la chimiokine en vue de sa dégradation ou de son recyclage à la membrane. Un RCPG peut reconnaître plusieurs chimiokines et une chimiokine peut se fixer à plusieurs RCPG à l'exception de certains couples tels que CXCR4 qui ne reconnait que SDF-1/CXCL12 ou la fractalkine/CX₃CL1 qui ne se fixe qu'à CX₃CR1. Certaines chimiokines peuvent être des agonistes pour un récepteur et des antagonistes pour un autre, par exemple les ligands de CCR3 sont des antagonistes de CXCR3 et inversement. Il existe des ligands qui n'appartiennent pas à la classe des chimiokines, comme l'ubiquitine qui peut se fixer au CXCR4 et avoir des propriétés anti-inflammatoires (Zlotnik and Yoshie, 2012) (Figure 20).



Figure 20 : Système chimiokine-RCPG

Les chimiokines peuvent se fixer sur plusieurs RCPG et un RCPG peut reconnaître plusieurs chimiokines (Shared) à l'exception de certains couples (Specific) (Rajagopalan and Rajarathnam, 2006).

Les chimiokines interagissent avec leurs RCPG au niveau de deux sites d'interaction par interactions électrostatiques entre les acides aminés basiques des chimiokines (arginine, histidine, lysine) et les domaines extracellulaires du récepteur (N-terminal, boucles) majoritairement chargées négativement (tyrosines sulfatées). Le site I du récepteur au niveau du domaine N-terminal permet une interaction avec la boucle N des chimiokines alors que le site II implique les boucles E2 et E3 avec le domaine N-terminal des chimiokines (Rajagopalan and Rajarathnam, 2006) (Figure 21).

La délétion des résidus en N-terminal de RANTES/CCL5, MCP-1/CCL2 ou MCP-3/CCL7 n'a pas un grand effet sur l'affinité de ces chimiokines à leurs récepteurs. En revanche, bien que ces chimiokines délétées soient inactives, elles peuvent se fixer sur d'autres RCPG. L'addition d'une méthionine au domaine N-terminal de RANTES/CCL5 entraine une perte de son effet chiomioattractant mais pas de sa fixation à son récepteur CCR1. Ceci indique que le domaine N-terminal des chimiokines joue un rôle important dans la spécificité et l'activité mais pas dans l'affinité des chimiokines au RCPG (Gong et al., 1996; Proudfoot et al., 1996). Le site I est responsable de l'affinité et la stabilité de l'interaction chimiokine-RCPG. Ceci entraîne un changement de conformation de la chimiokine et/ou du récepteur permettant l'interaction au niveau du site II conduisant à l'activation du RCPG. La spécificité de l'interaction chimiokine-RCPG semble quant à elle impliquer les deux sites de fixation (Rajagopalan and Rajarathnam, 2006).



Figure 21 : Sites d'interaction chimiokine-RCPG

L'interaction des chimiokines avec leur récepteur va se faire au niveau de deux sites. Le site I du récepteur au niveau de son domaine N-terminal (receptor N-domain) permet une interaction avec la boucle N (ligand N-loop) des chimiokines alors que le site II implique les boucles E2 et E3 (receptor exoloops) avec le domaine N-terminal des chimiokines (ligand N-terminal residues) (Rajagopalan and Rajarathnam, 2006).

ii. Protéines G

Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques composées des sous-unités Ga, G β et G γ . Il existe 21 G α , 6 G β et 12 G γ et les protéines G sont réparties en quatre groupes suivant l'effecteur activé par la sous-unité Ga. La famille Gas stimule l'Adénylate Cyclase (AC) qui va produire de l'Adénosine Monophosphate cyclique (AMPc) à partir d'Adénosine Triphosphate (ATP) activant les Protéines Kinase A (PKA) alors que la famille Gai/o inhibe l'AC ce qui diminue la quantité d'AMPc. La famille Gαq/11 active des phospholipases (dont la PLC) qui clive le Phosphatidylinositol 4,5-biphosphate (PIP2) en Inositol triphosphate (IP3) et en Diacylglycérol (DAG). Ceci entraîne une augmentation du calcium intracellulaire et une activation des PKA et PKC impliquées dans la désensibilisation des RCPG. La famille Ga12/13 va réguler les protéines associées au cytosquelette d'actine et tubuline dont la voie RhoG, Rac1 et cdc42. Les protéines G peuvent également activer la PI3K, phosphorylant le PIP2 en PIP3. Le PIP3 recrute à la membrane des protéines avec le domaine PIP3-Pleckstrin Homology (PH), impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine permettant la polarisation cellulaire (Chung, 2013; Patel et al., 2013; Schappi et al., 2014). La majorité des récepteurs aux chimiokines sont couplés à une protéine G de la famille Gai/o ou Gaq (Patel et al., 2013) (Figure 22).



Figure 22 : Signalisation intracellulaire des protéines G

Les protéines G sont des protéines hétérotrimériques composées des sous-unités G α , G β et G γ , couplés à un RCPG. Lorsque le ligand (L) se fixe au RCPG, les sous-unités G β et G γ se dissocient de G α qui est activée (GDP remplacé par GTP). La famille G α s stimule l'adénylate cyclase (AC) qui va produire de l'AMPc à partir d'ATP activant les PKA alors que la famille G α i/o inhibe l'adénylate cyclase. La famille G α q/11 active la PLC- β qui va cliver le PIP2 en IP3 entraînant une augmentation du calcium intracellulaire, et en DAG activant les PKC. La famille G α 12/13 active la voie RhoG (Frooninckx et al., 2012).

La fixation d'un ligand au RCPG va entraîner un échange du GDP fixé par la sous-unité G α au niveau de sa poche nucléotide en GTP, ce qui va entrainer l'activation de la sous-unité G α . Après fixation du GTP, le dimère G $\beta\gamma$ va se dissocier de G α . Le dimère peut interagir avec les canaux ioniques calciques et potassiques alors que G α active, ou inhibe, ses effecteurs spécifiques selon la famille de G α . Une fois le GTP hydrolysé en GDP par l'activité GTPasique de G α , le dimère G $\beta\gamma$ revient interagir avec la sous-unité G α et le système redevient inactif (Chung, 2013; Schappi et al., 2014).

c. Désensibilisation et régulation

La désensibilisation des RCPG implique différents processus, la phosphorylation du récepteur, la séquestration et le recyclage/dégradation. Ces processus font intervenir les Kinases couplées au RCPG (GRK) et les β -arrestines. La fixation du ligand au RCPG entraîne une signalisation intracellulaire permettant l'activation des voies décrites précédemment mais également l'activation de kinases impliquées dans sa désensibilisation. Parmi ces kinases, les PKA et PKC ont un rôle important mais également la famille des GRK (Kelly et al., 2009).

Les GRK phosphorylent des sérines et des thréonines au niveau du domaine Cterminal et de la boucle intracellulaire I3 du RCPG. Cette phosphorylation va permettre à une autre famille de protéines, les arrestines, de venir se fixer au récepteur. La forte affinité des arrestines pour les RCPG phosphorylés et l'encombrement stérique induit inhibe l'association des protéines G au récepteur. De ce fait, la signalisation induite par le ligand s'arrête. Les arrestines vont aussi avoir un rôle dans le trafic intracellulaire du récepteur. Le complexe arrestine/RCPG phosphorylé est reconnu par les clathrines qui induisent une endocytose du complexe puis une dégradation de celui-ci par les lysosomes. Le RCPG peut être déphosphorylé par des phosphatases associées à l'endosome, permettant un recyclage membranaire du récepteur. Le recyclage du récepteur peut dépendre du ligand. En effet, CCR7 est plus fortement internalisé par MIP-3^β/CCL19 que par la chimiokine Secondary Lymphoid-tissue Chemokine/CCL21 (SLC/CCL21) car il induit une plus forte phosphorylation du récepteur. RANTES/CCL5 quant à lui entraîne une dégradation totale du CCR1, partielle du CCR3 et un recyclage du CCR5. Les GRK2 et GRK3 peuvent également désensibiliser un RCPG en l'absence de phosphorylation et d'arrestine par fixation directe au récepteur et inhibition du couplage de Gaq au récepteur par encombrement stérique. GRK2 et GRK5 sont importants dans la régulation de l'inflammation mais ont des effets opposés. Chez des souris déficientes en GRK2, les lésions athéromateuses sont moins nombreuses bien que le recrutement de monocytes/macrophages et cellules musculaires lisses soit fortement augmenté. Pour GRK5, son absence conduit à une augmentation des lésions et du recrutement cellulaire. Ceci suggère que GRK2 serait pro-athérogène alors que GRK5 serait anti-athérogène (Kelly et al., 2009; Patel et al., 2013) (Figure 23).



Figure 23 : Désensibilisation du RCPG par la voie GRK/arrestine

Après fixation d'une chimiokine au récepteur, celui-ci va activer la protéine G α (1). G α va d'une part activer des effecteurs spécifiques du couple ligand-récepteur (2) et d'autre part activer des GRK. Les GRK vont phosphoryler le RCPG (3), le désensibilisant en permettant à l'arrestine de se fixer au récepteur (4) et d'induire son internalisation (5). Le récepteur peut être ensuite dégradé, recyclé ou induire une signalisation secondaire passant par la voie des MAPK (6) (Patel et al., 2013).

Par ailleurs, les RPCG peuvent être désensibilisés par la PKA et la PKC. De manière similaire aux GRK, la phosphorylation du RCPG par PKA ou PKC permet la fixation des arrestines et la désensibilisation. Il existe aussi d'autres systèmes de désensibilisation. Par exemple, la phosphorylation du récepteur adrénergique β 2 par la PKA entraîne un changement de couplage passant de la protéine G α s à la protéine G α i, provoquant une inhibition de l'adénylate cyclase et un arrêt de la signalisation. Dans certains cas, la PKA et la

PKC peuvent phosphoryler des RCPG libres sans ligand associé, ce qui n'est pas le cas pour les GRK (Kelly et al., 2009).

Il existe également une relation entre les GRK et les PKC/PKA. En effet, PKC et PKA peuvent phosphoryler GRK2 lui permettant de phosphoryler à son tour un RCPG. Dans certains cas, le même RCPG peut être phosphorylé et désensibilisé par des GRK et la PKA ou PKC. Pour CCR5, la sérine 337 est phosphorylée par la PKC alors que la sérine 349 est phosphorylée par une GRK (Pollok-Kopp et al., 2003).

Bien qu'internalisés par les endosomes, certains récepteurs continuent à activer une signalisation intracellulaire. Après fixation de la β -arestine 2 sur le récepteur du complexe SDF-1/CXCL12-CXCR4, le complexe est internalisé par endocytose et la voie des p38MAPK est activée. La β -arrestine 2 se retrouve d'ailleurs surexprimée dans les lésions athéromateuses et chez des souris déficientes en cette protéine, les lésions sont moins développées et les cellules musculaires lisses moins nombreuses (Patel et al., 2013) (Figure 23).

La désensibilisation des RCPG peut être indépendante de son internalisation. En effet, les protéines Regulator of G-protein Signaling (RGS) sont capables d'inactiver la sous-unité G α en se fixant et maintenant G α dans une configuration propice à l'activité de protéines GTPases qui hydrolysent le GTP en GDP, inactivant le système (Patel et al., 2013).

Il existe des récepteurs fixant les chimiokines dits atypiques. Bien qu'ils soient proches structurellement des RCPG (7 domaines transmembranaires en hélice α , boucles et partie N-terminale extracellulaires) et qu'ils soient capables de fixer les chimiokines, ils n'ont pas la capacité à induire un signal intracellulaire car ils ne peuvent pas se coupler aux protéines G (séquence DRYLAIV de la seconde boucle intracellulaire absente ou modifiée). Les récepteurs DARC, D6, CXCR7, CCRL2 et CCX-CKR font partie de ces récepteurs atypiques. Les récepteurs D6 et DARC peuvent fixer 12 et 22 chimiokines respectivement, dont 8 peuvent reconnaitre les deux récepteurs (parmi lesquelles MCP-1/CCL2 et RANTES/CCL5). D6 va plutôt fixer des chimiokines pro-inflammatoires de la famille CC et DARC de la famille CC et CXC alors que CCX-CKR fixe des chimiokines homéostatiques. CXCR7 quant à lui reconnaît les chimiokines Interferon-inductible T-cell A Chemottractant/CXCL11 (I-TAC/CXCL11) et SDF-1/CXCL12. Ces récepteurs permettent de réguler la signalisation induite par les chimiokines en les séquestrant à la membrane d'une part et d'autre part en favorisant la dégradation des chimiokines après endocytose, empêchant leurs actions sur leurs RCPG « classiques ». Une fois internalisée par endocytose, la chimiokine sera dégradée par voie lysosomale et le

récepteur recyclé à la membrane. Les récepteurs D6, CXCR7 et CCX-CKR sont internalisés et recyclés de manière constitutive que la chimiokine soit présente ou non. DARC peut également s'oligomériser avec CCR5 entraînant une diminution de son effet. Ces récepteurs peuvent également participer à la transcytose des chimiokines. DARC permet la transcytose endothéliale de plusieurs chimiokines et CXCR7 celle de SDF-1/1CXCL12 (Mortier et al., 2012; Hansell et al., 2011) (Figure 24).



Figure 24 : Récepteurs atypiques

Les chimiokines peuvent se fixer à des récepteurs atypiques (ACKR) n'induisant pas de signalisation intracellulaire dépendante des protéines G. Le récepteur atypique régule l'activité des chimiokines en les internalisant entrainant leur dégradation, il peut également se dimériser avec des RCPG modulant leur effet (a). Il peut aussi transporter les chimiokines d'un côté de la cellule à l'autre ou les séquestrer à la membrane (b) (Nibbs and Graham, 2013).

B. Les GAG

a. Structure

Les Glycosaminoglycanes (GAG) sont des polysaccharides linéaires de taille variable constitués d'une répétition d'unités disaccharidiques chargées négativement. A l'exception des kératanes sulfates qui sont composés d'un dissacharide de D-glucose lié à une N-acétyl-glucosamine, les disaccharides sont composés d'un acide uronique (acide D-glucuronique ou L-iduronique) lié par liaison osidique à un ose aminé (N-acétyl-glucosamine ou N-acétyl-glactosamine). Les GAG sont présents dans la matrice extracellulaire ou au niveau de la membrane des cellules, et peuvent être libres ou associé à une protéine pour former un protéoglycane. Les chaînes de GAG sont associées à une sérine portée par la protéine au niveau d'un motif sérine-glycine par l'intermédiaire d'un résidu xylose-galactose-galactose-acide glucuronique, le xylose et la sérine formant une liaison O-glycosidique. Les GAG peuvent être classés en deux familles, les GAG non sulfatés (l'acide hyaluronique) et les GAG

sulfatés comprenant les Chondroïtines Sulfates (CS), les Dermatanes Sulfates (DS), les Kératanes Sulfates (KS) et l'Héparine/Héparanes Sulfates (Hp/HS). Les CS et DS se composent de N-acétyl-galactosamine alors que les Hp/HS, qui constituent la majorité des GAG membranaires, se composent de N-acétyl-glucosamine (Gandhi and Mancera, 2008) (Figure 25).



Figure 25 : Structure des GAG

Les GAG sont formés d'une répétition d'un disaccharide définissant le type de GAG. Acide glucuronique et galactosamine pour les chondroïtines, acide glucuronique ou iduronique et galactosamine pour les dermatanes et acide glucuronique ou iduronique et glucosamine pour les héparane. Les GAG peuvent être fixés par O-glycosylation par un motif xylose-galactose-galactose-acide glucuronique sur la sérine d'une protéine. Les GAG sont sulfatés à différentes positions, 2-O pour l'acide iduronique, 4-O et 6-O pour le galactosamine ou 3-O et 6-O pour le glucosamine. (Couchman, 2010).

b. Sulfaté ou non

Outre l'acide hyaluronique, tous les GAG sont sulfatés. Les chaînes GAG subissent des modifications post-traductionnelles de sulfatation et d'épimérisation. Pour les HS, le disaccharide est composé de l'acide D-glucuronique et du N-acétyl-D-glucosamine et la chaîne GAG se compose d'une répétition de 50 à 200 disaccharides. Les polymérases Exostosines (EXT) sont responsables de l'élongation de la chaîne, EXT-1 possède l'activité transférase alors que EXT-2 semble plutôt être la protéine chaperonne dans le complexe EXT-1/EXT-2. Suite à l'élongation de la chaîne polysaccharidique, les N-Déacétylases/N-Sulfotransférases (NDST) vont remplacer les groupements N-acétylés de certain glucosamines par des groupements N-sulfatés. Certain acides glucuroniques vont être

épimérisés en acide iduronique puis sulfaté en position 2-O. Il va se produire également des sulfatations en position 6-O, et plus rarement 3-O, du glucosamine. Les sulfatations et acétylations sont très variables d'un polysaccharide à l'autre, l'héparine possède des motifs glucosidiques sulfatés homogènes et un taux de sulfatation parmi les plus élevés. Contrairement à l'héparine, les chaînes HS possèdent des domaines riches en sulfates (5-10 disaccharides composés d'un acide L-iduronique sulfaté en position 2-O avec un N-SO₃-glucosamine sulfaté en position 2-N et 6-O), faiblement sulfatés (acide glucuronique ou iduronique avec glucosamine N-acétylé non sulfaté ou sulfaté en 2-N, 6-O et/ou 3-O) et non sulfatés (acide glucuronique avec N-acétyl-glucosamine). La sulfatation permet d'apporter une forte charge négative, nécessaire pour l'interaction électrostatique avec ses ligands (Gandhi and Mancera, 2008; Multhaupt and Couchman, 2012) (Figure 26).



Figure 26 : Voie de synthèse des GAG à chaînes HS

Les GAG subissent des modifications post-traductionnelles de sulfatation et d'acétylation. Le complexe EXT-1/EXT-2 permet l'élongation de la chaîne GAG. Les NDST vont remplacer les groupements N-acétylés par des groupements N-sulfatés. Les acides D-glucuroniques peuvent être épimérisés en acide L-iduronique puis sulfatés en position 2-O. Le D-glucosamine peut être sulfaté en position 6-O et 3-O (A). Les chaînes HS possèdent des domaines riches en sulfates (5-10 disaccharides composés d'acide iduronique et de N-SO₃-glucosamine, S domain), faiblement sulfatés (N-acétyl- et N-SO₃-glucosamine, NA/NS domain) et non sulfatés (N-acétyl-glucosamine, NAc domain) (B) (Alexopoulou et al., 2007).

c. Réservoir à chimiokines ou co-Récepteur fonctionnel

Les chaînes HS ont de nombreux ligands, tels que des facteurs de croissance (FGF), des chimiokines (RANTES/CCL5, IL-8/CXCL8), des protéines d'adhérence (fibronectine), des récepteurs (FGFR), des pathogènes (glycoprotéine 120 (gp120) du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH)), ce qui confère aux chaînes GAG de nombreux rôles biologiques. L'interaction a principalement lieu entre des clusters d'acides aminés basiques chargés positivement (arginine, lysine et histidine) des protéines avec les groupements sulfates et carboxyles chargés négativement des chaînes GAG. Il a été montré une séquence commune au niveau du site d'interaction des chimiokines avec les chaînes HS, elles contiennent une séquence XBBXBX ou XBBBXXBX avec B étant un acide aminé basique tels que l'arginine, la lysine ou l'histidine et X un autre acide aminé. Cette séquence se situe dans le domaine C-terminal pour l'IL-8/CXCL8, la boucle 40S pour MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 et RANTES/CCL5 et dans la boucle 20S pour SDF-1/CXCL12. La proportion entre les groupements N-sulfates et O-sulfates semble avoir une importance dans la spécificité de l'interaction avec un ligand. La N-sulfatation est moins importante que la O-sulfatation pour la liaison de RANTES/CCL5 alors que MCP-1/CCL2 et IL-8/CXCL8 semblent avoir besoin des deux types de sulfatation. En ce qui concerne le FGF-2, les groupements 2-O sulfate et Nsulfate sont suffisants pour l'interaction entre les HS et le FGF-2 mais les 6-O sulfates sont importants pour la présentation du FGF-2 au FGFR-1 par les chaînes HS. La diversité des chaînes de GAG, que ce soit en terme de structure (chondroïtine, kératane, dermatane, héparane) ou de modification (taux et position de sulfatation et d'acétylation), permet une spécificité des GAG pour un ligand donné (Gandhi and Mancera, 2008; Salanga and Handel, 2011). Les GAG ont d'abord été décris comme servant de réservoir aux facteurs de croissance et chimiokines.

Les GAG ont aussi une importance dans le système immunitaire. Ils favorisent le recrutement de leucocytes sur le site inflammatoire. Les HS portés par les cellules endothéliales vont intervenir dans l'arrêt de leucocytes sur l'endothélium ainsi que dans leur infiltration vers le tissu lésé par interaction avec des molécules d'adhérences portées par les leucocytes tels que la L-sélectine.

Les cytokines et les chimiokines sont des protéines qui peuvent subir une protéolyse dans la circulation sanguine. L'interaction avec des HS permet une protection contre la protéolyse. Les GAG modulent également les effets biologiques des cytokines. En effet, la liaison de l'INF-y à son récepteur est facilitée par sa liaison à des chaînes HS. L'accumulation des chimiokines séquestrées par les GAG entraîne la formation d'un gradient de chimiokine, nécessaire à la migration des cellules par chimio-attraction. L'oligomérisation de

RANTES/CCL5 ou encore MCP-1/CCL2 est facilitée par leur liaison à des HS membranaires, ce qui permet d'une part une meilleure reconnaissance à leurs RCPG et d'autre part de former un gradient de chimiokines pour attirer d'autres cellules (Simon Davis and Parish, 2013). Les GAG peuvent également participer à la transcytose des chimiokines en les transportant du pôle basolatéral au pôle apical des cellules endothéliales, permettant un recrutement leucocytaire facilité (Mortier et al., 2012).

Les chaînes GAG peuvent être portés par des protéoglycanes localisés dans la matrice extracellulaire ou au niveau de la membrane plasmique.

La fixation du FGF-2 aux chaînes GAG d'un protéoglycane membranaire, le Synddécane-4 (SDC-4), permet la protection du FGF-2 de la protéolyse, sa présentation à son récepteur mais également une signalisation intracellulaire dépendante du SDC-4 et indépendante du FGFR (Couchman, 2010).

d. Protéoglycanes

i. Protéoglycanes matriciels

Les protéoglycanes matriciels sont des constituants proches de la matrice extracellulaire mais ils ont également des rôles biologiques, notamment dans l'angiogenèse.

Le perlécane est un long PGHS dont la partie protéique est composée de plus de 4 000 acides aminés. C'est le principal constituant des lames basales. Il peut fixer de nombreux facteurs pro-angiogéniques tels que plusieurs FGF, le VEGF-A ou encore les PDGF-AA et PDGF-BB lui permettant de moduler l'angiogenèse en séquestrant ces facteurs ou en les présentant à leurs récepteurs respectifs. Le clivage par l'héparanase des chaînes HS portées par le domaine N-terminal permet la libération des chaînes HS et du VEGF ce qui a pour effet de stimuler l'angiogenèse. En revanche, lorsque la partie C-terminale du perlécane est clivée par des protéases, le fragment libéré (endorépelline) agit en agent antiangiogéniques par l'intermédiaire d'une cascade de signalisation induite par sa liaison à l'intégrine $\alpha 2\beta 1$ (lozzo and Sanderson, 2011).

La décorine appartient à la famille des Small Leucine-Rich Proteoglycans (SLRP). C'est un protéoglycane à chaînes CS et DS « décorant » les fibres de collagène. La décorine a un effet anti-prolifératif en régulant l'activité de facteurs de croissance tels que le TGF-β (séquestration) ou l'EGF (endocytose et dégradation de l'EGFR) mais aussi pro-apoptotique par activation de la caspase-3 (lozzo and Sanderson, 2011).

Il existe de nombreux autres protéoglycanes matriciels tels que l'agrécane, le versicane ou encore le lumicane. Le lumicane est un KS de la famille SLRP qui aurait des effets anti-angiogéniques. En effet, il peut interagir avec des intégrines membranaires ce qui déstabiliserait le cytosquelette d'actine et l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire (lozzo and Sanderson, 2011).

ii. Protéoglycanes membranaires

La majorité des protéoglycanes membranaires portent des GAG de type HS (PGHS). Parmi les PGHS membranaires, la famille des quatre syndécanes transmembranaires et la famille des six glypicanes fixés à la membrane par une ancre Glycosylphosphatidylinositol (GPI) sont les plus représentatifs. Le CD44, le β -glycane, le testicane, les neuropilines sont également des protéoglycanes membranaires qui peuvent porter des chaînes CS et/ou HS (Simon Davis and Parish, 2013).

La partie protéique des glypicanes présente un poids moléculaire compris entre 60 et 70kDa. Le domaine C-terminal contient des sites d'attachement aux HS mais également à l'ancre GPI. Les glypicanes sont impliqués dans de nombreux processus telles que la carcinogenèse ou la morphogenèse. Le glypicane-3 participe à l'oncogenèse induite par l'Insuline-like Growth Factor (IGF) et la voie Wnt lorsqu'il est lié à la membrane mais sa forme soluble inhibe la croissance du carcinome hépatocellulaire (Cheng et al., 2008; Zittermann et al., 2010). Le glypicane-1 membranaire favorise la signalisation induite par le FGF-2 et l'EGF conduisant à la croissance tumorale alors que la forme clivée a tendance à inhiber ces effets (Kleeff et al., 1998). Le glypicane-5 potentialise l'effet prolifératif du FGF-2 et de l'HGF (lozzo and Sanderson, 2011).
iii. La famille des syndécanes

Les quatre syndécanes humains sont des protéoglycanes transmembranaires à chaînes héparane sulfate, les SDC-1 et SDC-3 portent également des chaînes chondroïtine sulfate. L'expression tissulaire de chaque syndécane est différente.

Le SDC-1, composé de 310 acides aminés pour 33 kDa, est exprimé principalement au niveau de la membrane basolatérale des cellules épithéliales. Il permet l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire et régule la morphologie des cellules par interaction avec le cytosquelette d'actine. Le SDC-2, composé de 201 acides aminés pour 23k Da, est surtout retrouvé dans les cellules mésenchymateuses et dans les tissus neuronaux. Il est impliqué dans l'angiogenèse par interaction avec l'EGF, le FGF-2 et le VEGF, mais aussi dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Le plus grand des syndécanes, avec 442 acides aminés pour 43 kDa est le SDC-3. Il est présent, entre autre, dans les tissus neuronaux et musculaires squelettiques et est impliqué dans la formation du cytosquelette et dans la pathogenèse de l'obésité. Contrairement aux autres syndécanes, le SDC-4 est exprimé ubiquitairement et avec 198 acides aminés pour 22 kDa c'est le plus petit des syndécanes. Il est impliqué dans la migration cellulaire par la réorganisation du cytosquelette d'actine et formation de contacts focaux et par interaction avec le FGF-2 (Alexopoulou et al., 2007; lozzo and Sanderson, 2011). Alors que les domaines transmembranaire et intracellulaire sont fortement conservés, le domaine extracellulaire est variable entre chaque syndécane (Figure 27).

Le domaine extracellulaire porte les chaînes GAG au niveau de résidus sérines conservés entre les syndécanes. Par l'intermédiaire des chaînes GAG, le domaine extracellulaire permet une interaction avec le milieu extérieur par reconnaissance de protéines de la matrice (fibronectine) mais également une communication avec le milieu environnant par fixation de facteurs de croissance (FGF), cytokines/chimiokines (RANTES/CCL5). La chaîne GAG commence par un tétrasaccharide xylose-galactose-galactose-acide glucuronique servant d'accroche au syndécane. Les chaînes HS se composent d'une répétition de 50 à 150 disaccharides. Les acides D-glucuroniques peuvent être épimérisés en acides L-iduroniques qui peuvent être sulfatés en position 2-O. Le N-acetyl-glucosamine peut être sulfaté en positions 6-O et 3-O mais également subir des N-sulfatations. Le type de sulfatation peut être important dans la spécificité d'un ligand, par exemple le FGF-2 reconnaît des séquences riches en N-, 2-O et 6-O sulfatation alors que la fibronectine nécessite une N-sulfatation. Le domaine extracellulaire peut être clivé par des protéases relarguant l'ectodomaine dans le milieu extracellulaire (Alexopoulou et al., 2007).

Le domaine transmembranaire de 25 acides aminés présente une homologie de 60 à 80% entre les différents syndécanes. Il joue une rôle important dans l'oligomérisation des syndécanes, étape clé dans la fonctionnalité des syndécanes (Alexopoulou et al., 2007).

Le domaine C-terminal intracellulaire est subdivisé en trois sous-domaines, un domaine Variable (V) entouré de deux domaines hautement Conservés (C), le sous-domaine C1 étant juxtaposé au domaine transmembranaire et le sous-domaine C2 étant localisé en position C-terminale. Le domaine intracellulaire des syndécanes permet une interaction avec les protéines cytoplasmiques des cellules. Le sous-domaine C1 permet un lien avec le cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de protéines telles que l'erzine, la cortactine, c-src. Le sous-domaine C2 se termine par quatre acides aminés (EFYA) permettant une interaction avec les protéines à domaine Post-Synaptic Density protein 95 (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor-1 (Dlg1), Zonula occludens-1 (Zo1) (PDZ) telles que la synectine, la synténine, la synbidine, Calcium/calmodulin-dependent Serine protein Kinase (CASK). Le domaine V est différent pour chaque syndécane ce qui permet une interaction de protéines spécifiques à chaque syndécane. Pour le SDC-4, le domaine V interagit avec le PIP2, la PKC- α et l' α -actinine (Alexopoulou et al., 2007).



Figure 27 : La famille des syndécanes

Les syndécanes sont des protéoglycanes transmembranaires à chaînes HS pour les SDC-2 et SDC-4 ou HS et CS pour les SDC-1 et SDC-3. Le domaine extracellulaire N-terminal porte les chaînes HS et CS. Le domaine intracellulaire est divisé en régions C1 (sous membranaire) et C2 (C-terminale) très conservées entourant la région V variable. Le domaine extracellulaire peut être clivé dans la zone proche de la membrane (Shedding site) par des protéases (Pap and Bertrand, 2013).

C. Le Syndécane-4

Le SDC-4, anciennement nommé ryudocane, est le plus petit des syndécanes (198 acides aminés pour 22 kDa). Il a une expression ubiquitaire et il est codé par un gène qui se trouve sur la région q12 du chromosome 20. Le SDC-4 se trouve dans la membrane sous forme de dimère par interaction entre le domaine intracellulaire de chaque syndécane (Shin et al., 2001).

L'expression génique du SDC-4 est augmentée en conditions d'hypoxie par l'intermédiaire du TNF- α qui induit une plus forte transcription en ARNm par la voie NF κ B et une stabilisation de l'ARNm du SDC-4. En revanche, le TNF- α a une régulation négative de l'expression du SDC-1. Le TGF- β 2 présente le même effet que le TNF- α . Le FGF-2 peut induire l'expression de SDC-4 par les cellules musculaire lisses mais pas l'expression du SDC-1 (Zhang et al., 1999; Tkachenko et al., 2005; Alexopoulou et al., 2007).

a. Interactions

i. Relation avec le milieu extracellulaire

Le domaine N-terminal extracellulaire de 145 acides aminés du SDC-4 porte des chaînes HS au niveau de 3 sérines (39, 61 et 63). Ces chaînes GAG permettent une interaction avec l'environnement extérieur que ce soit la matrice extracellulaire (fibronectine), les facteurs de croissance et les cytokines/chimiokines (FGF, RANTES/CCL5) ou encore avec des molécules d'adhérence (intégrine) (Manon-Jensen et al., 2013).

Les ectodomaines des SDC-1 et SDC-4 peuvent être clivés et relargués dans la circulation sanguine. Le processus de clivage, ou « shedding », pourrait réguler les fonctions cellulaires des GAG. En effet, il a été montré que le clivage du domaine extracellulaire du SDC-4 par la protéase ADAMTS1 induit une perte de l'adhérence cellulaire (Rodríguez-Manzaneque et al., 2009). Il a été montré que les clivages de l'ectodomaine du SDC-4 peuvent être effectués par plusieurs protéases différentes (MMP-2, MMP-9, thrombine, plasmine) et au niveau de plusieurs acides aminés rassemblés en deux groupes, un groupe en amont des sérines de fixation des chaînes HS, et un groupe situé dans les 40 acides aminés juxtaposés au domaine transmembranaire (Manon-Jensen et al., 2013) (Figure 28).



<u>Figure 28</u> : Sites de clivage protéolytiques des domaines extracellulaires des SDC-1 et SDC-4 Les ectodomaines des SDC-1 et SDC-4 peuvent être clivés par de nombreuses protéases (shedding). Les protéases vont cliver les syndécanes principalement dans les 20-40 acides aminés en amont du domaine transmembranaire et entre les chaînes HS et CS pour le SDC-1 ou juste en amont des HS pour le SDC-4 (Manon-Jensen et al., 2013).

Notre laboratoire a montré l'importance des chaînes GAG des SDC-1 et SDC-4 dans les effets cellulaires induits par les chimiokines SDF-1/CXCL12 et RANTES/CCL5 (Brule et al., 2009; Charni et al., 2009; Friand et al., 2009; Suffee et al., 2012).

Le SDC-4 permet l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire par interaction de son domaine extracellulaire avec les composants de la matrice extracellulaire. En effet, les chaînes HS de l'ectodomaine interagissent avec des composants de la matrice extracellulaire telle que la fibronectine. De plus, la partie protéique et les chaînes HS de l'ectodomaine du SDC-4 peuvent interagir avec la laminine-332 (Carulli et al., 2012). Par ailleurs, le domaine intracellulaire du SDC-4 interagit avec des protéines associées au cytosquelette d'actine telle que l' α -actinine, ce qui sous-entend le rôle du SDC-4 dans la migration cellulaire (Elfenbein and Simons, 2013).

L'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire est un processus nécessaire à l'organisation des tissus. La modulation de l'adhérence est également une étape importante dans l'angiogenèse. Les cellules endothéliales migrent pour se déplacer vers un gradient chimioattractant. Pour ce faire, la cellule s'étale sur la matrice extracellulaire puis le pôle postérieur de la cellule se détache du support et se rétracte vers l'avant. Ce mécanisme de migration directionnelle nécessite à la fois l'intervention du cytosquelette intracellulaire mais également la matrice extracellulaire. L'expression de molécules d'adhérence à la surface cellulaire permet l'interaction de la cellule avec les protéines de la matrice extracellulaire (Woodham and Machesky, 2014).

Les intégrines sont des protéines transmembranaires composées d'une sous-unité a et d'une sous-unité β . Elles participent à l'adhérence cellulaire en interagissant d'un côté avec le cytosquelette d'actine, et d'un autre coté avec des protéines de la matrice extracellulaire. La formation de contacts focaux et la migration de cellules de mélanome sur de la fibronectine requièrent deux mécanismes parallèles. Soit l'intégrine α 5 β 1 est impliquée, ce qui nécessite la présence du SDC-4 et l'activation de la PKC-α, soit l'intégrine α 4 β 1 est impliquée et ne nécessite ni le SDC-4 ni la PKC- α (Mostafavi-Pour et al., 2003). Des résultats contradictoires ont été montrés avec des cellules mésenchymateuses. En effet, l'adhérence de ces cellules à un peptide composé uniquement du domaine extracellulaire du SDC-2 ou du SDC-4 et la migration est dépendante de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$. Cette adhérence passe par la formation de contacts focaux et l'activation de RhoA. De plus, l'adhérence des cellules sur l'ectodomaine du SDC-2 ou SDC-4 semble indépendante de la présence de chaînes HS (Whiteford et al., 2007). Il a été montré que l'intégrine α 6 β 4 peut interagir avec le SDC-1 et le SDC-4 et que cette interaction régule l'étalement et la migration de kératinocytes sur un support de laminine-5 via les récepteurs Human Epidermal growth factor Receptor 2 (HER2) et EGFR respectivement (Wang et al., 2014).

Lors d'une blessure, la Tissue transGlutaminase 2 (TG2) est sécrétée et se fixe sur la fibronectine. Des MMP sont également sécrétées et dégradent la fibronectine. De ce fait, la fibronectine dégradée interagit avec l'intégrine α 5 β 1, ce qui déstabilise l'adhérence cellulaire. Afin de pallier à cette déstabilisation, les chaînes HS du SDC-4 vont interagir avec la TG2 fixé à la fibronectine. La PKC- α , activée par le domaine intracellulaire du SDC4, active le SDC-2. L'ectodomaine du SDC-2 interagit avec la fibronectine soluble et favorise la formation de fibrille de fibronectine. De cette manière, la cellule reste adhérée à la matrice extracellulaire (Wang et al., 2010).

Le domaine extracellulaire du SDC-4 permet d'interagir avec l'environnement extracellulaire à deux niveaux. Il permet à la fois l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire et à la fois une régulation des signaux extérieurs.

ii. Oligomérisation dans la membrane

Le domaine transmembranaire de 25 acides aminés est fortement conservé entre les différents syndécanes. Chaque syndécane peut se retrouver sous forme d'homodimère par l'intermédiaire d'un motif GXXXG (GGIVG pour le SDC-4). En effet, des peptides codant pour les domaines transmembranaires des différents syndécanes peuvent s'homodimériser. Les peptides peuvent également se trouver sous forme d'hétérodimère selon différentes affinités à l'exception du couple SDC-1/SDC-4. La mutation de la première glycine du motif GXXXG diminue l'affinité des peptides alors que la mutation de la seconde glycine abolit la formation de dimère, prouvant l'importance du motif GXXXG dans ces dimérisations (Dews and MacKenzie, 2007).

Le domaine transmembranaire permet de faire le lien entre l'environnement extracellulaire et l'environnement intracellulaire (cytosquelette, signalisation) ainsi que la transmission de signaux (Couchman, 2010).

iii. Domaine intracellulaire

Le domaine C-terminal est court (28 acides aminés). Le domaine C1 interagit avec des protéines liées au cytosquelette d'actine telles que Src, la tubuline, l'erzine, la cortactine. Le domaine C2 va interagir avec des protéines à domaine PDZ telles que CASK, la synténine, la synectine, la synbindine, les Protein Phosphatase 1 (PP1) et PP2A. Contrairement aux autres membres de la famille des syndécanes, la partie V du SDC-4 permet une interaction avec le PIP2 (par le motif Y¹⁸⁸KK), à la PKC- α , à l' α -actinine, au syndesmose et à la FAK. Le domaine V du SDC-4 permet la stimulation d'une signalisation intracellulaire et la présence du SDC-4 au niveau des contacts focaux (Alexopoulou et al., 2007) (Figure 29).



Figure 29 : Interaction intracellulaire du SDC-4

Le domaine intracellulaire du SDC-4 permet une interaction du SDC-4 avec de nombreuses protéines. Le domaine C1 interagit avec des protéines liées au cytosquelette, C2 avec les protéines à domaine PDZ et V avec le PIP2, la PKC- α et des protéines liées au cytosquelette (Multhaupt et al., 2009).

b. Signalisation intracellulaire

En fixant le FGF par l'intermédiaire de ses chaînes HS, le SDC-4 présente d'une part le FGF à son récepteur classique FGFR entraînant une signalisation dépendante du FGFR, et d'autre part le SDC-4 entraîne une signalisation intracellulaire dépendante de son domaine intracellulaire et indépendante du FGFR (Elfenbein and Simons, 2013).

En l'absence de stimulation, la sérine en position 179 chez l'homme (183 chez le rat) du domaine C1 du SDC-4 est phosphorylée. La PKC- δ est responsable de cette phosphorylation (Murakami et al., 2002).

La liaison du FGF-2 aux chaînes HS du SDC-4 induit le recrutement d'une phosphatase cellulaire de la famille PP1 ou PP2A, au niveau du domaine C2, et la déphosphorylation de la sérine 179. Le PIP2 se fixe alors au niveau du domaine V par l'intermédiaire des acides aminés Y¹⁸⁸KK. Le PIP2 va promouvoir l'oligomérisation de plusieurs SDC-4 ce qui a pour effet d'activer la PKC- α (Horowitz and Simons, 1998a, 1998b; Horowitz et al., 2002). L'activation de la PKC- α permet une signalisation intracellulaire par l'intermédiaire de RhoG et Rac1 (Elfenbein et al., 2009).

En absence de ligand, le SDC-4 interagit avec la synectine ce qui permet de complexer Rho protein GDP Dissociation Inhibitor-1 (RhoGDI-1). RhoGDI-1 est un inhibiteur de RhoG et Rac1 en les séquestrant sous une forme inactive liée avec un GDP. En revanche, RhoA est activé. Ceci entraîne une faible capacité migratoire des cellules. Lorsque la PKC- α est activée, elle phosphoryle la sérine 96 de RhoGDI-1 libérant RhoG et Rac1 de RhoGDI-1. RhoG activé forme alors un complexe avec la protéine Engulfment and cell Motility protein 1 (ELMO1) et la protéine Dedicator of cytokinesis 180 (Dock180) et ce complexe va échanger le GDP lié à Rac1 en GTP, permettant son activation. RhoA peut également être activé par la phosphorylation de la sérine 34 de RhoGDI-1 par la PKC- α (Elfenbein et al., 2009; Elfenbein and Simons, 2013) (Figure 30).



<u>Figure 30</u> : Signalisation intracellulaire SDC-4 dépendante induite par le FGF-2 La fixation du FGF-2 au SDC-4 entraine l'activation de la PKC- α qui phosphoryle RhoGDI-1 sur la sérine 96 du complexe synectine-RhoGDI-1-RhoG. RhoG libéré du complexe est activé (GDP remplacé par GTP), forme un complexe avec ELMO1 et Dock180 activant Rac1 (GDP remplacé par GTP) (Elfenbein et al., 2009).

Il a également été décrit une signalisation impliquant la voie mammalian Target Of Rapamycin (mTOR). L'axe SDC-4/FGF-2/FGFR va d'une part activer la PI3K par le FGFR, conduisant à la formation de PIP3 et à la translocation d'Akt à la membrane, et d'autre part activer la PKC- α permettant l'activation de Akt par la Phosphoinositide-Dependent Kinase 1 (PDK1), p21 Protein Activated Kinase 1 (PAK1) et le mTOR Complex 2 (mTORC2). Cette signalisation conduit à l'activation de l'endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) permettant de réguler la pression sanguine. En effet, en absence de SDC-4, eNOS n'est pas activée ce qui résulte en une augmentation de la pression sanguine (Partovian et al., 2008; Ju and Simons, 2013).

c. Rôles

i. Co-récepteur fonctionnel

Les chaînes GAG du SDC-4 peuvent fixer des facteurs de croissances tels que le FGF et le VEGF. Il a été montré que le SDC-4 permet de présenter le FGF à son récepteur « classique » à tyrosine kinase FGFR et de stabiliser le complexe ainsi formé. Il participe ainsi à la signalisation induite par le FGF, notamment par la voie MAPK. Comme décrit précédemment, le FGF induit également une signalisation indépendante du FGFR directement via le SDC-4. Le SDC-4 va ainsi permettre d'induire les effets cellulaires induits par le FGF-2 tels que la prolifération, la migration, la formation de réseaux vasculaires. Le SDC-4 va aussi permettre d'induire la libération d'oxyde nitrique après une stimulation de cellules endothéliales par le FGF-2, ce qui a pour conséquence d'induire la vasodilatation (Zhang et al., 2003; Alexopoulou et al., 2007; Elfenbein and Simons, 2013).

Par ailleurs, le SDC-4 intervient dans la stabilisation des contacts focaux par formation de complexes intégrine $\alpha 5\beta 1/SDC-4/\alpha$ -actinine/cytosquelette d'actine. La stabilisation de ces contacts focaux passe par l'activation de protéines intracellulaires impliquées dans le remodelage du cytosquelette telles que la FAK, la vinculine et la paxilline (Elfenbein and Simons, 2013).

L'ectodomaine du SDC-4 peut être clivé par des protéases de la famille des MMP. L'ectodomaine, sur lequel sont toujours fixées les chaînes HS, ainsi libéré dans le milieu extracellulaire séquestre les ligands (facteurs de croissance, chimiokines, protéases) au niveau de la matrice extracellulaire plutôt que de les présenter à leurs récepteurs. Le SDC-4 régule ainsi régule le gradient de ligands (Elfenbein and Simons, 2013; Manon-Jensen et al., 2013).

Le SDC-4 a également un rôle dans l'internalisation du FGFR. En réponse au FGF-2, le SDC-4 est internalisé sous forme d'un complexe SDC-4/FGF-2/FGFR. L'internalisation se produit par macropinocytose impliquant l'activation de Rac1 et RhoG. L'internalisation du complexe par l'intermédiaire de la clathrine ou la cavéoline seraient minoritaires. De plus, l'internalisation du complexe permet une activation de la voie Erk1/2 par le FGFR depuis l'endosome (Tkachenko et al., 2004; Alexopoulou et al., 2007; Elfenbein et al., 2012) (Figure 31).



<u>Figure 31</u> : Internalisation du complexe FGF-2/FGFR par le SDC-4 L'activation de RhoG par le complexe SDC-4/FGF-2/FGFR entraîne l'internalisation du complexe. Le complexe internalisé active ainsi la voie Erk1/2 *via* Rab5 (Elfenbein et al., 2012).

ii. Développement embryonnaire

Le SDC-4 est important pour le développement embryonnaire mais pas indispensable, les souris déficientes en SDC-4 étant viables et fertiles. Elles montrent une dégénérescence des vaisseaux sanguins du placenta mais également une réparation tissulaire plus faible par défaut de l'angiogenèse et de la formation de contacts focaux. Les souris SDC-4 déficientes meurent après une injection de Lipopolysaccharide (LPS), ce qui suggère qu'elles sont sensibles aux pathogènes (Tkachenko et al., 2005). Bien que le SDC-4 soit fortement exprimé dans le foie, des souris déficientes ne montrent pas de défaut pour l'organogenèse du foie ou pour sa fonction. En revanche, l'administration de κ -carrageenan, qui cause une néphropathie par obstruction des vaisseaux, provoque la mort de ces souris (Alexopoulou et al., 2007; Couchman, 2010).

Le SDC-4 est indispensable pour le développement de la crête neurale chez le Xénope en contrôlant la polarisation et la migration directionnelle des cellules par interaction avec la fibronectine et l'inhibition de Rac (Matthews et al., 2008).

iii. Inflammation et réparation tissulaire

L'inflammation est un processus impliquant un recrutement leucocytaire sur le site lésé. Ce recrutement nécessite un arrêt des leucocytes circulants sur les cellules endothéliales et une transmigration à travers l'endothélium vers le tissu.

Après un infarctus du myocarde, l'hypoxie associée à la sécrétion de TNF-α induit une augmentation de l'expression de SDC-4 et de VEGF dans les cellules avoisinant la zone de lésion (fibroblastes, cellules endothéliales, cardiomyocytes). On retrouve également chez les patients ayant présenté un infarctus un taux plasmatique de SDC-4 plus élevé que chez des patients sains. Etant donné que le SDC-4 peut interagir avec des facteurs de croissance, des protéases et anti-protéases, il pourrait jouer un rôle de balance dans le processus de réparation (angiogenèse, prolifération) en le favorisant lorsque l'ectodomaine du SDC-4 a été clivé puis relargué loin du site lésé (Kojima et al., 2001; Alexopoulou et al., 2007).

Après une angioplastie par ballonnet (blessure de la paroi d'un vaisseau sanguin), les cellules musculaires lisses vont sécréter de la matrice extracellulaire, proliférer et migrer vers l'intima, ce qui a pour effet de déstabiliser la paroi. Le FGF-2 synthétisé lors de l'angioplastie va entraîner une forte et rapide synthèse de SDC-4 sur une courte période alors que les PDGF-AB et PDGF-BB vont permettre une plus faible synthèse de SDC-1 pour une expression prolongée dans le temps. La balance entre les deux syndécanes régule ainsi la migration, la prolifération et l'interaction des cellules musculaires lisses et endothéliales avec la matrice extracellulaire (Cizmeci-Smith et al., 1997; Alexopoulou et al., 2007).

La surexpression du SDC-4 dans les cœurs de rats par injection intra-myocardique d'un vecteur codant pour le SDC-4 permet une survie augmentée après un infarctus. En effet, le SDC-4 induit une augmentation de la néovascularisation dans la zone ischémiée, ce qui peut expliquer la survie accrue des myocytes et une diminution de la fibrose. Le SDC-4 entraîne également une diminution de l'inflammation au niveau de la blessure (baisse de l'infiltration monocytaire et des cytokines/chimiokines pro-inflammatoires/fibrotiques) (Xie et al., 2012). La diminution de l'infiltration monocytaire chez des rats surexprimant le SDC-4 est en contradiction avec une précédente étude qui a montré le même effet mais chez des souris déficientes en SDC-4 (Matsui et al., 2011). Une hypothèse avancée par les auteurs pouvant expliquer cette contradiction serait l'implication de la forme clivée du SDC-4. En effet, les rats surexprimant le SDC-4 montrent également une surexpression de

l'ectodomaine du syndécane. Les ectodomaines pourraient fixer les facteurs proinflammatoires et les éloigner de la zone blessée, ce qui pourrait expliquer la diminution de l'inflammation au niveau de la blessure (Xie et al., 2012).

iv. Angiogenèse et cancer

Il a été montré que le SDC-4 est impliqué dans plusieurs cancers tels que les cancers testiculaire (Labropoulou et al., 2013), pulmonaire (Park et al., 2013), mammaire (Baba et al., 2006), ovarien (Davies et al., 2004) ou le mélanome (Chalkiadaki et al., 2009; O'Connell et al., 2009).

Les prostaglandines sont des médiateurs lipidiques. La Prostaglandine E2 (PGE2) stimule l'angiogenèse et la croissance des tumeurs. La PGE2 agit par l'intermédiaire de RCPG spécifiques conduisant à l'activation d'Erk *via* la voie PI3K et à l'angiogenèse. Il a été montré que des souris déficientes en SDC-4 présentent une réponse angiogénique à la PGE2 plus faible que des souris sauvages. Des tests *in vitro* ont montré que l'activation d'Erk par la PGE2 peut être indépendante de la voie PI3K en passant par la voie SDC-4/PKC- α . Le SDC-4 aurait un rôle dans la tumorigenèse en stimulant l'angiogenèse induite par la PGE2 (Corti et al., 2013).

Notre laboratoire a récemment montré que la chimiokine RANTES/CCL5 a un rôle angiogénique *in vitro* et *in vivo* dépendant des chaînes GAG par l'utilisation de mutants de RANTES/CCL5 déficients dans leur fixation aux GAG. De plus, l'utilisation d'anticorps neutralisants anti-SDC-1, -SDC-4 ou -CD44 diminue son rôle pro-angiogénique, démontrant une implication de ces protéoglycanes (Suffee et al., 2012). Nous avons précédemment montré que la chimiokine SDF-1/CXCL12 induit l'invasion de cellules de carcinome hépatocellulaire (Huh7) et de tumeur du col utérin (HeLa) de manière SDC-4 dépendante par l'utilisation de siRNA anti SDC-4 (Sutton et al., 2007a; Brule et al., 2009; Charni et al., 2009). RANTES/CCL5 agit de même sur plusieurs lignées de carcinome hépatocellulaire (Huh7, HepG2, Hep3B) (Charni et al., 2009). MCP-1/CCL2 induit également la migration et l'invasion de cellules Huh7 de manière SDC-4 dépendante (Dagouassat et al., 2010).

v. Autres pathologies

La néphropathie IgA est caractérisée par une altération de l'interaction des cellules avec la matrice extracellulaire. Chez des patients atteints de cette maladie, le taux de SDC-4 est augmenté. Etant donné que le SDC-4 est un lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine, il pourrait avoir un rôle dans la modulation de l'adhérence des cellules (Alexopoulou et al., 2007).

Le VIH porte à sa surface la glycoprotéine gp120. Le virus peut entrer dans les cellules par l'intermédiaire d'un complexe gp120/CD4 puis interaction gp120/CCR5 ou CXCR4, fusion des membranes du virus et de la cellule et internalisation dans la cellule. Les syndécanes peuvent moduler l'entrée du VIH dans les cellules. En effet, la gp120 peut se fixer aux chaînes HS portées par les syndécanes. Il a été montré que l'entrée du VIH dans des macrophages exprimant faiblement CD4 est diminuée si l'interaction gp120/syndécane est bloquée, mais cela n'a pas d'effet sur les lymphocytes T exprimant fortement CD4. Dans les cellules exprimant peu de CD4, les syndécanes jouerait un rôle de co-récepteur pour présenter le virus aux RCPG. Les syndécanes endothéliaux agiraient de la même façon en présentant le VIH aux RCPG des cellules circulantes. L'ectodomaine du SDC-4 relargué dans le sang pourrait se fixer au gp120 et permettrait de diminuer l'entrée du virus dans les cellules en saturant les domaines de fixation de la gp120 (Gallay, 2004).

Le Virus de l'Hépatite C (VHC) s'associe avec des lipoprotéines humaines, telle que l'ApoE, afin d'infecter les cellules du foie. Il a été montré que l'attachement du virus a des hépatocytes est dépendant de la fixation de l'ApoE aux PGHS cellulaires (Jiang et al., 2012). De plus, l'entrée du VHC dans les cellules est dépendante du SDC-1 et du SDC-4. En effet, l'utilisation d'ARN interférents ciblant le SDC-1 ou le SDC-4 montre une diminution de l'attachement et l'infection des cellules hépatiques par le VHC (Lefèvre et al., 2014; Shi et al., 2013).

3. Rôles des chimiokines A. Développement embryonnaire

Les cellules sanguines dérivent de Cellules Souches Hématopoïétiques (CSH). Les CSH sont circulantes dans le sang, elles ont besoin de traverser l'endothélium pour rejoindre la moelle osseuse et se différencier en cellule de la lignée hématopoïétique. Des souris

déficientes en SDF-1/CXCL12 ou son récepteur CXCR4 ne sont pas viables. L'analyse de moelle osseuse d'embryons SDF-1/CXCL12 déficients montrent une diminution du nombre de CSH (Ara et al., 2003). De même, la vascularisation de l'intestin et du rein est altérée chez des embryons déficients en SDF-1/CXCL12 ou son récepteur CXCR4 (Ara et al., 2005; Takabatake et al., 2009).

L'axe SDF-1/CXCL12-CXCR4 est impliqué dans l'organogenèse du pancréas. En effet, la chimiokine SDF-1/CXCL12 est sécrétée par l'endoderme. Les angioblastes, qui expriment le CXCR4, sont attirés vers l'endoderme et permettent ainsi la différenciation de cellules endodermiques en cellules du pancréas par induction de l'expression du facteur de transcription Pancreatic and duodenal homeobox 1 (Pdx1) nécessaire au développement pancréatique (Katsumoto and Kume, 2013).

SDF-1/CXCL12 est également impliqué dans le développement du cartilage et du squelette, notamment en régulant la différenciation de la lignée ostéogénique (Yellowley, 2013).

B. Inflammation et Recrutement cellulaire

Les chimiokines MCP-1/CCL2 et fractalkine/CX₃CL1 sont surexprimées chez des patients ayant subi un infarctus, elles pourraient jouer un rôle dans la vulnérabilité des plaques d'athérome, notamment en favorisant le recrutement monocytaire (Li et al., 2012a).

a. Mécanisme du recrutement des leucocytes

Le recrutement leucocytaire est un mécanisme important dans le système immunitaire. Il permet l'infiltration de leucocytes circulants dans le tissu lésé. Pour ce faire, les leucocytes traversent l'endothélium en différentes étapes, l'arrêt par roulement, l'adhérence et la transmigration (Figure 32).



Figure 32 : Etapes du recrutement leucocytaire

Après activation de l'endothélium par des facteurs pro-inflammatoires, celui-ci va exprimer à sa membrane luminale des molécules d'adhérence (sélectines, ICAM, VCAM) permettant une interaction avec le leucocyte circulant. Le leucocyte va rouler sur l'endothélium (Rolling), y adhérer (Adhesion), migrer vers une jonction serrée (Crawling) et enfin transmigrer à travers l'endothélium pour rejoindre le tissu (Transmigration) (Kolaczkowska and Kubes, 2013).

Le recrutement leucocytaire est initié par un changement de la surface de l'endothélium activé. Les cellules endothéliales expriment à leur surface des molécules d'adhérence lorsqu'elles sont activées par des facteurs pro-inflammatoires (TNF- α , IL-8/CXCL8) tels que l'E-sélectine, la P-sélectine, le P-Selectin Glycoprotein Ligand 1 (PSGL1) et ICAM-1. Les leucocytes circulants vont être capturés par l'endothélium à l'aide d'interaction entre les molécules d'adhérence exprimées par les cellules endothéliales et celles exprimées par les leucocytes (L-sélectine, CD44, PSGL1, Lymphocyte Function-associate Antigen 1 (α L β 2/LFA-1)). Les leucocytes vont ainsi ralentir sur l'endothélium par un roulement (Kolaczkowska and Kubes, 2013).

Suite à ce roulement, les leucocytes vont adhérer plus fortement à l'endothélium permettant un arrêt complet des leucocytes. De nombreuses chimiokines (IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2, SDF-1/CXCL12) sont présentes à la surface de l'endothélium, liées aux protéoglycanes à chaînes HS et au récepteur DARC entraînant la formation d'un gradient chimio-attractant. Elles permettent d'activer les leucocytes par interaction avec les RCPG présents à la surface des leucocytes (CCR1, CCR2, CCR5, CXCR2, CXCR4, CX₃CR1). A la surface des leucocytes, les molécules d'adhérence « Very Late Antigen 4 » (α 4 β 1/VLA4) et L-sélectine et le récepteur CXCR4 sont retrouvés localisés à « l'avant » du leucocyte et vont interagir avec VCAM-1, CD34, et SDF-1/CXCL12 porté par des protéoglycanes de l'endothélium. Ces interactions permettent au leucocyte de migrer directionnellement par l'activation d'une signalisation intracellulaire passant par Rac1. En revanche, à « l'arrière » du leucocyte, α L β 2/LFA-1 va interagir avec ICAM-1 de l'endothélium entraînant la rétraction du cytosquelette d'actine via l'activation de RhoA et permettant un détachement du

leucocyte, nécessaire à sa migration (Buul and Hordijk, 2004). Le rôle des chimiokines dans le recrutement leucocytaire peut être modulé par leurs récepteurs. En effet, chez des souris déficientes en ApoE, la délétion de CCR1 entraîne un développement plus important des lésions athéromateuses et un recrutement lymphocytaire accru, alors que la délétion de CCR2 ou CCR5 a l'effet inverse (Patel et al., 2013). Ces chimiokines vont renforcer l'expression de molécules d'adhérence à la membrane des leucocytes (α Lβ2/LFA-1, α 4 β 1/VLA4, Macrophage-1 antigen (α Mβ2/MAC-1)) mais également à la membrane des cellules endothéliales (ICAM-1, VCAM-1). Le leucocyte qui a adhéré sur la cellule endothéliale va migrer vers une jonction entre deux cellules endothéliales pour pouvoir transmigrer grâce à l'interaction entre α Mβ2/MAC-1 et ICAM-1 et à l'activation de cdc42 (Kolaczkowska and Kubes, 2013) (Figure 33).

Pour quitter la circulation sanguine et atteindre le tissu, le leucocyte a besoin de traverser l'endothélium et la lame basale. Le leucocyte va traverser l'endothélium en passant entre deux cellules endothéliales. Les VE-cadhérines reliant les deux cellules endothéliales se dissocient et une réorganisation du cytosquelette des cellules endothéliales (FAK, paxilline) permet un réarrangement de leur adhérence à la lame basale. La transmigration nécessite l'interaction entre molécules d'adhérence endothéliales (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, CD99, Junctional Adhesion Molecule (JAM)) et leucocytaires (α Lβ2/LFA-1, α 4β1/VLA4, α Mβ2/MAC-1, CD99). Une fois la barrière endothéliale franchie, les leucocytes traversent la lame basale. La sécrétion de protéases (MMP9) induit la digestion de la lame basale mais elle n'est pas indispensable. En effet, les leucocytes passent dans des régions où la lame basale est pauvre en matrice extracellulaire et où il existe des espaces entre les péricytes, ce qui facilite la transmigration. L'IL-7 favorise le recrutement lymphocytaire en augmentant l'expression de MCP-1/CCL2, VCAM-1 par activation des voies JAK2, PI3K, NFκB et ICAM-1 par la voie NFκB (Li et al., 2012b; Kolaczkowska and Kubes, 2013) (Figure 33).



Figure 33 : Signalisation intracellulaire dans le recrutement leucocytaire

Une fois adhéré à l'endothélium, le leucocyte va migrer vers une jonction serrée entre deux cellules endothéliales pour traverser l'endothélium. Le leucocyte va interagir à l'avant avec VCAM-1, SDF-1/CXCL12 (activation de Rac1) et à l'arrière avec ICAM-1 (activation de RhoA), ceci permettant une migration directionnelle par la réorganisation du cytosquelette. Au niveau de la jonction serrée, le leucocyte interagit avec les JAM, PECAM-1, CD99 et les VE-cadhérines des cellules endothéliales s'écartent permettant le passage du leucocyte (Buul and Hordijk, 2004).

La transmigration du leucocyte est déterminée par l'adhérence du leucocyte aux deux cellules endothéliales au niveau d'une jonction serrée. L'adhérence du leucocyte est régulée par l'interaction entre des molécules d'adhérence exprimées par les cellules endothéliales (ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, CD99, JAM) avec celles exprimées par le leucocyte (α L β 2/LFA-1, α 4 β 1/VLA4, α M β 2/MAC-1, CD99) mais aussi par l'écartement des cellules endothéliales. La modulation de l'interaction entre les VE-cadhérines exprimées au niveau des jonctions serrées entre les cellules endothéliales est aussi importante. La VE-cadhérine forme un complexe avec la p120-caténine et la β -caténine.

La thrombine entraîne une augmentation de la perméabilité membranaire de manière dépendante de la PKC- α . En effet, les auteurs ont observé une dissociation entre la VE-cadhérine et la p120-caténine (par phosphorylation) et la β -caténine (par

déphosphorylation) localisées au niveau des espaces entre les cellules endothéliales de manière dépendante de la PKC- α après incubation des cellules avec la thrombine (Konstantoulaki et al., 2003).

L'adhérence de neutrophiles avec les cellules endothéliales par l'intermédiaire d'ICAM-1 entraîne l'activation des kinases endothéliales Src et Protein tyrosine kinase 2 (Pyk2) qui vont phosphoryler la tyrosine 658 de la VE-cadhérine, correspondant au site de fixation de la p120-caténine et de la β-caténine. Ces phosphorylations sont nécessaires à la transmigration des neutrophiles car elles permettent la dissociation entre les caténines et la VE-cadhérine (Allingham et al., 2007). L'interaction du leucocyte avec VCAM-1 exprimé par l'endothélium conduit à l'activation de la Protein Tyrosine Phophatase 1B (PTP1B) endothéliale via les voies de signalisation PKC- α et Erk1/2 permettant la transmigration leucocytaire. La PTP1B déphosphoryle la β-caténine participant à sa dissociation de la VEcadhérine (Deem et al., 2007; Abdala-Valencia et al., 2011). En conditions physiologiques, la tyrosine 731 de la VE-cadhérine est phosphorylée alors que la tyrosine 685 est déphosphorylée, maintenant l'endothélium imperméable. L'arrêt du leucocyte sur la cellule endothéliale va provoquer la déphosphorylation de la tyrosine 731 par la phosphatase endothéliale Src-Homology 2 (SH2) et la phosphorylation de la tyrosine 685. La VE-cadhérine phosphorylée sur la tyrosine 685 et déphosphorylée sur la tyrosine 731 va interagir avec l'Adaptor-related Protein complex 2 (AP-2) conduisant à l'endocytose de la VE-cadhérine et au passage du leucocyte (Wessel et al., 2014) (Figure 34).

Le VEGF, la thrombine et le TNF- α sont des facteurs augmentant la perméabilité vasculaire. Ils entrainent la phosphorylation de la tyrosine 685 par les kinases Src et Pyk2. L'interaction entre les VE-cadhérine doublement phosphorylées (tyrosines 685 et 731) est déstabilisée, permettant le passage de fluides mais pas de cellules (Wessel et al., 2014) (Figure 34).



<u>Figure 34</u> : Rôle de l'état de phosphorylation de la VE-cadhérine dans le recrutement leucocytaire L'écartement des VE-cadhérine entre deux cellules endothéliales situées au niveau de jonction serrées détermine le passage de fluide et de leucocytes. A l'état basal (pas de passage), la tyrosine 731 (Y731) est phosphorylée et la tyrosine 685 (Y685) est déphosphorylée. Le passage de fluide mais pas de cellule est possible après phosphorylation de la tyrosine 685. Pour la transmigration de leucocyte, la tyrosine 685 doit être phosphorylée et la tyrosine 731 déphosphorylée. La VE-cadhérine est ensuite internalisée, entrainant un écartement plus important des cellules endothéliales (Wessel et al., 2014).

Plus rarement, le leucocyte peut traverser une cellule endothéliale. Par l'intermédiaire du cytosquelette d'actine, la membrane de la cellule endothéliale va former une sorte de cylindre permettant au leucocyte de traverser la cellule endothéliale (Kolaczkowska and Kubes, 2013) (Figure 35).



Figure 35 : Transmigration transendothéliale

Le leucocyte va rouler sur l'endothélium et adhérer au niveau d'une cellule endothéliale. La cellule endothéliale capture le leucocyte et le fait traverser l'endothélium à travers un cylindre formé au sein de la cellule endothéliale. Le leucocyte rejoint ainsi le tissu (Kolaczkowska and Kubes, 2013).

b. Devenir dans le tissu

Une fois dans le tissu, le monocyte peut se différencier en macrophage. Dans des conditions physiologiques, les macrophages tissulaires, dits résidents, ont un profil antiinflammatoire M2 alors que suite à une stimulation (infection, blessure) les monocytes sont recrutés puis se différencient en macrophages qui acquièrent un profil pro-inflammatoire M1.

Lors des stades précoces de l'athérosclérose, les cellules endothéliales activées augmentent leur niveau d'expression des molécules d'adhérence à leur surface luminale et les jonctions entre les cellules endothéliales sont altérées, ce qui entraîne un recrutement accru de leucocytes et monocytes au niveau de la future plaque d'athérome. Une sécrétion de MCP-1/CCL2, favorise également le recrutement de monocytes via le récepteur CCR2 exprimé par les cellules circulantes. Les monocytes recrutés se différencient alors en macrophages pro-inflammatoires M1 et phagocytent des lipides oxydés sous forme d'oxLDL-C (oxydated Low Density Lipoprotein-cholesterol). L'accumulation dans les macrophages d'oxLDL-C entraîne la surcharge en cholestérol des macrophages et la formation de cellules spumeuses. Le recrutement de monocytes et leur transformation en cellules spumeuses contribue à la formation du cœur lipidique de la plaque d'athérome et à son extension. D'autre part, les macrophages/cellules spumeuses sécrètent de nombreux facteurs de croissance (VEGF, PDGF, FGF), cytokines (TNF- α) et chimiokines (MCP-1/CCL2) proinflammatoires qui favorisent le développement de la plaque d'athérome. En effet, ces médiateurs pro-inflammatoires stimulent le recrutement de nouveaux monocytes depuis le sang, la prolifération des macrophages présents dans la plaque et le recrutement de cellules musculaires lisses depuis la média. Les cellules spumeuses ont la capacité de remodeler la matrice extracellulaire par la sécrétion de protéases (MMP), ce qui déstabilise la chape fibreuse de la plaque d'athérome et peut provoquer sa rupture (Fernández-Velasco et al., 2014) (Figure 36).

Dans les lésions athéromateuses, le récepteur CXCR7 est exprimé par les macrophages stimulés par l'INF-γ, un fort facteur pro-inflammatoire, et les macrophages M1 expriment d'avantage ce récepteur que les macrophages M2. La chimiokine SDF-1/CXCL12 favorise la phagocytose de LDL par les macrophages *via* son interaction avec son récepteur CXCR7 et l'activation des voies c-Jun N-terminal Kinase/Stress-Activated Protein Kinase (JNK/SAPK) et p38MAPK (Ma et al., 2013).

L'injection d'un vecteur à ADN codant pour MCP-1/CCL2 ou CX₃CR1 chez la souris entraîne la production d'anticorps contre ces deux protéines. La transmigration de macrophages à travers une couche de cellules endothéliales est diminuée lorsque les macrophages sont incubés avec le sérum de ces souris, suggérant un rôle important de MCP-1/CCL2 et de la fractalkine/CX₃CL1 (*via* son récepteur CX₃CR1) dans la présence de macrophages au niveau de la plaque d'athérome (Zhou et al., 2012).

La chimiokine MIP-3/CCL23 est retrouvée au niveau de lésions athéromateuses et dans le sang de patients athéromateux en corrélation avec MCP-1/CCL2. La présence d'oxLDL-C induit la sécrétion de MIP-3/CCL23 par les macrophages et favorise le recrutement monocytaire. Les macrophages aggraveraient ainsi l'état pro-inflammatoire de la plaque d'athérome en favorisant le recrutement monocytaire par sécrétion de MIP-3/CCL23 (Kim et al., 2011).



<u>Figure 36</u> : Implication des monocytes dans le développement de la plaque d'athérome Les monocytes (Mo) recrutés au niveau de la plaque d'athérome vont se différencier en macrophages (M Φ) et phagocyter du LDL-Cholestérol oxydé (oxLDL). La surcharge en lipides des macrophages les transforme en cellules spumeuses. Les lymphocytes T adoptent un phénotype T_H1 pro-inflammatoire (A). Les lymphocytes et cellules spumeuses vont sécréter des facteurs proinflammatoires recrutant de nouveaux monocytes et des cellules musculaires lisses qui vont former la chape fibreuse (B). L'accumulation des cellules augmente la taille de la plaque et la production de protéases (MMP) déstabilise la chape fibreuse, conduisant à la rupture et à la formation d'un thrombus par agrégation plaquettaire (C) (Fernández-Velasco et al., 2014).

C. Réparation tissulaire

Dans un contexte ischémique, l'hypoxie permet d'activer le facteur de transcription HIF-1 α qui va stimuler la production de SDF-1/CXCL12. La chimiokine induit le recrutement de progéniteurs endothéliaux exprimant le récepteur CXCR4. Le recrutement de ces cellules permet d'une part la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et d'autre part la réparation du tissu ischémié (Ceradini et al., 2004). SDF-1/CXCL12 peut également participer à la réparation osseuse lors d'une fracture par recrutement de cellules souches mésenchymateuses et de progéniteurs d'ostéoclastes *via* une signalisation calcique et l'activation des voies PI3K/Akt et MAPK (Yellowley, 2013).

La chimiokine MCP-1/CCL2 induit *in vitro* une prolifération et une migration de myoblastes par interaction avec son récepteur CCR2 et activation de la voie MAPK. Cette chimiokine se retrouve surexprimée après une lésion musculaire, ce qui suggère qu'elle pourrait avoir un rôle dans la réparation musculaire en recrutant des cellules immunitaires et en activant les myoblastes. Il en est de même pour les chimiokines MIP-1 α /CCL3 et MIP-1 β /CCL4 (Yahiaoui et al., 2008) (Figure 37).



Figure 37 : Implication des chimiokines dans la réparation musculaire

Lors d'une blessure musculaire, des chimiokines sont sécrétées (MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4). Elles vont à la fois recruter des cellules immunitaires (lymphocytes, monocytes/macrophages, neutrophiles) et activer les myoblastes (migration, prolifération par activation de la voie Erk1/2) permettant une réparation musculaire (Yahiaoui et al., 2008).

D. Angiogenèse et cancer

Lors d'un cancer, les cellules tumorales prolifèrent de manière incontrôlée et plusieurs chimiokines favorisent cette prolifération. Les cellules de la tumeur primaire peuvent migrer vers d'autres organes et former de nouvelles tumeurs qu'on nomme métastases. Pour ce faire, les cellules tumorales migrent à partir de la tumeur primaire vers le sang par invasion en détruisant la matrice extracellulaire à l'aide de protéases et collagénases.

Les chimiokines contenant la séquence ELR de la famille CXC ont des propriétés proangiogéniques, stimulant la croissance des tumeurs. Par exemple, II-8/CXCL8 participe à la tumorigenèse en stimulant l'angiogenèse (prolifération et survie des cellules endothéliales, activation du VEGFR2), la prolifération, survie, migration et invasion des cellules tumorales (activation de PI3K, MAPK, FAK, sécrétion de MMP-2, MMP-9) (Gales et al., 2013). La Breast And Kidney-expressed chemokine (BRAK/CXCL14) induit la prolifération de cellules de cancer pulmonaire par l'intermédiaire, entre autre, du SDC-4 (Park et al., 2013).

En revanche, les chimiokines CXC dépourvues de séquence ELR ont des propriétés anti-angiogéniques. La chimiokine Platelet Factor-4 (PF-4/CXCL4) permet de diminuer l'angiogenèse par interférence avec des facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGF-2, II-8/CXCL8) ou le cycle cellulaire (diminution de l'activité de la E-cyclin-dependent kinase 2 (E-cdk2)) (Wang and Huang, 2013).

Lors du développement tumoral, le contexte hypoxique entraîne la sécrétion de nombreuses chimiokines pro-angiogéniques par les TAM telles que MCP-1/CCL2, IL-8/CXCL8, Melanoma Growth stimulating activity- α /CXCL1 (GRO- α /CXCL1), B Lymphocyte Chemoattractant (BLC/CXCL13) (Benazzi et al., 2014). La chimiokine SDF-1/CXCL12 qui n'a pas la séquence ELR est tout de même pro-angiogénique. En condition d'hypoxie, SDF-1/CXCL12 et le VEGF sont exprimés par des cellules de cancer ovarien. Ils stimulent la néovascularisation du tissu permettant un apport en oxygène à la tumeur facilitant ainsi la formation de métastases (Kryczek et al., 2005). SDF-1/CXCL12 entraîne la prolifération et la survie de cellules carcinomateuses exprimant le récepteur CXCR4 ainsi que l'angiogenèse, ce qui permet la croissance de la tumeur (Chen et al., 2006).

Notre laboratoire a montré que SDF-1/CXCL12 induit la migration et l'invasion de cellules d'hépatome de manière GAG dépendante (Friand et al., 2009). L'invasion de cellules de tumeur de l'utérus fait intervenir le récepteur CXCR4 qui active la PKC- δ , la voie JNK/SAPK et induit la sécrétion de MMP-9. L'invasion de ces cellules est dépendante des chaînes HS et plus particulièrement du SDC-4 (Brule et al., 2009). Les myofibroblastes du foie peuvent sécréter la chimiokine MCP-1/CCL2. Cette chimiokine induit la migration et l'invasion de cellules d'hépatome par activation de ses récepteurs CCR1 et CCR2, l'activation des voies

MAPK, PKC et PI3K et la sécrétion de MMP-2 et MMP-9. L'effet de MCP-1/CCL2 est également dépendant du SDC-1 et du SDC-4 (Dagouassat et al., 2010).

4. Régulation du niveau d'expression et de l'activité des chimiokines

La régulation du niveau d'expression et de l'activité des chimiokines peut avoir lieu au niveau du gène ou de la protéine.

A. Régulation génique

Les chimiokines peuvent être induites en réponse à une infection. En effet, les bactéries présentent des Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP) tels que les LPS. Ces molécules peuvent être reconnues par les Pattern-Recognition Receptors (PRR) exprimés par les cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques). La reconnaissance des PAMP va induire la transcription de gènes codant pour des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires par l'intermédiaire du facteur de transcription NFKB (Mortier et al., 2012).

Les ARNm des chimiokines sont très instables. Ils contiennent des AU-Rich sequence Element (ARE) dans leur séquence 3' non traduite. Certaines protéines peuvent interagir avec ces ARE permettant de réguler la stabilité des ARNm. Les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , INF- γ , IL-1) et les LPS augmentent la stabilité des ARNm, permettant une traduction plus importante des chimiokines. En revanche, des médiateurs anti-inflammatoires tels que la cytokine IL-10 ou le facteur de croissance TGF- β favorisent la dégradation des ARNm des chimiokines (Mortier et al., 2012).

La régulation du niveau d'expression des chimiokines peut également se produire au niveau de leur transcription par épissage alternatif, conduisant à la formation d'isoformes. Par exemple, il a été décrit plusieurs isoformes de SDF-1/CXCL12. Le variant SDF-1/CXCL12- γ a une forte affinité pour les GAG. La séquestration de ce variant au niveau des GAG réduit sa présentation au CXCR4, diminuant l'internalisation du complexe chimiokine-RCPG. Ainsi, le variant SDF-1/CXCL12- γ serait présent plus longtemps a la membrane des cellules endothéliales ce qui permettrait un effet prolongé sur l'infiltration leucocytaire. Au contraire, le variant SDF-1/CXCL12- α qui a une forte affinité pour CXCR4 entraîne une forte

infiltration leucocytaire mais à court terme. La chimiokine SR-PSOX/CXCL16 est une chimiokine transmembranaire qui peut être relarguée dans l'environnement extracellulaire suite à une stimulation après clivage par une protéase. Il existe un variant de cette chimiokine sans partie transmembranaire ni cytosolique qui est sécrétée directement en absence de stimulation (Mortier et al., 2012).

B. Régulation protéique

L'action des chimiokines peut être régulée de plusieurs manières. Comme décrit précédemment, les récepteurs atypiques des chimiokines (DARC, D6, CCX-CKX, CXCR7) peuvent les séquestrer ou les internaliser, régulant ainsi leur action. Les chimiokines peuvent également générer des boucles d'activation. Par exemple, la chimiokine IL-8/CXCL8 va recruter des neutrophiles qui sécrètent la MMP-9 qui clive la chimiokine en N-terminal la rendant plus active (Mortier et al., 2012).

Une fois traduite, les chimiokines peuvent subir des modifications posttraductionnelles. Par exemple, le clivage du coté N-terminal de nombreuses chimiokines de la famille CXC ELR+ par des protéases augmente leur pouvoir chimioattractant, et la chimiokine Neutrophil-Activating Peptide-2/CXCL7 (NAP-2/CXCL7) nécessite un clivage Nterminal pour être chimioattractante. Au contraire, le clivage N-terminal de MCP-2/CCL8 lui fait perdre son activité de chimio-attraction mais pas sa capacité à se fixer à son RCPG. La chimiokine MCP-2/CCL8 clivée fixée à son récepteur provoque un encombrement stérique empêchant la chimiokine non clivée d'interagir avec le récepteur et d'induire un effet de chimio-attraction. Le clivage de RANTES/CCL5 en N-terminal réduit son affinité pour CCR1 et CCR3 et donc les effets biologiques induits contrairement à CCR5. Pour les chimiokines transmembranaires fractalkine/CX₃CL1 et SR-PSOX/CXCL16, le clivage protéolytique régule la balance entre forme transmembranaire et soluble. Les chimiokines peuvent également subir des glycosylations ou des citrullinations, régulant leurs effets biologiques et leurs affinités aux RCPG et GAG (Mortier et al., 2012).

5. RANTES/CCL5 A. Généralités

La chimiokine Regulated upon Activation Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES/CCL5) appartient à la famille des CC-chimiokines. Elle peut se fixer aux récepteurs couplés aux protéines G CCR1, CCR3, CCR4 et CCR5, mais également à des chaînes GAG sulfatées. Les récepteurs DARC et D6 peuvent empêcher la signalisation induite par RANTES/CCL5 en le séquestrant à la membrane. Chez l'homme, le gène codant pour cette protéine est situé sur la région q11.2-q12 du chromosome 17. La pré-protéine RANTES/CCL5 fait 91 acides aminés pour 10 kDa, après clivage des 23 acides aminés du peptide signal, elle ne fait plus que 7.8 kDa pour 68 acides aminés (Appay and Rowland-Jones, 2001).

Suite à une stimulation, RANTES/CCL5 peut être sécrété par plusieurs types cellulaires dont les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses, les fibroblastes, les macrophages ou les plaquettes. RANTES/CCL5 recrute de nombreuses cellules tels que les monocytes, les lymphocytes T, les basophiles, les éosinophiles, les cellules NK, dendritiques (Appay and Rowland-Jones, 2001). Par exemple, les fibroblastes péritonéaux sécrètent RANTES/CCL5 suite à une stimulation par l'INF- γ en coopération avec le TNF- α et l'IL-1 β , pouvant participer au recrutement de cellules immunitaires (Kawka et al., 2014). La combinaison du TNF- α et de l'INF- γ permet la production de RANTES/CCL5 par des cellules endothéliales (Marfaing-Koka et al., 1995). RANTES/CCL5 peut être exprimé par des lymphocytes T après stimulation par l'IL-2 (Krensky and Ahn, 2007). La sécrétion de RANTES/CCL5 est dépendante de sa séquence ⁴³TRKN⁴⁶ situé dans la boucle 40S de la chimiokine. De plus, la sécrétion de RANTES/CCL5 est dépendante de sa l'appareil de golgi (Soria et al., 2012).

Le promoteur du gène de RANTES/CCL5 contient des séquences de liaison aux facteurs de transcription NFkB, NFAT-1, Nuclear Factor of Interleukin-6 (NF-IL6), RANTES/CCL5 Factor of Late Activated T lymphocytes-1 (RFLAT-1). La protéine Cyclic AMP response element Binding Protein/p300 (CBP/p300) tient un rôle important dans la transcription de RANTES/CCL5 en jouant un rôle de protéine chaperonne pour les facteurs de transcription. (Krensky and Ahn, 2007; Goetz and Mohammadi, 2013) (Figure 38).



<u>Figure 38</u> : Promoteur de RANTES/CCL5 Le promoteur de RANTES/CCL5 contient de nombreuses séquences de liaison aux facteurs de transcriptions tels que NFκB, NFAT-1, NF-IL6, RFLAT-1. (Krensky and Ahn, 2007).

Les polymorphismes RANTES/CCL5-28 C>G et RANTES/CCL5-403 G>A sont deux polymorphismes localisés au niveau du promoteur du gène. Ils sont associés à une augmentation de l'activité du promoteur et donc à une augmentation de l'expression de la chimiokine. Les patients hétérozytes pour le polymorphisme RANTES/CCL5-28 C>G ou homozygotes pour le polymorphisme RANTES/CCL5-403 G>A ont un risque accru de développer un carcinome hépatocellulaire. Ces polymorphismes sont également associés à une sévérité de l'inflammation. Les hommes porteurs de l'allèle RANTES/CCL5-403 A à l'état homozygote ont un risque accru de développer des maladies coronariennes. L'allèle CCR5Δ32 est délété de 32 paires de bases dans la partie codante du gène. Il code pour un récepteur délété non fonctionnel car non exprimé à la membrane plasmique. Le récepteur délété est séquestré dans l'appareil de golgi. Le portage de l'allèle CCR5Δ32 est associé à un risque accru de développer un anévrisme aortique mais a une protection contre l'infection au VIH. A l'état hétérozygote, l'allèle CCR5Δ32 est associé à un risque accru de développer des maladies corosocié à un risque accru de développer un anévrisme aortique mais a une protection contre l'infection au VIH. A l'état hétérozygote, l'allèle CCR5Δ32 est associé à un risque accru de développer des hépatites C (Navratilova, 2006; Qin et al., 2011; Tsai et al., 2012).

B. Structure

RANTES/CCL5 se retrouve dans le sérum sous forme de monomère et de dimère mais en cas de forte concentration cette chimiokine s'oligomérise. RANTES/CCL5 peut également former un dimère avec la chimiokine PF-4/CXCL4, lui permettant d'interagir avec les récepteurs CCR2 et CXCR4 et favorisant ses fonctions biologiques (Marques et al., 2013). Les acides aminés glutamines 26 et 66 sont impliqués dans cette oligomérisation. La structure tridimensionnelle a été déterminée par résonance magnétique nucléaire il y a presque 20 ans. La région N-terminale (acides aminés 1-10), composée d'un court feuillet β (β 0) et d'une boucle N terminée par un tour 3₁₀, est suivie par un feuillet β 1 (acides aminés 11-29), permettant la formation du motif CC (cystéines 10 et 11). Ces deux cystéines forment deux ponts disulfures avec les cystéines 34 et 50. Les trois feuillets β (β 1-3) sont en conformation antiparallèle connectés par des boucles, dont la boucle 40S (acides aminés 43-48) comprenant le site de fixation au GAG. Le domaine C-terminal est structuré en hélice α (Vangelista et al., 2008) (Figure 39).



<u>Figure 39</u> : Structure tridimensionnelle de la chimiokine RANTES/CCL5 La chimiokine RANTES/CCL5 sous forme de monomère comporte un court feuillet β (β 0) dans sa région N-terminale, trois feuillets β (β 1-3) antiparallèles qui contiennent la séquence de fixations avec les GAG (⁴⁴RKNR⁴⁷) et une hélice α en région C-terminale (Handel et al., 2005).

La chimiokine RANTES/CCL5 peut interagir avec les RCPG CCR1, CCR3, CCR4 et CCR5. Le domaine N-terminal est nécessaire pour la fixation de RANTES/CCL5 à ces récepteurs. En effet, l'ajout d'une méthionine du coté N-terminal devant l'asparagine en position 1 empêche sa liaison au récepteur et entraîne la formation d'un antagoniste de RANTES/CCL5 (Proudfoot et al., 1996). L'interaction de RANTES/CCL5 avec ses RCPG implique différents acides aminés de la boucle N, l'arginine 17 pour CCR1, la phénylalanine 12 pour CCR3, l'isoleucine 15 pour CCR5. La proline en position 2 du domaine N-terminal est également nécessaire pour l'interaction avec CCR5. La proline 2, l'acide aspartique 6 et la thréonine 7 permettent la transduction de signal par CCR1, la proline 2 et la tyrosine 3 via CCR3, la tyrosine 3 et l'acide aspartique 6 via CCR5 (Pakianathan et al., 1997) (Figure 40).

Les acides aspartiques 2 et 11, les tyrosines 3 et 10, l'acide glutamique 18, et la lysine 26 du domaine N-terminal de CCR5 sont nécessaires pour la fixation de la chimiokine. La proline 84 du 2^{ème} domaine transmembranaire est également impliquée dans la fixation de RANTES/CCL5 (Fernandez and Lolis, 2002) (Figure 40).

RANTES/CCL5 peut également interagir avec des chaînes GAG. Cette interaction est dépendante du motif ⁴⁴RKNR⁴⁷ de la boucle 40S. Ce motif est également important pour l'interaction de RANTES/CCL5 avec son récepteur CCR1 (Proudfoot et al., 2001) (Figure 40).



Figure 40 : Interaction de RANTES/CCL5 avec ses récepteurs

L'interaction de RANTES/CCL5 avec des chaînes GAG intervient *via* le motif ⁴⁴RKNR⁴⁷ de la boucle 40S, motif important pour l'interaction avec CCR1 (A). L'interaction de RANTES/CCL5 avec ses RCPG implique différents acides aminés de la boucle N, R17 pour CCR1, F12 pour CCR3, I15 pour CCR5 et du domaine N-terminal, P2 pour CCR5. Les acides aminés D2, Y3, Y10, D 11, E18, et K26 du domaine N-terminal et P84 du 2^{ème} domaine transmembranaire de CCR5 sont nécessaires pour la fixation de la chimiokine (B) (Vangelista et al., 2008).

C. Rôles

RANTES/CCL5 a de nombreux rôles biologiques. Elle est impliquée dans des pathologies virales (VIH (Vangelista et al., 2008)), inflammatoires (athérosclérose, arthrite, maladies auto-immune (Li et al., 2012a; White et al., 2013)), cancéreuses (foie, sein (Charni et al., 2009; Soria et al., 2012)).

a. Inflammation et recrutement cellulaire

La chimiokine RANTES/CCL5 est une chimiokine inflammatoire, mais contrairement à de nombreuses chimiokines, elle est exprimée tardivement, 3 à 5 jours après l'activation des lymphocytes T. Ce délai a son importance dans le maintien de l'inflammation et dans son développement (Krensky and Ahn, 2007).

RANTES/CCL5 peut être sécrété par les cellules de la paroi de l'artère (cellules endothéliales, musculaires lisses) mais aussi par les cellules recrutées au niveau de la paroi (plaquettes, monocytes/macrophages) ce qui peut expliquer sa présence dans les plaques d'athérome. Il se trouve que RANTES/CCL5 est surexprimée chez des patients ayant subi un infarctus (Montecucco et al., 2010). Cette chimiokine pourrait jouer un rôle dans la vulnérabilité des plaques d'athérome et dans la déstabilisation de la plaque fibrotique en plaque hémorragique, notamment en favorisant le recrutement monocytaire et lymphocytaire *via* CCR1 et CCR5 (Li et al., 2012a; Malaud et al., 2014).

Les souris déficientes en ApoE sont un modèle d'athérosclérose. La taille de la plaque d'athérome chez des souris déficientes en ApoE invalidées génétiquement en CCR5 est réduite. Cela pourrait être la conséquence de la réduction de l'infiltration de monocytes et lymphocytes T Helper 1 (T_H 1). La plaque d'athérome est également plus stable par augmentation des cellules musculaires lisses et du taux d'expression de l'IL-10 (anti-inflammatoire) mais aussi par inversement de la balance entre lymphocytes T_H 1 pro-inflammatoires et T_H 2 et T régulateurs (Treg) anti-inflammatoires. De manière intéressante, la délétion de CCR1 par invalidation génétique chez ces souris favorise la formation de la plaque d'athérome, notamment par recrutement de lymphocytes T_H 1 pro-inflammatoires (Braunersreuther et al., 2007).

La moelle osseuse de souris invalidées génétiquement en RANTES/CCL5 ou PF-4/CXCL4 a été transférée chez des souris déficientes en ApoE préalablement irradiées. Ces souris montrent une plus faible infiltration monocytaire au niveau de la plaque d'athérome ainsi qu'une réduction de la lésion. L'utilisation d'un peptide empêchant l'hétérodimérisation de RANTES/CCL5 avec PF-4/CXCL4 provoque une diminution du recrutement monocytaire induit par RANTES/CCL5 *in vitro* et *in vivo*, ainsi qu'une diminution de la taille de la plaque chez la souris. L'hétérodimérisation de RANTES/CCL5 avec PF-4/CXCL4 potentialise donc l'effet délétère de RANTES/CCL5 sur le développement de l'athérosclérose (recrutement monocytaire, taille de la plaque d'athérome) (Koenen et al., 2009).

RANTES/CCL5 aurait donc un double rôle dans l'athérosclérose, d'une part il aggraverait l'inflammation par activation de CCR5 (recrutement de monocytes, lymphocytes T_H1 , production d'INF- γ) et d'autre part il stabiliserait la plaque par activation de CCR1 (recrutement de lymphocytes T_H2 et Treg, production d'IL-10).

Le recrutement de leucocytes à partir des vaisseaux sanguins vers le tissu lésé est un processus important dans la réponse immunitaire. Les chimiokines sont classiquement décrites comme favorisant le recrutement et RANTES/CCL5 ne déroge pas à la règle. En effet, par interaction avec ses RCPG, cette chimiokine est capable de recruter de nombreuses cellules circulantes telles que les lymphocytes T et monocytes (CCR5), les macrophages, cellules dendritiques et NK (CCR1 et CCR5), les polynucléaires éosinophiles, basophiles et neutrophiles (CCR3) (Krensky and Ahn, 2007; Katsounas et al., 2011). RANTES/CCL5 aurait également un rôle dans la polarisation des lymphocytes T en lymphocytes T_H1 pro-inflammatoires, exprimant les récepteurs CCR1 et CCR5 (Lapteva and Huang, 2010). Ce fort recrutement de cellules immunitaires joue un rôle délétère dans les phénomènes d'asthme et d'allergie. RANTES/CCL5 favorise le contexte pro-inflammatoire et la réponse excessive du système immunitaire d'abord par recrutement des polynucléaires éosinophiles, neutrophiles, monocytes et lymphocytes T_H2 en T_H1, dégranulation) (Marques et al., 2013).

De plus, l'expression de RANTES/CCL5 est corrélée à l'aggravation des hépatites chroniques C et B, notamment par stimulation de l'infiltration de lymphocytes T et macrophages et activation des cellules étoilées du foie (Katsounas et al., 2011).

Outre le fait que RANTES/CCL5 induit le recrutement de leucocytes, il a été montré que cet effet est dépendant de son oligomérisation. En effet, l'utilisation de mutants de RANTES/CCL5 monomérique (Nme-Thr7), dimérique (E66A) ou tétramérique (E26A) diminue l'arrêt de monocytes et de lymphocytes T sur des cellules endothéliales. De plus, l'utilisation de l'antagoniste de CCR1 BX471 montre que l'arrêt de monocytes sur les cellules endothéliales nécessite l'activation d'une signalisation intracellulaire dépendante du récepteur CCR1 monocytaire. De manière intéressante, la transmigration des leucocytes à travers la couche de cellules endothéliales ne semble pas dépendante de l'oligomérisation

de RANTES/CCL5 ni de la voie CCR1 mais plutôt de la voie CCR5 (antagoniste TAK-779) et des chaînes GAG (mutant de RANTES/CCL5 ⁴⁴AANA⁴⁷) (Baltus et al., 2003).

b. Réparation tissulaire

Lors d'une blessure, les cellules endothéliales et les macrophages expriment RANTES/CCL5 et son récepteur CCR5. La réparation de la blessure implique une néoangiogenèse, le recrutement de cellules progénitrices endothéliales et la production de collagène. Il a été montré que RANTES/CCL5 est impliqué dans le recrutement de cellules progénitrices endothéliales lors d'une blessure. En effet, RANTES/CCL5 induit la migration de cellules progénitrices endothéliales *in vitro* par l'intermédiaire du CCR5. Parallèlement, des souris déficientes en CCR5 présentent une réduction du nombre de cellules progénitrices endothéliales sur le tissu lésé ainsi qu'une plus faible néoangiogenèse et production de collagène (Ishida et al., 2012).

Des tests *in vitro* ont montré que du milieu conditionné de cellules souches mésenchymateuses, contenant entre autres IL-8/CXCL8, MCP-1/CCL2 et RANTES/CCL5 permet d'induire la migration de fibroblastes et de kératinocytes, deux types cellulaires impliquées dans la cicatrisation de la peau (Walter et al., 2010).

Les cellules endothéliales progénitrices issues de moelle osseuse participent à la réparation des glomérules rénaux. Il a été montré que RANTES/CCL5 est impliqué dans le recrutement de ces progéniteurs endothéliaux au niveau de la lésion par l'utilisation du mutant Met-RANTES/CCL5 qui diminue le recrutement des progéniteurs endothéliaux (Rookmaaker et al., 2007).

c. Cancer et angiogenèse

RANTES/CCL5 est présent dans plusieurs types de tumeurs et son implication dans le recrutement et l'activation de cellules immunitaires tels que les cellules dendritiques, NK, les lymphocytes T_H1 et cytotoxiques. De plus, le taux d'expression de la chimiokine est corrélé à la sévérité de certains cancers tels que les cancers mammaire ou hépatique (Lapteva and Huang, 2010).

Dans le cancer du sein, le taux d'expression de RANTES/CCL5 est corrélé au stade d'avancement du cancer. RANTES/CCL5 exprimé à la fois par les cellules tumorales et par les cellules du microenvironnement tumoral (TAM, fibroblastes, cellules endothéliales, musculaires lisses, mésenchymateuses). La chimiokine va interagir avec les cellules tumorales exprimant CCR5 et stimuler la croissance tumorale et la formation de métastases. RANTES/CCL5 induit également le recrutement de monocytes qui se différencient en TAM. Ces macrophages favorisent la croissance de la tumeur par sécrétion de facteurs proangiogéniques (VEGF, FGF-2) pour alimenter la tumeur, et de protéases (MMP-2, MMP-9) pour dégrader la matrice extracellulaire (Soria and Ben-Baruch, 2008; Lapteva and Huang, 2010). De plus, il semble que RANTES/CCL5 stimule l'invasion de cellules cancéreuses du sein (MDA-MB-231). L'utilisation d'un antagoniste de CCR5 (maraviroc) diminue le nombre de métastases pulmonaires chez la souris, ce qui suggère que l'effet de RANTES/CCL5 est dépendant de son récepteur CCR5 (Velasco-Velazquez and Pestell, 2013). L'utilisation d'ostéopontine sécrétée par des cellules MDA-MB-231 entraîne la production de RANTES/CCL5 par des cellules stromales mésenchymateuses et la xénogreffe des cellules cancéreuses humaines avec des cellules mésenchymateuses humaines chez la souris favorise la croissance des cellules cancéreuses. De plus, les cellules mésenchymateuses se différencient en fibroblastes associés aux cancers, cellules connues comme favorisant la croissance tumorale, l'angiogenèse et la formation de métastases. Les souris transplantées se retrouvent avec de fortes métastases dans les poumons et le foie. Il semblerait que RANTES/CCL5 sécrété par les MDA-MB-231 favorise la croissance et la dissémination tumorale (Mi et al., 2011). RANTES/CCL5 induit la transcription de la protéine p53, connue comme étant un gène suppresseur de tumeur, par fixation à son récepteur CCR5 et activation de JAK2 et p38-MAPK. L'absence d'expression de CCR5 favorise la prolifération tumorale par rapport à des cellules exprimant ce récepteur lorsque p53 n'est pas muté alors qu'il n'y a pas de différence chez des cellules exprimant une forme inactive de p53. Le portage de l'allèle CCR5Δ32 à l'état homozygote diminue la survie de patients atteints d'un cancer du sein. De manière intéressante, les auteurs ont montré que la protéine p53 était mutée dans 46% des tumeurs chez les patients CCR5 porteurs de l'allèle sauvage, de 35% chez les hétérozygotes CCR5∆32 et dans aucune tumeur chez les homozygotes. Il semble donc que RANTES/CCL5, par activation de CCR5, joue un double rôle dans la régulation du cancer du sein. D'un coté il serait anti-tumoral par activation de la p53 mais d'un autre coté pro-tumoral en provoquant des mutations de la p53, rendant la protéine inactive (Mañes et al., 2003) (Figure 41).



<u>Figure 41</u> : Implication de RANTES/CCL5 dans la progression tumorale Les chimiokines MCP-1/CCL2 et RANTES/CCL5 sont impliquées dans la progression tumorale. Elles favorisent la croissance tumorale d'un côté par stimulation de l'angiogenèse et d'un autre côté par recrutement de monocytes (A), qui se différencient en TAM sécrétant des facteurs pro-tumoraux (B). Elles favorisent la dissémination cancéreuse par stimulation de sécrétion de MMP, stimulation de la migration et de l'invasion des cellules tumorales (C) (Soria and Ben-Baruch, 2008).

L'expression de plusieurs chimiokines dont RANTES/CCL5 est corrélée à une augmentation de l'infiltration de lymphocytes T_H1 et cytotoxiques (CD8+) et de cellules NK au niveau de la tumeur primaire d'un carcinome hépatocellulaire. RANTES/CCL5 est exprimé par les cellules tumorales, les lymphocytes recrutés et les macrophages résidents activés par l'INF- γ ou le TNF- α . De manière intéressante, RANTES/CCL5 induit l'activation de la caspase-3 dans les cellules tumorales, ce qui provoque leur apoptose. Dans les stades précoces de la maladie, RANTES/CCL5 est fortement exprimé ce qui ralentirait la progression du cancer par une forte infiltration de cellules immunitaires et améliorerait la survie des patients. En revanche, dans les stades tardifs RANTES/CCL5 est moins exprimée, ce qui diminuerait son effet anti-tumoral (Chew et al., 2012).

De manière contradictoire, notre laboratoire a précédemment montré que RANTES/CCL5 stimule la migration et l'invasion de plusieurs lignées de cellules d'hépatome humain (Huh7, Hep3B et HepG2) en se fixant aux SDC-1 et SDC-4 et par activation des voies

Erk et JNK/SAPK (Sutton et al., 2007b; Charni et al., 2009). RANTES/CCL5 pourrait avoir un rôle à la fois protecteur en favorisant le recrutement de cellules immunitaires et délétère en favorisant la migration et l'invasion des cellules tumorales.

Au cours de la progression tumorale, RANTES/CCL5 aurait des effets opposés. Dans les stades précoces, il serait anti-tumoral en favorisant la destruction des cellules tumorales par activation de la p53 et stimulation de la réponse immunitaire (infiltration leucocytaire). Dans les stades plus tardifs, il serait pro-tumoral en favorisant la croissance des cellules tumorales, leur survie (mutation de p53) et la mise en place d'une inflammation chronique (remodelage de la matrice extracellulaire, production de cytokines/chimiokines).

L'angiogenèse tien un rôle important dans le développement tumoral. La vascularisation permet l'oxygénation de la tumeur primaire et la dissémination des cellules tumorales de la tumeur primaires vers d'autres organes. Notre laboratoire a récemment montré que RANTES/CCL5 induit l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo*. L'utilisation du mutant dimérique E66A-RANTES/CCL5 et d'anticorps neutralisants laisse penser que cet effet proangiogénique est dépendant de son oligomérisation et de ses récepteurs CCR1 et CCR5. L'utilisation du mutant déficient dans la liaison aux GAG RANTES/CCL5 (⁴⁴AANA⁴⁷) ou d'anticorps neutralisants suppose que la liaison aux protéoglycanes SDC-1, SDC-4 et CD44 est nécessaire pour l'effet de la chimiokine (Suffee et al., 2012).

Des souris déficientes en CCR5 montrent une plus faible vascularisation de la cornée après dénudation probablement causée par une expression plus faible de VEGF. La baisse d'expression de VEGF pourrait être due à une diminution du recrutement leucocytaire induit par les chimiokines RANTES/CCL5, MIP-1 α /CCL3 et MIP-1 β /CCL4, trois ligands proinflammatoires de CCR5 (Ambati et al., 2003).

De manière contradictoire, il a été montré *in vivo* que l'injection de RANTES/CCL5 réduit l'angiogenèse dans des temps courts (1 à 5 jours) mais n'a plus d'effet sur des temps plus longs (9 à 13 jours). Lorsque la liaison de RANTES/CCL5 à son récepteur CCR5 est supprimée (souris déficientes en CCR5) la chimiokine n'a plus d'effet anti-angiogénique mais lorsque la liaison de RANTES/CCL5 à ses deux récepteurs est supprimée (mutant Met-RANTES/CCL5), la chimiokine mutée induit une angiogenèse (Barcelos et al., 2009).
d. Infections virales

La majorité des recherches sur RANTES/CCL5 ont été menées sur le VIH car le récepteur de la chimiokine CCR5 est le co-récepteur du VIH-R5. Le VIH-X4 peut quant à lui interagir avec le récepteur CXCR4. Le VIH peut entrer dans les cellules dites permissives par interaction avec CCR5. Par ailleurs, un composant chimique (30-oxo-calenduladiol triterpene) interagissant spécifiquement avec CCR5 permet d'une part d'empêcher l'entrée du virus et d'autre part la signalisation activée par RANTES/CCL5. Ce composant pourrait être un antagoniste à la fois pour le VIH (limitation de l'infection) et pour RANTES/CCL5 (limitation de la signalisation) (Barroso-Gonzalez et al., 2009). Le polymorphisme CCR5 Δ 32, rendant le récepteur non fonctionnel, permet une protection contre l'infection par le VIH en empêchant son entrée dans les macrophages. De nombreuses thérapies anti-VIH ciblant le CCR5 (interaction avec le virus, activation, internalisation) ont vu le jour (Marques et al., 2013). Par ailleurs, a faible concentration (inférieure à 100 nM), RANTES/CCL5 inhibe l'infection de cellules sanguines par le VIH alors qu'à haute concentration (supérieure à 1 μ M) il la favorise, et de manière dépendante de son oligomérisation (Czaplewski et al., 1999).

RANTES/CCL5 est impliqué dans de nombreuses infections respiratoires, souvent causées par des virus à ARN. Le taux de chimiokine dans les voies respiratoires est corrélé avec la sévérité de la maladie chez des patients atteints d'une infection par le Virus Respiratoire Syncytial (VRS), pouvant causer des bronchites. RANTES/CCL5 jouerait un rôle en deux étapes. Dans les premières 48 heures, il favoriserait la réponse immunitaire des macrophages résidents dans les poumons et le recrutement de lymphocytes T. Dans un second temps, le virus induirait une forte production de RANTES/CCL5 par les lymphocytes T recrutés et provoquerait un rôle torte réponse immunitaire dans la seconde phase de la maladie alors qu'il aurait un rôle délétère dans la première phase (Culley et al., 2006). Les patients infectés par la grippe ou pour le Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) ont des taux de RANTES/CCL5 pulmonaires fortement élevés. La chimiokine régulerait la survie des macrophages infectés par interaction avec son récepteur CCR5 (Marques et al., 2013).

RANTES/CCL5 est également impliqué dans des infections touchant le système nerveux. Par exemple, le traitement avec Met-RANTES/CCL5 de souris infectées par le Virus de l'Herpes Simplex-1 (VHS-1), pouvant causer une encéphalite, réduit le recrutement leucocytaire au niveau du cerveau mais entraîne également un phénomène de compensation par augmentation des taux de chimiokines endogènes (MIP-1 α /CCL3, RANTES/CCL5) (Vilela et al., 2009).

RANTES/CCL5 régule la réponse de l'organisme aux infections du foie. Le portage des polymorphismes RANTES/CCL5-403 G>A (surexpression de la chimiokine) ou CCR5Δ32 (récepteur non fonctionnel) ont un rôle protecteur dans l'inflammation et la fibrose causées par les virus de l'hépatite B et C chez des patients homozygotes (Hellier et al., 2003; Marques et al., 2013).

Les patients atteints de la dengue ou de la fièvre jaune, qui causent de fortes hémorragies, ont un taux hépatique important de la chimiokine. Elle pourrait réguler le recrutement leucocytaire et provoquer une inflammation systémique, précédant une hémorragie (Marques et al., 2013).

Dans les différentes infections virales, RANTES/CCL5 aurait un double rôle, dans les phases précoces de l'infection il permettrait la réponse immunitaire pour combattre le virus alors que dans les phases tardives il contribuerait à une trop forte inflammation qui conduirait à une fibrose et des dommages tissulaires.

D. Thérapies ciblant RANTES/CCL5

La majorité des thérapies ciblant RANTES/CCL5 sont des thérapies ciblant l'activation de ces récepteurs, principalement CCR5 dans le cadre du VIH (Marques et al., 2013).

Il existe de nombreux antagonistes de CCR5 en court de développement et le maraviroc (Celsentri[®]) est actuellement utilisé en clinique. Le maraviroc est un antagoniste de CCR5, il inhibe l'activation du récepteur par ses ligands MIP-1 α /CCL3, MIP-1 β /CCL4 et RANTES/CCL5. Il empêche la fixation du VIH-1 sur CCR5 (protéine VIH-1 gp120-CCR5) et sa fusion avec la membrane plasmique (protéine VIH-1 gp160-CCR5) (Dorr et al., 2005). De nombreuses études ont montré son efficacité dans la résistance à l'infection par le VIH et il est actuellement utilisé comme traitement contre le VIH-1. Malgré tout, il existe une résistance à cet antagoniste. Le VIH-1 peut échapper à cette thérapie par fixation au corécepteur CXCR4 ou par fixation à un autre site de CCR5 non reconnu par le maraviroc (Haqqani and Tilton, 2013). Il a été montré chez des souris ApoE déficientes que le maraviroc permet une protection contre le développement de la plaque d'athérome, notamment par une diminution du recrutement monocytaire et de l'activation endothéliale (diminution de VCAM-1, ICAM-1, TNF- α , MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5). Le maraviroc semble protéger les patients atteints du VIH-1 de risques cardiovasculaires (Cipriani et al., 2013). Il aurait

également un rôle protecteur dans le cancer gastrique en diminuant la croissance tumorale et la dissémination péritonéale (Mencarelli et al., 2013).

Des dérivés synthétiques de RANTES/CCL5 ont été utilisés pour contrer l'infection par le VIH-1 comme AOP-RANTES/CCL5 (groupement n-pentyl du coté N-terminal) ou PSC-RANTES/CCL5 (groupement n-nonanoyl du coté N-terminal). PSC-RANTES/CCL5 se fixe sur le même site que le VIH-1 sur le CCR5, entrant en compétition avec le virus. Il va de plus entrainer l'internalisation du récepteur, empêchant le virus de se fixer sur CCR5 et d'infecter la cellule (Lobritz et al., 2013). AOP-RANTES/CCL5 va agir de la même manière que PSC-RANTES/CCL5 (Mack et al., 1998).

III. But du projet

Les chimiokines sont impliquées dans le recrutement de cellules inflammatoires, l'activation de cellules de la paroi vasculaire, la croissance des tumeurs, l'induction de l'angiogenèse. De part leur multiples rôles, elles sont des cibles privilégiées pour le traitement de nombreuses pathologies. Il est nécessaire de connaître leur mécanisme d'action pour pouvoir proposer des thérapies efficaces et ciblées. Lors de l'athérosclérose, la chimiokine RANTES/CCL5 est retrouvée au niveau de la plaque d'athérome (Malaud et al., 2014) et il a été précédemment montré dans notre laboratoire que RANTES/CCL5 est pro-angiogénique (Suffee et al., 2012).

Ma thèse porte sur l'implication du syndécane-4 dans les effets cellulaires induits par RANTES/CCL5. Deux approches ont été utilisées afin de répondre à cette question.

Nous avons voulu déterminer l'importance du domaine intracellulaire du SDC-4, et plus particulièrement de la signalisation induite par le SDC-4. Au regard de la littérature, certains acides aminés du domaine intracellulaire du SDC-4 sont indispensables pour la signalisation induite par le FGF-2 et dépendante du SDC-4 (Horowitz et al., 2002). Nous avons construit trois mutants intracellulaires du SDC-4 activant constitutivement la PKC- α (S179A), empêchant la liaison du PIP2 (L188QQ) et empêchant la fixation des protéines à domaines PDZ (A198del).

Les effets biologiques de RANTES/CL5 peuvent être divisés en deux parties, les effets pro-angiogéniques d'une part et pro-inflammatoire d'autre part. Les outils décrits précédemment ont été utilisés pour déterminer l'importance des domaines extracellulaire et intracellulaire du SDC-4 dans ces deux types d'effets.

Afin d'analyser les effets pro-angiogéniques de RANTES/CCL5 sur des Human Umbilical Vein, Endothelial Cells HUV-EC-Cs, nous avons étudié l'adhérence, l'étalement, la migration, l'invasion cellulaire et la formation de tubes vasculaires qui sont différentes étapes du processus angiogénique. L'activation du SDC-4 par le FGF-2 induit l'activation de la PKC- α et la PKC- δ a été décrite comme étant la kinase responsable de l'inactivation du SDC-4 (Murakami et al., 2002). Nous avons donc analysé la translocation membranaire des PKC- α et PKC- δ , reflet de leur activation (Collazos et al., 2006). L'implication du l'axe SDC-4-RANTES/CCL5 dans l'activation des PKC a été effectuée en collaboration avec le Pr. N. Saito au Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, à l'Université de Kobe au Japon. Ces résultats ont permis la publication d'un article dans le journal Biology Open.

L'effet pro-inflammatoire de RANTES/CCL5 a été déterminé par l'étude de l'arrêt d'une lignée monocytaire, les mono mac 6 (MM6), à une monocouche de cellules endothéliales HUV-EC-Cs ainsi que la transmigration de ces monocytes à travers la couche de cellules endothéliales, représentant différentes étapes du recrutement monocytaire. Concernant ces résultats, un article est en cours d'écriture.

Parallèlement, nous avons voulu déterminer l'importance des chaînes GAG dans l'interaction de RANTES/CCL5 avec les cellules. Nous avons utilisé deux mutants de RANTES/CCL5 déficients dans leur fixation aux GAG, les mutants R47E (⁴⁴RKNE⁴⁷) et 3Ala (⁴⁴AANA⁴⁷).



Figure 42 : But du projet

RANTES/CCL5 favorise l'angiogenèse et le recrutement monocytaire via fixation à ses récepteurs classiques CCR1 et CCR5 et de manière dépendante des GAG membranaires (Baltus et al., 2003; Suffee et al., 2012). Le projet de ma thèse est de déterminer si le SDC-4 est impliqué dans les effets de RANTES/CCL5 et si cela passe par une activation du domaine intracellulaire du SDC-4 et une signalisation intracellulaire.

Résultats

Part I : Involvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced angiogenesis

1. Article **1** : RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan4-PKCα signaling pathway

The perpetuation of angiogenesis is involved in certain chronic inflammatory diseases such as atherosclerosis. The accelerated neovascularisation may result from an inflammatory status with a response of both endothelial cells and monocytes to inflammatory mediators such as chemokines. We have previously described *in vitro* and *in vivo* the pro-angiogenic effects of the chemokine RANTES/CCL5 (Suffee et al., 2012). The effects of RANTES/ CCL5 may be related to its binding to GPCR such as CCR1 or CCR5 and to proteoglycans such as SDC-1 and SDC-4.

The aim of this study is to evaluate the functionality of SDC-4 as a coreceptor of RANTES/CCL5 by the use of mutated SDC-4 constructs in the intracellular domain of SDC-4. Our data demonstrate that site-directed mutations in SDC-4 intracellular domain modify RANTES/CCL5-induced angiogenesis (spreading, migration, vascular sprout formation) in endothelial cells. The mutation of serine 179 in alanine (S179A), associated with an induced PKC- α activation, leads to higher RANTES/CCL5 proangiogenic effects. In contrast, mutation of the PIP2 binding motif (L188QQ) or the PDZ protein binding motif (A198del) in the intracellular SDC-4 domain decreased RANTES/CCL5-induced angiogenesis.

Our data highlight that the intracellular domain of SDC-4 is involved in RANTES/CCL5induced activation of the PKC- α and Rac1, two signaling pathway involved in migration process (Woodham and Machesky, 2014). Moreover, modulation of RANTES/CCL5-induced angiogenesis by SDC-4 is mediated by PKC- α signaling pathway.

As RANTES/CCL5 is involved in various physiopathological processes, the development of a new therapeutic strategy may be reliant on the mechanism by which RANTES/CCL5 exerts its biological activities, for example by targeting the binding of the chemokine to its proteoglycan receptor.



RESEARCH ARTICLE

RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKC α signaling pathway

Loïc Maillard¹, Naoaki Saito², Hanna Hlawaty¹, Véronique Friand¹, Nadine Suffee¹, Fanny Chmilewsky¹, Oualid Haddad¹, Christelle Laguillier^{1,3}, Erwan Guyot^{1,3}, Takehiko Ueyama², Olivier Oudar¹, Angela Sutton^{1,3,*} and Nathalie Charnaux^{1,3,*,‡}

ABSTRACT

The perpetuation of angiogenesis is involved in certain chronic inflammatory diseases. The accelerated neovascularisation may result from an inflammatory status with a response of both endothelial cells and monocytes to inflammatory mediators such as chemokines. We have previously described in vitro and in vivo the pro-angiogenic effects of the chemokine Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES)/CCL5. The effects of RANTES/ CCL5 may be related to its binding to G protein-coupled receptors and to proteoglycans such as syndecan-1 and -4. The aim of this study was to evaluate the functionality of syndecan-4 as a coreceptor of RANTES/CCL5 by the use of mutated syndecan-4 constructs. Our data demonstrate that site-directed mutations in syndecan-4 modify RANTES/CCL5 biological activities in endothelial cells. The SDC4S179A mutant, associated with an induced protein kinase C (PKC)a activation, leads to higher RANTES/CCL5 proangiogenic effects, whereas the SDC4L188QQ and the SDC4A198del mutants, leading to lower phosphatidylinositol 4,5bisphosphate (PIP2) binding or to lower PDZ protein binding respectively, are associated with reduced RANTES/CCL5 cellular effects. Moreover, our data highlight that the intracellular domain of SDC-4 is involved in RANTES/CCL5-induced activation of the PKCa signaling pathway and biological effect. As RANTES/CCL5 is involved in various physiopathological processes, the development of a new therapeutic strategy may be reliant on the mechanism by which RANTES/CCL5 exerts its biological activities, for example by targeting the binding of the chemokine to its proteoglycan receptor.

KEY WORDS: Syndecan-4, Chemokine, PKC, RANTES/CCL5, Endothelial cell

INTRODUCTION

A member of the β-chemokine family, the CC-chemokine Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and

¹Inserm U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, Bio-Ingénierie Cardio-vasculaire, UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France. ²Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe 657-6501, Japan. ³Laboratorie de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, AP-HP, 93143 Bondy, France. *These authors contributed equally to this work

[‡]Author for correspondence (nathalie.charnaux@jvr.aphp.fr)

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/ficenses/by/3.0), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium provided that the original work is properly attributed.

Received 4 March 2014; Accepted 22 July 2014

Secreted (RANTES)/CCL5 is both a T cell chemoattractant and an immunoregulatory molecule. It is now apparent that RANTES/ CCL5 exhibits critical functions in many diverse physiopathological mechanisms, including tumor progression and angiogenesis (Suffee et al., 2011; Rossi and Zlotnik, 2000; Soria and Ben-Baruch, 2008). Indeed, we have previously demonstrated that RANTES/CCL5 is pro-angiogenic in rat in a subcutaneous model (Suffee et al., 2012). This activity is related to the in vitro promotion of endothelial cell migration, spreading and neo-vessel formation. RANTES/CCL5 signals through its specific G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) CCR1, CCR3 and CCR5. Moreover, RANTES/CCL5, like other chemokines, also binds to glycosaminoglycans (GAGs), which are long, linear, and heterogenous sulfated polysaccharides. RANTES/ CCL5 exhibits selectivity in glycosaminoglycan binding with the highest affinity (nanomolar range) for heparin (Martin et al., 2001; Proudfoot et al., 2001). Glycosaminoglycans exist in covalent linkage to a protein core as proteoglycans. We have previously demonstrated that RANTES/CCL5 not only associates with its GPCRs but also with heparan sulfate proteoglycan belonging to the syndecan family, syndecan-1 (SDC-1) and syndecan-4 (SDC-4) on various cell types (Sutton et al., 2007; Charni et al., 2009; Slimani et al., 2003a; Slimani et al., 2003b). The binding of the chemokine to glycosaminoglycan chains modulate RANTES/CCL5 biological activities. Indeed, soluble heparin, GAG mimetics or GAG-binding deficient mutants of RANTES/CCL5 can modulate the biological activities of the chemokine as shown in vitro (Charni et al., 2009; Sutton et al., 2007) or in vivo (Suffee et al., 2012; Nellen et al., 2012).

Syndecan-4 (SDC-4) is one of a family of four transmembrane heparan sulfate proteoglycans, whose extracellular domains interact with various soluble and insoluble factors in the extracellular matrix (ECM). Syndecans have been thought to act as co-receptors for various heparin-binding growth factors such as fibroblast growth factors (FGFs), vascular endothelial growth factors (VEGFs) and fibronectin-binding integrins (Kwon et al., 2012; Beauvais and Rapraeger, 2010; Bernfield et al., 1999). An evolutionary conserved cytoplasmic domain on syndecans supports a key role for cell surface ligand binding and cytoplasmic signaling. Common to all syndecans, three regions of cytoplasmic domain have been identified. The first (C1) is the membrane-proximal region that binds Src kinase, ezrin, and cortactin (Granés et al., 2003; Kinnunen et al., 1998). The second (C2) is a C-terminal region that contains a postsynaptic density 95, discs-large, ZO-1 (PDZ)-domain binding motif (Multhaupt et al., 2009). The variable (V) domain is located between the two conserved domains and its sequence is unique to each syndecan family member. The V domain of SDC-4 binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) and also to protein

1

m

kinase C α (PKC α) complex, α -actinin, and syndesmos (Lim et al., 2003; Horowitz et al., 1999; Greene et al., 2003; Denhez et al., 2002). These interactions are responsible for the previously demonstrated SDC-4 role in cytoskeleton regulation that includes formation of focal adhesions, of dynamic stress fibers, and cell protrusions (Kwon et al., 2012). SDC-4 null mice are viable and fertile but exhibit defective skin wound healing reflecting impaired cell migration and angiogenesis (Echtermeyer et al., 2001; Okina et al., 2012).

Therefore, the hypothesis tested here is that the interaction of RANTES/CCL5 with SDC-4 triggers the transduction of signals leading to changes in the intracellular environment. To that purpose, we will evaluate the involvement of intracellular cytoplasmic SDC-4 domains in RANTES/CCL5-induced angiogenesis.

RESULTS

Site-directed mutations in syndecan-4 modify RANTES/CCL5 biological activities in endothelial cells

We addressed the potential role of SDC-4 in regulating the biological effects of RANTES/CCL5 by transfecting HUV-EC-C endothelial cells, which express SDC-4 endogenously, with Green Fluorescent Protein-tagged wild-type (SDC4WT-GFP) or with GFP-tagged SDC-4 constructs mutated at three key sites (Fig. 1A). In the first construct (SDC4S179A-GFP), the amino acid residue Ser located in the C1 domain was substituted by an Alanine. Phosphorylation of Ser 179 (Ser 183 in rat) in the intracellular domain of SDC-4 has been shown to regulate protein interactions, such as PKCa association (Horowitz and Simons, 1998; Finsen et al., 2011). In the second construct Y^{188} KK in the cytoplasmic tail of SDC-4 were mutated to LQQ, a mutation that affects the PIP2 affinity of the cytoplasmic tail (Horowitz et al., 2002). In the third construct (SDC4A198del-GFP, PDZ⁻), the COOH-terminal residue (Ala¹⁹⁸) was deleted, leading to a deficient PDZ-dependent protein binding of SDC-4 (Horowitz et al., 2002) (Fig. 1A). We first verified that the EGFP tag present in our construct in intracellular C terminus did not alter on its own the functionality of SDC-4. RANTES/CCL5induced chemotaxis on HUV-EC-C cells is similar in cells transfected with plasmids encoding for SDC-4 without any tag, or for SDC-4 with a CFP tag in N-terminal position, or for SDC-4 with Myc-His tag at C-terminal position, or for SDC-4 with GFP at C-terminus (data not shown). To measure the expression level of the transfected constructs and to locate the distribution of the GFP-SDC-4 constructs, we have carried out flow cytometry and immunofluorescence experiments (Fig. 1B). As a negative control, cells were transfected with the vector encoding for GFP alone (control). Flow cytometry analyses were carried out on non-permeabilized cells in order to detect by the use of redlabelled anti-SDC-4 antibodies, the SDC-4 present at the cell surface. For each SDC-4 constructs, the transfection efficiency, assessed by EGFP fluorescence intensity, ranges from 35 to 46% and was similar among the different constructions. The SDC-4 expression quantified by flow cytometry at the membrane of nonpermeabilized GFP positive cells was similar whatever the SDC-4 constructs overexpressed by the cells (Fig. 1C). The relative expression of each SDC-4 (SDC4WT-GFP, SDC4S179A-GFP, SDC4L188QQ-GFP or SDC4A198del-GFP) construct to the SDC4-WT was also assessed in the membrane fraction after cell fractionation, by Western-blot (Fig. 1D). The specificity of anti-SDC-4 antibody was verified by the reduced detection of SDC-4 molecules in cells transfected with a specific SDC-4 small interfering RNA (siRNA). Whatever the SDC-4 variant, the protein amounts of SDC-4 detected in the membrane fraction were almost similar (Fig. 1D). The SDC-4 localization at the cell membrane was also evidenced by confocal microscopy (Fig. 1E). In these experiments, the membrane is underlined by the staining of \$1 integrin chains, a typical membrane cell marker (Fig. 1E). Confocal analysis demonstrated that all SDC-4 constructs, including SDC4L188QQ-GFP, encode proteins expressed at the endothelial cell surface (data not shown). It is to note that overexpressed SDC-4 molecules also aggregate into the cells in all conditions. The degree of sulfatation of heparan sulfate chains is essential for the binding of RANTES/CCL5. To avoid any experimental bias, we next addressed the question whether SDC-4 construct overexpression could lead to a saturation of heparan sulfate chain biosynthesis enzymes, and therefore to lower sulfated heparan sulfate chains. The degree of sulfatation of syndecan-4 glycosaminoglycan chains is essential for the binding of RANTES/CCL5 (Gandhi and Mancera, 2008). Heparan sulfate chains present at the cell surface were increased by the SDC-4 overexpression as assessed by flow cytometry using specific antiheparan sulfate antibodies (Fig. 1F). Moreover, the levels of heparan sulfate chains were similar whatever the SDC-4 variant overexpressed (data not shown). As assessed by real-time RT-PCR, the levels of mRNA encoding for EXT1 and EXT2, which are involved in the first step of heparan sulfate chain biosynthesis, were unaffected by SDC-4 overexpression (data not shown).

Migration rate in response to RANTES/CCL5 treatment was measured by modified Boyden chamber experiments. As shown in Fig. 2A, in the absence of stimulation by the chemokine, SDC4WT-GFP, SDC4L188QQ-GFP, SDC4A198del-GFPtransfected endothelial cell migration was unchanged as compared to vector-transfected ones (control). By contrast, SDC4S179A-GFP-transfected cell migration was increased by 32±3% as compared to SDC4WT-transfected cell migration. RANTES/CCL5 increased vector-transfected cell migration by 19±3% as compared to vector-transfected cell migration towards medium alone (401±13 cells/field versus 336±4 cells/field, n=3, P<0.05). The chemotactic effect of RANTES/CCL5 was higher in SDC4WT-GFP-transfected cells as it increased SDC4WT-GFP-transfected cell migration by 55±9% as compared to SDC4WT-GFP-transfected cell migration towards medium alone (531±50 cells/field versus 344±10 cells/field, n=3, P<0.05). RANTES/CCL5 treatment led to a similar induction of cell migration after over-expression of SDC4S179A-GFP (17+4%)or SDC4L188QQ-GFP (PIP2) (18±1%) or SDC4A198del-GFP (PDZ⁻) (18±3%). Indeed, cell number/ field was 455±8 in unstimulated SDC4S179A-GFP cells versus 534±30 in SDC4S179A-GFP cells stimulated by RANTES/ CCL5, 349±4 in unstimulated SDC4L188QQ-GFP (PIP2⁻) cells versus 411±4 in SDC4L188QQ-GFP cells stimulated by RANTES/CCL5 or 349±9 in unstimulated SDC4A198del-GFP (PDZ⁻) cells versus 410±10 in SDC4A198del-GFP cells stimulated by RANTES/CCL5 (Fig. 2A). These results were confirmed by a migration wound healing assay and an invasion transwell assay (data not shown).

Cell migration involves formation of a leading edge in the direction of migration and adhesion points from which tension is generated to move the cell body forward. Disassembly of adhesion points occurs at the back of the cell, a region known as the trailing edge. In order to analyze the morphology of the SDC-4 transfected-cells, live fluorescent microscopy was carried out. This technique enables the visualization of only one cell per

3iology Open



Biology Open (2014) 000, 1-10 doi:10.1242/bio.20148227



Fig. 1. Syndecan-4 mutants are located at the membrane of endothelial cells. (A) Schemes of the syndecan-4 cytoplasmic constructs used in the study: S179A mutation expected to lead to a constitutive PKC₂ activation; PIP₂ (Y188KK to L188QQ) mutation; PDZ' (deletion of the COOH-terminal A198 residue) mutation. (B) HUV-EC-C transfection efficiency was determined by flow cytometry on non-perneabilized cells. Transfected cells were quantified for EGFP fluorescence (horizontal axis) and for fluorescent SDC-4 staining after cell incubation with specific antibody or control isotype (vertical axis). Transfection rate from representative experiments were estimated for each plasmid. (C) Cells were transfected with GFP plasmid (control), SDC4WT-GFP (SDC4WT) or SDC-4 constructs (S179A, L188QQ or A198del) (horizontal axis). Expression of membrane SDC-4 in GFP-positive cells was quantified by flow cytometry with specific anti-SDC-4 antibodies without cell permeabilization (vertical axis). * P<0.05, versus control cells. (D) Membrane SDC-4 constructs (S179A, L188QQ or A198del). Specific(ty of SDC-4 antibodies was checked using SDC-4 stifted with SDC4WT) or SDC-4 constructs (S179A, L188QQ or A198del). Specificity of SDC-4 antibodies was checked using SDC4-WT-GFP (SDC4WT) or SDC-4 constructs (S179A, L188QQ or A198del). Specificity of SDC-4 antibodies was checked using SDC4-WT-GFP (SDC4WT) or SDC-4 constructs (S179A, L188QQ or A198del). Specificity of SDC-4 antibodies was checked using SDC4-WT-GFP (SDC4WT) or SDC-4 constructs (S179A, L188QQ or A198del). Specificity of SDC-4 antibodies was checked using SDC4-WT-GFP (SDC4WT) or SDC-4 constructs (S179A, L188QQ or A198del). Specificity of SDC-4 antibodies as checked using SDC4-WT-GFP (SDC4WT) and siRNA negative control (SNC). (C) (HUV-EC-C transfected with GFP plasmid (control) or SDC4-WT-GFP (SDC4WT) were incubated with anti-β1 integrin antibodies or isotype control (red fluorescence) and analyzed under confocal microscopy (×400). Scale bars: 10 µm. The EGFP fluorescence indicat

observation field and was repeated six times. Upon RANTES/ CCL5 induction, SDC4-GFP molecules preferentially localize at the leading lamella and along the trailing edge of migratory SDC4WT-GFP-transfected cells (Fig. 2B; supplementary material Movie 1). SDC4S179A-GFP-transfected cells display morphology similar to the SDC4WT-transfected cells (Fig. 2B). Interestingly, endothelial cells expressing SDC4L188QQ-GFP (PIP₂⁻) or SDC4A198del-GFP (PDZ⁻), whereas also forming lamellipodia, failed to polarize by forming leading and trailing edge when compared with cells expressing SDC4WT-GFP (Fig. 2B). The reduction of cell area may be associated with cell migration properties. The area of cells transfected with SDC4WT-GFP or SDC4S179A-GFP was reduced upon RANTES/ CCL5 treatment by 11±4% and 13±3% respectively (n=6,

3

Open

ogv

Biol



Fig. 2. Intracellular domains of syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-mediated HUV-EC-C migration. (A) HUV-EC-C transfected with GFP plasmid (control) or with SDC4WT-GFP (SDC4WT) or with SDC-4 constructs (S179A, L188QQ, or A198del) were stimulated or not by 3 nM RANTES/CCL5 and cell migration was assayed by a transwell chamber model. Results are indicated as cell number/field (mean ± SEM). The vertical axis ranges from 300 to 600 cells/ field. * P<0.05, RANTES/CCL5 versus control; # P<0.05, S179A versus SDC4WT (in the absence of RANTES/CCL5); \$ SDC4WT versus control (in the presence of RANTES/CCL5). (B) The morphology of transfected HUV-EC-C was analyzed by live confocal microscopy upon RANTES/CCL5 stimulation for 15 minutes. (x400). Scale bars: 10 µm. Membrane protrusions were shown by white arrows.

 $P{<}0.05)$. In contrast, cells transfected either with SDC4L188QQ-GFP or with SDC4A198del-GFP exhibit similar area after RANTES/CCL5 treatment as compared to cells expressing SDC4WT-GFP (0±2% and 3±2% respectively, n=6).

Cell spreading participates at the highly integrated multistep process leading to cell migration. We then assayed RANTES/ CCL5-induced spreading of endothelial cells transfected with SDC4WT-GFP or with SDC-4 mutants. In the absence of any RANTES/CCL5 stimulation, the spreading of endothelial cells expressing SDC4S179A-GFP was increased by about 18% as compared to SDC4WT-GFP expressing cells (0.131 \pm 0.001 *versus* 0.111 \pm 0.001, n=3, P<0.05) (Fig. 3A). The spreading of endothelial cells expressing either wild-type SDC-4 or SDC-4 deleted in the PIP₂ or PDZ regions was unchanged as compared to vector-transfected ones (control) (Fig. 3A). RANTES/CCL5 increased the spreading of SDC4WT-GFP-transfected cell by $26\pm1\%$ as compared to untreated ones (0.140 ± 0.001 versus 0.111 ± 0.001 , n=3, P<0.05). The spreading induction in response to RANTES/CCL5 treatment of cells expressing either SDC48179A-GFP ($5\pm2\%$) or SDC4L188QQ-GFP ($9\pm1\%$) or SDC4A198del-GFP ($11\pm1\%$) were similar to the vector-transfected cells (control, $9\pm1\%$) (Fig. 3A).

As RANTES/CCL5 has been demonstrated to exert proangiogenic effects (Suffee et al., 2012), angiogenesis assay was tested on SDC-4 construct-transfected cells upon chemokine stimulation. In the absence of stimulation by RANTES/CCL5, the

RESEARCH ARTICLE



Fig. 3. Intracellular domains of syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-mediated HUV-EC-C spreading and vascular tube formation. HUV-EC-C transfected with GFP plasmid (control), SDC4WT-GFP (SDC4WT) or mutated SDC-4 constructs (S179A, L188QQ, A198del) were stimulated or not by 3 nM RANTES/CCL5 and assayed for cell spreading on fibronectin (A) or vascular tube formation in Matrigel (B). Results are expressed as area (A) or as length of vascular sprout (B) (mean ± SEM) expressed in arbitrary units (A.U.). The vertical axis ranges from (A) 0.1 to 0.15 or from (B) 0.5 to 0.85 A.U. * P<0.05, RANTES/CCL5. Versus control; # P<0.05, S179A versus SDC4 (in the absence of RANTES/CCL5); \$ P<0.05 SDC4WT versus control (in the presence of RANTES/CCL5).

formation of vascular sprout, as assessed by vascular sprout length, was increased in cells expressing SDC4S179A-GFP by 28±1% increase as compared to vector-transfected cells (control) but was unchanged when cells were transfected with SDC4WT-GFP, SDC4L188QQ-GFP or SDC4A198del-GFP constructs. The endothelial vascular sprout length upon RANTES/CCL5 stimulation of cells expressing SDC4WT-GFP was increased as compared to unstimulated ones (0.782±0.011 versus 0.574±0.002, corresponding to an increase of 36±1%, n=3, P<0.05). RANTES/CCL5 increased to a lesser extent the endothelial vascular sprout length of cells expressing SDC4S179A-GFP (0.813±0.016 versus 0.705±0.007, corresponding to an increase of 15±2%, n=3, P<0.05) orSDC4L188QQ-GFP (0.632±0.002 versus 0.563±0.003, corresponding to an increase of 12±1%, n=3, P<0.05) or SDC4A198del-GFP (0.629±0.005 versus 0.560±0.006, corresponding to an increase of 12±1%, n=3, P<0.05) as compared to the unstimulated respective cells (Fig. 3B).

Altogether, biological effects induced by the chemokine RANTES/CCL5 were largely decreased when cells overexpressed SDC4S179A, SDC4L188QQ or SDC4A198del.

RANTES/CCL5 biological effects depend on the syndecan-4/ PKCa signaling pathway

A demonstrated signaling role of syndecan-4 is the modulation of FGF-2-stimulated PIP2-dependent PKCa activity. We therefore addressed the question whether PKCa was activated when transfected endothelial cells are stimulated by RANTES/CCL5. Prior studies have established that dephosphorylation of Ser-179 in SDC-4 cytoplasmic domain is required for PKCa activation (Horowitz and Simons, 1998). RANTES/CCL5 treatment induced Ser-179 dephosphorylation in endothelial cells transfected with SDC4WT-GFP, in a way similar to FGF-2 used as positive control (Fig. 4A). The less intense expression of SDC-4 and pSDC-4 revealed by western blot using anti-SDC-4 and antipSDC-4 antibodies in cells transfected with siRNA SDC-4, attested the specificity of these antibodies (Fig. 4A). In subsequent studies, the involvement of $PKC\alpha$ in RANTES/ CCL5-induced biological effects was tested either by incubating cells with Gö6976, or by the use of transfected dominant negative plasmid. Gö6976 is a potent and selective PKCa inhibitor (IC50=2.3 nmol/L for PKCa), but does not inhibit the activity of PKCδ, -ε, or -ζ (Chen et al., 2014). Upon Gö6976 cell treatment, endothelial cell migration and vascular tube formation induced by RANTES/CCL5 were largely decreased in SDC4WT-transfected cells as compared to SDC4WT-transfected cells in the absence of inhibitor (Fig. 4B,C). These data were confirmed and even more pronounced after PKCα inhibition by the transfection with a dominant negative PKCα plasmid. Strikingly, in the absence of RANTES/CCL5 stimulation, endothelial cell migration was increased upon Gö6976 cell treatment, conversely to HUV-EC-C vascular sprout length.

Finally, endothelial cells were co-transfected with SDC4WT-GFP or the SDC4-GFP mutants and with a Ds-red PKCa and their localization was visualized with a confocal microscope. The low red signal associated with PKCa and the high green signal due to the intracellular accumulation of SDC4WT-GFP do not allow the precise quantification of co-localized signals. As control, 12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induces the translocation of Ds-red PKCa at the cell membrane (Fig. 5A). RANTES/CCL5 treatment of co-transfected endothelial cells exerts no effect on cells transfected with empty plasmid but induces membrane localization of Ds-Red PKCa and SDC4WT-GFP, especially visible in areas where membrane protrusions appear distinctly, suggesting the membrane translocation of PKC α leading to its activation (Fig. 5C; supplementary material Movie 2). The effect of RANTES/CCL5 on PKCa translocation to the membrane was assessed by western blot after fractionation of cells overexpressing SDC4WT-GFP, SDC4S179A-GFP, SDC4L188OO-GFP or SDC4A198del-GFP. RANTES/CCL5 induced PKCa translocation to the membrane in cells transfected with empty plasmid, and even more in cells overexpressing SDC-4. The SDC4S179A-GFP overexpression leads to an increased total expression of PKCa associated with a high level of PKCa at the cell membrane, unchanged by the stimulation with RANTES/CCL5. This result was confirmed by confocal microscopy (supplementary material Movie 3). Whereas cells transfected with SDC4A198del-GFP exhibit intermediate amounts of PKCa expressed at the cell membrane, the SDC4L188QQ-GFP variant inhibits the PKCa translocation (Fig. 5D; supplementary material Movie 4)

Similarly, the effect of RANTES/CCL5 on Rac1 activation was assessed by a pull-down assay in cells overexpressing SDC4WT-GFP, SDC4S179A-GFP, SDC4L188QQ-GFP or

5

Open



Fig. 4, PKCu mediates RANTES/CCL5-induced endothelial cell migration and vascular tube formation via syndecan-4. (A) Specificity of SDC-4 and pSDC-4 antibodies was checked using siRNA-negative control (SNC) or siRNA-SDC-4 (siRNA SDC-4) transfected cells by western blot analysis. HUV-EC-C transfected with GFP plasmid (control) or with SDC4WT-GFP (SDC4WT) were stimulated or not (U) by 3 nM RANTES/CCL5 (R) or 20 ng/ml FGF-2 (F) and SDC-4 phosphorylation at Ser179 was evaluated by western blot. Upper panel, representative Western blot analysis. Lower panel, densitometry quantification of three independent experiments. pSDC-4 band intensity was normalized to SDC-4 one. Results of relative densitometry intensities (mean \pm SEM) are expressed in arbitrary units (A.U.). * P<0.05, RANTES/CCL5 or FGF-2 *versus* unstimulated cells. (B,C) HUV-EC-C transfected with GFP plasmid (control) or with SDC4WT-GFP (SDC4WT) were either co-transfected with a dominant negative PKC $_{2}$ plasmid (DN-PKC $_{2}$). They were pre-incubated or not with Gö6976, a PKC $_{2}$ inhibitor, and treated or not with 3 nM RANTES/CCL5. They were then assayed for cell migration in a transwell chamber model (B) or for vascular sproul length are presented as mean \pm SEM of migrated cell number/field. Vertical axis ranges from 300 to 600 cells/field. (C) Results of vascular sproul length are presented as mean \pm SEM expressed in arbitrary units (A.U.). Vertical axis ranges from 300 to 600 cells/field. (C) Results of vascular sproul length are presented as mean \pm SEM expressed cells in the absence of PKC $_{2}$ inhibitor (in the absence of RANTES/CCL5); # P<0.05 cells preincubated owith Gö6976 or with the dominant negative PKC $_{2}$ plasmid *versus* cells in the absence of PKC $_{2}$ inhibitor (in the presence of RANTES/CCL5); # P<0.05 cells preincubated with Gö6976 or with the dominant negative PKC $_{2}$ plasmid *versus* cells in the absence of PKC $_{2}$ inhibitor (in the presence of RANTES/CCL5); # P<0.05 cells preincubated with Gö6976 or with the

SDC4A198del-GFP. RANTES/CCL5 induced Rac1 activation only in cells transfected with SDC4WT-GFP or SDC4S179A-GFP. The cell transfection with SDC4S179A-GFP induces Rac1-GTP activation in the absence of RANTES/CCL5 (Fig. 5E).

DISCUSSION

We have recently demonstrated the proangiogenic role of the chemokine RANTES/CCL5 by the use of *in vitro* and *in vivo* experimental approaches (Suffee et al., 2012). RANTES/CCL5-induced proangiogenic effects depend both on CCR1, its G-protein coupled receptor, and also on glycosaminoglycans carrying by membrane proteoglycans belonging to the syndecan family, namely SDC-1 and -4. It was recently demonstrated that PGE₂-induced ERK activation in endothelial cells and PGE₂-induced angiogenesis are driven by SDC-4-dependent PKC activation (Cori et al., 2013). Our working hypothesis was that syndecan-4 molecules participate to RANTES/CCL5 signalling, leading to biological effects in endothelial cells. For that purpose,

syndecan-4 constructs were established in the intracellular syndecan-4 domain. A Ser-to-Ala mutation in the C1 SDC-4 intracellular domain was introduced at position 179 (S183 in rat) and would have been expected to favor PKC activation (Horowitz and Simons, 1998; Murakami et al., 2002). In the second construct, the three consecutive residues Y188KK in the V domain were mutated to LQQ. This mutant has been described to have a reduced affinity to PIP2, leading to an inhibition of its PIP2mediated PKC activation (Horowitz et al., 2002). The third construct has a deletion of A¹⁹⁸, which abolished PDZ-dependent binding of syndecan-4 (Horowitz et al., 2002). The PDZ protein interaction domain of SDC-4 (EFYA amino-acid sequence) is very important for the syndecan-4-induced signaling. Some studies showed that the mutation of this domain altered the cell migration induced by FGF-2 via syndecan-4 signaling (Gao et al., 2000; Horowitz et al., 2002; Tkachenko et al., 2006). It was shown that the abolition of PDZ-binding in the SDC-4 intracellular domain failed to activates PKCa which is





Fig. 5. RANTES/CCL5 induced co-localization of SDC-4 and PKCa at the cell membrane and Rac1 activation. (A-C) HUV-EC-C were co-transfected with PKCα-DsRed2 plasmid and with either GFP plasmid (control, panels A and B) or GFP-SDC4WT (SDC4WT, panel C). They were incubated or not with (A) 0.5 µM TPA or with (B.C) 3 nM RANTES/CCL5 for 15 minutes and analyzed under live confocal microscopy. Membrane localization of SDC-4 (green) and PKCa (red) was indicated with white arrows. (×400). (D) HUV-EC-C transfected with GFP plasmid (control) or with SDC4WT-GFP (SDC4WT) or with mutated SDC-4 constructs (S179A, L188QQ, A198del) were stimulate or not (U) by 3 nM RANTES/CCL5 (R). After cell fractionation, the amount of $PKC\alpha$ in membrane of total fraction was evaluated by western blot. (E) HUV-EC-C transfected with GFP plasmid (control) or with SDC4WT-GFP (SDC4WT) or with mutated SDC-4 constructs (S179A, L188QQ, A198del) were stimulated or not (U) by 3 nM RANTES/CCL5 (R). Rac1-GTP activity was determined by pull down assay and analyzed using specific Rac1-GTP antibodies by western blot. Scale bars: 10 um.

necessary for the FGF-2 dependant migration (Horowitz et al., 2002). SDC-4 PDZ deficient mutant is unable to bind the PDZ protein synectin. This abolition failed to activate and localize Rac1 at proximity of the leading edge, which is essential for the initiation of cell migration (Tkachenko et al., 2006). Spreading, migration and vascular tube formation induced by RANTES/ impaired in SDC4L18800-CCL5 were largely or SDC4A198del-transfected cells as compared to the mocktransfected ones, suggesting that the chemokine biological activities are dependent on PKC activation. The biological activities mentioned above were not affected by the mutants under basal conditions (in the absence of RANTES/CCL5). By contrast, the overexpression of SDC4-S179A mutant highly raised endothelial cell spreading, migration and tube formation without any chemokine stimulation and leads to a reduced magnitude of the RANTES/CCL5 effects, as compared to mocktransfected cells. Therefore, these data give evidence that SDC-4 is a co-receptor for the chemokine RANTES/CCL5 by activating signaling through its own intracellular domains. Furthermore, RANTES/CCL5 dependence on the SDC-4/PKCa signaling pathway is demonstrated by a number of observations. First, RANTES/CCL5 biological activities are largely reduced when endothelial cells are incubated with a specific PKCa inhibitor or co-transfected with a dominant negative PKCa. Second, RANTES/CCL5 treatment of endothelial cells leads to the dephosphorylation of the Ser-179 site of SDC-4 cytoplasmic tail. This amino acid residue (S183 in rat) is crucial for PIP2mediated PKCa binding to SDC-4 leading to PKCa activation. Third, western blotting analysis demonstrates that RANTES/ CCL5 induced membrane translocation for SDC4WT-GFP transfected cells but not in SDC4L188QQ-GFP or SDC4A198del-GFP-transfected ones and confocal microscopy analysis demonstrates that RANTES/CCL5 induced the membrane localization of DsRed-Tagged PKCa and SDC4-GFP in SDC4WT-GFP tranfected endothelial cells. These data are

consistent with those previously published whereby the SDC-4 interacts with PIP2 which allow the activation of PKCa (Oh et al., 1997; Oh et al., 1998). Regulation of Rho family GTPases may also lie downstream of PKCa (Bass et al., 2007; Bass et al., 2008; Dovas et al., 2006). Previous studies indicated that SDC-4 orchestrates the polarization of active Rac1 in the presence of chemotactic signals such as FGF-2 and that SDC-4 induces Rac1dependent cell migration in a manner that requires both its PDZbinding domain and PKCa (Tkachenko et al., 2006; Bass et al., 2007). Elfenbein et al. have also demonstrated that Rac1 activation downstream of SDC-4 is mediated by RhoG activation pathway (Elfenbein et al., 2009). Rac1 activation has been shown to be critical for both CCR1- and CCR5-triggered signaling cascades mediating RANTES/CCL5-induced reorganization of the actin cytoskeleton (Di Marzio et al., 2005). It has been shown that RANTES/CCL5 mediated T-cell activation and chemotaxis requires Rho GTPase activity (Clissi et al., 2000). We therefore hypothesize that SDC-4 may probably participate to RANTES/CCL5 biological activities by activating members of the Rho family of small GTPases, and we demonstrated by pull down assay that RANTES/CCL5 induced Rac1 activation for SDC4WT-GFP transfected endothelial cells but not in SDC4L188QQ-GFP or SDC4A198del-GFP-transfected ones

Our data also highlight that SDC-4 participates to RANTES/ CCL5-mediated biological effects, such as cell migration or vascular tube formation in a PDZ domain-dependent manner since chemokine activities were impaired in SDC4A198del-GFPtransfected endothelial cells. PDZ domains are protein interaction modules that regulate targeting and trafficking of cell surface proteins. It has been previously demonstrated that SDC-4 promotes endothelial cell migration in response to ligand binding by activating Rac1 and localizing it to the leading edge and that these processes are dependent on its PDZ-binding domain interaction with synectin, a small intracellular scaffold protein (Tkachenko et al., 2006; Grootjans et al., 1997). FGF-2-induced

Biology Open

Rac1 activation depends on the suppression of RhoG by a SDC4synectin-RhoGD11 complex and activation via PKCa (Elfenbein et al., 2009). Syntenin, the first-described syndecan-binding partner, binds also to SDC-4, leading to a regulation of integrin recycling (Morgan et al., 2013). The identification and the precise role of PDZ proteins interacting with SDC-4 in RANTES/CCL5 activities are actually unknown.

In summary, our data demonstrate that SDC-4 is a typical coreceptor for the chemokine RANTES/CCL5 and that the interaction of both partners leads to activation of PKCa through the intracellular domain of SDC-4. Regarding the multiple role of RANTES/CCL5 in various pathologies, including cancer, viral diseases and inflammation, deciphering the mechanism by which RANTES/CCL5 exerts its biological activities is a preliminary step to develop new therapeutic strategy, for example by targeting the binding of the chemokine to its proteoglycan receptor.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents RANTES/CCL5 was synthesized by L. Martin and C. Vita (CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France) as previously described (Charni et al., 2009) and used at 3 nM. Fibronectin (100 µg/ml) and Matrigel (320 µg/ml) were from BD Biosciences Pharmingen (Le Pont de Claix, France). Mayer's Hemalun (a nucleus marker) was from Roth (Lauterbourg, France). Crystal Violet (0.1%), TPA (0.5 µM, 12-O-tetradecanovlphorbol-13acetate), FGF-2 (20 ng/ml, Fibroblast Growth Factor-basic) and PKCa/ β1 inhibitor Gö6976 (1 μM) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Antibodies were used at a 10 µg/ml concentration: primary antibodies mouse IgG2a anti-human SDC-4 (5G9) and mouse IgG1 anti-human integrin B1 were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu Bio, Le Perray-en-Yvelines, France), mouse IgM anti-human heparan sulfate (F58-10E4) was from Seikagaku Biobusiness Corporation (Tokyo, Japan). Isotype controls, mouse IgG1, mouse IgG2a and mouse IgM, were from BD Biosciences Pharmingen. Secondary antibodies Alexa Fluor 555-goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 647-goat anti-mouse IgG were from Invitrogen (Life Technology), APC-rat anti-mouse IgM was from BD Biosciences Pharmigen. For Western blotting analysis, primary antibodies goat IgG anti-human pSDC-4 (Ser 179), rabbit IgG anti-human SDC-4 (H140) were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu Bio) and mouse IgG2b anti-human PKCa was from BD Biosciences Pharmigen; isotype controls goat IgG and mouse IgG were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu Bio) and rabbit IgG was from R&D Systems (Lille, France); secondary antibodies HRP-donkey anti-goat IgG was from Santa Cruz Biotechnology (Tebu Bio), HRP-donkey anti-mouse IgG and HRP-donkey anti-rabbit IgG was from Jackson ImmunoResearch (Immunotech S.A.S, Marseille, France).

cDNA contructs

Syndecan-4 cDNA (OriGene, CliniSciences, Nanterre, France) was inserted in pEGFP-N3 plasmid (Clontech, Ozyme, Saint-Germain-en-Laye, France) between EcoRI and KpnI restriction sites. Specific mutations for SDC-4 sequence were performed with QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Agilent Technologies, Les Ulis, France). Briefly, pEGFP-N3-SDC-4 (50 ng) and primers (125 ng of upper primer and 125 ng of lower primer) for each mutation were mixed with reaction buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5), 1 μL dNTPmix and 2.5 U PfuUltra HF DNA polymerase, and PCR was performed (1 step 30 seconds at 95°C, 18 stages of 3 steps (30 seconds at 95°C, 1 minute at 55°C, 6 minutes at 68°C). The amplified PCR products were then digested by DpnI for 1 hour.

pEGFP-N3 (Control), pEGFP-N3-SDC-4 wild-type (SDC4WT), pEGFP-N3-SDC-4-S179A (S179A), pEGFP-N3-SDC-4-L188QQ PEGFP-N3-SDC-4-S179A (S179A), pEGFP-N3-SDC-4-L188QQ (L188QQ), pEGFP-N3-SDC-4-A198del (A198del) plasmids were transformed in XL1-Blue Supercompetent cells (*E. coli*, Stratagene) according to manufacturer's instructions and sequences were checked by Beckman Coulter Genomics (Takeley, United Kingdom),

PKCa-DsRed2 and Dominant-Negatif PKCa-K368M-DsRed2 plasmids were constructed by Pr. N. Saito team (Masukawa et al., 2006). Plasmids amplification and purification were performed using miniprep and maxiprep kits (Qiagen, Courtaboeuf, France; Masukawa et al., 2006) according to manufacturer's protocols.

Cell culture, transfection and transduction

Human umbilical vein endothelial cells (HUV-EC-C, no. CRL-1730, ATCC) were cultured as previously described (Suffee et al., 2012).

HUV-EC-C were harvested and 10^6 cells were incubated with 5 µg of plasmid in 100 µl Amaxa cell line nucleofector solution V (Lonza). Cells were transfected using protocol V-001 of AMAXA nucleofector device II (Lonza). Transfected cells were cultured at 10⁶ cells/ml in ECBM2 containing 12% of fetal calf serum. After 8 hours, dead cells were removed and fresh medium was added. For all experiments, cells were used 24 hours after transfection.

Flow cytometry

The cell transfection efficiency with the various plasmids was analyzed 24 hours after transfection by flow cytometry by the measure of EGFP fluorescence intensity. SDC-4 overexpression at endothelial cell membrane was assessed by the use of specific antibodies directed against SDC-4 extracellular domain or with isotype controls revealed by Alexa Fluor 647-goat anti mouse IgG as secondary antibodies. Heparan sulfate chain expression at endothelial cell membrane was assessed using specific anti-heparan sulfate antibodies or isotype controls revealed by

APC-rat anti-mouse IgM as secondary antibodies. SDC-4 expression was analyzed by the detection of EGFP fluorescence with a confocal microscope 24 hours after transfection. The membrane localization of SDC-4 was evidenced by a merged fluorescence of EGFP and integrin ß1 immunostaining, a membrane marker, with specific antibodies and Alexa Fluor 555-goat anti mouse IgG as secondary antibodies.

Cell spreading

Transfected cells, incubated for 2 hours with or without RANTES/CCL5 were stained with Alexa Fluor 568-phalloidin (1:200, Invitrogen) and observed with a fluorescence microscope (Zeiss, AXIOPHOT, N°/ MicMac, Le Pecq, France) as previously described (Charni et al., 2009). Ten fields of stained cells were photographed and cell areas were evaluated on 40 cells with Scion Imager (Scion Image Software and National Institutes of Health, Release Beta 3b Software).

Cell migration

Cell migration was analyzed in Boyden transwell migration chambers (Beckton Dickinson, Le Pont de Claix, France) as previously described (Sutton et al., 2007). Inserts of Boyden cell migration chamber were coated with fibronectin and 5×10^4 transfected or co-transfected cells pretreated or not 2 hours with Gö6976, a specific PKC α and PKC β I inhibitor, were incubated 24 hours at 37°C. In the lower chamber, medium supplemented or not with RANTES/CCL5 was added. After staining with Mayer's hemalum, cells were quantified.

2D-angiogenesis

For 2D angiogenesis assay, 1.5×10^4 transfected cells were seeded on Matrigel-coated 8 wells Labtek for 24 hours with or without RANTES/ CCL5 pre-incubated or not for 2 hours with Gö6976, a specific PKC inhibitor (Suffee et al., 2012). Cells were fixed, stained with Crystal Violet (Sigma-Aldrich) and photographed under phase contrast microscope (Olympus CK40, Rungis, France). The length of 30 vascular sprouts was evaluated using Scion Imager (Scion Imager Software)

Live fluorescent microscopy HUV-EC-C were co-transfected with pEGFP-N3, pEGFP-N3-SDC-4 wild-type or SDC-4 mutated plasmids and with PKC α -DsRed2 plasmid and seeded on a glass bottom dish (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA). After 24 hours, co-transfected cells were incubated or not with

RESEARCH ARTICLE

RANTES/CCL5, and the localization of PKCa was monitored by confocal laser scanning fluorescence microscopy (model LSM 510 invert, Carl Zeiss, Jena, Germany). EGFP-SDC-4 was monitored at 488-nm argon excitation using a 510- to 535-nm band pass barrier filter. PKCa-DsRed2 was monitored at 543-nm HeNe1 excitation using a 590-nm-band pass barrier filter. DsRed2 and EGFP were monitored simultaneously using multitracking software which alternately detects each fluorescence by switching quickly between laser and filter system.

Syndecan-4 phosphorylation

2×106 HUV-EC-C transfected cells were cultured for 24 hours and incubated at 37°C for 15 minutes with or without 3 nM RANTES/CCL5 or 20 ng/ml FGF-2 and lysed in a buffer containing phosphate-buffered saline supplemented with 1% NP-40, 10 mM PMSF, 5 mM iodoacetamide, 25 mM ophenanthroline, 20 µg/ml aprotinin and 1 mM orthovanadate. Lysates were obtained by centrifugation at 10,000 × g for 15 minutes at 4°C and protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Brébières, France). 22 µg proteins were loaded on SDS-PAGE to reveal unphosphorylated SDC-4 on Ser-179, total SDC-4 using specific antibodies, purchased from Santa Cruz Biotechnology (Tebu Bio): antip-syndecan-4 (Ser179) at 0.5 µg/ml, anti-syndecan-4 (rabbit polyclonal lgG, clone H140) at 1 µg/ml. Revelation was performed using horseradish peroxidase-conjugated anti-goat lgG (at 0.2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Tebu Bio) or anti-rabbit IgG (at 0.16 µg/ml, Jackson Immuno Research).

PKCa membrane translocation

2×10⁶ HUV-EC-C transfected cells were cultured for 24 hours and incubated at 37°C for 15 minutes with or without 3 nM RANTES/CCL5. Cell fractionation was performed using Subcellular Protein Fractionation Kit for Cultured Cells from Pierce according to manufacturer's protocol. Briefly, cells were harvested, wash with cold PBS and pellet was obtained by centrifugation at 500 × g for 5 minutes at 4°C. Cell pellet was gently mixed with CEB buffer for 10 min at 4°C and cytoplasmic fraction was collected by centrifugation at 500 × g for 5 minutes at 4°C. Cell pellet was gently mixed with MEB buffer for 15 minutes at 4°C and membrane fraction was collected by centrifugation at 3,000 × g for 5 minutes at 4°C. Protein concentration was determined using the BCA protein assay kit (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Brébières, France). 10 ug proteins were loaded on SDS-PAGE to reveal PKCa using specific mouse IgG2b anti-human PKCa antibody purchased from BD Biosciences Pharmigen at 0.5 µg/ml. Revelation was performed using horseradish peroxidase-conjugated antiise IgG at 0.16 µg/ml purchased from Jackson Immuno Research.

Rac-1-GTP pull down

2×106 HUV-EC-C transfected cells were cultured for 24 hours and incubated at 37°C for 15 minutes with or without 3 nM RANTES/CCL5. Quantity of Rac1-GTP (active form) was determined using Rac1 Activation Magnetic Beads Pulldown Assay from Merck Millipore (Millipore S.A.S, Guyancourt, France) according to manufacturer's protocol. Briefly, cells were washed 2 times with cold PBS and were lysed in MLB buffer (25 mM HEPES, 150 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, 5 mM EDTA, 1% Igepal CA-630, glycerol 10%, aprotinin 10 μ g/ml, leupeptine 10 μ g/ml, orthovanadate 1 mM, pH 7.5). Lysates were incubated with 10 μ g of Pak-1 PBD magnetic beads and gently mixed for 45 minutes at 4°C (binding of Rac1-GTP to the beads). Beads containing active Rac1 were washed 3 times with MLB buffer to remove all inactive Rac1 and were loaded on SDS-PAGE to reveal Rac-1 using supplied specific mouse IgG2a anti-human Rac1 antibodies at 1 µg/ml. Revelation was performed using horseradish peroxidaseconjugated anti-mouse IgG at 0.16 µg/ml purchased from Jackson Immuno Research.

Statistical analysis

Results are presented as mean ± SEM. Statistical significance was assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) test performed with the Statview software (StatView 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). A P value of <0.05 was used as the criterion of statistical significance

Acknowledgements The authors are grateful to Roger Vranckx (Inserm U698, Paris, France) for his help in plasmid construction. RANTES/CCL5 was a generous gift provided by Loic Martin, CEA Saclay, Franc

Competing interests

The authors have no competing interests to declare

Author contributions

LM: Acquisition, analysis and interpretation of all experimental data, drafting and revision of the work for intellectual content. NS: Study conception and design acquisition, analysis and interpretation of live confocal microscopy experiment drafting and revision of the work for intellectual content. HH: Analysis and interpretation of data (spreading, migration and angiogenesis assays). VF: Acquisition, analysis and interpretation of data (plasmid construction for SDC-4). NS: Acquisition, analysis and interpretation of data. FC: Acquisition and analysis NS: Acquisition, analysis and interpretation of data. FC: Acquisition and analysis of data (plasmid construction for SDC-4 mutants). OH: Acquisition, analysis and interpretation of data (spreading, migration and angiogenesis assays). CL: Acquisition, analysis and interpretation of data (pull down). EG: Acquisition, analysis and interpretation of data (plasmid construction for PKCs). OC: Analysis and interpretation of data (plasmid construction for PKCs). OC: Analysis and interpretation of data (plasmid construction for PKCs). interpretation of experimental data, revision of the work for intellectual content andcontext. AS: Study conception and design, analysis and interpretation of data,drafting and revision of the work for intellectual content, final approval and overall responsibility for the published work. NC: Study conception and design, analysis and interpretation of data, drafting and revision of the work for intellectual content and context, final approval and overall responsibility for the published

Funding

LM was supported by a fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, France. The collaboration with the Biosignal Research Center from Kobe, Japan, was supported by grants from University Paris 13, France

- References Bass, M. D., Roach, K. A., Morgan, M. R., Mostafavi-Pour, Z., Schoen, T., Muramatsu, T., Mayer, U., Ballestrem, C., Spatz, J. P. and Humphries, M. J. (2007). Syndecan-4-dependent Rac1 regulation determines directional migration in response to the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 177, 527-538. Bass, M. D., Morgan, M. R., Roach, K. A., Settleman, J., Goryachev, A. B. and Humphries, M. J. (2008). p190RhoGAP is the convergence point of adhesion signals from alpha 5 beta 1 integrin and syndecan-4. *J. Cell Biol.* 181, 1013-1026.
- 1026. Beauvais, D. M. and Rapraeger, A. C. (2010). Syndecan-1 couples the insulin-like growth factor-1 receptor to inside-out integrin activation. J. Cell Sci. 123, 3796-3807.
- 3796-3807.
 Bernfield, M., Götte, M., Park, P. W., Reizes, O., Fitzgerald, M. L., Lincecum, J. and Zako, M. (1999). Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans. Annu. Rev. Biochem. 68, 729-777.
 Charni, F., Friand, V., Haddad, O., Hlawaty, H., Martin, L., Vassy, R., Oudar, O., Gattegno, L., Charnaux, N. and Sutton, A. (2009). Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-Induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 1314-1326.
 Chen, F., Yu, Y., Haido, K., Johnson, J., Lucas, R., Stepe, D., W. and Fulton.
- Chen, F., Yu, Y., Haigh, S., Johnson, J., Lucas, R., Stepp, D. W. and Fulton, D. J. R. (2014). Regulation of NADPH oxidase 5 by protein kinase C isoforms. *PLoS ONE* 9, e88405.
- PLOS ONE 9, e88405.
 Clissi, B., D'Ambrosio, D., Geginat, J., Colantonio, L., Morrot, A., Freshney, N. W., Downward, J., Sinigagila, F. and Pardi, R. (2000). Chemokines fail to up-regulate beta 1 integrin-dependent adhesion in human Th2 T lymphocytes. J. Immunol. 164, 3292-3300.
 Corti, F., Finetti, F., Ziche, M. and Simons, M. (2013). The syndecan-dyrotein bilance of the predicting distribution of the prediction of the prediction of the prediction.
- kinase Car pathway mediates prostaglandin E2-induced extracellular regulated kinase (ERK) activation in endothelial cells and angiogenesis in vivo. J. Biol. Chem. 288, 12712-12721.
- Chem. 288, 12712-12721.
 Denhez, F., Wilcox-Adelman, S. A., Baciu, P. C., Saoncella, S., Lee, S., French, B., Neveu, W. and Goetinck, P. F. (2002). Syndesmos, a syndecan-4 cytopiasmic domain interactor, binds to the focal adhesion adaptor proteins paxillin and Hic-5. J. Biol. Chem. 277, 12270-12274.
 Di Marzio, P., Dai, W. W., Franchin, G., Chan, A. Y., Symons, M. and Sherry, B. (2005). Role of Rho family GTPases in CCR1- and CCR5-induced actin reorganization in macrophages. Biochem. Biophys. Res. Commun. 331, 909-916.
- Dovas, A., Yoneda, A. and Couchman, J. R. (2006). PKCbeta-dependent activation of RhoA by syndecan-4 during focal adhesion formation. J. Cell Sci. 119, 2837-2846.

9

Open

Vpo

RESEARCH ARTICLE

- Echtermeyer, F., Streit, M., Wilcox-Adelman, S., Saoncella, S., Denhez, F., Detmar, M. and Goetinck, P. (2001). Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J. Clin. Invest.* 107, R9-R14.
 Elfenbein, A., Rhodes, J. M., Meller, J., Schwartz, M. A., Matsuda, M. and Simons, M. (2009). Suppression of RhoG activity is mediated by a syndecan 4-synectin-RhoGD11 complex and is reversed by PKCalpha in a Rac1 activation pathway. *J. Cell Biol.* 186, 75-83.
 Finsen, A. V., Lunde, I. G., Sjaastad, I., Østli, E. K., Lyngra, M., Jarstadmarken, H. O., Hasic, A., Nygård, S., Wilcox-Adelman, S. A., Goetinck, P. F. et al. (2011). Syndecan-4 is essential for development of concentic myocardial hypertrophy via stretch-induced activation of the calcineurin-NFAT pathway. *PLoS ONE* 66, e28302.
 Gao, Y., Li, M., Chen, W. and Simons, M. (2000). Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J. Cell. Physiol.* 184, 373-379.
- cytoplasmic u 184, 373-379.

- Supersonand oursam of PD2 protein, inhibits cell migration. J. Cell. Physiol. 184, 373-379.
 Gandhi, N. S. and Mancera, R. L. (2008). The structure of glycosaminoglycans and their interactions with proteins. Chem. Biol. Drug Des. 72, 455-482.
 Granés, F., Berndt, C., Roy, C., Mangeat, P., Reina, M. and Vilaró, S. (2003). Identification of a novel Ezrin-binding site in syndecan-2 cytoplasmic domain. FEBS Lett. 547, 212-216.
 Greene, D. K., Tumova, S., Couchman, J. R. and Woods, A. (2003). Syndecan-4 associates with alpha-actinin. J. Biol. Chem. 278, 7617-7623.
 Grootjans, J. J., Zimmermann, P., Reekmans, G., Smets, A., Degeest, G., Dür, J. and David, G. (1997). Syntenin, a PD2 protein that binds syndecan-cytoplasmic domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 13683-13688.
 Horowitz, A. and Simons, M. (1998). Phosphoritation of the cytoplasmic tail of syndecan-4 regulates activation of protein kinase Calpha. J. Biol. Chem. 273, 25548-25551.
 Horowitz, A., Murakami, M., Gao, Y. and Simons, M. (1999). Phosphorid-tilenced and the syndecander and the synd
- Horowitz, A., Murakami, M., Gao, Y. and Simons, M. (1999). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate mediates the interaction of syndecan-4 with protein kinase C. 4.5-bisphosphate mediates the interaction of syndecar-4 with protein kinase C. Biochemistry 38, 15871-15877.
 Horowitz, A., Tkachenko, E. and Simons, M. (2002). Fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecar-4. J. Cell Biol. 157, 715-705.
- 725
- 123. Innunen, T., Kaksonen, M., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Peng, H. B. and Rauvala, H. (1998). Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. J. Biol. Chem. 273, 10702-10708 Kinnu 10708
- 10708.
 Kwon, M. J., Jang, B., Yi, J. Y., Han, I. O. and Oh, E. S. (2012). Syndecans play dual roles as cell adhesion receptors and docking receptors. *FEBS Lett*. 586, 2207-2211.
 Lim, S. T., Longley, R. L., Couchman, J. R. and Woods, A. (2003). Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C alpha (PKC alpha) increases focal adhesion localization of PKC alpha. J. Biol. Chem. 278, 13795-13802.
 Martin, L., Blanpain, C., Garnier, P., Wittamer, V., Parmentier, M. and Vita, C. (2001). Structural and functional analysis of the RANTES-glycosaminoglycans interactions. *Biochemistry* 40, 8303-6318.
 Masukawa, K., Sakai, N., Ohmori, S., Shirai, Y. and Saito, N. (2006). Spatiotemporal analysis of the molecular interaction between PICK1 and PKC. *Acta Histochem. Cytochem.* 39, 173-181.

- Morgan, M. R., Hamidi, H., Bass, M. D., Warwood, S., Ballestrem, C. and Humphries, M. J. (2013). Syndecan-4 phosphorylation is a control point for integrin recycling. *Dev. Cell* 24, 472-485.
 Multhaupt, H. A., Yoneda, A., Whiteford, J. R., Oh, E. S., Lee, W. and Couchman, Neurophysical Content of the content o
- J. R. (2009). Syndecan signaling: whe 60 Suppl. 4, 31-38. re and why? J. Physiol. P
- 60 Suppl. 4, 31-38.
 Murakami, M., Horowitz, A., Tang, S., Ware, J. A. and Simons, M. (2002). Protein kinase C (PKC) delta regulates PKCalpha activity in a Syndecan-4-dependent manner. J. Biol. Chem. 277, 20367-20371.
 Nellen, A., Heinrichs, D., Berres, M. L., Sahin, H., Schmitz, P., Proudfoot, A. E., Trautwein, C. and Wasmuth, H. E. (2012). Interference with oligomerization and glycosaminoglycan binding of the chemokine CCL5 improves experimental liver injury. *PLoS ONE* 7, e36614.
 Oh, E. S., Woods, A. and Couchman, J. R. (1997). Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. J. *Biol. Chem.* 272, 8133-8136.
 Oh, E. S., Woods, A., Lim, S. T., Theihert, A. Wardshill, S. M. (2012).
- Oh, E. S., Woods, A., Lim, S. T., Theibert, A. W. and Couchman, J. R. (1998). Syndecan-4 proteoglycan cytoplasmic domain and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate coordinately regulate protein kinase C activity. J. Biol. Chem. 273. 10624-10629
- 10624-10629.
 Okina, E., Grossi, A., Gopal, S., Multhaupt, H. A. and Couchman, J. R. (2012).
 Alpha-actinin interactions with syndecan-4 are integral to fibroblast-matrix adhesion and regulate cytoskeletal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 2161-2174.
 Proudfoot, A. E., Fricheley, S., Borlat, F., Shaw, J. P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P. R. and Wells, T. N. (2001). The BSXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. *J. Biol. Chem.* 276, 10620-10626.
 Rossi, D. and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 217-242.

- selectivity. J. Biol. Chem. 276, 10620-10626.
 Rossi, D. and Zlotnik, A. (2000). The biology of chemokines and their receptors. Annu. Rev. Immunol. 18, 217-242.
 Slimani, H., Charnaux, N., Mbemba, E., Saffar, L., Vassy, R., Vita, C. and Gattegno, L. (2003a). Binding of the CC-chemokine RANTES to syndecan-1 and syndecan-4 expressed on HeLa cells. Glycobiology 13, 623-634.
 Slimani, H., Charnaux, N., Mbemba, E., Saffar, L., Vassy, R., Vita, C. and Gattegno, L. (2003b). Interaction of RANTES with syndecan-1 and syndecan-4 expressed by human primary macrophages. *Biochim. Biophys. Acta* 1617, 80-88.
 Soria, G. and Ben-Baruch, A. (2008). The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. Cancer Lett. 267, 271-285.
 Suffee, N., Richard, B., Hlawaty, H., Oudar, O., Charnaux, N. and Sutton, A. (2011). Angiogenic properties of the chemokine RANTES/CCL5. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1649-1653.
 Suffee, N., Hlawaty, H., Meddahi-Pelle, A., Maillard, L., Louedec, L., Haddad, O., Martin, L., Laguillier, C., Richard, B., Oudar, O. et al. (2012). RANTES/ CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1. CCR5 and glycosaminoglycans. Angiogenesis 15, 727-744.
 Sutton, A., Friand, V., Papy-Garcia, D., Dagouassat, M., Martin, L., Vassy, R., Haddad, O., Sainte-Catherine, O., Kraemer, M., Saffar, L. et al. (2007). Glycosaminoglycans and their synthetic mimetics inhibit RANTES-induced migration and invasion of human hepatoma cells. *Mol Cancer Thre.* 6, 2948-2958.
 Tkachenko, E., Elfenbein, A., Tirziu, D. and Simons, M. (2006). Syndecan-4 clustering induces cell migration in a PDZ-dependent manner. Circ. Res. 98, 1398-1404.

We demonstrated that SDC-4 intracellular domain is involved in RANTES/CCL5induced angiogenesis. Indeed, overexpression of SDC-4 wild type or mutated in serine 179 (S179A, constitutive active mutant) increased RANTES/CCL5-induced angiogenic effects (spreading, migration, vascular sprout formation) through PKC- α activation. By contrast, overexpression of SDC-4 mutated on PIP2 (L188QQ) or PDZ protein (A198del) binding domains decreased RANTES/CCL5-induced angiogenesis. Moreover, RANTES/CCL5-induced PKC- α and Rac1 activation are regulated by SDC-4 intracellular domain.

For now, signaling pathway induced by SDC-4 intracellular domain after RANTES/CCL5 stimulation remains unknown. Deciphering which intracellular signaling pathways mediate RANTES/CCL5-induced angiogenesis after SDC-4 activation will be analyzed in the continuation of this work.

RANTES/CCL5 is involved in leukocyte recruitment through its GAG-binding domain (Baltus et al., 2003). Proteoglycans, such as syndecans, on the luminal part of endothelium are also involved in leukocyte recruitment (Götte, 2003). We showed here that RANTES/CCL5-induced angiogenesis is regulated by SDC-4 intracellular domain. It could be interesting to analyze if RANTES/CCL5-induced leukocyte recruitment is regulated by SDC-4 intracellular domain. We started to answer this question in the second part of this work.

A. Complementary article dataa. EGFP tag in C-terminal do not disturb SDC-4 function

We construct a SDC-4-EGFP fusion protein in C-terminal and three intracellular mutants of this SDC-4-EGFP protein. EGFP is a 27 kDa protein, the utilization of SDC-4-EGFP protein tagged in intracellular C-terminal domain of SDC-4 could disturb signaling induced by intracellular domain of SDC-4. To confirm that EGFP in C-terminal position do not disturb SDC-4 function, we used RANTES/CCL5-induced chemotaxis on HUV-EC-Cs cells transfected with plasmids encoding for SDC-4 without any tag (pCMV6.XL5-SDC4), or for our SDC-4 with EGFP at C-terminus (EGFP-N3-SDC4), or for SDC-4 with a ECFP tag in N-terminal position (ECFP-C1-SDC4), or for SDC-4 with Myc-His tag at C-terminal position (pcDNA-SDC4). There is no difference in the RANTES/CCL5-induced migration between all SDC-4 constructs. Our SDC-4 4-EGFP fusion protein in C-terminal position is functional (Figure 43).



Figure 43 : Functionality of EGFP-SDC-4 construct

HUV-EC-Cs transfected with plasmids encoding for SDC-4 protein (pCMV6.XL5-SDC4, EGFP-N3-SDC4, ECFP-C1-SDC4 or pcDNA-SDC4) or for their control plasmids (pCMV6.XL5, EGFP-N3, ECFP-C1 or pcDNA respectively) were stimulated or not (Untreated) by RANTES/CCL5 (3 nM) and cell migration was assayed by a transwell chamber model. Results are indicated as cell number/field (mean ± SEM). The vertical axis ranges from 300 to 600 cells/field. *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* untreated. #p<0.05, SDC-4 plasmids *versus* respectively control plasmids (in presence of RANTES/CCL5).

b. SDC-4-EGFP mutants are expressed at the cell membrane

We showed previously that the expression level of SDC-4 after transfection by each constructs (SDC4WT, S179A, L188QQ, A198del) is similar by flow cytometry (Article 1, Figure 1B). We also demonstrated that SDC-4 constructs are expressed at the membrane by flow cytometry and western blot (Article 1, Figures 1C and 1D). Even if SDC-4 aggregates into the cells, SDC-4-EGFP mutated constructs are expressed at the cell membrane (Figure 44) as SDC-4-EGFP wild type (Article 1, Figure 1E). The results of confocal microscopy and western blot experiments correlated.



<u>Figure 44</u> : Membrane expression of EGFP-SDC-4 mutated construct HUV-EC-Cs transfected with SDC-4-EGFP mutants (S179A, L188QQ, or A198del) were incubated with anti- β 1 integrin antibodies (red fluorescence) and analyzed under confocal microscopy (X 400). The EGFP (geen) fluorescence indicates that SDC-4 is localized at the cell membrane. The immunostaining of β 1 integrin was used as a specific membrane cell marker.

c. SDC-4-EGFP mutants are sulfated

The sulfatation degrees of the glycosaminoglycan (GAG) chains of the SDC-4 are important for the binding of cytokines, chemokines and growth factors. To be sure that the overexpression of SDC-4 not leads to a SDC-4 protein without GAG or heparan sulfate (HS) chains, we checked the HS chains of transfected cells at the membrane by flow cytometry. We previously showed that SDC4WT overexpression leads to an HS chains overexpression at the cell membrane, resulting by HS chains binding to SDC4WT protein core overexpressed. The results presented in the manuscript only concerned the SDC4WT plasmid (Article 1, Figure 1F). HS chains of S179A, L188QQ or A198del transfected cells are overexpressed *versus* control cells (Figures 45A, 45B and 45C respectively) and there is no difference between SDC4WT and the mutants (Figure 45D). Mutation of the intracellular domain of the SDC-4 did not affect the glycosylation and sulfatation of the proteoglycan.



<u>Figure 45</u>: Membrane expression of HS-chains for EGFP-SDC-4 mutated construct Membrane heparan sulfate (HS) chain expression of EGFP-positive cells was quantified by flow cytometry with specific anti-HS antibodies without cell permeabilization. HUV-EC-Cs were transfected with EGFP plasmid (control), SDC-4 wild-type (SDC4WT) or mutated (S179A, L188QQ, or A198del). The cells were incubated with anti-HS chains antibodies (solids histograms) or isotype control (dotted histograms). Membrane expression of HS chains for S179A (green histograms), L188QQ (blue histograms) or A198del (light blue histograms) transfected cells was compared with control (black histograms) (A, B, C) or with SDC4WT (red histogram) (D) transfected cells.

d. SDC-4-EGFP are glycosylated

The levels of mRNA encoding for EXT-1 and EXT-2, which are involved in the first step of heparan sulfate chain biosynthesis, were unaffected by SDC-4 overexpression, meaning that EXT-1 and EXT-2 are not saturated in SDC-4 overexpressed cells (Figure 46).



<u>Figure 46</u> : EXT-1 and EXT-2 expression for EGFP-SDC-4 overexpressed cells mRNA expression of EXT-1 and EXT-2 were performed by real time PCR for HUV-EC-Cs transfected with EGFP plasmid (control) or SDC4WT-EGFP (SDC4WT).

Another way to check that the overexpression of SDC-4 did not altered the glycosylation of the SDC-4 is to knocking-down SDC-4 with the use of siRNA against SDC-4 and then restoring SDC-4 expression with SDC-4 plasmid in transfected cells. The involvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced cell migration was determined after SDC-4 siRNA knock-down followed by the overexpression of SDC-4 in transfected cells. RANTES/CCL5-induced migration of cells transfected with siRNA-SDC-4 and then SDC-4 plasmid (only exogenous SDC-4) is decreased compared to the control-siRNA and SDC4WT (endogenous and exogenous SDC-4) transfected ones (486 ± 6 versus 572 ± 9 cells/field respectively, p<0.05) (Figure 47). SDC-4 overexpressed-cells (endogenous and exogenous SDC-4) may express more RANTES/CCL5-binding sites than SDC-4 restored-cells (only exogenous SDC-4). We conclude that overexpression of SDC-4 did not prevent the glycosylation of overexpressed SDC-4.



<u>Figure 47</u>: Over or restore SDC-4 expression on transfected HUV-EC-Cs transwell migration HUV-EC-Cs co-transfected with control siRNA (SNC) or siRNA against SDC-4 (siRNA-SDC4) and then with plasmid encoding for SDC-4 protein (SDC4) or it control plasmid (N3-EGFP) were stimulated or not (Untreated) by RANTES/CCL5 (3 nM) and cell migration was assayed by a transwell chamber model. Results are indicated as cell number/field (mean ± SEM). The vertical axis ranges from 300 to 600 cells/field. *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* untreated. #p<0.05, siRNA-SDC4 co tansfected cells *versus* respectively SNC co-transfected cells (in presence of RANTES/CCL5).

e. RANTES/CCL5-induced wound healing migration and transwell invasion are mediated by SDC-4 intracellular domain

We showed that SDC-4 is involved in RANTES/CCL5-induced migration *via* intracellular domain of SDC-4 by transwell chamber assay (Article 1, Figure 2A). To confirm the involvement of the SDC-4 in RANTES/CCL5-induced migration, we also analyzed the effect of SDC-4 wild type or mutated overexpression in a wound healing migration assay and a transwell invasion assay (Figure 48).

For the wound healing assay, a monolayer of transfected HUV-EC-Cs by control EGFP (control), SDC-4-EGFP wild type (SDC4WT) or mutated (S179A, L188QQ or A198del) plasmid was scratched and the wound closure was analyzed by measuring the distance between the both fronts of migration. In the absence of stimulation by the chemokine, SDC4WT, L188QQ and A198del transfected cells migration was unchanged as compared to control transfected ones. By contrast, S179A transfected cell migration was increased by 43 ± 4 % as compared to SDC4WT transfected cell migration. RANTES/CCL5 increased control transfected cell migration. The migration induced by RANTES/CCL5 was higher in SDC4WT transfected cells. RANTES/CCL5 treatment led to a similar cell migration after overexpression of S179A or L188QQ (PIP2-) or A198del (PDZ-) (Figure 48A and Table 1).

For the transwell invasion assay, invasion rate in response to RANTES/CCL5 treatment was measured by modified Boyden chamber experiments. In the absence of stimulation by the chemokine, SDC4WT, L188QQ, A198del transfected endothelial cell invasion was unchanged as compared to control-transfected ones. By contrast, S179A transfected cell invasion was increased by 33 ± 3% as compared to SDC4WT transfected cell invasion. RANTES/CCL5 increased control transfected cell invasion. The chemotactic effect of RANTES/CCL5 was higher in SDC4WT transfected cells. RANTES/CCL5 treatment led to a similar induction of cell invasion after overexpression of S179A or L188QQ (PIP2-) or A198del (PDZ-) (Figure 48B and Table 1).

Wound healing migration and transwell invasion assays confirm the regulation of RANTES/CCL5-induced transwell migration by SDC-4 intracellular domain.



<u>Figure 48</u>: Wound healing migration and transwell invasion of transfected HUV-EC-Cs HUV-EC-Cs transfected with EGFP (control) or with SDC-4-EGFP wild-type (SDC4WT) or mutated (S179A, L188QQ, or A198del) plasmid were stimulated or not (Untreated) by RANTES/CCL5 (3 nM) and cell migration was assayed by a wound healing model (A) and invasion by a transwell chamber model (B). Results are indicated as mm (mean ± SEM) for wound healing assay (A) or as cell number/field (mean ± SEM) for invasion transwell assay (B). The vertical axis ranges from 0.15 to 0.35mm (A) or from 300 to 700 cells/field (B). *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* control. \$p<0.05, S179A *versus* SDC4WT (in the absence of RANTES/CCL5). #p<0.05, SDC4WT *versus* control (in the presence of RANTES/CCL5).

Wound healing migration or transwell invasion assay of transfected HUV-EC-Cs						
Untreated versus RANTES/CCL5						
	Wound healing migration	d healing migration Transwell invasion				
Control	34 ± 3 %	18 ± 4 %				
SDC4WT	48 ± 4 %	45 ± 6 %				
S179A	10 ± 2 %	17 ± 4 %				
L188QQ	14 ± 2 %	16 ± 5 %				
A198del	13 ± 4 %	19 ± 4 %				

<u>Table 1</u>: Wound healing migration and transwell invasion of transfected HUV-EC-Cs HUV-EC-Cs transfected with EGFP (control) or with SDC-4-EGFP wild-type (SDC4WT) or mutated (S179A, L188QQ, or A198del) plasmid were stimulated or not by RANTES/CCL5 (3 nM). Cell migration was assayed by a wound healing model and invasion by a transwell chamber model. Results are indicated as percentage (mean ± SEM).

f. RANTES/CCL5-induced PKC-α membrane translocation is mediated by SDC-4 intracellular domain

We showed previously that SDC-4 is involved in RANTES/CCL5-induced PKC- α translocation to the membrane *via* intracellular domain of SDC-4 by western blotting (Article 1, Figure 5D). We confirmed under confocal microscopy that SDC-4 is necessary for RANTES/CCL5-induced PKC- α translocation to the membrane using co-transfected PKC- α -DsRed2 cells (Article 1, Figures 5B and 5C).

PKC- α is at the membrane without any stimulation and after RANTES/CCL5 treatment in S179A co-tranfected cells (Figure 49A) but for the others two mutants (L188QQ and A198del) RANTES/CCL5 did not induced membrane translocation of PKC- α (Figures 49B and 49C respectively). These results confirm western blotting results for the involvement of SDC-4 intracellular domain for PKC- α activation.



<u>Figure 49</u> : Localization of PKC- α in EGFP-SDC4 mutants co-transfected HUV-EC-Cs HUV-EC-Cs co-transfected with PKC α -DsRed2 plasmid and with SDC-4-EGFP mutants (S179A (A), L188QQ (B), or A198del (C)) were stimulated or not (Untreated) with RANTES/CCL5 (3 nM) for 15 minutes and analyzed under live confocal microscopy. Localization of SDC-4 and PKC- α were monitored with EGFP (green) and DsRed2 (red) respectively. (X 400). White arrows indicate PKC- α membrane localization.

2. Supplementary RANTES/CCL5-angiogenesis data

A. SDC-4-RANTES/CCL5 axis induces intracellular signaling

a. RANTES/CCL5-induced angiogenesis is mediated by intracellular signaling pathways

We previously showed that SDC-4 intracellular domain mediates RANTES/CCL5induced angiogenesis (Article 1). RANTES/CCL5 induces activation of PKC- α and Rac1 through SDC-4 intracellular domain. We showed that inhibition of PKC- α prevent angiogenesis induced by RANTES/CCL5-SDC-4 axis. However, intracellular pathways induced by RANTES/CCL5 after activation of SDC-4 remain unknown (Figure 50).



Figure 50 : SDC-4 mediates RANTES/CCL5-induced angiogenesis

RANTES/CCL5 activates PKC- α through syndecan-4 (SDC-4) intracellular domain. Mutation on the serine 179 in alanine (S179A) leads to a constitutive PKC- α activation. Mutations on PIP2 (Y188KK in L188QQ) or PDZ (A198del) binding domain prevent RANTES/CCL5 activation of PKC- α . SDC-4 overexpression increases RANTES/CCL5-induced angiogenesis *in vitro* (spreading, migration, invasion, vascular tube formation) and mutations of SDC-4 intracellular domain prevent this augmentation. Intracellular signaling pathways after PKC- α activation by RANTES/CCL5-SDC-4 axis remain unknown (Maillard et al., 2014).

Adhesion of cells to the support is also an important step in the angiogenesis process. We analyzed the involvement of SDC-4 in cellular adhesion by transfection of HUV-EC-Cs with control (control), SDC-4 wild type (SDC4WT) or mutated (S179A, L188QQ or A198del) plasmid. Adhesion to both support (plastic and fibronectin) was determined by measuring the phosphatase activity in a colorimetric assay (Figure 51).

First, we analyzed several times of adhesion (2 minutes, 5 minutes, 10 minutes and 15 minutes) for all transfected cells (control, SDC4WT, S179A, L188QQ and A198del) in the presence or absence of RANTES/CCL5. Adhesion on plastic of HUV-EC-Cs transfected with each SDC-4 plasmid is increased in comparison to the control transfected ones for each time (2 minutes, 5 minutes, 10 minutes or 15 minutes) and with or without RANTES/CCL5 stimulation. Moreover, RANTES/CCL5 has no effect in comparison to untreated SDC-4 overexpressed cells (Figure 51A).

RANTES/CCL5 increased cell adhesion on fibronectine after 10 minutes only for SDC4WT transfected cells by 47 \pm 18 % (1,065 \pm 0.16 A.U. for RANTES/CCL5 SDC4WT transfected cell *versus* 0.725 \pm 0.103 A.U. for untreated SDC4WT ones, p<0.05) (Figure 51B).

We decided to analyze only adhesion to fibronectin after 10 minutes for all SDC-4 constructs. Adhesion after 10 minutes on fibronectin, in the absence of RANTES/CCL5 stimulation, for cells transfected with SDC-4 wild type (SDC4WT) or mutated on serine 179 (S179A) is increased in comparison to control transfected ones by 88 ± 34 % (0.725 ± 0.103 A.U. for untreated SDC4WT transfected cell *versus* 0.386 ± 0.019 A.U. for untreated control ones, p<0.05) or by 119 ± 29 % (0.846 ± 0.108 A.U. for untreated S179A transfected cell *versus* 0.386 ± 0.019 A.U. for untreated control ones, p<0.05) and cell adhesion is similar between each SDC-4 construct (SDC4WT, S179A, L188QQ, A198del). In the presence of RANTES/CCL5, adhesion of SDC4WT transfected cells is increased by 190 ± 36 % *versus* 0.367 ± 0.023 A.U. for RANTES/CCL5 control ones, p<0.05). Adhesion of S179A transfected cells is similar with SDC4WT transfected ones in the presence of RANTES/CCL5 but is decreased by 48 ± 13 % and 16 ± 7 % for L188QQ or A198del transfected ones (1.065 ± 0.106 A.U. for RANTES/CCL5 SDC4WT transfected ones (1.065 ± 0.16 A.U. for RANTES/CCL5 but is decreased by 48 ± 13 % and 16 ± 7 % for L188QQ or A198del transfected ones (1.065 ± 0.104 A.U. for RANTES/CCL5 L188QQ or A198del ones, p<0.05) (Figure 51C).

We concluded that SDC-4 is indispensable for RANTES/CCL5-induced cell adhesion on fibronectin *via* intracellular signaling.





(A, B) HUV-EC-Cs transfected with EGFP plasmid (control, black lines) or with SDC4WT-EGFP (SDC4WT, purple lines) or with SDC-4 constructs (S179A, red lines, L188QQ, green lines, or A198del, blue lines) were stimulated (solids lines) or not (Untreated, dotted lines) by RANTES/CCL5 (3 nM). Adhesion on plastic (A) or fibronectin (B) was analyzed by phosphatase activity colorimetric assay after 2 minutes (2min), 5 minutes (5min), 10 minutes (10min) and 15 minutes (15min). Results are indicated as arbitrary unit (A.U., mean \pm SEM). The vertical axis ranges from 0.1 to 0.7 (A) or from 0.2 to 1.2 A.U. (B). *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* control.

(C) HUV-EC-Cs transfected with EGFP plasmid (control) or with SDC4WT-EGFP (SDC4WT) or with SDC-4 constructs (S179A, L188QQ, or A198del) were stimulated or not (Untreated) by RANTES/CCL5 (3 nM). Adhesion on fibronectin was analyzed by phosphatase activity colorimetric assay after 10 minutes. Results are indicated as arbitrary unit (A.U., mean ± SEM). The vertical axis ranges from 0.2 to 1.2 A.U. *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* control. \$p<0.05, *versus* control (in the absence of RANTES/CCL5). #p<0.05, *versus* SDC4WT (in the presence of RANTES/CCL5).

We previously showed that RANTES/CCL5-induced activation of PKC- α and Rac1 are mediated by SDC-4 intracellular domain. (Article 1, Figure 5). It is interesting to analyze which intracellular signaling pathway is involved in SDC-4 mediated RANTES/CCL5 biologicals effects. In this way, we used several pharmacological inhibitors. Before using these inhibitors, we needed to determine the toxicity of each inhibitor in our transfected cells by a dose-dependence viability colorimetric assay (Figure 52).

Cells transfected with SDC-4 wild-type plasmid were incubated or not (Untreated) with Gö6976 (PKC- α), Rottlerin (PKC- δ), Cantharidic acid (PP1/2A), Y27632 (Rho Kinase), SP600125 (JNK/SAPK), PD98059 (MAPK), LY294002 (PI3K), NSC (Rac1), ML141 (Cdc42) or C3 exoenzyme (RhoA/RhoG) at three concentrations (1 μ M, 10 μ M and 100 μ M, or 10 ng/mL, 100 ng/mL and 1000 μ g/mL for C3 exoenzyme). The concentration of inhibitor is toxic if the viability is statistical decreased *versus* cells without inhibitor (Figure 52).



Figure 52 : Inhibitors toxicity in transfected cells

HUV-EC-Cs transfected with SDC4WT-EGFP plasmid were incubated or not (Without inhibitor) with pharmacological inhibitors (Gö6976, Rottlerin, Cantharidic acid, Y27632, SP600125, PD98059, LY294002, NSC, ML141 or C3 exoenzyme) at 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M (or 10 ng/ml, 100 ng/ml and 1000 ng/ml for C3 exoenzyme). Viability was assayed by colorimetric assay after 24 hours. Results are indicated as percentage of untreated cells (mean ± SEM). *p<0.05, with inhibitor *versus* without inhibitor.

The concentration used were the highest non-toxic concentration which are 1 μ M for Gö6976, Rottlerin, Cantharidic acid, Y27632, SP600125, PD98059, LY294002 and NSC, 10 μ M for ML141 and 10 ng/ml for C3 exoenzyme.

Signaling pathways involved in adhesion of HUV-EC-Cs transfected with SDC-4 plasmid was determined using pharmacological inhibitors. Transfected cells were preincubated or not (Without inhibitor) with Gö6976, Rottlerin or C3 exoenzyme. RANTES/CCL5 increased cell adhesion after 10 minutes on fibronectin only for SDC-4 wild-type transfected ones without any inhibitor by 47 ± 2 %. In the absence of RANTES/CCL5 stimulation, adhesion for transfected cells pretreated with PKC- δ inhibitor (Rottlerin) is decreased by 28 ± 8 % versus transfected cells without inhibitor pretreated ones. In the presence of RANTES/CCL5, adhesion of SDC4WT transfected cells pretreated with PKC- α (Gö6976), PKC- δ (Rottlerin) and RhoA/RhoG (C3 exoenzyme) inhibitor is decreased in comparison with SDC4WT transfected cells without inhibitor is decreased in comparison with SDC4WT transfected cells without inhibitor is decreased in comparison with SDC4WT transfected cells without inhibitor is decreased in comparison with SDC4WT transfected cells without inhibitor is decreased in comparison with SDC4WT transfected cells without inhibitor is decreased in comparison with SDC4WT transfected cells without inhibitor [Figure 53 and Table 2].



<u>Figure 53</u> : Signaling pathway invoved in adhesion of SDC-4 transfected cells HUV-EC-Cs transfected with SDC4WT-EGFP plasmid were stimulated (grey histograms) or not (Untreated, black histrograms) by RANTES/CCL5 (3 nM) and pretreated or not (Without inhibitor) by PKC-α (Gö6976), PKC-δ (Rottlerin) and RhoA/RhoG (C3 exoenzyme) inhibitor. Adhesion on fibronectin was analyzed by phosphatase activity colorimetric assay after 10 minutes. Results are indicated as arbitrary unit (A.U., mean ± SEM). The vertical axis ranges from 0.2 to 1.2 A.U. *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* untreated. \$p<0.05, *versus* without inhibitor (in the absence of RANTES/CCL5). #p<0.05, *versus* without inhibitor (in the presence of RANTES/CCL5). In conclusion, PKC- δ mediates adhesion induced by SDC-4 and PKC- α , PKC- δ , RhoA and RhoG are involved in the adhesion induced by SDC-4-RANTES/CCL5 axis.

Adhesion assay of SDC4WT-EGFP transfected HUV-EC-Cs					
With inhibitor versus without inhibitor in presence of RANTES/CCL5					
	SDC4WT				
Gö6976 (PKC-α)	- 38 ± 2 %				
Rottlerin (PKC-δ)	- 52 ± 3 %				
C3 exoenzyme (RhoA/RhoG)	- 37 ± 5 %				

<u>Table 2</u> : Signaling pathway involved in adhesion of SDC-4 transfected cells HUV-EC-Cs transfected with SDC-4-EGFP wild-type (SDC4WT) plasmid were stimulated by RANTES/CCL5 (3 nM) and pretreated or not by PKC- α (Gö6976), PKC- δ (Rottlerin) and RhoA/RhoG (C3 exoenzyme) inhibitor. Adhesion on fibronectin was analyzed by phosphatase activity colorimetric assay after 10 minutes. Results are indicated as percentage (mean ± SEM).

Previously, we showed that SDC-4 mediated RANTES/CCL5-induced migration *via* PKC- α activation by using specific pharmacological inhibitor (Gö6976) and dominant negative PKC- α co-transfection (Article 1, Figure 4B). To analyze other intracellular signaling pathway involved in SDC-4 mediated RANTES/CCL5-induced migration, we used several pharmacological inhibitors. Transfected cells with EGFP (Control) or SDC-4 wild type (SDC4WT) plasmid were preincubated or not (Without inhibitor) with Rottlerin, Cantharidic acid, Y27632, SP600125, PD98059, NSC, ML141 or C3 exoenzyme and stimulated or not (Untreated, black and white histograms) with RANTES/CCL5 (grey and purple histograms) (Figure 54).



<u>Figure 54</u> : Signaling pathway involved in migration of transfected cells HUV-EC-Cs transfected with EGFP (control) or SDC-4-EGFP control (SDC4WT) plasmid were stimulated (grey or purple histograms) or not (black or white histograms) by RANTES/CCL5 (3 nM) and pretreated or not (Without inhibitor) by Rottlerin, Cantharidic acid, Y27632, SP600125, PD98059, NSC, ML141 or C3 exoenzyme inhibitor. Cell migration was assayed by a transwell chamber model. Results are indicated as cell number/field (mean ± SEM). The vertical axis ranges from 300 to 700 cells/field. *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* control. \$p<0.05, *versus* without inhibitor (in the absence of RANTES/CCL5). #p<0.05, *versus* without inhibitor (in the presence of RANTES/CCL5).

RANTES/CCL5 increased cell transwell migration for control or SDC4WT transfected cells without any inhibitor. Inhibition of PP1/2A (Cantharidic acid), Rac1 (NSC) or Cdc42 (ML141) decrease the effect of RANTES/CCL5 on migration for control transfected cells while inhibition of PKC- δ (Rottlerin), Rho Kinase (Y27632), JNK/SAPK (SP600125), MAPK (PD98059) or RhoA/RhoG (C3 exoenzyme) abolished RANTES/CCL5-induced control transfected cells migration. Inhibition of PKC- δ , Rho Kinase, MAPK, Rac1, Cdc42 or RhoA/RhoG decrease the effect of RANTES/CCL5 on migration for SDC4WT transfected cells while inhibition of PP1/2A or JNK/SAPK abolished RANTES/CCL5-induced SDC4WT transfected cells migration (Figure 54 and Table 3).

In the absence of RANTES/CCL5 stimulation, inhibition of PKC- δ increases by 22 ± 1 % (493 ± 7 cells/field for Rottlerin *versus* 403 ± 4 cells/field for without inhibitor, p<0.05) or 24 ± 4 % (512 ± 20 cells/field for Rottlerin *versus* 412 ± 10 cells/field for without inhibitor, p<0.05) the migration of cells transfected by control or SDC4WT plasmid in comparison to cells without inhibitor while there are no difference for all others inhibitors (Figure 54).

In the presence of RANTES/CCL5, inhibition of PKC- δ , PP1/2A, JNK/SAPK or Rac1 decrease the migration of cells transfected by SDC4WT but have no effect for control transfected ones. Inhibition of Rho Kinase, MAPK, Cdc42 or RhoA/RhoG decrease the migration for cells transfected by control or SDC4WT plasmid (Figure 54 and Table 3).

In conclusion, PKC- δ mediates migration induced by SDC-4 with and without RANTES/CCL5 stimulation while PP1/2A, Rho Kinase, JNK/SAPK, MAPK, Rac1, Cdc42 and RhoA/RhoG are involved in the migration induced by SDC-4-RANTES/CCL5 axis. Moreover, PP1/2A and JNK/SAPK are essential for the migration induced by SDC-4-RANTES/CCL5 axis.

Transwell migration assay of SDC4WT-EGFP transfected HUV-EC-Cs							
	Untreated versus		With inhibitor versus without				
	RANTES/CCL5		inhibitor in presence of RANTES/CCL5				
	Control	SDC4WT	Control	SDC4WT			
Without inhibitor	19 ± 2 %	55 ± 7 %					
Rottlerin (PKC-δ)	NS	13 ± 3 %	NS	- 9 ± 5 %			
Cantharidic acid (PP1/2A)	12 ± 1 %	NS	NS	- 34 ± 5 %			
Y27632 (Rho Kinase)	NS	12 ± 3 %	- 12 ± 2 %	- 30 ± 5 %			
SP6300125 (JNK/SAPK)	NS	NS	NS	- 32 ± 5 %			
PD98059 (MAPK)	NS	9 ± 2 %	- 11 ± 3 %	- 32 ± 5 %			
NSC (Rac1)	11 ± 2 %	15 ± 2 %	NS	- 26 ± 5 %			
ML141 (Cdc42)	10 ± 2 %	17 ± 1 %	- 8 ± 2 %	- 25 ± 4 %			
C3 exoenzyme (RhoA/RhoG)	NS	10 ± 3 %	- 14 ± 2 %	- 29 ± 5 %			

Table 3 : Signaling pathway involved in migration of transfected cells

HUV-EC-Cs transfected with EGFP (control) or SDC-4-EGFP control (SDC4WT) plasmid were stimulated or not (Untreated) by RANTES/CCL5 (3 nM) and pretreated or not (Without inhibitor) by Rottlerin, Cantharidic acid, Y27632, SP600125, PD98059, NSC, ML141 or C3 exoenzyme inhibitor. Cell migration was assayed by a transwell chamber model. Results are indicated as percentage (mean ± SEM) or are not statistical different (NS).

Previously, we showed that SDC-4 mediated RANTES/CCL5-induced 2D vascular tube formation *via* PKC- α activation by using specific pharmacological inhibitor (Gö6976) (Article 1, Figure 4C). To analyze other intracellular signaling pathway involved in SDC-4 mediated

RANTES/CCL5-induced vascular tube formation, we used several pharmacological inhibitors. Transfected cells with EGFP (Control) or SDC-4 wild type (SDC4WT) plasmid were preincubated or not (Without inhibitor) with Rottlerin, Cantharidic acid, NSC or ML141 and stimulated or not (Untreated, black and white histograms) with RANTES/CCL5 (grey and purple histograms) (Figure 55).



<u>Figure 55</u> : Signaling pathway involved in vascular tube formation of transfected cells HUV-EC-Cs transfected with EGFP (control) or SDC-4-EGFP wild-type (SDC4WT) plasmid were stimulated (grey or purple histograms) or not (black or white histograms) by RANTES/CCL5 (3 nM) and pretreated or not (Without inhibitor) by Rottlerin, Cantharidic acid, NSC or ML141 inhibitor. Vascular tube formation in Matrigel was assayed in an *in vitro* angiogenesis model. Results are indicated as length of vascular sprout (mean ± SEM) expressed in arbitrary unit (A.U.). The vertical axis ranges from 0.5 to 1.1 A.U. *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* control. \$p<0.05, *versus* without inhibitor (in the absence of RANTES/CCL5). #p<0.05, *versus* without inhibitor (in the presence of RANTES/CCL5).

RANTES/CCL5 increased cell vascular sprout length for control or SDC4WT transfected cells without any inhibitor. Inhibition of, PKC- δ (Rottlerin), PP1/2A (Cantharidic acid), Rac1 (NSC) or Cdc42 (ML141) decrease the effect of RANTES/CCL5 on vascular sprout length for control or SDC4WT transfected cells (Figure 55 and Table 4).
In the absence of RANTES/CCL5 stimulation, inhibition of Rac1 or Cdc42 decrease the vascular sprout length of control transfected cells while there are no difference for PKC- δ and PP1/2A inhibition. By contrast, inhibition of PKC- δ or PP1/2A increase the vascular sprout length for SDC4WT transfected cells and is similar for Rac1 and Cdc42 inhibition (Figure 55 and Table 4).

In the presence of RANTES/CCL5, inhibition of PKC- δ , PP1/2A, Rac1 or Cdc42 decrease the vascular sprout length of cells transfected by SDC4WT plasmid. Interestingly, only Rac1 or Cdc42 inhibition decrease the vascular sprout length for control transfected cells (Figure 55 and Table 4).

In conclusion, PKC- δ and PP1/2A mediate vascular sprout length induced by SDC-4 with and without RANTES/CCL5 stimulation while Rac1 and Cdc42 are involved in the vascular sprout length induced by SDC-4-RANTES/CCL5 axis.

Vascular tube formation assay of SDC4WT-EGFP transfected HUV-EC-Cs						
	Untreated <i>versus</i> RANTES/CCL5		With inhibitor versus without inhibitor			
			Without		With RANTES/CCL5	
			RANTES/CCL5			
	Control	SDC4WT	Control	SDC4WT	Control	SDC4WT
Without inhibitor	16 ± 2 %	58 ± 3 %				
Rottlerin (PKC-δ)	8±1%	16 ± 1 %	NS	11 ± 2 %	NS	- 18 ± 1 %
Cantharidic acid (PP1/2A)	8 ± 3 %	9 ± 3 %	NS	12 ± 2 %	NS	- 23 ± 2 %
NSC (Rac1)	10 ± 1 %	15 ± 2 %	- 4 ± 2 %	NS	- 9 ± 2 %	- 30 ± 2 %
ML141 (Cdc42)	13 ± 1 %	26 ± 2 %	- 5 ± 2 %	NS	-8±1%	- 22 ± 2 %

<u>Table 4</u> : Signaling pathway involved in vascular tube formation of transfected cells HUV-EC-Cs transfected with EGFP (control) or SDC-4-EGFP wild-type (SDC4WT) plasmid were stimulated or not (Untreated) by RANTES/CCL5 (3 nM) and pretreated or not (Without inhibitor) by Rottlerin, Cantharidic acid, NSC or ML141 inhibitor. Vascular tube formation in Matrigel was assayed in an *in vitro* angiogenesis model. Results are indicated as percentage (mean ± SEM) or are not statistical different (NS).

b. SDC-4 is necessary for RANTES/CCL5-induced PKC- α and PKC- δ activation

We showed previously that SDC-4 is involved in RANTES/CCL5-induced PKC- α translocation to the membrane *via* intracellular domain of SDC-4 by western blotting (Article

1, Figure 5D). We confirmed under live confocal microscopy that SDC-4 is necessary for RANTES/CCL5-induced PKC- α translocation to the membrane (Article 1, Figures 5B and 5C) *via* intracellular domain of SDC-4 (Figure 49).

It was previously published that SDC-4 can activate PKC- α without calcium (Horowitz and Simons, 1998; Horowitz et al., 2002; Murakami et al., 2002). To determine if RANTES/CCL5 induced PKC- α membrane translocation without calcium, we analyzed under live confocal microscopy the cellular localization of PKC- α in EGTA or Bapta-AM (two calcium chelators) buffer in co-transfected PKC- α -DsRed2 cells (Figure 56).

PKC- α is not at the membrane without or with RANTES/CCL5 stimulation for EGFP cotransfected cells (control) in EGTA or Bapta-AM buffer (Figures 56A and 56C respectively). Interestingly, for SDC-4 co-tranfected cells (SDC4WT), PKC- α is localized at the membrane and seems disappeared from the membrane after RANTES/CCL5 treatment in EGTA or Bapta-AM buffer (Figures 56B and 56D respectively). These and previous (Article 1, Figures 5C and 5D) results suggest that calcium prevents PKC- α membrane localization in SDC-4 overexpressing cells without stimulation while RANTES/CCL5 treatment requires calcium to maintain PKC- α membrane localization. However, these results need to be confirmed by western blotting analysis.



<u>Figure 56</u> : Influence of calcium on RANTES/CCL5-induced PKC- α membrane translocation HUV-EC-Cs co-transfected with PKC α -DsRed2 plasmid and with EGFP (control, A, C) or SDC-4-EGFP (SDC4WT, B, D) plasmid were incubated with EGTA (0.1 μ M, A, B) or Bapta-AM (10 μ M, C, D) buffer and then stimulated or not (Untreated) with RANTES/CCL5 (3 nM) for 15 minutes. Localization of SDC-4 and PKC- α were analyzed under live confocal microscopy with EGFP (green) and DsRed2 (red) respectively. (X 400). White arrows indicate PKC- α membrane localization. RANTES/CCL5 can bind to HUV-EC-Cs through its co-receptor SDC-4 but also through its G-protein coupled receptor (GPCR) CCR1 and CCR5. To determine if PKC- α membrane translocation induced by RANTES/CCL5 is dependent only to SDC-4 or to a complex GPCR-SDC-4, we analyzed under live confocal microscopy the PKC- α localization in co-tranfected cells with EGFP (control) or SDC-4-EGFP (SDC4WT) and with PKC- α -DsRed2 and with control siRNA (SNC) or siRNA against CCR1 (siRNA-CCR1) or siRNA against CCR5 (siRNA-CCR5) or siRNA against both (siRNA-CCR1/5) (Figure 57).

PKC- α is not translocated at the membrane for EGFP co-transfected cells (control) after RANTES/CCL5 whatever the siRNA used (Figures 57A, 57B, 57C and 57D). RANTES/CCL5 induced the translocation of PKC- α at the membrane for SDC-4 overexpressed cells co-transfected with control siRNA (Figure 57E) while RANTES/CCL5 did not induced membrane PKC- α translocation for SDC4WT cells co-transfected with siRNA against CCR1, CCR5 or both (Figures 57F, 57G and 57H respectively). These results suggest that the classical RANTES/CCL5 GPCR (CCR1 and CCR5) are necessary for RANTES/CCL5-induced PKC- α membrane translocation in SDC-4 overexpressing cells. However, these results need to be confirmed by western blotting analysis.



<u>Figure 57</u>: Influence of CCR1 and CCR5 on RANTES/CCL5-induced PKC- α membrane translocation HUV-EC-Cs co-transfected with PKC α -DsRed2 plasmid, with EGFP (control, A, B, C, D) or SDC-4-EGFP (SDC4WT, E, F, G, H) plasmid and with control siRNA (SNC, A, E) or siRNA against CCR1 (siRNA-CCR1, B, F) or siRNA against CCR5 (siRNA-CCR5, C, G) or siRNA against both (siRNA-CCR1/5, D, H) were stimulated or not (untreated) with RANTES/CCL5 (3 nM) for 15 minutes. Localization of SDC-4 and PKC- α were analyzed under live confocal microscopy with EGFP (green) and DsRed2 (red) respectively. (X 400). White arrows indicate PKC- α membrane localization.

The dephosphorylation of serine 179 in the intracellular domain of SDC-4 induced the activation of PKC- α and leads to the migration of the cells. It have been published that PKC- δ phosphorylates the serine 179 which inactivates SDC-4 and PKC- α and leads to the adhesion of the cells (Bass and Humphries, 2002; Murakami et al., 2002) (Figure 58).



Figure 58 : PKC-α and PKC-δ system in SDC-4 activation

After binding of FGF-2 (FGF) to the syndecan-4-FGF receptor complex, the syndecan-4 is dephosphorylated on the serine 179 by Ser/Thr phosphatase which leads to the binding of PIP2 and the activation of PKC- α . The phosphorylation of the serine 179 by PKC- δ , disassociates the PIP2 and the PKC- α leading to its inactivation (Bass and Humphries, 2002).

As for PKC- α , the translocation of PKC- δ is necessary for its activation (Collazos et al., 2006). To determine if RANTES/CCL5 could activate PKC- δ in a SDC-4 manner, we co-transfected HUV-EC-Cs with PKC- δ -mCherry plasmid and with EGFP (control), SDC-4-EGFP wild type (SDC4WT) or mutated (S179A, L188QQ, A198del) plasmid and we analyzed under live confocal microscopy the PKC- δ localization (Figure 59).

RANTES/CCL5 did not induce PKC- δ translocation at the membrane for EGFP cotransfected cells (control) while for SDC-4 co-transfected ones (SDC4WT), RANTES/CCL5 induced PKC- δ translocation (Figures 59A and 59B respectively). PKC- δ is localized at the membrane without any stimulation and remained at the membrane after RANTES/CCL5 stimulation for S179A co-transfected cells (Figure 59C) while RANTES/CCL5 did not induced membrane PKC- δ translocation for cells co-transfected with L188QQ or A198del plasmid (Figures 59D and 59E respectively). These results suggest that RANTES/CCL5 induced PKC- δ membrane translocation *via* SDC-4 intracellular domain. However, these results need to be confirmed by western blotting analysis.



<u>Figure 59</u> : Localization of PKC- δ in EGFP-SDC4 co-transfected cells

HUV-EC-Cs co-transfected with PKC δ -mCherry plasmid and with either EGFP (control (A)), SDC-4-EGFP wild-type (SDC4WT (B)) or mutants (S179A (C), L188QQ (D), or A198del (E)) plasmid were stimulated or not (untreated) with RANTES/CCL5 (3 nM) for 30 minutes and analyzed under live confocal microscopy. Localization of SDC-4 and PKC- δ were monitored with EGFP (green) and mCherry (red) respectively. (X 400). White arrows indicate PKC- δ membrane localization. PKC- δ can regulate the activation of PKC- α via phosphorylation of SDC-4 at the serine 179 (Murakami et al., 2002). To analyze the balance between PKC- α and PKC- δ activation, we inhibited PKC- α or PKC- δ using specific pharmacological inhibitor (Gö6976 or Rottlerin respectively) and monitored the cellular localization of PKC- δ in cells transfected by PKC- δ -mCherry or the localization of PKC- α in cells transfected by PKC- α -DsRed2 respectively. Cells were co-transfected with EGFP (control) or SDC-4-EGFP (SDC4WT) (Figure 60).

In the presence of PKC- α inhibitor, RANTES/CCL5 did not induce PKC- δ translocation at the membrane for EGFP co-transfected cells (control) while for SDC-4 co-transfected ones (SDC4WT), PKC- δ is localized at the membrane and RANTES/CCL5 stimulation maintains this membrane localization (Figures 60A and 60B respectively). In the presence of PKC- δ inhibitor, RANTES/CCL5 did not induce PKC- α translocation at the membrane for EGFP cotransfected cells (control) while for SDC-4 co-transfected ones (SDC4WT), RANTES/CCL5 induced PKC- α translocation (Figures 60C and 60D respectively). These results suggest that PKC- α regulates negatively SDC-4 induced PKC- δ membrane translocation while PKC- δ seems have no inhibitory effect on PKC- α membrane translocation by SDC-4-RANTES/CCL5 axis. However, these results need to be confirmed by western blotting analysis.



<u>Figure 60</u> : Balance between PKC-α and PKC-δ in EGFP-SDC4 co-transfected cells HUV-EC-Cs co-transfected with PKCδ-mCherry (A, B) or PKCα-DsRed2 (C, D) plasmid and with EGFP (control (A, C)) or SDC-4-EGFP wild-type (SDC4WT (B, D)) were incubated with PKC-α (A, B) or PKC-δ (C, D) inhibitor. Co-transfected cells were stimulated or not (untreated) with RANTES/CCL5 (3 nM) for 30 minutes (A, B) or 15 minutes (C, D) and analyzed under live confocal microscopy. Localization of SDC-4 was monitored with EGFP (green) and PKC-δ or PKC-α with mCherry or DsRed2 respectively (red). (X 400). White arrows indicate PKC-δ (B) or PKC-α (D) membrane localization. We showed here the involvement of SDC-4 intracellular domain in the RANTES/CCL5induced angiogenesis (Article 1). Moreover, the inhibition of intracellular signaling proteins such as PKC- α , PKC- δ , Rac1 or Cdc42 leads to a decrease adhesion (Figure 53), migration (Figure 54) or vascular sprout formation (Figure 55) induced by SDC-4-RANTES/CCL5 axis.

RANTES/CCL5 activates PKC- α through SDC-4 intracellular domain (Article 1 and Figure 59). This activation is regulated by classical GPCR CCR1 and CCR5 (Figure 57) and seems calcium independent (Figure 56). Additionally, SDC-4 intracellular domain also regulates RANTES/CCL5-induced PKC- δ activation (Figure 59) and Rac1 activation (Article 1, Figure 5).

These results were obtained in teamwork with Hanna Hlawaty, Véronique Friand, Nadine Suffee, Fanny Chmilewsky, Oualid Haddad, Christelle Laguillier, Erwan Guyot, Olivier Oudar, Angela Sutton and Nathalie Charnaux. Naoaki Saito and Takehiko Ueyama from Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan collaborated to this work.

These data resulted in an **oral communication** at the 4th Glucidoc meeting (Landéda, France, 08-10/04/2013).

L. Maillard, N. Suffee, N. Saito, V. Friand, L. Martin, H. Hlawaty, O. Haddad, F. Chmilewsky, O. Oudar, N. Charnaux, A. Sutton. *L'activation de la PKCα médiée par le domaine intracellulaire du syndécane-4 régule la migration de cellules endothéliales induite par RANTES/CCL5.*

These data resulted also in a **poster communication** at the 81st European Atherosclerosis Society congress (Lyon, France, 02-05/06/2013). L. Maillard, V. Friand, N. Suffee, H. Hlawaty, O. Haddad, F. Chmilewsky, O. Oudar, N. Saito, L.

Martin, D. Letourneur, N. Charnaux, A. Sutton. *Syndecan-4 intracellular domain orchestrates RANTES/CCL5-induced endothelial cell migration by modulation of PKC activation.*

B. RANTES/CCL5 GAG-binding sequence is necessary for its biological effects

a. RANTES/CCL5-induced angiogenesis is mediated by RANTES/CCL5 GAG-binding sequence

We previously showed that SDC-4 mediates RANTES/CCL5-induced biological effects *via* intracellular signaling pathway dependent of intracellular domain of SDC-4. SDC-4 interacts with cytokines, chemokines and growth factors *via* glycosaminoglycans (GAG) chains bind to its extracellular protein core. SDC-4 binds three GAG chains of heparan sulfate (HS) type negatively charged (Gandhi and Mancera, 2008).

To determine if SDC-4 mediates RANTES/CCL5-induced biological effects through GAG chains, we used two RANTES/CCL5 GAG-binding mutants deficient in the GAG-binding sequence of RANTES/CCL5 (⁴⁴RKNR⁴⁷) (Proudfoot et al., 2001). For the R47E-RANTES/CCL5, arginine 47 is mutated in glutamic acid, resulting in a destabilization of the interaction between HS chains and the mutant. For the mutant 3Ala-RANTES/CCL5, arginines 44 and 47 and lysine 45 are mutated in alanines, resulting in an abolition of electrostatic interaction between HS chains and the mutant. These two RANTES/CCL5 mutants were previously confirmed and characterized as GAG-binding deficient mutants (Baltus et al., 2003; Charni et al., 2009).

In addition, we used a mix of enzymes which cleave GAG chains, heparitinase I and heparitinase III cleave HS chains and chondroitinases ABC cleave chondroitin sulfate chains (CS), resulting in SDC-4 without GAG chains.

First, we analyzed the importance of GAG chains in RANTES/CCL5-induced adhesion on fibronectin for cells transfected with SDC-4 wild-type plasmid (SDC4WT) as previously described. RANTES/CCL5 increased adhesion by 94 \pm 11 % (1.036 \pm 0.06 A.U. for RANTES/CCL5 versus 0.518 \pm 0.03 A.U. for untreated, p<0.05) while adhesion induced by both GAG-deficient RANTES/CCL5 mutants is similar to untreated cells. R47E-RANTES/CCL5 and 3Ala-RANTES/CCL5 abolished the RANTES/CCL5-induced cellular adhesion in SDC-4 overexpressed cells (Figure 61).

We concluded that binding of RANTES/CCL5 to HS chains of SDC-4 is indispensable for its effect on cell adhesion on fibronectin.



<u>Figure 61</u>: Heparan sulfate chains in adhesion of SDC-4 transfected cells HUV-EC-Cs transfected with SDC4WT-EGFP plasmid were stimulated or not (Untreated) by RANTES/CCL5 wild-type (3 nM), R47E-RANTES/CCL5 (3 nM) or 3Ala-RANTES/CCL5 (3 nM). Adhesion on fibronectin was analyzed by phosphatase activity colorimetric assay after 10 minutes. Results are indicated as arbitrary unit (A.U., mean ± SEM). The vertical axis ranges from 0.2 to 1.2 A.U. *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* untreated. #p<0.05, GAG-deficient RANTES/CCL5 mutant *versus* RANTES/CCL5.

We analyzed the importance of GAG chains in RANTES/CCL5-induced migration for cells transfected with EGFP (control) or SDC-4 wild-type (SDC4WT) plasmid by transwell migration assay. RANTES/CCL5 (grey histograms) increased migration by $17 \pm 3 \%$ (484 ± 13 cells/field for RANTES/CCL5 versus 415 ± 10 cells/field for untreated, p<0.05) and $32 \pm 3 \%$ (551 ± 15 cells/field for RANTES/CCL5 versus 418 ± 7 cells/field for untreated, p<0.05) for cells transfected with EGFP (control) or SDC-4-EGFP (SDC4WT) plasmid while migration induced by both GAG-deficient RANTES/CCL5 mutants is similar to untreated cells (black histograms) whatever the plasmid. R47E-RANTES/CCL5 (white histograms) and 3Ala-RANTES/CCL5 (purple histograms) abolished the RANTES/CCL5-induced migration for both transfected cells (Figure 62).

Migration of cells pretreated with enzymes (heparitinase I, heparitinase III and chondroitinases ABC) in the absence of RANTES/CCL5 (blue histograms) is similar to the untreated (black histograms) cells for both transfected cells and RANTES/CCL5 has no more effects on migration for cells pretreated with enzymes (orange histograms) in comparison to pretreated cells without RANTES/CCL5 (blue histograms) for both transfected cells (Figure 62).

We concluded that binding of RANTES/CCL5 to HS chains is indispensable for its effect on cell migration mediated by SDC-4.



<u>Figure 62</u>: Heparan sulfate chains in migration of transfected cells HUV-EC-Cs transfected with EGFP (control) or SDC4WT-EGFP (SDC4WT) plasmid were stimulated or not (black histograms) by RANTES/CCL5 wild-type (3 nM, grey and orange histograms), R47E-RANTES/CCL5 (3 nM, white histograms) or 3Ala-RANTES/CCL5 (3 nM, purple histograms) and were pretreated (blue and orange histograms) or not with a mix of enzymes (heparitinase I (20 mU/mI), heparitinase III (10 mU/mI), chondroitinases ABC (33 mU/mI)). Cell migration was assayed by a transwell chamber model. Results are indicated as cell number/field (mean ± SEM). The vertical axis ranges from 300 to 600 cells/field. *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* untreated. #p<0.05, *versus* RANTES/CCL5.

Cell migration involves formation of a leading edge in the direction of migration and adhesion points from which tension is generated to move the cell body forward. Promigratory factors induce detachment of the back of the cell (trailing edge) and attachment of the front of the cell (leading edge) by modulation of actin cytoskeleton (polymerization/depolymerization, focal contact formation) and intracellular signaling (RhoA, PKC- α , RhoG, Rac1, Cdc42). Modification of cell area is associated with migration process (Figure 63).



Figure 63 : Cell morphology during cell migration

Cell morphology could be characterized in trailing and leading edge ("back" and "front" of the cell). In presence of pro-migratory factors (VEGF, FGF), cell migrates in the direction of the factors gradient (A). Area of the cell decreases in the trailing edge by detachment from the support and retraction of cell body (actin depolymerization, RhoA activation) (B). Cell area increases in the leading edge by formation of protrusion (fillopodia, lamellipodia) and intracellular signaling (actin polymerization, PKC α , RhoG, Rac1, Cdc42) (C) (Schwab et al., 2012).

We previously showed that RANTES/CCL5 is involved in change of cell morphology by the reduction of cell area which is associated with activation of the migration (Article 1, Figure 2B).

We analyzed the importance of GAG chains in the modification of morphology induced by RANTES/CCL5 treatment for cells transfected with SDC-4 wild-type plasmid (SDC4WT) under live confocal microscopy (Figure 64).



<u>Figure 64</u>: Heparan sulfate chains in EGFP-SDC-4 transfected cells morphology HUV-EC-Cs transfected with SDC4WT-EGFP plasmid were stimulated by RANTES/CCL5 wild-type (3nM, A, D), R47E-RANTES/CCL5 (3 nM, B) or 3Ala-RANTES/CCL5 (3 nM, C) for 15 minutes and were pretreated (D) or not (A, B, C) with a mix of enzymes (heparitinase I (20 mU/ml), heparitinase III (10 mU/ml), chondroitinase ABC(33 mU/ml)). The morphology of transfected HUV-EC-Cs was analyzed by live confocal microscopy. (X 400). Membrane protrusions were shown by white arrows.

The area of cells transfected overexpressing SDC-4 was reduced upon RANTES/CCL5 treatment by 11 ± 4 % while treatment with GAG-deficient RANTES/CCL5 did not change cell area. RANTES/CCL5 treatment had no effects on cell area for SDC4WT cells pretreated with enzymes (heparitinase I, heparitinase III and chondroitinases ABC) (Figure 64). We concluded that binding of RANTES/CCL5 to HS chains is indispensable for its effect on activation of cell migration mediated by SDC-4.

We analyzed the importance of GAG chains in RANTES/CCL5-induced vascular sprout length for cells transfected with EGFP (control) or SDC-4 wild-type (SDC4WT) plasmid by 2D vascular sprout formation in Matrigel assay. RANTES/CCL5 (grey histograms) increased vascular sprout length by $20 \pm 1 \%$ (0.736 ± 0.006 A.U. for RANTES/CCL5 versus 0.612 ± 0.002 A.U. for untreated, p<0.05) and $39 \pm 1 \%$ (0.853 ± 0.009 A.U. for RANTES/CCL5 versus 0.616 \pm

0.003 A.U. for untreated, p<0.05) for cells transfected with EGFP (control) or SDC-4-EGFP (SDC4WT) plasmid while vascular sprout length induced by both GAG-deficient RANTES/CCL5 mutants is similar to untreated cells (black histograms) whatever the plasmid. R47E-RANTES/CCL5 (white histograms) and 3Ala-RANTES/CCL5 (purple histograms) abolished the RANTES/CCL5-induced vascular sprout length for both transfected cells (Figure 65).

We concluded that binding of RANTES/CCL5 to HS chains is indispensable for its effect on vascular sprout formation mediated by SDC-4.



<u>Figure 65</u>: Heparan sulfate chains in vascular tube formation of transfected cells HUV-EC-Cs transfected with EGFP (control) or SDC4WT-EGFP (SDC4WT) plasmid were stimulated or not (black histograms) by RANTES/CCL5 wild-type (3 nM, grey histograms), R47E-RANTES/CCL5 (3 nM, white histograms) or 3Ala-RANTES/CCL5 (3 nM, purple histograms). Vascular tube formation in Matrigel was assayed in an *in vitro* angiogenesis model. Results are indicated as length of vascular sprout (mean ± SEM) expressed in arbitrary unit (A.U.). The vertical axis ranges from 0.5 to 0.9 A.U. *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* untreated. #p<0.05, *versus* RANTES/CCL5.

b. RANTES/CCL5-induced PKC- α and PKC- δ activation are mediated by RANTES/CCL5 GAG-binding sequence

We showed previously that SDC-4 is involved in RANTES/CCL5-induced PKC- α translocation to the membrane *via* intracellular domain of SDC-4 by western blotting. See article 1, figure 5D. We confirmed under live confocal microscopy that SDC-4 is necessary for RANTES/CCL5-induced PKC- α translocation to the membrane (Article 1, Figures 5B and 5C) *via* intracellular domain of SDC-4 (Figure 49).

We analyzed the importance of GAG chains in the activation of PKC- α induced by RANTES/CCL5 treatment for cells co-transfected with SDC-4-EGFP wild-type (SDC4WT) and PKC α -DsRed2 plasmid under live confocal microscopy (Figure 66).

GAG-deficient mutant of RANTES/CCL5 failed to induce PKC- α translocation at the membrane in SDC4WT co-transfected cells (Figures 66A and 66B). Preincubation with enzymes (heparitinase I, heparitinase III and chondroitinase ABC) avoid RANTES/CCL5-induced PKC- α translocation at the membrane (Figure 66C). We concluded that binding of RANTES/CCL5 to HS chains is indispensable for its effect on PKC- α membrane translocation mediated by SDC-4. However, these results need to be confirmed by western blotting analysis.



<u>Figure 66</u>: Heparan sulfate chains in RANTES/CCL5-induced PKC- α membrane translocation HUV-EC-Cs co-transfected with PKC α -DsRed2 plasmid and with SDC-4-EGFP plasmid were stimulated or not (Untreated) by RANTES/CCL5 wild-type (3 nM, C), R47E-RANTES/CCL5 (3 nM, A) or 3Ala-RANTES/CCL5 (3 nM, B) for 15 minutes and were pretreated (C) or not (A, B) with a mix of enzymes (heparitinase I (20 mU/mI), heparitinase III (10 mU/mI), chondroitinases ABC (33 mU/mI)). Localization of SDC-4 and PKC- α were analyzed under live confocal microscopy with EGFP (green) and DsRed2 (red) respectively. (X 400). We showed previously that SDC-4 is involved in RANTES/CCL5-induced PKC- δ translocation to the membrane *via* intracellular domain of SDC-4 under live confocal microscopy (Figure 59).

We analyzed the importance of GAG chains in the activation of PKC- δ induced by RANTES/CCL5 treatment for cells co-transfected with SDC-4-EGFP wild-type (SDC4WT) and PKC- δ -mCherry plasmid under live confocal microscopy (Figure 67).

GAG-deficient mutant of RANTES/CCL5 failed to induce PKC- δ translocation at the membrane in SDC4WT co-transfected cells (Figures 67A and 67B). We concluded that binding of RANTES/CCL5 to HS chains is indispensable for its effect on PKC- δ membrane translocation mediated by SDC-4. However, these results need to be confirmed by western blotting analysis.



<u>Figure 67</u> : Heparan sulfate chains in RANTES/CCL5-induced PKC- δ membrane translocation HUV-EC-Cs co-transfected with PKC δ -mCherry plasmid and with SDC-4-EGFP plasmid were stimulated or not (Untreated) by R47E-RANTES/CCL5 (3 nM, A) or 3Ala-RANTES/CCL5 (3 nM, B) for 30 minutes. Localization of SDC-4 and PKC- δ were analyzed under live confocal microscopy with EGFP (green) and mCherry (red) respectively. (X 400).

We showed here the involvement of GAG in the RANTES/CCL5-induced angiogenesis. Indeed, the deletion of RANTES/CCL5 GAG-binding motif leads to abolition of the chemokine effect. RANTES/CCL5 GAG-binding deficient mutants are unable to induce adhesion (Figure 61), migration (Figure 62) or vascular sprout formation (Figure 65). Moreover, deletion of GAG-binding motif prevent PKC- α and PKC- δ activation by the chemokine (Figures 66 and 67).

GAG-binding motif is necessary for RANTES/CCL5 effects and SDC-4 mediates RANTES/CCL5-induced angiogenesis. SDC-4 ectodomain has three GAG chains type HS. It could be interesting to check if the regulation of RANTES/CCL5-induced angiogenesis by SDC-4 is dependent of its HS chains. The utilization of SDC-4 deficient in HS chains of ectodomain could answer to this question.

These results were obtained in teamwork with Hanna Hlawaty, Véronique Friand, Nadine Suffee, Fanny Chmilewsky, Oualid Haddad, Christelle Laguillier, Erwan Guyot, Olivier Oudar, Angela Sutton and Nathalie Charnaux. Naoaki Saito and Takehiko Ueyama from Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan collaborated to this work.

These data resulted in an **oral communication** at the 25th Groupe Français des Glycosciences day (Paris, France, 12-15/05/2014).

L. Maillard, V. Friand, N. Suffee, H. Hlawaty, O. Haddad, F. Chmilewsky, O. Oudar, N. Saito, T. Ueyama, D.Letourneur, N. Charnaux, A. Sutton. *Syndecan-4 orchestrates RANTES/CCL5-induced endothelial cell migration and adherence by modulation of intracellular signaling.*

Part 2 : Involvement of SDC-4 in RANTES/CCL5-induced monocyte recruitment

1. Article 2 : RANTES/CCL5 mediated-monocyte recruitment depend on the syndecan-4 signaling pathway

Circulation Research Journal.

Loïc Maillard¹, Naoaki Saito², Hanna Hlawaty¹, Véronique Friand¹, Nadine Suffee¹, Fanny Chmilewsky¹, Oualid Haddad¹, Sana Bakhouche¹, Emeline Desbois¹, Takehiko Ueyama², Olivier Oudar¹, Angela Sutton^{*1,3}, Nathalie Charnaux^{*1,3}

¹INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, Bio-ingénierie cardiovasculaire ; UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France

²Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe 657-8501, Japan

³Laboratoire de biochimie, Hôpital Jean Verdier, AP-HP, Bondy, France

*: contributed equally to the work

Corresponding author : Nathalie Charnaux, INSERM U1148, Laboratory for Vascular Translational Science, Bio-ingénierie cardio-vasculaire ; UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 74 rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France. Phone : +33148388888, Mail : nathalie.charnaux@jvr.aphp.fr

Abstract

The leukocyte recruitment is essential for an efficient immune response. The over leukocyte recruitment may lead to an inflammatory disease such as atherosclerosis with a response of both endothelial cells and monocytes to inflammatory mediators such as chemokines. The chemokine Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES)/CCL5 is well described as a monocyte recruiter. The effects of RANTES/CCL5 may be related to its binding to G protein-coupled receptors and to proteoglycans such as syndecan-1 and -4. The aim of this study was to evaluate the functionality of syndecan-4 as a co-receptor of RANTES/CCL5 by the use of mutated syndecan-4 constructs. Our data demonstrate that site-directed mutations in syndecan-4 modify RANTES/CCL5-induced monocyte recruitement in endothelial cells. The SDC4S179A mutant, associated with an induced protein kinase C- α (PKC- α) activation leads to higher RANTES/CCL5-induced monocyte recruitement whereas the SDC4L188QQ and the SDC4A198del mutants leading to lower phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) binding or to lower PDZ protein binding respectively, are associated with reduced RANTES/CCL5 effect. Moreover, our data highlight that the SDC-4 is involved in RANTES/CCL5-induced monocyte recruitment through intracellular signaling and membrane expression of adhesion molecules. As RANTES/CCL5 is involved in various physiopathological process, the development of new therapeutic strategy

may be rely on the mechanism by which RANTES/CCL5 exerts its biological activities, for example by targeting the binding of the chemokine to its proteoglycan receptor.

Introduction

Leukocyte recruitement is essential for the development and for a correct immune process. The CC-chemokine Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed and Secreted (RANTES/CCL5), a member of the CC-chemokine family, is involved in the recruitment of leukocytes. RANTES/CCL5 can bind to the cell membrane through its specific G Protein-Coupled Receptors (GPCR) CCR1, CCR3 and CCR5 and also to glycosaminoglycans (GAG). GAG are long, linear, and heterogenous sulfated polysaccharides. RANTES/CCL5 exhibits selectivity in glycosaminoglycan binding with the highest affinity (nanomolar range) for heparin (Proudfoot et al., 2001). We have previously demonstrated that RANTES/CCL5 associates with its GPCRs but also with heparan sulfate proteoglycan belonging to the syndecan family, syndecan-1 (SDC-1) and syndecan-4 (SDC-4) on various cell types (Slimani et al., 2003a, 2003b; Sutton et al., 2007; Charni et al., 2009). RANTES/CCL5 can bind to GAG through its ⁴⁴RKNR⁴⁷ motif and the binding of the chemokine to glycosaminoglycan chains modulate RANTES/CCL5 biological activities. Indeed, we previously published that soluble heparin, GAG mimetics or GAG-binding deficient mutants of RANTES/CCL5 (R47E and ⁴⁴AANA⁴⁷ (named 3Ala) mutations) can modulate the biological activities of the chemokine as shown in vitro (Charni et al., 2009; Sutton et al., 2007) or in vivo (Suffee et al., 2012).

Proteoglycans carry on luminal part of the endothelium are involved in chemokineinduced leukocyte recruitment by forming a complex between the endothelial cell (due to the binding of chemokine to proteoglycan) and the leucocyte (due to the binding of chemokine to GPCR) (Götte, 2003).

Syndecan-4 (SDC-4) is one of a family of four transmembrane heparan sulfate proteoglycans, whose extracellular domains interact with various soluble factors in the blood circulation and insoluble factors in the extracellular matrix (ECM) such as growth factors or component of ECM (fibronectin, laminin). Syndecans have been thought to act as coreceptors for various heparin-binding growth factors such as fibroblast growth factors (FGFs), vascular endothelial growth factors (VEGFs) and fibronectin-binding integrins (Beauvais and Rapraeger, 2004; Kwon et al., 2012). An evolutionary conserved cytoplasmic domain on syndecans supports a key role for cell surface ligand binding and cytoplasmic signaling. Common to all syndecans, three regions of cytoplasmic domain have been identified. The first (C1) is the membrane-proximal region that binds Src kinase, ezrin, and cortactin (Kinnunen et al., 1998; Granés et al., 2003). The second (C2) is a C-terminal region that contains a post-synaptic density 95, discs-large, ZO-1 (PDZ)-domain binding motif (Multhaupt et al., 2009). The variable (V) domain is located between the two conserved domains and its sequence is unique to each syndecan family member. The V domain of SDC-4 binds to phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) and also to protein kinase C- α (PKC-

 α) complex, α -actinin, and syndesmos (Horowitz et al., 1999; Denhez et al., 2002; Greene et al., 2003; Lim et al., 2003). These interactions are responsible for the previously demonstrated SDC-4 role in cytoskeleton regulation that includes formation of focal adhesions, of dynamic stress fibers, and cell protrusions (Kwon et al., 2012). SDC-4 null mice are viable and fertile but exhibit defective skin wound healing reflecting impaired cell migration and angiogenesis (Echtermeyer et al., 2001; Okina et al., 2012).

Therefore, the hypothesis tested here is that the interaction of RANTES/CCL5 with SDC-4 triggers the transduction of signals leading to changes in the intracellular environment. For that purpose, we will evaluate the involvement of intracellular cytoplasmic SDC-4 domain and GAG-binding RANTES/CCL5 motif in RANTES/CCL5-induced leukocyte arrest on endothelial cells.

Results

Prior to analyze SDC-4 involvement in monocyte arrest, we want to validate our models of monocyte arrest in static and under flow. We activated or not Human Umbilical Vein Endothelial Cell (HUV-EC-Cs) monolayer with the pro-inflammatory cytokine Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α) over night and we pretreated or not endothelial cell monolayer with RANTES/CCL5. Next the monocyte cell line Mono Mac 6 (MM6) was introduced and the number of monocytes arrested was quantified in static condition (Fig. 1A). TNF- α induced monocyte adhesion to endothelial monolayer by 128 \pm 36 % (208 \pm 19 cells/well for TNF- α versus 61 ± 8 cells/well for unactivated cells, p<0.05) or 239 ± 29 % (359 ± 61 cells/well for TNF- α versus 157 ± 26 cells/well for unactivated cells, p<0.05) respectively for HUV-EC-Cs cells pretreated or not by RANTES/CCL5 (Fig. 1A). RANTES/CCL5 induced monocyte adhesion by 73 ± 34 % (359 ± 61 cells/well for RANTES/CCL5 versus 208 ± 20 cells/well for untreated, p<0.05) or 157 ± 50 % (157 ± 26 cells/well for RANTES/CCL5 versus 61 ± 8 cells/well for untreated, p<0.05) respectively for HUV-EC-Cs cells activated or not by TNF- α (Fig. 1A). For further experiments, we decided to use TNF- α activation. After TNF- α activation, HUV-EC-Cs monolayer was incubated or not with RANTES/CCL5 and MM6 were introduced under laminar flow to HUV-EC-Cs cells. RANTES/CCL5 induced monocyte arrest by 158 ± 34 % (418 ± 60 cells/chamber for RANTES/CCL5 versus 162 ± 25 cells/chamber for untreated, p<0.05) in comparison to untreated cells (Fig. 1B).

RANTES/CCL5 is a chemokine that can oligomerize and bind to GAG at the cell surface. We used mutants of RANTES/CCL5 deficient in oligomerization (E66A) and in GAG-binding (3Ala) to evaluate the roles of oligomerization and GAG-binding properties in monocyte recruitment. E66A-RANTES/CCL5 decreased monocyte arrest by $66 \pm 12 \%$ (124 \pm 13 cells/well for E66A-RANTES/CCL5 *versus* 359 \pm 61 cells/well for RANTES/CCL5, p<0.05) or 92 \pm 15 % (32 \pm 18 cells/chamber for E66A-RANTES/CCL5 *versus* 418 \pm 60 cells/chamber for RANTES/CCL5, p<0.05) in static or dynamic model respectively and 3Ala-RANTES/CCL5 decreased monoyte arrest by 69 \pm 11 % (113 \pm 7 cells/well for 3Ala-RANTES/CCL5 *versus* 359

 \pm 61 cells/well for RANTESE/CCL5, p<0.05) or 90 \pm 8 % (43 \pm 2 cells/chamber for 3Ala-RANTES/CCL5 versus 418 \pm 60 cells/chamber for RANTES/CCL5, p<0.05) in static or dynamic model respectively in comparison with RANTES/CCL5 wild type stimulation (Fig. 1C, 1D).

We conclude that our static and dynamic models constitute appropriate models to evaluate RANTES/CCL5 effect on monocyte arrest and RANTES/CCL5-induced arrest is dependent of chemokine oligomerization and GAG-binding.



Figure 1 : Heparan sulfate chains in monocyte arrest on endothelial cells monolayer

HUV-EC-Cs were activated (black histograms) or not (grey histograms) by TNF- α and stimulated or not by RANTES/CCL5 (3 nM) (A). HUV-EC-Cs were activated by TNF- α and stimulated or not (Untreated) by RANTES/CCL5 wild-type (3 nM) (B), GAG-deficient (3 nM, 3Ala-RANTES/CCL5) or oligomerization-deficient (3 nM, E66A-RANTES/CCL5) (C, D). MM6 monocyte arrest on HUV-EC-Cs monolayer was analyzed in static (A, C) or under flow (B, D) condition. Results are expressed as cell number/well (A, C) or cell number/chamber (B, D) (mean ± SEM) of MM6 arrested on HUV-EC-Cs cells. *p<0.05, *versus* untreated. #p<0.05, *versus* unactivated. \$p<0.05 *versus* RANTES/CCL5.

As RANTES/CCL5 needs GAG-binding to induce monocyte chemotaxis, we also investigated the effects of RANTES/CCL5 on monocyte arrest on EGFP or SDC-4-EGFP wild-type (SDC4WT) or SDC-4-EGFP intracellular mutant (S179A, L188QQ or A198del) transfected-endothelial cells in static or under laminar flow. Functionalization of SDC-4-EGFP construct, transfection efficiency and membrane expression of SDC-4 wild-type (SDC4WT), or mutated in intracellular domain (S179A, L188QQ and A198del) were previously confirmed (Maillard et al., 2014). Endothelial cells, transfected with either SDC4WT-EGFP (SDC4WT) or SDC4S179A-EGFP (S179A) or SDC4L188QQ-EGFP (L188QQ) or SDC4A198del-EGFP (A198del) were activated with TNF- α and pretreated or not (Untreated) with RANTES/CCL5. In the absence of RANTES/CCL5 stimulation, the transfection of HUV-EC-Cs with SDC4WT significantly increases the adhesion of monocytes under static or flow condition as compared to vector-transfected cells (control) by 134 ± 17 % (660 ± 36 cells/well for SDC4WT *versus* 282 ± 24 cells/well for control, p<0.05) or 200 ± 9 % (288 ± 6 cells/chamber for SDC4WT *versus* 96 ± 6 cells/chamber for control, p<0.05) respectively (Fig. 2).





HUV-EC-Cs transfected with EGFP plasmid (control), SDC4WT-EGFP (SDC4WT), mutated SDC-4 constructs (S179A, L188QQ, A198del) or with SDC-4 siRNA (siRNA SDC4) were activated by TNF- α and stimulated or not (Untreated, black histograms) by RANTES/CCL5 (3 nM). MM6 monocyte arrest on HUV-EC-Cs monolayer was analyzed in static (A) or under flow (B) condition. Results are expressed as cell number/well (A) or cell number/chamber (B) (mean ± SEM) of MM6 arrested on HUV-EC-Cs cells. For MM6 arrest under flow, the vertical axis is divided into two sections ranges from 50 to 155 and from 250 to 550 cells/chamber (B). *p<0.05, *versus* untreated. #p<0.05, S179A *versus* SDC4WT (in the absence of RANTES/CCL5). &p<0.05 SDC4WT *versus* control (in the absence of RANTES/CCL5).

Additionally, transient transfection of HUV-EC-Cs with small interfering (si)RNA against SDC-4 significantly decreases the adhesion of monocytes under flow conditions by 43 ± 13 % (59 ± 8 cells/chamber for siRNA-SDC-4 versus 104 ± 6 cells/chamber for control siRNA, p<0.05) as compared to control siRNA-transfected cells (Fig. 2B and data not shown). These data suggest that SDC-4 plays a major role in the adhesion of monocytes to endothelial cells under static and flow conditions. Interestingly, in the absence of stimulation by RANTES/CCL5, the number of monocytes which adhered to the S179A-transfected endothelial cells was largely increased as compared to SDC4WT-transfected cells in static of under flow by 103 ± 12 % (1338 ± 84 cells/well for S179A versus 660 ± 36 cells/well for SDC4WT, p<0.05) or 67 ± 10 % (480 ± 24 cells/chamber for S179A versus 288 ± 6 cells/chamber for SDC4WT, p<0.05) (Fig. 2). By contrast, the number of monocytes that adhered to the L188QQ or A198del-transfected cells was decreased as compared to SDC4WT-transfected cells by 66 \pm 7 % (222 \pm 24 cells/well for L188QQ versus 660 \pm 36 cells/well for SDC4WT, p<0.05) or 78 \pm 6 % (144 \pm 12 cells/well for A198del versus 660 \pm 36 cells/well for SDC4WT, p<0.05) respectively in static condition (Fig. 2A) and by 75 \pm 4 % (72 \pm 6 cells/chamber for L188QQ versus 288 ± 6 cells/chamber for SDC4WT, p<0.05) or 75 ± 4 % (72 ± 6 cells/chamber for A198del versus 288 ± 6 cells/chamber for SDC4WT, p<0.05) respectively under flow (Fig. 2B).

The RANTES/CCL5 stimulation of control cells significantly increases the number of monocytes which adhere to the endothelium by 49 ± 12 % (420 ± 48 cells/well for RANTES/CCL5 versus 282 \pm 24 cells/well for untreated, p<0.05) in static or 25 \pm 5 % (120 \pm 6 cells/chamber for RANTES/CCL5 versus 96 \pm 6 cells/chamber for untreated, p<0.05) under flow as compared to the cells unstimulated by the chemokine (Fig. 2). Similarly, the stimulation of SDC4WT cells by RANTES/CCL5 significantly increases the number of monocytes which adhere to the endothelium as compared to the unstimulated ones by 77 \pm 6 % (1170 ± 48 cells/well for RANTES/CCL5 versus 660 ± 36 cells/well for untreated, p<0.05) in static or 42 ± 4 % (408 ± 24 cells/chamber for RANTES/CCL5 versus 288 ± 6 cells/chamber for untreated, p<0.05) under flow (Fig. 2). Under RANTES/CCL5 stimulation, monocyte arrest to endothelial cells expressing either PIP2- or PDZ- SDC-4 constructs (L188QQ or A198del respectively) was largely decreased as compared to SDC4WT-transfected cells by 64 ± 6 % (420 ± 36 cells/well for L188QQ versus 1170 ± 48 cells/well for SDC4WT, p<0.05) or 83 ± 5 % (198 ± 24 cells/well for A198del versus 1170 ± 48 cells/well for SDC4WT, p<0.05) respectively in static condition (Fig. 2A) and by 76 \pm 7 % (96 \pm 6 cells/chamber for L188QQ versus 408 \pm 24 cells/chamber for SDC4WT, p<0.05) or 82 ± 7 % (72 ± 5 cells/chamber for A198del versus 408 ± 24 cells/chamber for SDC4WT, p<0.05) respectively under flow (Fig. 2B)). RANTES/CCL5 failed to induce monocyte adhesion on S179A-transfected cells in static (Fig. 2A) and was less efficient than SDC4WT-transfected ones under flow (10 \pm 4 %) (528 \pm 24 cells/chamber for RANTES/CCL5 versus 480 ± 24 cells/chamber for untreated, p<0.05) (Fig. 2B).

Taken together, these data highlight the fact that syndecan-4 cytoplasmic domains are involved in RANTES/CCL5-induced monocyte arrest to endothelial cells.

Under physiological flow, vascular endothelial cells acquire a polarization and spread in the direction of the flow. It is known that a modification of the rate of flow could activate the vascular endothelial cells through its mecanosensors as the cytoskeleton or the platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) which induced expression of adhesion molecules such as E-selectin, intracellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) or vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1). The increase of these adhesion molecule will promote the recruitment of circulating cells (monocytes, dendritic cells, T lymphocytes) (Seneviratne et al., 2013). To explain the increase of monocyte arrest on endothelial cells by SDC-4, we analyzed the morphology of HUV-EC-Cs transfected with EGFP or SDC-4-EGFP wild type under laminar flow by live confocal microscopy after TNF- α activation and with or without RANTES/CCL5 stimulation (Fig. 3). Without RANTES/CCL5 pretreatment (Untreated), flow induced more filopodia formation in SDC-4-EGFP transfected cells (SDC4WT) than in EGFP transfected cells (Control) (Fig. 3A, 3C). RANTES/CCL5 did not increased filopodia formation for control cells (Fig. 3B) whereas for SDC4WT transfected cells, RANTES/CCL5 increased the filopodia formation both before and after laminar flow (Fig. 3D). As GAG-binding deficient of RANTES/CCL5 mutant decreased the monocyte recruitment (Fig. 1D), we analyzed the effect of two RANTES/CCL5 GAG-binding deficient mutants, R47E-RANTES/CCL5 and ⁴⁴AANA⁴⁷ (3Ala)-RANTES/CCL5 on the filopodia formation. Pretreatment of SDC4WT cells by R47E-RANTES/CCL5 (Fig. 3E) or 3Ala-RANTES/CCL5 (Fig. 3F) have no effect on filopodia formation in comparison to untreated SDC4WT ones (Fig. 3C) and decrease filopodia formation in comparison to wild-type RANTES/CCL5 pretreated ones (Fig. 3D). These data suggest that RANTES/CCL5 induced filopodia formation through interaction with cell membrane GAG chains, may be linked to the SDC-4 protein core.



Figure 3 : Heparan sulfate chains in morphology of SDC-4 tranfected endothelial cells under laminar

flow

HUV-EC-Cs transfected with EGFP plasmid (control, A, B) or SDC4WT-EGFP (SDC4WT, C, D, E, F) plasmid were activated by TNF- α and stimulated or not (Untreated, A, C) by RANTES/CCL5 wild-type (B, D), 3Ala-RANTES/CCL5 (E) or R47E-RANTES/CCL5, (F, 3 nM). HUV-EC-Cs morphology was analyzed under laminar flow (10 minutes) by live confocal microcopy in EGFP (green) and phase contrast signal.

To explain differences of monocyte arrest on endothelial cells transfected by SDC-4 intracellular mutants under laminar flow (Fig. 2B), we analyzed the morphology of HUV-EC-Cs transfected with SDC-4-EGFP constructs (S179A, L188QQ, A198del) under laminar flow by

live confocal microscopy after TNF- α activation and with or without RANTES/CCL5 stimulation (Fig. 4). For S179A-transfected HUV-EC-Cs, cells had filopodia before and after flow whatever pretreatment by RANTES/CCL5 (Fig. 4A, 4B). For L188QQ or A198del-transfected cells, flow did not induced filopodia formation whatever the cells pretreatment (Fig. 4D or 4F respectively) or not (Fig. 4C or 4E respectively) by RANTES/CCL5. These data suggest that RANTES/CCL5 induced filopodia formation through SDC-4 intracellular domain.

Moreover, the formation of filopodia by SDC-4 overexpressed cells was prevented after expression of Rac1 or Cdc42 dominant negative form (data not shown). These results correlated with previous published data that showed the involvement of Rac1 and Cdc42 in filopodia formation (Nobes and Hall, 1995).



Figure 4 : SDC-4 intracellular domain in morphology of SDC-4 tranfected endothelial cells under laminar flow

HUV-EC-Cs transfected with SDC-4-EGFP mutants (S179A, A, B, or L188QQ, C, D, or A198del, E, F) plasmid were activated by TNF- α and stimulated or not (Untreated, A, C, E) by RANTES/CCL5, (B, D, F, 3 nM). HUV-EC-Cs morphology was analyzed under laminar flow (10 minutes) by live confocal microcopy in EGFP (green) and phase contrast signal.

SDC-4 mediates RANTES/CCL5-induced monocyte arrest on endothelial cell monolayer through SDC-4 intracellular domain (Fig. 2). We previously showed that RANTES/CCL5 induced migration and vascular sprout formation *via* activation of PKC- α by SDC-4 intracellular domain (Maillard et al., 2014). To determine which signaling pathway is involved in SDC-4 mediated RANTES/CCL5-induced monocyte recruitment, we used pharmacological inhibitors on HUV-EC-Cs transfected by EGFP (control) or SDC-4-EGFP (SDC4WT) plasmid and we analyzed RANTES/CCL5-induced monocyte arrest on these transfected cells in static model and under laminar flow (Fig. 5A and 5B).

Endothelial cells, transfected with EGFP (Control) or SDC-4-EGFP (SDC4WT) were activated with TNF- α , pretreated with RANTES/CCL5 and with or without (Untreated) pharmacological inhibitor against PKC- α (Gö6976), PKC- δ (Rottlerin), RhoA/RhoG (C3 exoenzyme) or Rac1 (NSC). In the absence of inhibitor, the transfection of HUV-EC-Cs with SDC4WT significantly increases the adhesion of monocytes under static or flow condition as compared to vector-transfected cells (control) by 27 ± 5 % (201 ± 11 cells/well for SDC4WT *versus* 158 ± 2 cells/well for control, p<0.05) or 126 ± 49 % (141 ± 17 cells/chamber for SDC4WT *versus* 62 ± 22 cells/chamber for control, p<0.05) respectively (Fig. 5A and 5B).



Figure 5 : Intracellular pathway involvement in RANTES/CCL5-induced monocyte arrest on SDC-4 tranfected endothelial cells monolayer

HUV-EC-Cs transfected with EGFP plasmid (control) or SDC4WT-EGFP (SDC4WT) were activated by TNF- α , stimulated by RANTES/CCL5 (3 nM) and preincubated or not (Untreated, black histograms) with pharmacological inhibitor against PKC- α (Gö6976, grey histograms) or PKC- δ (Rottlerin, white histograms) or RhoA/RhoG (C3 exoenzyme, purple histograms) or Rac1 (NSC, blue histograms). MM6 monocyte arrest on HUV-EC-Cs monolayer was analyzed in static (A) or under flow (B) condition. Results are expressed as cell number/well (A) or cell number/chamber (B) (mean ± SEM) of MM6 arrested on HUV-EC-Cs cells. The vertical axis ranges from 50 to 250 cells/well (A) or from 20 to 180 cells/chamber (B). *p<0.05, versus untreated. \$p<0.05 versus control.

In the presence of PKC- α inhibitor (Gö6976), RANTES/CCL5-induced monocyte adhesion in static model is decreased by 56 ± 3 % (70 ± 6 cells/well for Gö6976 *versus* 158 ± 2 cells/well for untreated, p<0.05) or 58 ± 7 % (84 ± 8 cells/well for Gö6976 *versus* 201 ± 11 cells/well for untreated, p<0.05) for endothelial cells transfected with control or SDC4WT plasmid respectively and is similar between both transfected cells (Fig. 5A). By contrast, PKC- α inhibition had no significant effect in RANTES/CCL5-induced monocyte arrest under laminar flow for both transfected cells (Fig. 5B).

In the presence of PKC- δ inhibitor (Rottlerin), RANTES/CCL5-induced monocyte adhesion in static model is increased by 14 ± 2 % (181 ± 4 cells/well for Rottlerin *versus* 158 ± 2 cells/well for untreated, p<0.05) for control or decreased by 21 ± 7 % (158 ± 6 cells/well for Rottlerin *versus* 201 ± 11 cells/well for untreated, p<0.05) for SDC4WT tranfected cells in comparison to untreated transfected ones respectively (Fig. 5A).

In static model, RhoA/RhoG (C3 exoenzyme) or Rac1 inhibition (NSC) had no significant effect on control cells whereas it decreased RANTES/CCL5-induced monocyte adhesion for SDC4WT transfected cells by $54 \pm 6 \%$ (94 ± 4 cells/well for C3 exoenzyme versus 201 \pm 11 cells/well for untreated, p<0.05) or $50 \pm 6 \%$ (101 ± 2 cells/well for NSC versus 201 \pm 11 cells/well for untreated, p<0.05) respectively. Moreover, the RANTES/CCL5-induced monocyte arrest in static condition is significantly decreased by $35 \pm 6 \%$ (94 ± 4 cells/well for SDC4WT versus 145 \pm 7 cells/well for control, p<0.05) or $33 \pm 2 \%$ (101 ± 2 cells/well for SDC4WT versus 151 ± 2 cells/well for control, p<0.05) for SDC4WT transfected cells in comparison to control transfected ones for RhoA/RhoG or Rac1 respectively inhibited cells (Fig. 5A). In addition, under laminar flow, RhoA/RhoG inhibition decreased RANTES/CCL5-induced monocyte arrest by $49 \pm 17 \%$ (72 ± 14 cells/chamber for C3 exoenzyme versus 141 \pm 17 cells/chamber for untreated, p<0.05) in SDC4WT transfected cells (Fig. 5B).

Taken together, these data highlight the fact that syndecan-4 induced intracellular signaling pathways in RANTES/CCL5-induced monocyte arrest to endothelial cells.

Adhesion molecules expressed at the membrane of vascular endothelial cells are essentials in monocyte recruitment. As RANTES/CCL5-induced monocyte arrest is dependent of SDC-4-induced signaling pathway (Fig. 2), we analyzed the membrane expression of ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 and E-selectin adhesion molecules in SDC-4 transfected cells (Fig. 6).

Endothelial cells, transfected with EGFP (Control) or SDC-4-EGFP (SDC4WT) were activated with TNF- α , pretreated or not (Untreated) with RANTES/CCL5. Adhesion molecules expression at the cell membrane of non-permeabilized cells was analyzed by flow cytometry. Surprising, RANTES/CCL5 had no effects on membrane expression for each adhesion

molecules in comparison to untreated cells whatever the plasmid transfected (EGFP or SDC-4-EGFP). Membrane expression of ICAM-1 for cells transfected by SDC4WT is increased by 38 \pm 5 % (1.38 \pm 0.099 A.U. for SDC4WT versus 1 \pm 0 A.U. for control, p<0.05) in absence of RANTES/CCL5 in comparison to control ones whereas ICAM-1 membrane expression is not significantly different in presence of RANTES/CCL5. By contrast, membrane expression of VCAM-1 or E-selectin for cells transfected by SDC4WT is not significantly different in absence of RANTES/CCL5 in comparison to control ones whereas VCAM-1 or E-selectin membrane expression is increased by 42 ± 16 % (1.43 \pm 0.236 A.U. for SDC4WT versus 1.01 \pm 0.088 A.U. for control, p<0.05) or 23 ± 6 % (1.28 ± 0.066 A.U. for SDC4WT versus 1.04 ± 0.052 A.U. for control, p<0.05) respectively in presence of RANTES/CCL5. PECAM-1 membrane expression is increased by 26 ± 4 % (1.29 ± 0.178 A.U. for SDC4WT versus 1 ± 0 A.U. for control, p<0.05) or 23 ± 5 % (1.24 ± 0.059 A.U. for SDC4WT versus 1.01 ± 0.047 A.U. for control, p<0.05) in absence or presence of RANTES/CCL5 respectively for SDC4WT transfected cells in comparison to control transfected ones. (Fig. 6). Interestingly, there is no difference in membrane expression for all four adhesion molecules between SDC-4 wild-type or mutant transfected cells whatever the SDC-4 mutant (S179A, L188QQ or A198del) or the treatment (presence or absence of RANTES/CCL5) (data not shown).



Figure 6 : Adhesion molecule membrane expression of SDC-4 tranfected endothelial cells HUV-EC-Cs transfected with EGFP plasmid (control, black and grey histograms) or SDC4WT-EGFP (SDC4WT, white and purple histograms) were activated by TNF- α and stimulated (grey and purple histograms) or not (black and white histograms) by RANTES/CCL5 (3 nM). Membrane expression of adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 or E-selectin was analyzed by flow cytometry on non-permeabilized cells. Results are expressed as arbitrary unit (A.U., mean ± SEM). #p<0.05, versus control (in the absence of RANTES/CCL5). #p<0.05 versus control (in the presence of RANTES/CCL5).

After the arrest and the adhesion of the monocyte on the vascular endothelial cell monolayer, the monocyte needs to transmigrate across endothelium to reach the tissue.
Endothelial cells, transfected with EGFP (Control) or SDC-4-EGFP (SDC4WT) were deposited in the upper chamber of a modified transwell chamber to obtain an endothelial monolayer. HUV-EC-Cs were activated with TNF- α , pretreated or not with RANTES/CCL5. Monocytes prestained were introduced in the upper chamber and the Monocyte-chemoattractant protein-1 (MCP-1), a well describe monocyte attractant chemokine, was added in the lower chamber. Monocytes which are transmigrated across the endothelial transfected monolayer were quantified by flow cytometry (Fig. 7A).

Endothelial cells, transfected with EGFP (Control) or SDC-4-EGFP (SDC4WT) were activated with TNF- α and pretreated or not (Untreated) with RANTES/CCL5 (Fig. 6B). In the absence of RANTES/CCL5 stimulation (Untreated), MM6 transmigration is increased by a 6.5 fold factor (566 ± 159 cells/chamber for SDC4WT *versus* 75 ± 28 cells/chamber for control, p<0.05) through HUV-EC-Cs transfected by SDC4WT plasmid in comparison to EGFP-transfected ones. Interestingly, MM6 transmigration is decreased by 81 ± 30 % (106 ± 24 cells/chamber for RANTES/CCL5 *versus* 566 ± 159 cells/chamber for untreated, p<0.05) across SDC4WT transfected cells pretreated by RANTES/CCL5 whereas RANTES/CCL5 has no effect for control transfected cells. Moreover, the SDC-4 overexpression no longer promotes monocyte transmigration in the presence of RANTES/CCL5 (Fig. 7B). These data suggest that SDC-4 stimulated monocyte transmigration.

To understand why RANTES/CCL5 abolished SDC-4-induced monocyte transmigration, endothelial cells were transfected with EGFP (Control) or SDC-4-EGFP (SDC4WT), activated with TNF- α , pretreated with RANTES/CCL5 and with or without (Untreated) pharmacological inhibitor against PKC- α (Gö6976) or PKC- δ (Rottlerin) (Fig. 6C). In the presence of RANTES/CCL5 and absence of inhibitor (Untreated), MM6 transmigration is similar for HUV-EC-Cs transfected by SDC4WT or control plasmid. The inhibition of PKC- α (Gö6976) had no effect on MM6 transmigration through HUV-EC-Cs monolayer.

Inhibition of PKC- δ (Rottlerin) in control transfected cells significantly increased monocyte transmigration by 178 ± 39 % (212 ± 21 cells/chamber for Rottlerin *versus* 76 ± 20 cells/chamber for untreated, p<0.05) in comparison to control transfected cells without inhibitor (Untreated). Moreover, PKC- δ inhibition in SDC4WT transfected cells significantly decreased by 59 ± 18 % (86 ± 34 cells/chamber for SDC4WT *versus* 212 ± 21 cells/chamber for control, p<0.05) the monocyte transmigration in comparison to PKC- δ -inhibited control transfected ones (Fig. 7C). These data suggest that RANTES/CCL5 abolishes monocyte transmigration *via* PKC- δ activation and other signaling pathways may be involved in RANTES/CCL5-abolished SDC-4-induced monocyte transmigration.



Figure 7 : SDC-4 involvement in monocyte transmigration across SDC-4 transfected endothelial cell monolayer

(A) HUV-EC-Cs transfected with EGFP or SDC4WT-EGFP plasmid were cultivated in the upper chamber of modified transwell chamber, activated by TNF- α , stimulated or not by RANTES/CCL5 (3 nM) and preincubated or not with pharmacological inhibitor against PKC- α or PKC- δ (1). MM6 prestained were introduced in the upper chamber for 2 hours (2) and transmigrated MM6 in the lower chamber were quantified by flow cytometry (3).

(B, C) HUV-EC-Cs transfected with EGFP plasmid (control) or SDC4WT-EGFP (SDC4WT) were activated by TNF- α , and stimulated (grey histograms) or not (Untreated, black histograms) by RANTES/CCL5 (3 nM) (B). Transfected HUV-EC-Cs stimulated with RANTES/CCL5 (3 nM) were preincubated or not (Untreated, grey histograms) with pharmacological inhibitor against PKC- α (Gö6976, white histograms) or PKC- δ (Rottlerin, purple histograms) (C). Results are expressed as cell number/well (mean ± SEM) of MM6 that have transmigrated across HUV-EC-Cs monolayer. *p<0.05, RANTES/CCL5 *versus* untreated (B). #p<0.05 SDC4WT *versus* control (in the absence of RANTES/CCL5) (B). &p<0.05, Rottlein *versus* untreated (in the presence of RANTES/CCL5) (C). \$p<0.05 SDC4WT *versus* control (in the presence of RANTES/CCL5 and Rottlerin) (C).

Discussion

We have recently demonstrated the proangiogenic role of the chemokine RANTES/CCL5 by the use of *in vitro* and *in vivo* experimental approaches (Suffee et al., 2012) and that SDC-4 modulates RANTES/CCL5 signaling through its intracellular domain and the activation of PKC- α (Maillard et al., 2014).

In vitro and *in vivo* studies have established that leukocyte arrest during rolling is rapidly triggered by chemokines and is mediated by the binding of leukocyte integrins to immunoglobulin superfamily members, such as ICAM-1 and VCAM-1 expressed by endothelial cells. During inflammation, endothelial cells are activated by inflammatory cytokines to express adhesion molecules and synthetize chemokines that are presented on their luminal surface by interacting with membrane proteoglycans (Ley et al., 2007). RANTES/CCL5 is one of these chemokines and it was previously published that RANTES/CCL5 participates to monocyte recruitment through its GPCR CCR1 and CCR5 (Weber et al., 2001). In our static and dynamic models, RANTES/CCL5 induced monocyte arrest on endothelial cells. Moreover, the binding of RANTES/CCL5 to glycosaminoglycans chains (3Ala-RANTES/CCL5 mutant) and the oligomerization (E66A-RANTES/CCL5 mutant) are a prerequisite for its chemotaxis effect. These results correlated with previous published data (Baltus et al., 2003).

These results raise the hypothesis that SDC-4 is involved in RANTES/CCL5 signaling, leading to monocyte recruitment by endothelial cells. For that purpose, syndecan-4 constructs were established in the intracellular syndecan-4 domain. A Ser-to-Ala mutation in the C1 SDC-4 intracellular domain was introduced at position 179 (S183 in rat) and would have been expected to favor PKC-α activation (Horowitz and Simons, 1998; Murakami et al., 2002). In the second construct, the three consecutive residues Y188KK in the V domain were mutated to LQQ. This mutant has been described to have a reduced affinity to PIP2, leading to an inhibition of its PIP2-mediated PKC-α activation (Horowitz et al., 2002). The third construct has a deletion of A198, that abolished PDZ-dependent binding of syndecan-4 (Horowitz et al., 2002). Functionalization of SDC-4-EGFP constructs, transfection efficiency and membrane expression of SDC-4 wild-type (SDC4WT) and mutated in intracellular domain (S179A, L188QQ and A198del) were previously confirmed (Maillard et al., 2014). Regarding the role of the SDC-4 constructs expressed by endothelial cells on monocyte arrest upon RANTES/CCL5 stimulation, our results are quite interesting because they correlated with our previous published data concerning the involvement of SDC-4 intracellular domain in RANTES/CCL5-induced angiogenesis (Maillard et al., 2014). Indeed, increasing wild-type SDC-4 expression at their surface largely raises the level of monocyte arrest as compared to untransfected cells or to cells transfected with L188QQ or A198del. These data highlight that the intracellular domain of SDC-4, expressed on the endothelial cell surface, is involved in monocyte arrest on an endothelial cell monolayer.

Vascular endothelial cells are polarized according to the blood flow direction. A modification of the flow could activate the vascular endothelial cells through their mecanosensors as the cytoskeleton (Seneviratne et al., 2013). SDC-4 is connected with cytoskeleton through cytoskeleton associated protein such as α -actinin or integrin α 5 β 1 in focal adhesion contact (Greene et al., 2003; Okina et al., 2012) and SDC-4 has been described to be involved in FGF-2 or RANTES/CCL5 Rac1 activation (Elfenbein et al., 2009; Maillard et al., 2014) and in FGF-2 induced Cdc42 activation (Tkachenko et al., 2004). Rac1 and Cdc42 are involved in lamellipodia and filopodia formation (Nobes and Hall, 1995) and we hypothesize that Rac1 activation due to the SDC-4 intracellular domain induced the formation of filopodia that may interact with monocyte and promotes monocyte arrest on endothelial cells. Endothelial cell morphology under laminar flow indicates that SDC-4 wildtype transfected endothelial cells increased RANTES/CCL5-induced filopodia formation. In contrast, no filopodia formation was observed in L188QQ or A198del transfected transfected cells or GAG-deficient RANTES/CCL5-stimulated SDC-4 wild-type transfected cells. Moreover, no filopodia formation was observed in co-transfected cells with SDC-4 wild-type and Rac1 or Cdc42 dominant negative form (data not shown). These data suggest that intracellular domain of SDC-4 mediates RANTES/CCL5-induced filopodia formation through GAG binding which could immobilize monocyte and explain the effect of SDC-4 in monocyte recruitment.

Among syndecans, syndecan-1 has been demonstrated to play a role in leukocyteendothelial interactions. Indeed, in SDC-1 knock-out mice, the lack of syndecan-1 leads to enhanced leukocyte-endothelial cell interactions, increased angiogenesis and increased inflammatory responses (Götte et al., 2005). The authors suggested that SDC-1 acts as a negative regulator of polymorphonuclear leukocytes and monocyte adhesion to endothelial cells. Although somewhat quite in contrast with the study mentioned above, our data highlights the fact that SDC-4 plays a role in leukocyte-endothelial interactions, strikingly through its intracellular domain. We hypothesize that the altered ability of SDC-4 to activate PKC- α and potentially downstream effectors such as members of the Rho family of small GTPases may disturb the leukocyte-endothelial interaction. Moreover, it has been shown that RANTES/CCL5 mediated T-cell activation and chemotaxis requires Rho GTPase activity (Clissi et al., 2000). We suggest that SDC-4 modulation of RANTES/CCL5-induced monocyte arrest could be a consequence of SDC-4-dependant intracellular signaling pathways. Decrease of RANTES/CCL5-induced monocyte adhesion to SDC-4 wild-type transfected endothelial cells deficient in PKC- α , PKC- δ , RhoA, RhoG or Rac1 raise the suggestion that RANTES/CCL5-induced monocyte adhesion is dependent of intracellular signaling pathway activated by SDC-4. PECAM-1 is a mecanosensor which induced expression of adhesion molecules such as E-selectin, ICAM-1 or VCAM-1. The augmentation of these adhesion molecule will increase the recruitment of circulating cells (monocytes, dendritic cells, T lymphocytes) (Seneviratne et al., 2013). Indeed, PKC-α has been shown to participate to the activation of endothelial cells by enhancing transcription of genes encoding for adhesion molecules such as ICAM-1 or VCAM-1 (Ishizuka et al., 1998). Cells transfected with SDC-4-EGFP wild-type showed an increase of membrane expression of ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 and E-selectin adhesion molecule in comparison to EGFP transfected ones. Together, our data suggest that RANTES/CCL5-induced monocyte arrest on endothelial cells is dependent on SDC-4 intracellular signaling pathway activation and adhesion molecule membrane expression through SDC-4 intracellular domain.

Monocyte recruitment is a process with successive steps. After monocyte arrest and adhesion on endothelium, the monocyte needs to transmigrate across the endothelial cell monolayer to reach the tissue. PECAM-1 and VE-cadherin are two adhesion molecules involved in the transmigration step. PECAM-1 molecules interact together between endothelial cell and monocyte (Woodfin et al., 2007) and the phosphorylation state of VE-cadherin regulates the tight junction opening between both endothelial cells (Wessel et al., 2014). RANTES/CCL5 has been showed to promotes leukocyte transmigration through its GAG-binding motif (Baltus et al., 2003). We investigate the role of SDC-4 in monocyte transmigration using a modified transwell chamber model. Transfected endothelial cells with SDC-4 wild-type increased monocyte transmigration. Moreover, RANTES/CCL5 abolished the SDC-4-increased monocyte transfected with control plasmid deficient in PKC- δ whereas is decreased in SDC-4 transfected endothelial cells deficient in PKC- δ . This surprising data suggests that SDC-4 increased monocyte transmigration only in absence of RANTES/CCL5.

Our results are consistent with previously published data, suggesting a dual role of RANTES/CCL5 and SDC-4 in monocyte recruitment. In the first step of monocyte recruitment, RANTES/CCL5 bind to heparan sulfate chains of SDC-4 and increased monocyte arrest. In the transmigration step, RANTES/CCL5-SDC-4 complex prevents the transmigration of the monocyte across the monolayer. Our hypothesis is that endothelial cell catches the monocyte and keeps it to the membrane by forming a complex between RANTES/CCL5 bound to HS chains of SDC-4 expressed at the membrane of the endothelial cell and to the GPCR CCR1 and/or CCR5 expressed at the membrane of the monocyte (Fig. 8).



Figure 8 : Hypothetic SDC-4 modulation of RANTES/CCL5-induced monocyte recruitment

Overexpression of SDC-4 by HUV-EC-Cs increases membrane expression of adhesion molecules ICAM-1 and PECAM-1 and filopodia formation under flow. Monocyte adhesion on HUV-EC-Cs and transmigration across HUV-EC-Cs monolayer are increased in SDC-4 overexpressed HUV-EC-Cs (A). RANTES/CCL5 increases filopodia formation under flow and membrane expression of adhesion molecules (VCAM-1, PECAM-1, E-selectin) in SDC-4 overexpressed HUV-EC-Cs. RANTES/CCL5-induced monocyte adhesion is increased through SDC-4 intracellular domain and intracellular signaling pathway (PKC- α , PKC- δ , RhoA, RhoG, Rac1). In contrast, RANTES/CCL5 decreases monocyte transmigration across SDC-4 overexpressed HUV-EC-Cs monolayer. It could be explain by formation of complex between SDC-4 (HUV-EC-Cs), RANTES/CCL5 and GPCR (monocyte) which keeps monocyte at the HUV-EC-Cs membrane and prevents transmigration (B).

In summary, our data demonstrate that SDC-4 is a typical co-receptor for the chemokine RANTES/CCL5 and that the interaction of both partners leads to increase monocyte recruitment. Regarding the multiple role of RANTES/CCL5 in various pathologies, including cancer, viral diseases and inflammation, deciphering the mechanism by which RANTES/CCL5 exerts its biological activities is a preliminary step to develop new therapeutic strategy, for example by targeting the binding of the chemokine to its proteoglycan receptor.

Material and methods

Antibodies and reagents

RANTES/CCL5 and RANTES/CCL5 GAG-deficient mutant (R47E and ⁴⁴AANA⁴⁷ (3Ala)) and MCP-1 were synthesized by L. Martin and C. Vita (CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France) as previously described (Charni et al., 2009; Suffee et al., 2012) and used at 3 nM. Fibronectin (100 µg/ml) was from BD Biosciences Pharmingen (Le Pont de Claix, France). DAPI (1 µg/ml, 4',6'-diamidino-2-phénylindole, a nucleus marker) was from Roth (Lauterbourg, France). CMTMR (10 µM, 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine, a cytosolic marker) was from Invitrogen (Life Technologies, Cergy Pontoise, France). CPD (5 µM, Cell Proliferation Dye eFluor 670, a cytosolic marker) was from eBioscience (eBioscience S.A.S, Paris, France). PKC- α/β 1 inhibitor Gö6976 (1 µM), PKC- δ inhibitor Rottlerin (1 µM) and RhoA/RhoG inhibitor C3 exoenzyme (10 ng/ml) were from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Rac1 inhibitor NSC (1 µM) was from Millipore (Millipore S.A.S, Guyancourt, France). TNF- α (1 ng/ml, Tumor Necrosis Factor α) was from Gibco (Life Technologies).

Antibodies were used at a 1 μ g/ml concentration: primary antibodies mouse IgG1 anti-human ICAM-1 (P2A4) was from Millipore, mouse IgG1 anti-human PECAM-1 (JC70), mouse IgG2a anti-human E-selectin (CTB202) and rat IgG1 (M/K-2) anti-human VCAM-1 were from Santa Cruz Biotechnology (Tebu Bio, Le Perray-en-Yvelines, France). Isotype controls, mouse IgG1, mouse IgG2a and rat IgG1 were from BD Biosciences Pharmingen. Secondary antibodies Alexa Fluor 647-goat anti-mouse IgG and Alexa Fluor 647-goat anti-rat IgG were from Invitrogen.

cDNA contructs

Syndecan-4 plasmids pEGFP-N3 (Control), pEGFP-N3-SDC-4 wild-type (SDC4WT), pEGFP-N3-SDC-4-S179A (S179A), pEGFP-N3-SDC-4-L188QQ (L188QQ), pEGFP-N3-SDC-4-A198del (A198del) were obtained as previously described (Maillard et al., 2014).

Cell culture, transfection and transduction

Human umbilical vein endothelial cells (HUV-EC-Cs, N° CRL-1730, ATCC) were cultured as previously described (Suffee et al., 2012). Mono-Mac 6 (MM6, Institute for Immunology, University of Munich, Germany) were cultured in RPMI 1640 supplemented with 10 % fetal calf serum (Lonza, Levallois-Perret, France) and 1 % penicillin-streptomycin (Lonza).

HUV-EC-Cs were harvested and 10^6 cells were incubated with 5 µg of plasmid in 100 µl Amaxa cell line nucleofector solution V (Lonza). Cells were transfected using protocol V-001 of AMAXA nucleofector device II (Lonza). Transfected cells were cultured at 10^6 cells/ml in ECBM2 12 % serum. After 8 hours, dead cells were removed and fresh media was added. The cell transfection efficiency was verified by flow cytometry as previously described (Maillard et al., 2014).

Flow cytometry

Transfected cells were treated 32 hours after the transfection by TNF- α for 16 hours and then incubated or not with RANTES/CCL5 for 2 hours. Transfected cells were fixed and adhesion molecule expression at transfected endothelial cell membrane was assessed by the use of specific antibodies directed against ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 or E-selectin or with isotype controls revealed by Alexa Fluor 647-goat anti mouse IgG or Alexa Fluor 647-goat anti rat IgG as secondary antibodies. Adhesion molecule membrane expression of transfected (EGFP positive) endothelial cells was analyzed by flow cytometry.

Monocyte arrest in static condition

HUV-EC-Cs transfected cells were incubated at 3.10^5 cells in 8-well labtek for 24 hours to obtain a monolayer. HUV-EC-Cs were then stained with CMTMR. After 16 hours of TNF- α treatment, transfected cells were incubated or not with RANTES/CCL5 for 2 hours. Pre-stained MM6 with DAPI were added for 30 minutes. Cells were then fixed and the number of monocytes arrested on HUV-EC-Cs monolayer was quantified under fluorescence microscopy (Zeiss, AXIOPHOT). In parallel, HUV-EC-Cs incubated with RANTES/CCL5 were pretreated or not with PKC- α , PKC- δ , Rac1 or RhoA/RhoG pharmacological inhibitor.

Monocyte arrest under flow condition

HUV-EC-Cs transfected cells were incubated at 4.10⁵ cells in μ -slide flow chamber (μ -slide I^{0.4}Luer, Biovalley, , Marne la Vallée, France) for 24 hours to obtain a monolayer. HUV-EC-Cs were then stained with CMTMR. After 16 hours of TNF- α treatment, transfected cells were incubated or not with RANTES/CCL5 for 2 hours. Pre-stained MM6 with DAPI were added under flow condition at 0.67 dyn/cm² with peristaltic pump (Miniplus 2, Gilson, Villiers-le-Bel, France) for 10 minutes. Cells were then fixed and the number of monocytes arrested on HUV-EC-Cs monolayer was quantified under fluorescence microscopy (Zeiss, AXIOPHOT). In parallel, HUV-EC-Cs incubated with RANTES/CCL5 were pretreated or not with PKC- α or RhoA/RhoG pharmacological inhibitor.

Monocyte transmigration in modified transwell chamber

HUV-EC-Cs transfected cells were incubated at 2,5.10⁵ cells in the upper chamber preacoated by fibronectin of a Boyden transwell chamber (Beckton Dickinson, Le Pont de Claix, France) for 32 hours to obtain a monolayer. HUV-EC-Cs were then activated 16 hours by TNF- α and incubated or not with RANTES/CCL5 for 2 hours. Pre-stained MM6 with CPD were added in the upper chamber for 2 hours and MCP-1 solution in the lower chamber. Monocytes in the lower chamber were then quantified by flow cytometry. In parallel, HUV-EC-Cs incubated with RANTES/CCL5 were pretreated or not with PKC- α or PKC- δ pharmacological inhibitor.

Live fluorescent microscopy

HUV-EC-Cs transfected cells were seeded on a glass bottom dish (MatTek Corporation, Ashland, MA, USA). Transfected cells were stimulated by TNF α for 16 hours 32 hours after the transfection and then incubated or not with RANTES/CCL5 wild type or GAG-deficient (R47E or 3Ala) for 2 hours. Morphology of HUV-EC-Cs was analyzed under flow condition at 0.67 dyn/cm² with peristaltic pump (Miniplus 2, Gilson, Villiers-le-Bel, France) for 10 minutes by confocal laser scanning fluorescence microscopy (model LSM 510 invert, Carl Zeiss, Jena, Germany). EGFP-SDC-4 was monitored at 488-nm argon excitation using a 510 to 535 nm band pass barrier filter.

Statistical analysis

Results are presented as mean \pm SEM. Statistical significance was assessed by oneway analysis of variance (ANOVA) test performed with the Statview software (StatView 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA). A P value of < 0.05 was used as the criterion of statistical significance.

Acknowledgements

L. Maillard was supported by a fellowship from Ministère de la Recherche et de l'Enseignement Supérieur, France.

The collaboration with the Biosignal Research Center from Kobe, Japan, was supported by grants from University Paris 13, France.

The authors are grateful to Roger Vranckx (INSERM U698, Paris, France) for his help in plasmid construction.

RANTES/CCL5 forms and MCP-1/CCL2 were a generous gift provided by Loïc Martin, CEA Saclay, France.

These results were obtained in teamwork with Hanna Hlawaty, Véronique Friand, Nadine Suffee, Fanny Chmilewsky, Oualid Haddad, Emeline Desbois, Sana Bakhouche, Christelle Laguillier, Erwan Guyot, Olivier Oudar, Angela Sutton and Nathalie Charnaux. Naoaki Saito and Takehiko Ueyama from Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan collaborated to this work.

These data resulted in two **poster communication** at the 82nd European Atherosclerosis Society congress (Madrid, Spain, 31/05-03/06/2014) and at the 10th Nouvelle Société Française d'Athérosclérose congress (Biarritz, France, 19-21/06/2014).

L. Maillard, V. Friand, N. Suffee, H. Hlawaty, O. Haddad, E. Desbois, S. Bakhouche, F. Chmilewsky, C. Laguillier-Morizot, E. Guyot, B. Richard, O. Oudar, N. Saito, T. Ueyama, D. Letourneur, N. Charnaux, A. Sutton.

Syndecan-4 intracellular domain orchestrates RANTES/CCL5-induced monocyte arrest on endothelial cell monolayer under flow.

Discussion

Une activation de l'endothélium peut être causée par différents facteurs tels qu'une modification du flux sanguin, une infection ou la présence de facteurs pro-inflammatoires ou pro-angiogéniques. Suivant le stimulus, les cellules endothéliales peuvent exprimer des molécules d'adhérence à leur surface apicale (en contact avec le sang) afin de faciliter le recrutement de cellules circulantes immunitaires ou acquérir un phénotype prolifératif et migratoire et enclencher un processus angiogénique.

Lors de l'athérosclérose, l'obstruction artérielle provoque la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (cytokines, chimiokines, facteurs de croissances) permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins depuis le *vasa vasorum* présent dans l'adventice. Les nouveaux vaisseaux sanguins formés dans la plaque d'athérome augmentent la taille de la plaque et peuvent la déstabiliser, risquant de causer sa rupture (Sluimer and Daemen, 2009). Au cours du processus tumoral, la sécrétion de facteurs proangiogéniques par les cellules tumorales et/ou les Macrophges Associés aux Tumeurs (TAM) favorisent une néoangiogenèse augmentant la croissance de la tumeur. Parmi ces facteurs proangiogéniques, il a été montré que la chimiokine RANTES/CCL5 jouait un rôle important dans l'angiogenèse tumorale (Soria and Ben-Baruch, 2008).

Notre laboratoire a récemment démontré le rôle pro-angiogénique de RANTES/CCL5 *in vitro* sur une lignée de cellules endothéliales matures, les HUV-EC-Cs, et *in vivo* dans un modèle d'implantation sous-cutanée chez le rat (Suffee et al., 2012). RANTES/CCL5 peut se fixer à la membrane de cellules endothéliales par l'intermédiaire de ses RCPG CCR1 et CCR5. Notre laboratoire a montré que la régulation des effets de RANTES/CCL5 était liée en partie à son interaction avec les chaînes HS de différents protéoglycanes membranaires (CD44, SDC-1, SDC-4) (Slimani et al., 2003a, 2003b; Sutton et al., 2007; Charni et al., 2009; Suffee et al., 2012).

Le SDC-4 est un protéoglycane transmembranaire à chaînes HS. II a été montré que le SDC-4 stimule l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Horowitz et al., 2002; Corti et al., 2013). La fixation du facteur de croissance pro-angiogénique FGF-2 au SDC-4 entraîne son activation par déphosphorylation de la sérine 179 (183 chez le rat) de son domaine intracellulaire par une phosphatase de la famille PP1 ou PP2A (PP1/2A). Le SDC-4 déphosphorylé peut alors fixer le PIP2 au niveau de son domaine intracellulaire variable, ce qui entraîne l'oligomérisation de plusieurs SDC-4 conduisant à l'activation de la PKC-α et des protéines RhoG, Rac1 et Cdc42 (Horowitz and Simons, 1998; Horowitz et al., 1999, 2002; Tkachenko et al., 2006; Elfenbein et al., 2009, 2012). Le FGF-2 induit ainsi une angiogenèse dépendante du SDC-4 en association avec son récepteur classique FGFR (Figure 68).



<u>Figure 68</u> : Signalisation intracellulaire du SDC-4 en réponse au FGF-2 La fixation du FGF-2 aux chaînes HS du SDC-4 induit la fixation d'une phosphatase PP1/2A au domaine C2 intracellulaire du SDC-4 (1) qui déphosphoryle la sérine en position 179 (2). Le PIP2 interagit avec le domaine V intracellulaire du SDC-4 (3) ce qui permet l'oligomérisation de plusieurs SDC-4 (4). Les SDC-4 oligomérisés activent des voies de signalisation intracellulaires telles que la PKC- α , RhoG, Rac1 et Cdc42 (5) conduisant à une angiogenèse (6) (Horowitz and Simons, 1998; Horowitz et al., 1999, 2002; Tkachenko et al., 2006; Elfenbein et al., 2009, 2012).

RANTES/CCL5 peut se fixer au SDC-4 de manière similaire au FGF-2 et notre laboratoire a récemment suggéré que l'effet pro-angiogénique de RANTES/CCL5 était dépendant de sa capacité à se fixer aux protéoglycanes membranaires, et plus particulièrement au CD44, SDC-1 et SDC-4 (Suffee et al., 2012).

Choix des outils

Ces différents travaux nous ont conduits à déterminer si le SDC-4 constituit un corécepteur fonctionel de RANTES/CCL5, c'est-à-dire, si l'effet de RANTES/CCL5 était dépendant d'une signalisation intracellulaire induite par l'activation du SDC-4. Trois mutants intracellulaires du SDC-4 ont été développés au laboratoire. Le premier mutant intracellulaire est le mutant S179A, la sérine en position 179 (183 chez le rat) est mutée en

alanine, empêchant le SDC-4 d'être phosphorylé. La phosphorylation de cette sérine maintient le SDC-4 dans un état inactif et il a été montré que cette mutation permettait une activation constitutive de la PKC- α (Horowitz and Simons, 1998). Le deuxième mutant intracellulaire est le mutant L188QQ, la tyrosine 188 et les lysines 189 et 190 (192, 193 et 194 respectivement chez le rat) impliqués dans la liaison du PIP2 sont mutés respectivement en leucine, glutamine et glutamine. Le PIP2 est important pour l'activation de la PKC- α par le SDC-4 et il a précédemment été montré que ces mutations empêchent la fixation du PIP2 au domaine intracellulaire du SDC-4 muté (Horowitz et al., 2002). Le troisième mutant intracellulaire est le mutant A198del où l'alanine en position 198 (202 chez le rat) est délétée. Cette alanine en position C-terminale fait partie du motif EFYA, séquence impliquée dans la fixation des protéines à domaines PDZ. Plusieurs études ont montré que la délétion de l'alanine C-terminale perturbe la fixation des protéines à domaine PDZ, dont la phosphatase de la famille PP1/2A fait partie. Cette phosphatase est essentielle dans l'activation du SDC-4 étant donné qu'elle déphosphoryle la sérine en position 179 (Gao et al., 2000; Horowitz et al., 2002; Tkachenko et al., 2006).

Afin de déterminer l'importance du SDC-4 et de son domaine intracellulaire dans l'effet pro-angiogénique de RANTES/CCL5, ces différents mutants du SDC-4 ainsi que le SDC-4 sauvage ont été fusionnés avec la protéine fluorescente EGFP du coté C-terminal intracellulaire du SDC-4 dans un plasmide pEGFP-N3. Nous avons choisi un marquage en Cterminal intracellulaire plutôt que N-terminal extracellulaire afin de s'affranchir de la perte de fluorescence qui pourrait être due au clivage de l'ectodomaine du SDC-4 par des protéases (Manon-Jensen et al., 2013). Les différents plasmides pEGFP-N3 (control), pEGFP-N3-SDC-4 (SDC4WT), pEGFP-N3-SDC-4-S179A (S179A), pEGFP-N3-SDC-4-L188QQ (L188QQ) et pEGFP-N3-SDC-4-A198del (A198del) ont été transfectées transitoirement par nucléofection dans une lignée de cellules endothéliales matures, les HUV-EC-Cs. Après avoir vérifié l'efficacité de transfection de nos plasmides (Article 1, Figure 1), nous avons vérifié que l'addition d'une protéine fluorescente en C-terminal intracellulaire ne perturbait pas la migrtion induite par RANTES/CCL5 (Figure 43). Le SDC-4 étant une protéine transmembranaire, nous avons confirmé par cytométrie en flux, western blot et microscopie confocale que toutes les formes de SDC-4-EGFP (sauvage et mutantes) sont exprimées à la membrane des cellules HUV-EC-Cs (Article 1, Figure 1 et Figure 44).

Le SDC-4 est un protéoglycane portant trois chaînes GAG de type HS dans sa partie extracellulaire. La surexpression du SDC-4 ne sature pas les enzymes responsables de la glycosylation (EXT-1 et EXT-2) et les GAG portés par le SDC-4 sont sulfatés (Article1, Figure 1 et Figures 45 et 46). Nous avons également éteint l'expression du SDC-4 par l'utilisation d'un siRNA ciblant le SDC-4 puis nous avons restauré son expression avec le plasmide pEGFP-N3-SDC-4. Les cellules exprimant seulement le SDC-4 exogène (siRNA anti-SDC-4 puis plasmide

SDC-4) ont une migration induite par RANTES/CCL5 plus faible que les cellules exprimant le SDC-4 endogène et exogène (siRNA control puis plasmide SDC-4), ce qui nous laisse penser que les cellules surexprimant le SDC-4 (endogène et exogène) possèdent plus de sites de fixation pour RANTES/CCL5 que les cellules exprimant un SDC-4 restauré (seulement exogène) (Figure 47). Ces différents résultats confirment que la surexpression du SDC-4 n'induit pas une limitation des capacités de glycosylation ni de sulfatation du SDC-4.

Tous ces résultats nous confirment que nos constructions et notre modèle de surexpression nous permettent d'étudier l'implication du SDC-4 et du domaine intracellulaire du SDC-4 dans les effets pro-angiogéniques de RANTES/CCL5.

Analyse du processus angiogénique

L'angiogenèse est un processus en plusieurs étapes. Nous avons montré que le SDC-4 était impliqué dans plusieurs de ces étapes. Pour former un nouveau vaisseau sanguin, les cellules endothéliales doivent se déplacer vers un gradient chimiotactique. Nous avons montré que le SDC-4 participe à la fois la migration et l'invasion des HUV-EC-Cs induite par RANTES/CCL5 de manière dépendante du domaine intracellulaire du SDC-4. En effet, la surexpression du SDC-4 sauvage ou muté sur la sérine 179 potentialise l'effet pro-migratoire induit par RANTES/CCL5 par rapport aux cellules surexprimant les deux autres mutants du SDC-4 (L188QQ ou A198del). De plus, en absence de stimulation les cellules surexprimant la forme S179A migrent plus que les cellules surexprimant les trois autres formes (sauvage, L188QQ ou A198del) (Article 1, Figure 2 et Figure 48).

La migration est un processus nécessitant que la cellule s'étale sur le support puis se détache au niveau du pôle postérieur et se rétracte vers le pôle antérieur lui permettant une migration directionnelle. Cette migration nécessite l'implication du cytosquelette. Le cytosquelette d'actine forme des points de contacts focaux avec le support au pôle antérieur de la cellule puis les microtubules et la myosine vont rétracter le pôle postérieur de la cellule vers le pôle antérieur afin que la cellule migre de manière directionnelle. Ce processus fait intervenir de nombreuses protéines telles que la PKC- α , Rac1 et Cdc42 (Woodham and Machesky, 2014). RANTES/CCL5 permet la formation d'une polarisation de la cellule. RANTES/CCL5 induit une rétractation du pôle postérieur des cellules surexprimant le SDC-4 sauvage ou muté sur la sérine 179 mais pas des cellules surexprimant les deux autres mutants du SDC-4 (L188QQ ou A198del) (Article 1, Figure 2). Par ailleurs, l'étalement des cellules induit par RANTES/CCL5 est également dépendant du SDC-4 et de son domaine intracellulaire (Article 1, Figure 3). Le SDC-4 est également impliqué dans l'adhérence des cellules à un support et RANTES/CCL5 stimule l'adhérence induite par le SDC-4. En effet, la surexpression du SDC-4 sauvage entraîne une augmentation de l'adhérence cellulaire et RANTES/CCL5 induit davantage l'adhérence des cellules surexprimant le SDC-4 sauvage. De plus, l'adhérence induite par RANTES/CCL5 est dépendante de l'activation du domaine intracellulaire du SDC-4 (Figure 51).

Le domaine intracellulaire du SDC-4 est impliqué dans l'angiogenèse *in vitro* induite par RANTES/CCL5 en favorisant la formation de réseaux vasculaires. En effet, la surexpression du SDC-4 sauvage ou muté sur la sérine 179 potentialise l'angiogenèse induite par RANTES/CCL5 par rapport aux cellules surexprimant les deux autres mutants du SDC-4 (L188QQ ou A198del) (Article 1, Figure 3).

Tous ces résultats nous suggèrent que le SDC-4, par l'intermédiaire de son domaine intracellulaire, est impliqué dans plusieurs étapes du processus angiogénique induit par RANTES/CCL5.

<u>Rôle de la PKC-α</u>

L'activation du SDC-4 semble importante pour réguler l'effet de RANTES/CCL5. Il a été montré que l'activation du SDC-4 nécessite la déphosphorylation de la sérine 179 (183 chez le rat) (Horowitz and Simons, 1998). Nous avons montré que RANTES/CCL5 pouvait déphosphoryler la sérine 179 de manière similaire au FGF-2, et donc activer le SDC-4 (Article 1, Figure 4). Il a précédemment été montré que cette déphosphorylation induite par le FGF-2 conduisait à l'activation de la PKC- α (Horowitz and Simons, 1998). Nous avons voulu vérifier si la signalisation intracellulaire dépendante du SDC-4 induite par RANTES/CCL5 était semblable à celle induite par le FGF-2. Etant donné que l'activation de la PKC- α nécessite sa translocation membranaire (Collazos et al., 2006), nous avons déterminé que le SDC-4 était nécessaire à la translocation membranaire de la PKC- α induite par RANTES/CCL5 par western blot et microscopie confocale et qu'une modification du domaine intracellulaire du SDC-4 perturbait cette activation. En effet, RANTES/CCL5 permet une translocation membranaire de la PKC- α pour les cellules surexprimant le SDC-4 sauvage ou muté sur la sérine 179 mais pas pour les cellules surexprimant les deux autres mutants du SDC-4 (L188QQ ou A198del). De plus, en absence de stimulation, la PKC- α est présente à la membrane de cellules surexprimant la forme S179A (confirmant les résultats précédemment publiés (Horowitz and Simons, 1998)) mais pas à la membrane de cellules surexprimant les trois autres formes (sauvage, L188QQ ou A198del) (Article 1, Figure 5 et Figure 49).

RANTES/CCL5 est une chimiokine qui se lie à ses RCPG « classiques » CCR1 et CCR5. Il a été montré que bloquer l'interaction de RANTES/CCL5 avec CCR5 perturbait

l'augmentation calcique intracellulaire induite par la chimiokine (Barroso-Gonzalez et al., 2009). La PKC- α est classiquement décrite comme une kinase nécessitant la fixation de calcium pour son activation. L'activation de la PKC- α induite par RANTES/CCL5 pourrait être à la fois dépendante du SDC-4 et de ses récepteurs CCR1 et/ou CCR5. Afin de déterminer si l'activation de la PKC- α induite par RANTES/CCL5 est dépendante uniquement du SDC-4 ou en association avec ses RCPG, nous avons étudié en microscopie confocale la translocation de la PKC-α de cellules surexprimant le SDC-4 mais déficientes en CCR1, CCR5 ou les deux RCPG. Il s'avère que la délétion d'un seul des RCPG conduit à l'incapacité de RANTES/CCL5 d'induire la translocation membranaire de la PKC- α (Figure 57). Ceci suggère que les RCPG et le SDC-4 agissent de concert pour induire l'activation de la PKC- α . Notre laboratoire a précédemment montré que le SDC-4 formait un complexe avec le récepteur CXCR4 en présence ou en absence de la chimiokine SDF-1/CXCL12 (Hamon et al., 2004). De plus, le SDC-4 forme un complexe avec le récepteur CCR5 à la membrane de macrophages ou de cellules HeLa (carcinome épidermoïde du col utérin) en absence de chimiokine et la chimiokine RANTES/CCL5 s'associe à ce complexe (Slimani et al., 2003a, 2003b). La présence d'un complexe entre le SDC-4 et CCR5 ou CCR1 à la surface de nos cellules HUV-EC-Cs transfectées pourrait expliquer la nécessité de l'un comme l'autre des récepteurs dans la translocation membranaire de la PKC- α induite par l'axe SDC-4-RANTES/CCL5. La cotransfection de nos cellules endothéliales avec des RCPG couplés à des fluorochromes (DsRed ou mCherry par exemple) et le SDC-4-EGFP (vert) pourrait nous permettre d'analyser en microscopie confocale la formation d'un complexe. L'implication de RANTES/CCL5 dans ce complexe pourrait être déterminée en utilisant du RANTES/CCL5 biotinylé (Suffee et al., 2012) révélé à l'aide de streptavidine fluorescente (bleue).

Certaines études ont montré que le SDC-4 pouvait activer la PKC- α de manière dépendante du PIP2 et indépendamment du calcium (Horowitz and Simons, 1998; Horowitz et al., 1999, 2002; Murakami et al., 2002) en contradiction avec de nombreuses données bibliographiques qui décrivent la PKC- α comme étant calcium dépendante. La PKC- α est sous forme inactive dans le cytosol. La présence de calcium entraîne la translocation à la membrane plasmique de la PKC- α grâce à la fixation à la phosphatidylsérine (PS) et au PIP2, permettant l'activation de la kinase (Ziemba et al., 2014) (Figure 69).



Figure 69 : Mécanisme d'activation de la PKC-α

(A) La PKC- α est constituée d'un pseudopeptide inhibiteur (P), de deux domaines inhibiteurs (C1A et C1B), d'un domaine de ciblage à la membrane (C2) et d'un domaine kinase.

(B) Dans le cytosol, les domaines inhibiteurs (C1A et C1B) et le pseudopeptide inhibiteur de la PKC- α sont repliés sur le domaine kinase, rendant la protéine inactive (i). En présence de calcium, la PKC- α est transloquée à la membrane plasmique par fixation du domaine C2 avec deux molécules de phosphatidylsérine (PS) (ii). Une molécule de PS est remplacée par un PIP2, rapprochant les domaines inhibiteurs de la membrane (iii). Les deux domaines inhibiteurs se fixent à une PS et un diacylglycérol (DAG) libérant le pseudopeptide inhibiteur du domaine kinase rendant la PKC- α active (iv) (Ziemba et al., 2014).

La Phospholipase C (PLC) peut hydrolyser le PIP2 en DAG et IP3 ce qui induit une augmentation calcique et permet la translocation membranaire de la PKC- α conduisant à son activation. Cependant, il a été montré que la PKC- α pouvait être transloquée à la membrane en absence de PLC. En effet, l'association de PIP2 avec le SDC-4 permet la localisation membranaire de la PKC- α (Son et al., 2006). La présence de calcium, PS et dioléine permet l'activation de la PKC- α . Pourtant, la PKC- α peut être activée en présence de PIP2 et de SDC-4. En effet, un peptide codant pour la séquence cytoplasmique du SDC-4 permet l'activation de la PKC- α en présence de PIP2 si la sérine 179 du SDC-4 est déphosphorylée (Horowitz and Simons, 1998). La fixation du PIP2 au domaine variable du SDC-4 est un pré-requis pour l'activation de la PKC- α (Horowitz et al., 1999). De plus, l'activation de la PKC- α par le PIP2 semble être régulée par la PKC- δ (Murakami et al., 2002).

En utilisant des chélateurs de calcium (EGTA et Bapta-AM), nous avons remarqué en microscopie confocale que la PKC- α était déjà présente à la membrane de cellules surexprimant le SDC-4 avant toute stimulation et que la PKC- α redevient cytosolique en présence de RANTES/CCL5 (Figure 56). Ce résultat surprenant, ainsi que les résultats précédents, nous laissent penser que le SDC-4 peut activer la PKC- α en absence de calcium.

Une hypothèse expliquant la diminution induite par RANTES/CCL5 de l'expression membranaire de la PKC- α pourrait être que toutes les PKC- α de la cellule aient déjà été activées avant le traitement par RANTES/CCL5. La chimiokine n'activerait pas la PKC- α mais une protéine inactivant la PKC- α (boucle d'autorégulation négative). Il a été montré que la PKC- δ était la kinase responsable de la phosphorylation de la sérine 179, conduisant à l'inactivation du SDC-4 et de la PKC- α (Murakami et al., 2002).

<u>Rôle de la PKC-δ</u>

Comme pour la PKC- α , la PKC- δ nécessite sa translocation membranaire pour être activée (Collazos et al., 2006). Nous avons étudié l'implication de RANTES/CCL5 et du SDC-4 dans la translocation membranaire de la PKC- δ en microscopie confocale. Nous avons montré que RANTES/CCL5 induit la translocation membranaire de la PKC- δ via le domaine intracellulaire du SDC-4. En effet, RANTES/CCL5 permet une translocation membranaire de la PKC- δ pour les cellules surexprimant le SDC-4 sauvage ou muté sur la sérine 179 mais pas pour les cellules surexprimant les deux autres mutants du SDC-4 (L188QQ ou A198del). De plus, en absence de stimulation la PKC- δ est présente à la membrane de cellules surexprimant la forme S179A mais pas de cellules surexprimant les trois autres formes (sauvage, L188QQ ou A198del) (Figure 59).

Etant donné qu'il semble exister une boucle de régulation entre la PKC- α et la PKC- δ (Bass and Humphries, 2002), nous avons voulu analyser si l'inhibition d'une des PKC avait une incidence sur la translocation membranaire de l'autre PKC. Il s'avère que l'inhibition de la PKC- δ n'a pas d'effet sur la translocation membranaire de la PKC- α induite par l'axe RANTES/CCL5-SDC-4 alors que l'inhibition de la PKC- α induit une localisation membranaire de la PKC- δ en absence de stimulation et qui reste stable après une stimulation par RANTES/CCL5 (Figure 60). Il semblerait que la PKC- α régule négativement l'activation de la PKC-δ alors que l'inverse a été décrit pour le SDC-4 (Bass and Humphries, 2002). Ces résultats ont été obtenus par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques. Les inhibiteurs pharmacologiques sont décrits comme spécifiques d'une protéine mais peuvent également inhiber à des concentrations plus importantes d'autres isoformes de cette même protéine. Par exemple, l'inhibiteur Gö6976 que nous utilisons pour inhiber la PKC- α a une concentration inhibitrice médiane (IC50) de 2.3 nM pour la PKC- α et 6.2 nM pour la PKC- β 1, démontrant la spécificité relative des inhibiteurs pharmacologiques. En revanche, cet inhibiteur n'a pas d'effet sur les PKC- δ , PKC- γ et PKC- ϵ . Afin de confirmer ces résultats, il serait intéressant de cibler directement les ARNm de la PKC- α ou de la PKC- δ par l'utilisation soit de siRNA soit de plasmides codant des formes inactives des kinases (dominant négatif).

Tous les résultats présentés en microscopie confocale concernant la translocation membranaire de la PKC- α (Figures 56, 57 et 60) et de la PKC- δ (Figures 59 et 60) nécessitent une confirmation en western blot. En effet, la microscopie confocale nous permet d'avoir une information qualitative et visuelle de la translocation membranaire en temps réel alors que le western blot nous permettrait d'obtenir une information quantitative quant à la translocation membranaire des PKC.

Implication d'une signalisation intracellulaire liée au SDC-4

Suite à l'activation de la PKC- α par l'axe FGF-2-SDC-4, il a été montré que la voie RhoG-Rac1 était activée (Elfenbein et al., 2009). Nous avons montré que RANTES/CCL5 permettait également l'activation de Rac1 par l'intermédiaire du domaine intracellulaire du SDC-4. En effet, RANTES/CCL5 active Rac1 dans des cellules surexprimant le SDC-4 sauvage ou muté sur la sérine 179 mais pas dans des cellules surexprimant les deux autres mutants du SDC-4 (L188QQ ou A198del). De plus, en absence de stimulation par RANTES/CCL5, Rac1 est déjà active dans des cellules surexprimant la forme S179A du SDC-4 mais pas dans des cellules surexprimant les trois autres formes (sauvage, L188QQ ou A198del) (Article 1, Figure 5). L'activation constitutive de Rac1 dans des cellules exprimant le mutant S179A du SDC-4 pourrait être expliquée par l'activation constitutive de la PKC- α que nous avons précédemment décrit (Article 1, Figure 5). En effet, il a été montré qu'en réponse au FGF-2, la PKC- α activée par le SDC-4 pouvait induire la forme active de Rac1 (Elfenbein et al., 2009).

Nous avons montré que le SDC-4 régulait les effets pro-angiogéniques de RANTES/CCL5. Etant donné que cette régulation passe par l'activation du SDC-4 et de son domaine intracellulaire, nous nous sommes posé la question de la signalisation intracellulaire impliquée dans l'angiogenèse induite par l'axe RANTES/CCL5-SDC-4. Pour ce faire, nous avons analysé l'adhérence, la migration et l'angiogenèse in vitro induites par RANTES/CCL5 d'HUV-EC-Cs surexprimant SDC-4 en présence le d'inhibiteurs pharmacologiques de différentes protéines intracellulaires. Nous avons remarqué que la PKC- α , PKC- δ , RhoA et RhoG sont impliquées dans l'adhérence (Figure 53), que la PKC- α , PKC-δ, RhoA, RhoG, PP1/2A, Rho Kinase, JNK/SAPK, MAPK, Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans la migration (Article 1, Figure 4 et Figure 54) et que la PKC- α , PKC- δ , PP1/2A, Rac1 et Cdc42 sont impliquées dans l'angiogenèse in vitro (Article 1, Figure 4 et Figure 55). Ces résultats concordent avec de précédents résultats montrant l'implication de la voie PKC- α -MAPK dans l'angiogenèse in vivo (Corti et al., 2013) ou encore la voie RhoG-Rac1 dans la migration in vitro (Elfenbein et al., 2009). Les résultats ayant été obtenus à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, il serait intéressant d'utiliser des siRNA ciblant directement les ARNm des différentes protéines de signalisation ou des plasmides codant pour des formes inactives des protéines (dominant négatif) afin de confirmer ces résultats.

Nous avons commencé à analyser différentes voies de signalisations intracellulaires induites par l'axe RANTES/CCL5-SDC-4 impliquées dans l'adhérence (Figure 53), la migration (Figure 54) et l'angiogenèse *in vitro* (Figure 55). Il serait intéressant d'analyser si d'autres voies de signalisation, et notamment la voie PI3K, participent à l'angiogenèse induite par l'axe RANTES/CCL5-SDC-4. En effet, il a été montré l'importance de la voie PI3K-Akt dans la modulation de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Jiang and Liu, 2009). Nous pourrions également analyser l'état d'activation du facteur de transcription NFκB par l'axe RANTES/CCL5-SDC-4. Cela nous informerait sur l'effet indirect de RANTES/CCL5 et du SDC-4 dans l'angiogenèse. En effet, le facteur NFκB est impliqué dans l'angiogenèse (Tammali et al., 2011) et il favorise l'expression du SDC-4 (Zhang et al., 1999).

Implication du cytosquelette dans l'angiogenèse

Le processus angiogénique nécessite un remodelage du cytosquelette pour permettre à la cellule de s'étaler et migrer. Le SDC-4 interagit avec le cytosquelette *via* son domaine cytoplasmique. Le SDC-4 interagit avec de nombreuses protéines liées au cytosquelette telles que les protéines 4.1, ezrine, radixine et moesine (FERM) *via* son domaine C1. Le syndesmose interagit avec les domaines C1 et V du SDC-4 et avec la paxilline, une protéine permettant la formation des contacts focaux, nécessaires à l'adhérence des cellules à la matrice extracellulaire. Le domaine C2 avec la CASK, Tiam-1, syntenine, synbindine et synectine (Roper et al., 2012). De manière Rho dépendante, le SDC-4 permet également l'activation de la FAK, une protéine permettant la formation des contacts focaux (Wilcox-Adelman et al., 2002) (Figure70).



Figure 70 : Syndécane-4 et cytosquelette

Après interaction du PIP2 avec le domaine variable du SDC-4, plusieurs SDC-4 sont oligomérisés permettant l'activation de la PKC- α . Le domaine cytoplasmique du SDC-4 interagit également avec des protéines telles que CASK, l' α -actinine, le paxilline *via* le syndesmose et les protéines de la famille FERM permettant de faire le lien avec le cytosquelette d'actine (actine filamenteuse, taline, vinculine). Le domaine extracellulaire du SDC-4 interagit avec l'intégrine α 5 β 1 et la fibronectine ce qui permet la formation de contacts focaux *via* l'activation de la FAK. Le SDC-4 est ainsi un lien entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette d'actine permettant l'étalement et la migration cellulaires (Beauvais and Rapraeger, 2004).

Le domaine C2 du SDC-4 est important dans la formation des contacts focaux. La formation des contacts focaux permettant l'adhérence de cellules sur le fibronectine est dépendante à la fois des intégrines et du SDC-4 (Saoncella et al., 1999). La délétion du domaine C2 du SDC-4 réduit le nombre de contact focaux formés par des fibroblastes (Longley et al., 1999). Le domaine C2 du SDC-4 est également important pour la migration des cellules. En effet, une mutation au niveau du domaine de fixation aux protéines à domaine PDZ du SDC-4 abolit la migration induite par le FGF-2 (Horowitz et al., 2002; Tkachenko et al., 2006). L'étalement et la migration de cellules est dépendante de l'interaction entre le domaine C2 du SDC-1 ou du SDC-4 et l'intégrine α 6β4 (Wang et al.,

2014). Nos résultats suggèrent que la migration induite par RANTES/CCL5 est également dépendante du domaine de fixation aux protéines à domaine PDZ du SDC-4 (Article 1, Figure 2).

Il pourrait être intéressant d'étudier le rôle de l'axe SDC-4-RANTES/CCL5 sur la réorganisation du cytosquelette nécessaire à la migration. La présence du complexe SDC-4-RANTES/CCL5 au niveau de contacts focaux pourrait être étudiée par microscopie confocale. Il serait également intéressant d'étudier l'activation de protéines impliquées dans la formation des contacts focaux, telle que la FAK.

Analyse du recrutement monocytaire

Lors du développement de l'athérosclérose, des monocytes s'infiltrent dans l'espace sous-endothélial. L'endothélium peut donc avoir un rôle crucial dans le développement de l'athérosclérose en régulant le recrutement monocytaire. Les chimiokines ont des propriétés chimio-attractantes, elles vont attirer le monocyte vers le tissu à l'aide d'un gradient de concentration. Il a été montré que plusieurs chimiokines sont impliquées dans le recrutement monocytaire, parmi elles MCP-1/CCL2 et RANTES/CCL5 (Soria and Ben-Baruch, 2008).

Etant donné l'importance de l'endothélium et de RANTES/CCL5 dans le recrutement monocytaire, nous avons émis l'hypothèse que le SDC-4 pouvait jouer un rôle dans le recrutement monocytaire induit par RANTES/CCL5. Nous avons utilisé deux modèles de coculture. Une lignée de monocytes, les MM6, ont été cultivés en condition statique ou sous un flux laminaire sur une monocouche d'HUV-EC-Cs afin de mimer l'endothélium d'un vaisseau sanguin. Il a été montré que RANTES/CCL5 est impliqué dans le recrutement leucocytaire de manière GAG dépendante (Baltus et al., 2003). Le prétraitement des cellules endothéliales par RANTES/CCL5 favorise l'arrêt des monocytes sur la monocouche dans les deux types de co-cultures (Article 2, Figure 1). Comme publié précédemment (Baltus et al., 2003), l'utilisation d'un mutant de RANTES/CCL5 déficient dans son domaine de liaison aux GAG, le mutant ⁴⁴AANA⁴⁷ (3Ala-RANTES/CCL5), entraîne une perte de l'effet chimioattractant de RANTES/CCL5 (Article 2, Figure 1). Ces résultats nous suggèrent que les GAG sont impliqués dans les effets biologiques induits par RANTES/CCL5. Notre hypothèse est que le recrutement monocytaire pourrait résulter d'une modification d'expression de molécules d'adhérence par les cellules endothéliales en réponse à la liaison de RANTES/CCL5 au SDC-4 à la membrane des cellules endothéliales. Ainsi nous avons utilisé des mutants intracellulaires du SDC-4 et nous avons étudié son implication dans l'effet chimio-attractant de RANTES/CCL5.

La transfection des cellules endothéliales par le SDC-4 potentialise l'effet chimioattractant de RANTES/CCL5 par l'intermédiaire du domaine intracellulaire du SDC-4 dans les deux systèmes de co-culture. En effet, la surexpression du SDC-4 sauvage par les cellules endothéliales entraîne une augmentation de l'arrêt de monocyte sur ces cellules en absence de stimulation et RANTES/CCL5 favorise d'autant plus l'arrêt monocytaire sur les cellules endothéliales surexprimant le SDC-4 sauvage. De plus, la diminution d'expression du SDC-4 par ARN interférent ou la surexpression des SDC-4 mutés (L188QQ ou A198del) dans les cellules endothéliales réduit le recrutement monocytaire. L'arrêt des monocytes est plus important sur des cellules endothéliales surexprimant le SDC-4 sauvage ou les deux autres mutants du SDC-4 (L188QQ ou A198del) que ce soit en absence ou en présence de RANTES/CCL5 (Article 2, Figure 2). Nous avons précédemment montré que le SDC-4 pouvait activer la PKC- α par l'intermédiaire de son domaine intracellulaire (Article 1, Figure 5). Les résultats obtenus concernant l'implication des mutants intracellulaires du SDC-4 dans le recrutement monocytaire nous suggèrent un rôle de la PKC- α . L'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou d'ARN interférant ciblant la PKC- α ainsi que la cotransfection de cellules endothéliales HUV-EC-Cs avec le SDC-4 sauvage et un dominant négatif de la PKC- α nous permettraient de démontrer l'implication de la PKC- α dans l'effet chimio-attractant de l'axe SDC-4-RANTES/CCL5.

Les cellules endothéliales sont polarisées dans la direction du flux sanguin. Une modification du flux peut activer les cellules endothéliales à l'aide de mécanosenseurs tel que le cytosquelette (Seneviratne et al., 2013). Il a précédemment été montré que le SDC-4 se retrouvait au niveau de contact focaux avec d'autres protéines associées au cytosquelette telles que l' α -actinine ou l'intégrine α 5 β 1 (Greene et al., 2003; Okina et al., 2012). Les contacts focaux sont des complexes protéiques formant des jonctions temporaires entre la membrane plasmique et la matrice extracellulaire. La dynamique de formation des contacts focaux est indispensable à la migration cellulaire. Le réarrangement du cytosquelette entraîne d'une part le désassemblage de certains contacts focaux et d'autre part la formation de lamellipodes et de filopodes permettant la migration de la cellule. Rac1 et Cdc42 sont impliqués dans la formation de contacts focaux, de lamellipodes et de filopodes (Nobes and Hall, 1995). Nous avons précédemment montré que le SDC-4 était impliqué dans l'activation de Rac1 induite par RANTES/CCL5 (Article 1, Figure 5) et d'autres études ont montré que le SDC-4 régulait l'activation de Rac1 (Elfenbein et al., 2009) et de Cdc42 (Tkachenko et al., 2004) par le FGF-2. Nous avons émis l'hypothèse que l'activation de Rac1 par l'axe RANTES/CCL5-SDC-4 pouvait provoquer la formation de filopodes qui interagiraient avec les monocytes, ce qui expliquerait l'augmentation du recrutement monocytaire pour les cellules surexprimant le SDC-4. En analysant la morphologie des HUV-EC-Cs transfectées sous flux, il s'avère que RANTES/CCL5 induit la formation de filopodes par interaction avec les chaînes GAG du SDC-4 et par activation de son domaine intracellulaire. En effet, la surexpression du SDC-4 sauvage entraîne une formation de filopodes sous flux laminaire en absence de stimulation et le prétraitement par RANTES/CCL5 de ces cellules augmente cette formation de filopodes. En revanche, le prétraitement des cellules surexprimant le SDC-4 sauvage avec des mutants de RANTES/CCL5 déficient dans sa liaison aux GAG (3Ala-RANTES/CCL5 ou R47E-RANTES/CCL5) n'entraîne pas la formation de filopodes, démontrant l'importance de la fixation aux GAG de RANTES/CCL5 pour la formation de filopodes (Article 2, Figure 3). De plus, la surexpression du SDC-4 muté sur la sérine 179 entraîne une formation importante de filopodes sous flux laminaire que ce soit en absence ou en présence de RANTES/CCL5, alors que les cellules surexprimant les deux autres mutants du SDC-4 (L188QQ ou A198del) présentent peu de filopodes (Article 2, Figure 4).

Il a été montré que RANTES/CCL5 augmente le recrutement de lymphocytes T *via* une signalisation intracellulaire et l'activation de Rac1 (Clissi et al., 2000). En inhibant la PKC-α, PKC-δ, RhoA, RhoG ou Rac1 nous avons remarqué que le pouvoir chimioattractant de RANTES/CCL5 était fortement diminué (Article 2, Figure 5). Les résultats ayant été obtenus à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, il serait intéressant d'utiliser des siRNA ciblant directement les ARNm des différentes protéines de signalisation ou des plasmides codant pour des dominants négatifs afin de confirmer ces résultats.

PECAM-1 est un mécanosenseur qui induit l'expression de molécules d'adhérence telles que la E-sélectine, ICAM-1 et VCAM-1. L'augmentation de l'expression de ces molécules d'adhérence est corrélée avec un recrutement de cellules circulantes (Seneviratne et al., 2013). De plus, la PKC- α induit la transcription de gènes codant pour ICAM-1 et VCAM-1 (Ishizuka et al., 1998). Nous nous sommes donc intéressés à l'expression membranaire de ces quatre molécules d'adhérence et nous avons détecté en cytométrie en flux qu'elles sont toutes surexprimées à la membrane des HUV-EC-Cs surexprimant le SDC-4 (Article 2, Figure 6). Pour confirmer l'implication des ces différentes molécules d'adhérence dans l'arrêt des monocytes induits par l'axe RANTES/CCL5-SDC-4, nous pourrions supprimer l'expression de ces différentes molécules d'adhérence, par l'utilisation de siRNA par exemple. L'utilisation d'anticorps neutralisant ciblant ces quatre molécules d'adhérence pourrait également nous informer quant à leur implication dans l'arrêt des monocytes.

Toutes ces données suggèrent que le recrutement monocytaire induit par RANTES/CCL5 est régulé par une signalisation intracellulaire dépendante du SDC-4.

Le recrutement monocytaire se déroule en plusieurs étapes. PECAM-1 et la VEcadhérine sont deux molécules d'adhérence impliquées dans l'étape de diapedèse. Les molécules de PECAM-1 exprimées par le monocyte et la cellule endothéliale vont former des interactions entre elles permettant « de guider » le monocyte à proximité d'une jonction serrée entre deux cellules endothéliales (Woodfin et al., 2007) (Figure 71).



Figure 71 : Les étapes du recrutement monocytaire

Après s'être arrêté sur la cellule endothéliale par interaction avec les molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1 (1), le monocyte migre à proximité d'une jonction serrée par des interactions entre les molécules de PECAM-1 monocytaire et endothéliale (2). L'interaction entre les molécules de PECAM-1 facilite la transmigration du monocyte (3) (Woodfin et al., 2007).

Les molécules de VE-cadhérine sont uniquement exprimées par les cellules endothéliales et permettent de maintenir l'endothélium imperméable. L'état de phosphorylation de la VE-cadhérine permet de réguler l'ouverture des jonctions serrées et la transmigration des monocytes. La VE-cadhérine forme un complexe avec la p120-caténine et la β-caténine et est phosphorylée sur la tyrosine 731 et déphosphorylée sur les tyrosines 658 et 685. Lors de l'adhérence de neutrophiles avec la molécule d'adhérence endothéliale ICAM-1, les kinases endothéliales Src et Pyk2 activées phosphorylent la tyrosine 658 de la VE-cadhérine, provoquant la dissociation du complexe (Allingham et al., 2007). L'interaction du leucocyte avec la molécule d'adhérence endothéliale VCAM-1 entraîne l'activation des voies de signalisation PKC- α et Erk1/2 conduisant à l'activation de la phosphatase PTP1B qui déphosphoryle alors la β-caténine la dissociant du complexe (Deem et al., 2007; Abdala-Valencia et al., 2011). L'arrêt du leucocyte entraine la déphosphorylation de la tyrosine 731 par la phosphatase SH2 et la phosphorylation de la tyrosine 685. La VE-cadhérine phosphorylée sur la tyrosine 685 et déphosphorylée sur la tyrosine 731 est internalisée par le complexe AP-2 permettant la transmigration du leucocyte (Wessel et al., 2014) (Figure 72).





(A) A l'état basal, la VE-cadhérine est phosphorylée sur la tyrosine 731 et forme un complexe avec la p120-caténine et la β -caténine (β -cat). Elle maintient les jonctions serrées entre les cellules endothéliales.

(B) L'adhérence d'un monocyte à ICAM-1 entraîne l'activation des kinases Src et Pyk2 (1) qui phosphorylent la tyrosine 658 de la VE-cadhérine conduisant à la dissociation du complexe (2). L'adhérence d'un monocyte à VCAM-1 entraîne l'activation de la phosphatase PTP1B via la PKC- α et Erk1/2 (3) qui déphosphoryle la β -caténine conduisant à sa dissociation du complexe (4).

(C) L'adhérence des monocytes aux cellules endothéliales activent les kinases Sr et Pyk2 qui phosphorylent la tyrosine 685 de la VE-cadhérine (1) et la phosphatase SH2 qui déphosphoryle la tyrosine 731 (2). La VE-cadhérine est ensuite internalisée *via* le complexe AP-2 (3) ce qui fragilise les jonctions sérrées intercellulaires et permet la transmigration des monocytes (4) (Allingham et al., 2007; Deem et al., 2007; Abdala-Valencia et al., 2011; Wessel et al., 2014).

De manière étonnante, la surexpression endothéliale du SDC-4 favorise la transmigration des monocytes alors qu'une stimulation par RANTES/CCL5 des cellules endothéliales diminue la transmigration des monocytes à travers les cellules endothéliales surexprimant le SDC-4 allant jusqu'à abolir l'effet de la surexpression du protéoglycane (Article 2, Figure 7). De plus, l'inhibition de la PKC-δ augmente la transmigration induite par RANTES/CCL5 pour des cellules contrôles mais diminue pour des cellules surexprimant le SDC-4 (Article 2, Figure 7). Etant donné qu'il semble y avoir une signalisation intracellulaire dépendante du SDC-4, il serait intéressant d'étudier la transmigration de monocytes à travers une monocouche de cellules endothéliales surexprimant les différents mutants intracellulaires du SDC-4 (S179A, L188QQ ou A198del). L'utilisation de mutants intracellulaires du SDC-4 nous permettrait de déterminer si la transmigration des monocytes est dépendante de l'activation du SDC-4 endothélial.

Les résultats de RANTES/CCL5 dans le recrutement monocytaire suggèrent un double rôle à l'axe RANTES/CCL5-SDC-4. Dans les premières étapes, RANTES/CCL5 se fixe aux chaînes HS du SDC-4 endothélial et favorise l'arrêt des monocytes par interaction avec les RCPG monocytaires. En revanche, le complexe RANTES/CCL5-SDC-4 empêche la transmigration. Une hypothèse expliquant ce résultat serait que le monocyte adhère à l'endothélium par une interaction entre RANTES/CCL5 fixé d'un côté aux récepteurs CCR1 et/ou CCR5 exprimés à la membrane du monocyte et de l'autre côté aux chaînes HS du SDC-4 exprimé à la membrane de la cellule endothéliale (Figure 73).





RANTES/CCL5 se fixe aux chaînes HS du SDC-4 endothélial et l'active. La chimiokine fixée est reconnue par ses récepteurs classiques CCR1 et CCR5 (RCPG) de monocytes circulant ce qui provoquer l'adhérence des monocytes à la surface de la cellule endothéliale. Le SDC-4 empêche les monocytes de transmigrer en les retenant à la surface de l'endothélium à l'aide du complexe formé entre les chaînes HS du SDC-4 endothélial, RANTES/CCL5 et les RCPG monocytaires.

A l'aide d'un triple marquage (RCPG monocytaire, SDC-4 endothélial, RANTES/CCL5) et d'une analyse en microscopie confocale, nous pourrions étudier la formation d'un complexe entre les RCPG monocytaires, le SDC-4 endothélial et RANTES/CCL5. Une autre voie pourrait être l'utilisation de monocytes déficients en RCPG par l'utilisation de siRNA ou l'utilisation d'un mutant de RANTES/CCL5 déficient dans sa liaison aux GAG (3Ala-RANTES/CCL5 ou R47E-RANTES/CCL5) ou dans sa liaison aux RCPG (met-RANTES/CCL5) (Proudfoot et al., 1996).

Perspectives

Implication de l'ectodomaine du SDC-4

Nous avons précédemment montré par l'utilisation de mutants GAG déficients de RANTES/CCL5 (3Ala-RANTES/CCL5 et R47E-RANTES/CCL5) et d'enzymes clivant les chaînes GAG sulfatées (héparitinase I, héparitinase III et chondroïtinases ABC) l'importance de la liaison de RANTES/CCL5 aux GAG dans ses effets proangiogéniques (Figures 61, 62 et 65) et dans le recrutement monocytaire (Article 2). En effet, les effets biologiques induits par RANTES/CCL5 sont abolis si la chimiokine est mutée dans son domaine de fixation aux GAG (mutant 3Ala-RANTES/CCL5 ou R47E-RANTES/CCL5) ou après clivage enzymatique des chaînes GAG. Il serait intéressant de déterminer le rôle du domaine extracellulaire du SDC-4 dans les effets biologiques induits par la chimiokine RANTES/CCL5.

Le SDC-4 porte trois chaînes GAG de type HS sur les sérines 39, 61 et 63 de son ectodomaine (Manon-Jensen et al., 2013). Il a été montré que les chaînes HS du SDC-4 interagissent avec l'environnement extracellulaire (matrice extracellulaire, protéines sécrétées) (Gandhi and Mancera, 2008). La signalisation cellulaire de facteurs protéiques (facteur de croissance, cytokine, chimiokine) peut être régulée par le clivage de l'ectodomaine du SDC-4 (Shedding). En effet, après shedding de l'ectodomaine, les facteurs liés aux chaînes HS de l'ectodomaine sont relargués dans le milieu extracellulaire à distance de leurs récepteurs classiques membranaires, ce qui empêcherait toute signalisation intracellulaire. Les chaînes HS peuvent également être clivées de l'ectodomaine par des héparanases, conduisant à un SDC-4 portant un ectodomaine dépourvus de chaînes HS. La question se pose de savoir quel est le rôle biologique de l'ectodomaine protéique du SDC-4 transmembranaire et quelle pourrait être l'incidence de son clivage. Pour répondre à cette question, nous pourrions construire des mutants extracellulaires du SDC-4. La délétion de l'ectodomaine du SDC-4 nous permettrait de déterminer l'incidence de son clivage sur les effets biologiques induits par RANTES/CCL5. En mutant les sérines 39, 61 et/ou 63 en acides aminés dépourvus de groupement hydroxyle ne permettant pas la O-glycosylation (alanine par exemple), nous obtiendrons des mutants déficients d'une, deux ou trois chaînes HS. Ceci nous permettrait de déterminer le rôle de chacune des chaînes HS de l'ectodomaine.

Les chaînes HS du SDC-4 sont sulfatées en 2-N, 2-O, 6-O et 3-O. Chacune de ces sulfatations est effectuée séquentiellement par une enzyme différente, NDST, 2-O-sulfotransférase, 6-O-sulfotransférase et 3-O sulfotransférase respectivement (Alexopoulou et al., 2007). Les 2-N, 6-O et 3-O sulfatations vont concerner le glucosamine et la 2-O sulfatation l'acide iduronique. Il a été décrit pour le FGF-2 que les 2-O et 2-N sulfatations sont indispensables pour son interaction avec les chaînes HS alors que la 6-O sulfatation est nécessaire pour sa présentation au FGFR-1 par les chaînes HS. Pour RANTES/CCL5, la N-sulfatation semble moins importante que les O-sulfatations alors que les deux types de

sulfatation semblent requises pour MCP-1/CCL2 (Gandhi and Mancera, 2008). Il serait intéressant de déterminer quelles sulfatations sont importantes pour les effets de RANTES/CCL5 *via* le SDC-4. Cela pourrait être analysé en empêchant la synthèse des différentes enzymes de sulfatation, par l'utilisation de siRNA par exemple. Le degré de sulfatation des chaînes HS peut être régulé au niveau de la membrane plasmique par des sulfatases membranaires. Il existe deux sulfatases extracellulaires (Sulf-1 et Sulf-2) chez l'homme capable d'enlever les sulfates en position 6-O. Il a été montré que les sulfatases réduisent l'interaction de SDF-1/CXCL12 avec les HS alors qu'elles diminuent l'activité du FGF-2, du HGF ou du TGF- β sans déstabiliser leur liaison. Dans le cas du FGF-1 ou du VEGF, les sulfatases réduisent à la fois leur liaison aux HS et leur activité (Vives et al., 2014). Etant donné que les O-sulfatations semblent plus importantes que la N-sulfatation pour la liaison de RANTES/CCL5 aux chaînes HS, il serait intéressant de déterminer l'importance des sulfatases dans la modulation de la liaison aux chaînes HS de RANTES/CCL5 et de son activité.

Autres modèles d'étude

Notre travail s'est concentré sur une lignée de cellules endothéliales mature, les HUV-EC-Cs, dans un modèle *in vitro*. Il pourrait être intéressant d'étudier l'implication du SDC-4 dans les effets de RANTES/CCL5 sur d'autres cellules endothéliales matures (provenant de microvaisseaux (human microvascular endothelial cells (HMV-EC)) par exemple) ou sur des cellules endothéliales progénitrices.

Afin de confirmer le rôle du SDC-4 dans les effets biologiques de RANTES/CCL5, passer au modèle animal est une nécessité. Notre laboratoire a précédemment montré que RANTES/CCL5 stimulait l'angiogenèse de manière dépendante de sa liaison aux GAG dans un modèle de délivrance sous-cutanée chez le rat (Suffee et al., 2012). Des résultats préliminaires de notre laboratoire actuellement non publiés montrent que l'utilisation d'une pastille cellularisée avec des HUV-EC-Cs potentialiserait l'effet pro-angiogénique de RANTES/CCL5 *in vivo*. Des résultats préliminaires suggèrent que l'implantation d'HUV-EC-Cs préalablement transfectées avec le plasmide codant pour le SDC-4-EGFP sauvage ou muté sur la sérine 179 favorisent l'angiogenèse induite par RANTES/CCL5 dans un modèle sous-cutané chez la souris nude par rapport à des HUV-EC-Cs exprimant la forme mutée L188QQ-EGFP ou l'EGFP seule. L'étude est toujours en cours mais les résultats obtenus *in vivo* semblent concorder aux résultats obtenus *in vitro*.

Rôle du SDC-1 et balance SDC-1/SDC-4

Notre laboratoire a précédemment montré que l'effet pro-angiogénique (Suffee et al., 2012) et pro-tumoral (Sutton et al., 2007; Charni et al., 2009) de RANTES/CCL5 était dépendant de sa liaison avec le SDC-4 mais également avec le SDC-1. De même, le SDC-1 est impliqué dans les effets de MCP-1/CCL2 (Dagouassat et al., 2010).

De précédentes études (Horowitz et al., 2002; Corti et al., 2013) ainsi que celle-ci (Article 1) ont montré que le SDC-4 favorisait l'angiogenèse via son domaine intracellulaire. Des souris déficientes en SDC-1 présentent une angiogenèse plus importante (Götte et al., 2002), suggérant que le SDC-1 inhibe l'angiogenèse. D'autres études ont montré que le SDC-1 favorise certaines étapes du processus angiogénique par l'intermédiaire de son domaine extracellulaire et non intracellulaire. En effet, une perturbation de l'interaction entre le domaine extracellulaire du SDC-1 et les intégrines avß3 ou avß5 par l'utilisation de peptides entraîne une déficience de l'angiogenèse in vitro et in vivo (Beauvais et al., 2009). Une hypothèse pouvant expliquer l'effet contradictoire du SDC-1 dans l'angiogenèse serait qu'il existe un mécanisme de compensation chez les souris déficientes en SDC-1, permettant de favoriser l'angiogenèse, ce qui ne serait pas le cas lors du blocage de l'interaction entre le SDC-1 et les intégrines. Il a été montré que la perte de SDC-1 chez des souris déficientes est compensée par une plus forte expression de SDC-4 (Voyvodic et al., 2014). Etant donné que le SDC-4 peut également interagir avec des intégrines (Bass and Humphries, 2002), le SDC-4 pourrait favoriser l'angiogenèse chez des souris déficientes en SDC-1 via une interaction avec les intégrines. Bien que, le SDC-4 ne puisse pas interagir ni activer les intégrines αvβ3 et ανβ5 (Beauvais et al., 2009), il pourrait y avoir une compensation avec d'autres intégrines telle que $\alpha 5\beta 1$. En effet, le SDC-4, via l'activation de la PKC- α , est indispensable pour la formation des contacts focaux et la migration cellulaire impliquant l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (Mostafavi-Pour et al., 2003). De plus, le SDC-4 participe à la dynamique des contacts focaux en favorisant le recyclage membranaire de l'intégrine $\alpha 5\beta 1$ (déstabilisation des contacts focaux) ou de l'intégrine αvβ3 (stabilisation des contacts focaux) (Morgan et al., 2013). Chez des souris déficientes en SDC-1, le SDC-4 est surexprimé. L'intégrine $\alpha\nu\beta3$ n'interagissant plus avec le SDC-1, le SDC-4 surexprimé augmenterait d'autant plus la migration cellulaire par dynamique des contacts focaux entre les intégrines ανβ3 et α5β1. Pour confirmer cette hypothèse, nous pourrions analyser la migration de cellules déficientes à la fois en SDC-1 et en intégrine $\alpha v\beta 3$ ou $\alpha 5\beta 1$.

Le SDC-4 semble favoriser le recrutement monocytaire (Article 2) alors que le SDC-1 semble l'inhiber (Götte et al., 2005). En effet, les cellules endothéliales déficientes en SDC-1 vont exprimer plus fortement des chimiokines pro-inflammatoires (MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5, SDF-1/CXCL12) mais également des molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1,

E-sélectine) (Voyvodic et al., 2014). Etant donné que l'expression du SDC-4 est augmentée chez des souris déficientes en SDC-1 (Voyvodic et al., 2014) et que le SDC-4 favoriserait l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1 et E-sélectine (Article 2, Figure 6), le phénotype pro-inflammatoire des cellules endothéliales déficientes en SDC-1 pourrait être expliquée par une surexpression du SDC-4.

Les SDC-1 et SDC-4 sont différents d'un point de vue structurel. En effet, l'ectodomaine du SDC-1 est plus long que celui du SDC-4 (251 et 145 acides aminés respectivement). De plus, bien que les deux syndécanes portent trois chaînes HS, le SDC-1 porte également deux chaînes CS (sérines 206 et 216) (Manon-Jensen et al., 2013). Les chaînes CS sont sulfatées en position 6-O du galactosamine alors que les chaînes HS peuvent être sulfatées en 2-N, 2-O, 6-O et 3-O (Couchman, 2010). Etant donné que la fixation des ligands aux GAG des syndécanes est liée au degré et au type de sulfatation, la présence de ces deux chaînes GAG supplémentaires de type CS pourrait avoir une incidence sur la fixation de RANTES/CCL5 aux cellules. Afin de confirmer cette hypothèse, nous pourrions construire des mutants extracellulaires du SDC-1 déficients en chaînes CS et/ou HS. Les domaines intracellulaires du SDC-1 et de du SDC-4 sont également différents. Bien qu'ils aient deux domaines conservés identiques (C1 et C2), le domaine variable V central est différent, ce qui rend le SDC-1 incapable d'interagir avec le PIP2 ou avec la PKC-α et donc d'activer la PKC- α (Oh et al., 1998). Nous avons montré que l'angiogenèse induite par RANTES/CCL5 était dépendante de l'activation de la PKC-α par le domaine intracellulaire du SDC-4 (Article 1). L'incapacité du SDC-1 à activer la PKC- α pourrait avoir une incidence sur l'angiogenèse induite par RANTES/CCL5. Pour étudier cette hypothèse, nous pourrions construire un mutant chimérique avec l'ectodomaine du SDC-1 et le domaine intracellulaire du SDC-4.

Il serait intéressant d'approfondir le rôle du SDC-1 dans les effets induits par RANTES/CCL5 que ce soit dans l'angiogenèse ou dans le recrutement monocytaire. L'utilisation d'HUV-EC-Cs déficientes en SDC-1 (siRNA) ou surexprimant le SDC-1 sauvage ou muté dans son domaine intracellulaire (remplacé par le domaine intracellulaire du SDC-4, domaine d'interaction PDZ déficient) comme extracellulaire (CS et/ou HS déficient, ectodomaine déficient) pourrait répondre à cette question.

Développement de biothérapies

Il a été montré que l'infiltration monocytaire et l'angiogenèse sont deux processus induisant une augmentation de la plaque d'athérome et une déstabilisation de cette plaque. L'avancement de l'état athérosclérotique du vaisseau sanguin peut entrainer des ruptures
de plaques d'athérome conduisant à des infarctus du myocarde ou des accidents vasculaires cérébraux (Silvestre-Roig et al., 2014). Notre étude suggère que l'axe RANTES/CCL5-SDC-4 est impliqué dans ces deux processus. Cibler l'activation du SDC-4 par RANTES/CCL5 pourrait permettre de réduire la progression de l'athérosclérose et, à terme, prévenir les risques d'infarctus ou d'accident vasculaire cérébral.

Une des pistes pour empêcher l'activation du SDC-4 par RANTES/CCL5 serait de cibler le domaine intracellulaire du SDC-4. Le domaine intracellulaire du SDC-4 régule l'effet proangiogénique du FGF-2 (Horowitz et al., 2002) et nous avons montré que c'est également le cas pour l'effet pro-angiogénique de RANTES/CCL5 (Article 1). La perturbation de la fixation du PIP2 ou des protéines à domaine PDZ au SDC-4 abolit l'effet du SDC-4 sur l'angiogenèse induite par le FGF-2 (Horowitz et al., 2002) ou RANTES/CCL5 (Article 1). Un peptide inhibiteur ciblant spécifiquement le domaine variable du SDC-4 pourrait perturber la fixation du PIP2 au SDC-4 ainsi que la signalisation intracellulaire induite par le SDC-4 et conduisant à l'angiogenèse, de manière similaire au mutant L188QQ utilisé dans cette étude. Etant donné que le site de fixation aux protéines à domaine PDZ est commun à la famille des syndécanes, il semble plus intéressant de cibler le site de fixation du PIP2 car seul le SDC-4 peut interagir avec le PIP2. Nous pourrions ainsi cibler spécifiquement l'activation du SDC-4.

Une autre piste pour réguler l'activation du SDC-4 par RANTES/CCL5 est d'empêcher sa fixation au SDC-4. Nous pourrions empêcher l'interaction physique entre RANTES/CCL5 et le SDC-4 par l'utilisation de mutants du SDC-4 ou de la chimiokine.

Notre laboratoire a précédemment montré que la mutation du site de fixation aux GAG de RANTES/CCL5 (3Ala-RANTES/CCL5) diminue l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* induite par la chimiokine (Suffee et al., 2012). Par ailleurs, il a été montré que ce mutant de RANTES/CCL5 peut séquestrer la chimiokine endogène non mutée ce qui conduit à une baisse du recrutement de leucocytes. En effet, ce mutant peut s'hétérodimériser avec une molécule de RANTES/CCL5 endogène non mutée *in vivo*, ce qui la rend non fonctionnelle (Johnson et al., 2004). Etant donné l'effet du mutant GAG-déficient de RANTES/CCL5 *in vivo*, il serait envisageable de l'utiliser en thérapie anti-angiogénique ou anti-inflammatoire. L'utilisation de ce mutant chez des patients athérosclérotiques serait tout indiquée. Il permettrait de réduire le recrutement monocytaire, limitant ainsi la croissance de la plaque d'athérome et de limiter le risque de rupture de plaque par son effet anti-angiogénique. Une autre possibilité serait d'utiliser des SDC-4 dépourvus de chaînes HS (sérines 39, 61 et 63 mutées en alanines, empêchant la fixation du tetrasaccharide de liaison et donc des chaînes GAG). La thérapie génique pourrait être préconisée pour permettre l'expression d'un SDC-4

mutant. Cependant, la thérapie génique ne semble pas encore être suffisamment efficace. En effet, une étude clinique utilisant un plasmide ou un vecteur viral pour surexprimer le VEGF-A n'a pas démontré d'effet positif dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins dans les membres inférieurs ischémiés de patients (Muona et al., 2012).

Séquestrer RANTES/CCL5 à distance des cellules par l'utilisation de mimétiques de GAG pourrait être une autre approche pour empêcher l'activation du SDC-4 par la chimiokine.

Les mimétiques de GAG sont des polysaccharides ayant une structure similaire aux GAG. Ils peuvent être naturels (fucoïdane) ou synthétiques (RGTA®). Les mimétiques de GAG pourraient entrer en compétition avec les GAG endogènes. Etant structurellement similaires, les mimétiques fixeraient les protéines ayant un domaine de reconnaissance aux GAG (facteurs de croissances, cytokines et chimiokines). De cette manière, les mimétiques pourraient séquestrer les facteurs protéiques à distance des cellules. Etant donné que RANTES/CCL5 interagit avec des chaînes GAG, les mimétiques de GAG pourrait fixer RANTES/CCL5 et moduler son activité.

Les RGTA[®] sont des mimétiques de GAG synthétiques. Ce sont des dérivés de dextrane substitués de groupements carboxyméthyles, acétates et/ou sulfates. Le processus de synthèse permet de réguler le type et le degré de substitution des RGTA[®]. Outre le contrôle des substitutions, le processus de synthèse est simple, répétable et peu couteux. Notre laboratoire a montré que le degré de substitution des RGTA[®] influence l'affinité de la chimiokine SDF-1/CXCL12 pour le mimétique de GAG. De plus, les RGTA[®] inhibent l'effet promigratoire et pro-invasif de la chimiokine SDF-1/CXCL12 sur des cellules d'hépatome (Friand et al., 2009). Notre laboratoire a montré que les RGTA[®] inhibent également l'effet promigratoire et pro-invasif de la chimiokine RANTES/CCL5 sur des cellules d'hépatome (Sutton et al., 2007). Ces résultats suggèrent que le mimétique séquestrerait les chimiokines à distance des cellules.

Le fucoïdane est un minétique de GAG naturel extrait d'algues brunes. C'est un polysaccharide sulfaté, composé d'une répétition d'un disaccharide de L-fucose substitué de groupements sulfate ou d'acide uronique. Bien que sa structure soit hétérogène, il est possible de le purifier partiellement et de le fractionner.

Le fucoïdane entraîne une baisse de l'angiogenèse et potentialise l'inhibition de la sécrétion de VEGF par le Bevacizumab, un anticorps neutralisant ciblant le VEGF prescrit dans de nombreux cancers (poumon, sein, ovaire) (Dithmer et al., 2014). Le fucoïdane entraîne l'apoptose de cellules de cancer du sein et diminue l'expression du VEGF de ces cellules. Dans un modèle de souris, le fucoïdane inhibe la croissance de la tumeur du sein en stimulant l'apoptose des cellules tumorales et en inhibant la vascularisation, probablement causée par la baisse de sécrétion de VEGF (Xue et al., 2012). Le mimétique de GAG pourrait être utilisé en tant que facteur anti-angiogénique, il fixerait RANTES/CCL5 ce qui empêcherait sa présentation à ses récepteurs cellulaires.

L'ensemble de ce travail de thèse a permis de démontrer l'importance du domaine intracellulaire du SDC-4 dans les effets proangiogéniques et chimiotactiques de la chimiokine RANTES/CCL5. Ceci permet d'envisager de nouvelles avancées thérapeutiques basées sur le ciblage de l'interaction entre les chimiokines et le SDC-4.

Bibliographie

Abdala-Valencia, H., Berdnikovs, S., and Cook-Mills, J.M. (2011). Mechanisms for Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Activation of ERK1/2 during Leukocyte Transendothelial Migration. PLoS ONE *6*, e26706.

Alexopoulou, A.N., Multhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2007). Syndecans in wound healing, inflammation and vascular biology. Int. J. Biochem. Cell Biol. *39*, 505–528.

Allingham, M.J., van Buul, J.D., and Burridge, K. (2007). ICAM-1-mediated, Src- and Pyk2-dependent vascular endothelial cadherin tyrosine phosphorylation is required for leukocyte transendothelial migration. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *179*, 4053–4064.

Ambati, B.K., Anand, A., Joussen, A.M., Kuziel, W.A., Adamis, A.P., and Ambati, J. (2003). Sustained Inhibition of Corneal Neovascularization by Genetic Ablation of CCR5. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 44, 590–593.

Andrae, J., Gallini, R., and Betsholtz, C. (2008). Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. Genes Dev. 22, 1276–1312.

Appay, V., and Rowland-Jones, S.L. (2001). RANTES: a versatile and controversial chemokine. Trends Immunol. 22, 83–87.

Ara, T., Tokoyoda, K., Sugiyama, T., Egawa, T., Kawabata, K., and Nagasawa, T. (2003). Long-Term Hematopoietic Stem Cells Require Stromal Cell-Derived Factor-1 for Colonizing Bone Marrow during Ontogeny. Immunity *19*, 257–267.

Ara, T., Tokoyoda, K., Okamoto, R., Koni, P.A., and Nagasawa, T. (2005). The role of CXCL12 in the organ-specific process of artery formation. Blood *105*, 3155–3161.

Baba, F., Swartz, K., van Buren, R., Eickhoff, J., Zhang, Y., Wolberg, W., and Friedl, A. (2006). Syndecan-1 and syndecan-4 are overexpressed in an estrogen receptor-negative, highly proliferative breast carcinoma subtype. Breast Cancer Res. Treat. *98*, 91–98.

Balaji, S., King, A., Crombleholme, T.M., and Keswani, S.G. (2013). The Role of Endothelial Progenitor Cells in Postnatal Vasculogenesis: Implications for Therapeutic Neovascularization and Wound Healing. Adv. Wound Care *2*, 283–295.

Baltus, T., Weber, K.S.C., Johnson, Z., Proudfoot, A.E.I., and Weber, C. (2003). Oligomerization of RANTES is required for CCR1-mediated arrest but not CCR5-mediated transmigration of leukocytes on inflamed endothelium. Blood *102*, 1985–1988.

Baluk, P., Hashizume, H., and McDonald, D.M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. Curr. Opin. Genet. Dev. *15*, 102–111.

Barcelos, L.S., Coelho, A.M., Russo, R.C., Guabiraba, R., Souza, A.L.S., Bruno-Lima Jr., G., Proudfoot, A.E.I., Andrade, S.P., and Teixeira, M.M. (2009). Role of the chemokines CCL3/MIP-1 α and CCL5/RANTES in sponge-induced inflammatory angiogenesis in mice. Microvasc. Res. *78*, 148–154.

Barroso-Gonzalez, J., El Jaber-Vazdekis, N., Garcia-Exposito, L., Machado, J.-D., Zarate, R., Ravelo, A.G., Estevez-Braun, A., and Valenzuela-Fernandez, A. (2009). The Lupane-type Triterpene 30-Oxo-calenduladiol Is a CCR5 Antagonist with Anti-HIV-1 and Anti-chemotactic Activities. J. Biol. Chem. *284*, 16609–16620.

Bass, M.D., and Humphries, M.J. (2002). Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling. Biochem. J. *368*, 1–15.

Beauvais, D.M., and Rapraeger, A.C. (2004). Syndecans in tumor cell adhesion and signaling. Reprod. Biol. Endocrinol. RBE 2, 3.

Beauvais, D.M., Ell, B.J., McWhorter, A.R., and Rapraeger, A.C. (2009). Syndecan-1 regulates $\alpha\nu\beta$ 3 and $\alpha\nu\beta$ 5 integrin activation during angiogenesis and is blocked by synstatin, a novel peptide inhibitor. J. Exp. Med. *206*, 691–705.

Benazzi, C., Al-Dissi, A., Chau, C.H., Figg, W.D., Sarli, G., Oliveira, J.T. de, and Gärtner, F. (2014). Angiogenesis in Spontaneous Tumors and Implications for Comparative Tumor Biology. Sci. World J. 2014, 1–16.

Braunersreuther, V., Zernecke, A., Arnaud, C., Liehn, E.A., Steffens, S., Shagdarsuren, E., Bidzhekov, K., Burger, F., Pelli, G., Luckow, B., et al. (2007). Ccr5 But Not Ccr1 Deficiency Reduces Development of Diet-Induced Atherosclerosis in Mice. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *27*, 373–379.

Brooks, A.N., Kilgour, E., and Smith, P.D. (2012). Molecular Pathways: Fibroblast Growth Factor Signaling: A New Therapeutic Opportunity in Cancer. Clin. Cancer Res. *18*, 1855–1862.

Brule, S., Friand, V., Sutton, A., Baleux, F., Gattegno, L., and Charnaux, N. (2009). Glycosaminoglycans and syndecan-4 are involved in SDF-1/CXCL12-mediated invasion of human epitheloid carcinoma HeLa cells. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. *1790*, 1643–1650.

Bussolati, B., Grange, C., and Camussi, G. (2011). Tumor exploits alternative strategies to achieve vascularization. FASEB J. *25*, 2874–2882.

Buul, J.D. van, and Hordijk, P.L. (2004). Signaling in Leukocyte Transendothelial Migration. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *24*, 824–833.

Carneiro, Â.M., Barthelmes, D., Falcão, M.S., Mendonça, L.S., Fonseca, S.L., Gonçalves, R.M., Faria-Correia, F., and Falcão-Reis, F.M. (2011). Arterial Thromboembolic Events in Patients with Exudative Age-Related Macular Degeneration Treated with Intravitreal Bevacizumab or Ranibizumab. Ophthalmologica *225*, 211–221.

Carulli, S., Beck, K., Dayan, G., Boulesteix, S., Lortat-Jacob, H., and Rousselle, P. (2012). Cell Surface Proteoglycans Syndecan-1 and -4 Bind Overlapping but Distinct Sites in Laminin 3 LG45 Protein Domain. J. Biol. Chem. *287*, 12204–12216.

Ceradini, D.J., Kulkarni, A.R., Callaghan, M.J., Tepper, O.M., Bastidas, N., Kleinman, M.E., Capla, J.M., Galiano, R.D., Levine, J.P., and Gurtner, G.C. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. Nat. Med. *10*, 858–864.

Chaabane, C., Coen, M., and Bochaton-Piallat, M.-L. (2014). Smooth muscle cell phenotypic switch: implications for foam cell formation. Curr. Opin. Lipidol. Oct. 2014 *25*, 374–379.

Chalkiadaki, G., Nikitovic, D., Berdiaki, A., Sifaki, M., Krasagakis, K., Katonis, P., Karamanos, N.K., and Tzanakakis, G.N. (2009). Fibroblast growth factor-2 modulates melanoma adhesion and migration through a syndecan-4-dependent mechanism. Int. J. Biochem. Cell Biol. *41*, 1323–1331.

Charni, F., Friand, V., Haddad, O., Hlawaty, H., Martin, L., Vassy, R., Oudar, O., Gattegno, L., Charnaux, N., and Sutton, A. (2009). Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-induced

migration and invasion of human hepatoma cells. Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj. 1790, 1314–1326.

Chen, G.-S., Yu, H.-S., Lan, C.-C. e., Chow, K.-C., Lin, T.-Y., Kok, L.-F., Lu, M.-P., Liu, C.-H., and Wu, M.-T. (2006). CXC chemokine receptor CXCR4 expression enhances tumorigenesis and angiogenesis of basal cell carcinoma. Br. J. Dermatol. *154*, 910–918.

Cheng, W., Tseng, C.-J., Lin, T.T.C., Cheng, I., Pan, H.-W., Hsu, H.-C., and Lee, Y.-M. (2008). Glypican-3-mediated oncogenesis involves the Insulin-like growth factor-signaling pathway. Carcinogenesis *29*, 1319–1326.

Chew, V., Chen, J., Lee, D., Loh, E., Lee, J., Lim, K.H., Weber, A., Slankamenac, K., Poon, R.T.P., Yang, H., et al. (2012). Chemokine-driven lymphocyte infiltration: an early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma. Gut *61*, 427–438.

Chung, K.Y. (2013). Structural Aspects of GPCR-G Protein Coupling. Toxicol. Res. 29, 149–155.

Cipriani, S., Francisci, D., Mencarelli, A., Renga, B., Schiaroli, E., D'Amore, C., Baldelli, F., and Fiorucci, S. (2013). Efficacy of the CCR5 Antagonist Maraviroc in Reducing Early, Ritonavir-Induced Atherogenesis and Advanced Plaque Progression in Mice. Circulation *127*, 2114–2124.

Cizmeci-Smith, G., Langan, E., Youkey, J., Showalter, L.J., and Carey, D.J. (1997). Syndecan-4 Is a Primary-Response Gene Induced by Basic Fibroblast Growth Factor and Arterial Injury in Vascular Smooth Muscle Cells. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *17*, 172–180.

Clapp, C., Thebault, S., Jeziorski, M.C., and Escalera, G.M.D.L. (2009). Peptide Hormone Regulation of Angiogenesis. Physiol. Rev. *89*, 1177–1215.

Clissi, B., D'Ambrosio, D., Geginat, J., Colantonio, L., Morrot, A., Freshney, N.W., Downward, J., Sinigaglia, F., and Pardi, R. (2000). Chemokines fail to up-regulate beta 1 integrin-dependent adhesion in human Th2 T lymphocytes. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *164*, 3292–3300.

Cochran, S., Li, C.P., and Ferro, V. (2009). A surface plasmon resonance-based solution affinity assay for heparan sulfate-binding proteins. Glycoconj. J. *26*, 577–587.

Collazos, A., Diouf, B., Guerineau, N.C., Quittau-Prevostel, C., Peter, M., Coudane, F., Hollande, F., and Joubert, D. (2006). A Spatiotemporally Coordinated Cascade of Protein Kinase C Activation Controls Isoform-Selective Translocation. Mol. Cell. Biol. *26*, 2247–2261.

Corti, F., Finetti, F., Ziche, M., and Simons, M. (2013). The Syndecan-4/Protein Kinase Cα Pathway Mediates Prostaglandin E2-induced Extracellular Regulated Kinase (ERK) Activation in Endothelial Cells and Angiogenesis in Vivo. J. Biol. Chem. *288*, 12712–12721.

Couchman, J.R. (2010). Transmembrane Signaling Proteoglycans. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 26, 89–114.

Culley, F.J., Pennycook, A.M.J., Tregoning, J.S., Dodd, J.S., Walzl, G., Wells, T.N., Hussell, T., and Openshaw, P.J.M. (2006). Role of CCL5 (RANTES) in Viral Lung Disease. J. Virol. *80*, 8151–8157.

Czaplewski, L.G., McKeating, J., Craven, C.J., Higgins, L.D., Appay, V., Brown, A., Dudgeon, T., Howard, L.A., Meyers, T., Owen, J., et al. (1999). Identification of Amino Acid Residues Critical for Aggregation of Human CC Chemokines Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1α, MIP-1β, and RANTES

CHARACTERIZATION OF ACTIVE DISAGGREGATED CHEMOKINE VARIANTS. J. Biol. Chem. 274, 16077–16084.

Dagouassat, M., Suffee, N., Hlawaty, H., Haddad, O., Charni, F., Laguillier, C., Vassy, R., Martin, L., Schischmanoff, P.-O., Gattegno, L., et al. (2010). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 secreted by hepatic myofibroblasts promotes migration and invasion of human hepatoma cells. Int. J. Cancer *126*, 1095–1108.

Das, S.T., Rajagopalan, L., Guerrero-Plata, A., Sai, J., Richmond, A., Garofalo, R.P., and Rajarathnam, K. (2010). Monomeric and Dimeric CXCL8 Are Both Essential for In Vivo Neutrophil Recruitment. PLoS ONE *5*, e11754.

Davies, E.J., Blackhall, F.H., Shanks, J.H., David, G., McGown, A.T., Swindell, R., Slade, R.J., Martin-Hirsch, P., Gallagher, J.T., and Jayson, G.C. (2004). Distribution and Clinical Significance of Heparan Sulfate Proteoglycans in Ovarian Cancer. Clin. Cancer Res. *10*, 5178–5186.

Deem, T.L., Abdala-Valencia, H., and Cook-Mills, J.M. (2007). VCAM-1 Activation of Endothelial Cell Protein Tyrosine Phosphatase 1B. J. Immunol. *178*, 3865–3873.

Denhez, F., Wilcox-Adelman, S.A., Baciu, P.C., Saoncella, S., Lee, S., French, B., Neveu, W., and Goetinck, P.F. (2002). Syndesmos, a syndecan-4 cytoplasmic domain interactor, binds to the focal adhesion adaptor proteins paxillin and Hic-5. J. Biol. Chem. *277*, 12270–12274.

Dews, I.C., and MacKenzie, K.R. (2007). Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *104*, 20782–20787.

Dithmer, M., Fuchs, S., Shi, Y., Schmidt, H., Richert, E., Roider, J., and Klettner, A. (2014). Fucoidan Reduces Secretion and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in the Retinal Pigment Epithelium and Reduces Angiogenesis In Vitro. PLoS ONE *9*, e89150.

Dorr, P., Westby, M., Dobbs, S., Griffin, P., Irvine, B., Macartney, M., Mori, J., Rickett, G., Smith-Burchnell, C., Napier, C., et al. (2005). Maraviroc (UK-427,857), a Potent, Orally Bioavailable, and Selective Small-Molecule Inhibitor of Chemokine Receptor CCR5 with Broad-Spectrum Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Activity. Antimicrob. Agents Chemother. *49*, 4721–4732.

Doyle, B., and Caplice, N. (2007). Plaque Neovascularization and Antiangiogenic Therapy for Atherosclerosis. J. Am. Coll. Cardiol. *49*, 2073–2080.

Echtermeyer, F., Streit, M., Wilcox-Adelman, S., Saoncella, S., Denhez, F., Detmar, M., and Goetinck, P. (2001). Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. J. Clin. Invest. *107*, R9–R14.

Elfenbein, A., and Simons, M. (2013). Syndecan-4 signaling at a glance. J. Cell Sci. 126, 3799–3804.

Elfenbein, A., Rhodes, J.M., Meller, J., Schwartz, M.A., Matsuda, M., and Simons, M. (2009). Suppression of RhoG activity is mediated by a syndecan 4–synectin–RhoGDI1 complex and is reversed by PKC α in a Rac1 activation pathway. J. Cell Biol. *186*, 75–83.

Elfenbein, A., Lanahan, A., Zhou, T.X., Yamasaki, A., Tkachenko, E., Matsuda, M., and Simons, M. (2012). Syndecan 4 Regulates FGFR1 Signaling in Endothelial Cells by Directing Macropinocytosis. Sci. Signal. *5*, ra36–ra36.

De Falco, S. (2014). Antiangiogenesis therapy: an update after the first decade. Korean J. Intern. Med. 29, 1.

Fernandez, E.J., and Lolis, E. (2002). Structure, Function, and Inhibition of Chemokines. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. *42*, 469–499.

Fernández-Velasco, M., González-Ramos, S., and Boscá, L. (2014). Involvement of monocytes/macrophages as key factors in the development and progression of cardiovascular diseases. Biochem. J. *458*, 187–193.

Forman, D., Bray, F., Brewester, D., Gombe Mbalawa, C., Kohler, B., Piñeros, M., Steliarova-Foucher, E., Swaminathan, R., and Ferlay, J. (2014). Cancer Incidence in Five Continents (Lyon: IARC Scientific Publications).

Friand, V., Haddad, O., Papy-Garcia, D., Hlawaty, H., Vassy, R., Hamma-Kourbali, Y., Perret, G.-Y., Courty, J., Baleux, F., Oudar, O., et al. (2009). Glycosaminoglycan mimetics inhibit SDF-1/CXCL12-mediated migration and invasion of human hepatoma cells. Glycobiology *19*, 1511–1524.

Frooninckx, L., Van Rompay, L., Temmerman, L., Van Sinay, E., Beets, I., Janssen, T., Husson, S.J., and Schoofs, L. (2012). Neuropeptide GPCRs in C. elegans. Neuroendocr. Sci. *3*, 167.

Frueh, J., Maimari, N., Homma, T., Bovens, S.M., Pedrigi, R.M., Towhidi, L., and Krams, R. (2013). Systems biology of the functional and dysfunctional endothelium. Cardiovasc. Res. *99*, 334–341.

Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A., and Betsholtz, C. (2009). Endothelial-Mural Cell Signaling in Vascular Development and Angiogenesis. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *29*, 630–638.

Gales, D., Clark, C., Manne, U., and Samuel, T. (2013). The Chemokine CXCL8 in Carcinogenesis and Drug Response. ISRN Oncol. 2013.

Gallay, P. (2004). Syndecans and HIV-1 pathogenesis. Microbes Infect. 6, 617–622.

Gandhi, N.S., and Mancera, R.L. (2008). The Structure of Glycosaminoglycans and their Interactions with Proteins. Chem. Biol. Drug Des. *72*, 455–482.

Gao, Q.-B., Ye, X.-F., and He, J. (2013). Classifying G-protein-coupled receptors to the finest subtype level. Biochem. Biophys. Res. Commun. *439*, 303–308.

Gao, Y., Li, M., Chen, W., and Simons, M. (2000). Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. J. Cell. Physiol. *184*, 373–379.

Garlanda, C., and Dejana, E. (1997). Heterogeneity of Endothelial Cells Specific Markers. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 17, 1193–1202.

Goetz, R., and Mohammadi, M. (2013). Exploring mechanisms of FGF signalling through the lens of structural biology. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 14, 166–180.

Gong, J.-H., Uguccioni, M., Dewald, B., Baggiolini, M., and Clark-Lewis, I. (1996). RANTES and MCP-3 Antagonists Bind Multiple Chemokine Receptors. J. Biol. Chem. *271*, 10521–10527.

Götte, M. (2003). Syndecans in inflammation. FASEB J. 17, 575–591.

Götte, M., Joussen, A.M., Klein, C., Andre, P., Wagner, D.D., Hinkes, M.T., Kirchhof, B., Adamis, A.P., and Bernfield, M. (2002). Role of Syndecan-1 in Leukocyte–Endothelial Interactions in the Ocular Vasculature. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. *43*, 1135–1141.

Götte, M., Bernfield, M., and Joussen, A.M. (2005). Increased leukocyte-endothelial interactions in syndecan-1-deficient mice involve heparan sulfate-dependent and -independent steps. Curr. Eye Res. *30*, 417–422.

Granés, F., Berndt, C., Roy, C., Mangeat, P., Reina, M., and Vilaró, S. (2003). Identification of a novel Ezrin-binding site in syndecan-2 cytoplasmic domain. FEBS Lett. *547*, 212–216.

Greene, D.K., Tumova, S., Couchman, J.R., and Woods, A. (2003). Syndecan-4 associates with alpha-actinin. J. Biol. Chem. *278*, 7617–7623.

Hamon, M., Mbemba, E., Charnaux, N., Slimani, H., Brule, S., Saffar, L., Vassy, R., Prost, C., Lievre, N., Starzec, A., et al. (2004). A syndecan-4/CXCR4 complex expressed on human primary lymphocytes and macrophages and HeLa cell line binds the CXC chemokine stromal cell–derived factor-1 (SDF-1). Glycobiology *14*, 311–323.

Handel, T.M., Johnson, Z., Crown, S.E., Lau, E.K., Sweeney, M., and Proudfoot, A.E. (2005). Regulation of Protein Function by Glycosaminoglycans—as Exemplified by Chemokines. Annu. Rev. Biochem. 74, 385–410.

Hansell, C.A.H., Hurson, C.E., and Nibbs, R.J.B. (2011). DARC and D6: silent partners in chemokine regulation? Immunol. Cell Biol. *89*, 197–206.

Hansson, G.K. (2005). Inflammation, Atherosclerosis, and Coronary Artery Disease. N. Engl. J. Med. *352*, 1685–1695.

Haqqani, A.A., and Tilton, J.C. (2013). Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection. Antiviral Res. *98*, 158–170.

Heil, M., and Schaper, W. (2004). Influence of Mechanical, Cellular, and Molecular Factors on Collateral Artery Growth (Arteriogenesis). Circ. Res. *95*, 449–458.

Heldin, C.-H., and Lennartsson, J. (2013). Structural and Functional Properties of Platelet-Derived Growth Factor and Stem Cell Factor Receptors. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. *5*, a009100.

Hellier, S., Frodsham, A.J., Hennig, B.J.W., Klenerman, P., Knapp, S., Ramaley, P., Satsangi, J., Wright, M., Zhang, L., Thomas, H.C., et al. (2003). Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. Hepatol. Baltim. Md *38*, 1468–1476.

Henry, T.D., Annex, B.H., McKendall, G.R., Azrin, M.A., Lopez, J.J., Giordano, F.J., Shah, P.K., Willerson, J.T., Benza, R.L., Berman, D.S., et al. (2003). The VIVA Trial Vascular Endothelial Growth Factor in Ischemia for Vascular Angiogenesis. Circulation *107*, 1359–1365.

Hlawaty, H., Suffee, N., Sutton, A., Oudar, O., Haddad, O., Ollivier, V., Laguillier-Morizot, C., Gattegno, L., Letourneur, D., and Charnaux, N. (2011). Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression. Biochem. Pharmacol. *81*, 233–243.

Horowitz, A., and Simons, M. (1998a). Phosphorylation of the Cytoplasmic Tail of Syndecan-4 Regulates Activation of Protein Kinase Cα. J. Biol. Chem. *273*, 25548–25551.

Horowitz, A., and Simons, M. (1998b). Regulation of Syndecan-4 Phosphorylation in Vivo. J. Biol. Chem. *273*, 10914–10918.

Horowitz, A., Murakami, M., Gao, Y., and Simons, M. (1999). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate mediates the interaction of syndecan-4 with protein kinase C. Biochemistry (Mosc.) *38*, 15871–15877.

Horowitz, A., Tkachenko, E., and Simons, M. (2002). Fibroblast growth factor–specific modulation of cellular response by syndecan-4. J. Cell Biol. *157*, 715–725.

lozzo, R.V., and Sanderson, R.D. (2011). Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. J. Cell. Mol. Med. *15*, 1013–1031.

Ishida, Y., Kimura, A., Kuninaka, Y., Inui, M., Matsushima, K., Mukaida, N., and Kondo, T. (2012). Pivotal role of the CCL5/CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. J. Clin. Invest. *122*, 711–721.

Ishizuka, Kawakami, Hidaka, Matsuki, Takamizawa, Suzuki, Kurita, and Nakamura (1998). Stimulation with thromboxane A2 (TXA2) receptor agonist enhances ICAM-1, VCAM-1 or ELAM-1 expression by human vascular endothelial cells. Clin. Exp. Immunol. *112*, 464–470.

Jakobsson, L., and van Meeteren, L.A. (2013). Transforming growth factor β family members in regulation of vascular function: In the light of vascular conditional knockouts. Exp. Cell Res. *319*, 1264–1270.

Jiang, B.-H., and Liu, L.-Z. (2009). PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. Adv. Cancer Res. *102*, 19–65.

Jiang, J., Cun, W., Wu, X., Shi, Q., Tang, H., and Luo, G. (2012). Hepatitis C Virus Attachment Mediated by Apolipoprotein E Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. J. Virol. *86*, 7256–7267.

Johnson, Z., Kosco-Vilbois, M.H., Herren, S., Cirillo, R., Muzio, V., Zaratin, P., Carbonatto, M., Mack, M., Smailbegovic, A., Rose, M., et al. (2004). Interference with Heparin Binding and Oligomerization Creates a Novel Anti-Inflammatory Strategy Targeting the Chemokine System. J. Immunol. *173*, 5776–5785.

Ju, R., and Simons, M. (2013). Syndecan 4 regulation of PDK1-dependent Akt activation. Cell. Signal. *25*, 101–105.

Katsounas, A., Schlaak, J.F., and Lempicki, R.A. (2011). CCL5: A Double-Edged Sword in Host Defense Against the Hepatitis C Virus. Int. Rev. Immunol. *30*, 366–378.

Katsumoto, K., and Kume, S. (2013). The Role of CXCL12-CXCR4 Signaling Pathway in Pancreatic Development. Theranostics *3*, 11–17.

Kawka, E., Witowski, J., Fouqet, N., Tayama, H., Bender, T.O., Catar, R., Dragun, D., and Jörres, A. (2014). Regulation of Chemokine CCL5 Synthesis in Human Peritoneal Fibroblasts: A Key Role of IFNγ. Mediators Inflamm. *2014*, 1–9. Keeley, E.C., Moorman, J.R., Liu, L., Gimple, L.W., Lipson, L.C., Ragosta, M., Taylor, A.M., Lake, D.E., Burdick, M.D., Mehrad, B., et al. (2011). Plasma Chemokine Levels Are Associated with the Presence and Extent of Angiographic Coronary Collaterals in Chronic Ischemic Heart Disease. PLoS ONE *6*, e21174.

Kelly, E., Bailey, C.P., and Henderson, G. (2009). Agonist-selective mechanisms of GPCR desensitization: GPCR desensitization and functional selectivity. Br. J. Pharmacol. *153*, S379–S388.

Kim, C.-S., Kang, J.-H., Cho, H.-R., Blankenship, T.N., Erickson, K.L., Kawada, T., and Yu, R. (2011). Potential involvement of CCL23 in atherosclerotic lesion formation/progression by the enhancement of chemotaxis, adhesion molecule expression, and MMP-2 release from monocytes. Inflamm. Res. Off. J. Eur. Histamine Res. Soc. Al *60*, 889–895.

Kim, M., Rooper, L., Xie, J., Rayahin, J., Burdette, J.E., Kajdacsy-Balla, A.A., and Barbolina, M.V. (2012). The Lymphotactin Receptor Is Expressed in Epithelial Ovarian Carcinoma and Contributes to Cell Migration and Proliferation. Mol. Cancer Res. *10*, 1419–1429.

Kinnunen, T., Kaksonen, M., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Peng, H.B., and Rauvala, H. (1998). Cortactin-Src kinase signaling pathway is involved in N-syndecan-dependent neurite outgrowth. J. Biol. Chem. *273*, 10702–10708.

Kleeff, J., Ishiwata, T., Kumbasar, A., Friess, H., Büchler, M.W., Lander, A.D., and Korc, M. (1998). The cell-surface heparan sulfate proteoglycan glypican-1 regulates growth factor action in pancreatic carcinoma cells and is overexpressed in human pancreatic cancer. J. Clin. Invest. *102*, 1662–1673.

Koenen, R.R., von Hundelshausen, P., Nesmelova, I.V., Zernecke, A., Liehn, E.A., Sarabi, A., Kramp, B.K., Piccinini, A.M., Paludan, S.R., Kowalska, M.A., et al. (2009). Disrupting functional interactions between platelet chemokines inhibits atherosclerosis in hyperlipidemic mice. Nat. Med. *15*, 97–103.

Kojima, T., Takagi, A., Maeda, M., Segawa, T., Shimizu, A., Yamamoto, K., Matsushita, T., and Saito, H. (2001). Plasma levels of syndecan-4 (ryudocan) are elevated in patients with acute myocardial infarction. Thromb. Haemost. *85*, 793–799.

Kolaczkowska, E., and Kubes, P. (2013). Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. Nat. Rev. Immunol. *13*, 159–175.

Konstantoulaki, M., Kouklis, P., and Malik, A.B. (2003). Protein kinase C modifications of VE-cadherin, p120, and beta-catenin contribute to endothelial barrier dysregulation induced by thrombin. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. *285*, L434–L442.

Krensky, A.M., and Ahn, Y.-T. (2007). Mechanisms of Disease: regulation of RANTES (CCL5) in renal disease. Nat. Clin. Pract. Nephrol. *3*, 164–170.

Kryczek, I., Lange, A., Mottram, P., Alvarez, X., Cheng, P., Hogan, M., Moons, L., Wei, S., Zou, L., Machelon, V., et al. (2005). CXCL12 and Vascular Endothelial Growth Factor Synergistically Induce Neoangiogenesis in Human Ovarian Cancers. Cancer Res. *65*, 465–472.

Kusuma, S., Shen, Y.-I., Hanjaya-Putra, D., Mali, P., Cheng, L., and Gerecht, S. (2013). Self-organized vascular networks from human pluripotent stem cells in a synthetic matrix. Proc. Natl. Acad. Sci. *110*, 12601–12606.

Kwon, M.-J., Jang, B., Yi, J.Y., Han, I.-O., and Oh, E.S. (2012). Syndecans play dual roles as cell adhesion receptors and docking receptors. FEBS Lett. *586*, 2207–2211.

Labropoulou, V.T., Skandalis, S.S., Ravazoula, P., Perimenis, P., Karamanos, N.K., Kalofonos, H.P., and Theocharis, A.D. (2013). Expression of Syndecan-4 and Correlation with Metastatic Potential in Testicular Germ Cell Tumours. BioMed Res. Int. *2013*, 1–10.

Lapteva, N., and Huang, X.F. (2010). CCL5 as an adjuvant for cancer immunotherapy. Expert Opin. Biol. Ther. *10*, 725–733.

Lee, K., Silva, E.A., and Mooney, D.J. (2011). Growth factor delivery-based tissue engineering: general approaches and a review of recent developments. J. R. Soc. Interface *8*, 153–170.

Lefèvre, M., Felmlee, D.J., Parnot, M., Baumert, T.F., and Schuster, C. (2014). Syndecan 4 Is Involved in Mediating HCV Entry through Interaction with Lipoviral Particle-Associated Apolipoprotein E. PLoS ONE *9*, e95550.

Lei, Y., and Takahama, Y. (2012). XCL1 and XCR1 in the immune system. Microbes Infect. *14*, 262–267.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., and Nourshargh, S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat. Rev. Immunol. *7*, 678–689.

Li, J., Guo, Y., Luan, X., Qi, T., Li, D., Chen, Y., Ji, X., Zhang, Y., and Chen, W. (2012a). Independent roles of monocyte chemoattractant protein-1, regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted and fractalkine in the vulnerability of coronary atherosclerotic plaques. Circ. J. Off. J. Jpn. Circ. Soc. *76*, 2167–2173.

Li, R., Paul, A., Ko, K.W.S., Sheldon, M., Rich, B.E., Terashima, T., Dieker, C., Cormier, S., Li, L., Nour, E.A., et al. (2012b). Interleukin-7 induces recruitment of monocytes/macrophages to endothelium. Eur. Heart J. *33*, 3114–3123.

Lim, S.-T., Longley, R.L., Couchman, J.R., and Woods, A. (2003). Direct binding of syndecan-4 cytoplasmic domain to the catalytic domain of protein kinase C alpha (PKC alpha) increases focal adhesion localization of PKC alpha. J. Biol. Chem. *278*, 13795–13802.

Lobritz, M.A., Ratcliff, A.N., Marozsan, A.J., Dudley, D.M., Tilton, J.C., and Arts, E.J. (2013). Multifaceted Mechanisms of HIV Inhibition and Resistance to CCR5 Inhibitors PSC-RANTES and Maraviroc. Antimicrob. Agents Chemother. *57*, 2640–2650.

Longley, R.L., Woods, A., Fleetwood, A., Cowling, G.J., Gallagher, J.T., and Couchman, J.R. (1999). Control of morphology, cytoskeleton and migration by syndecan-4. J. Cell Sci. *112*, 3421–3431.

Ludwig, A., and Weber, C. (2007). Transmembrane chemokines: Versatile "special agents" in vascular inflammation. Thromb. Haemost.

Ma, W., Liu, Y., Ellison, N., and Shen, J. (2013). Induction of C-X-C Chemokine Receptor Type 7 (CXCR7) Switches Stromal Cell-derived Factor-1 (SDF-1) Signaling and Phagocytic Activity in Macrophages Linked to Atherosclerosis. J. Biol. Chem. *288*, 15481–15494.

Mack, M., Luckow, B., Nelson, P.J., Cihak, J., Simmons, G., Clapham, P.R., Signoret, N., Marsh, M., Stangassinger, M., Borlat, F., et al. (1998). Aminooxypentane-RANTES Induces CCR5 Internalization but Inhibits Recycling: A Novel Inhibitory Mechanism of HIV Infectivity. J. Exp. Med. *187*, 1215.

Maillard, L., Saito, N., Hlawaty, H., Friand, V., Suffee, N., Chmilewsky, F., Haddad, O., Laguillier, C., Guyot, E., Ueyama, T., et al. (2014). RANTES/CCL5 mediated-biological effects depend on the syndecan-4/PKCα signaling pathway. Biol. Open.

Malaud, E., Merle, D., Piquer, D., Molina, L., Salvetat, N., Rubrecht, L., Dupaty, E., Galea, P., Cobo, S., Blanc, A., et al. (2014). Local carotid atherosclerotic plaque proteins for the identification of circulating biomarkers in coronary patients. Atherosclerosis *233*, 551–558.

Mañes, S., Mira, E., Colomer, R., Montero, S., Real, L.M., Gómez-Moutón, C., Jiménez-Baranda, S., Garzón, A., Lacalle, R.A., Harshman, K., et al. (2003). CCR5 Expression Influences the Progression of Human Breast Cancer in a p53-dependent Manner. J. Exp. Med. *198*, 1381–1389.

Manon-Jensen, T., Multhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2013). Mapping of matrix metalloproteinase cleavage sites on syndecan-1 and syndecan-4 ectodomains. FEBS J. *280*, 2320–2331.

Marfaing-Koka, A., Devergne, O., Gorgone, G., Portier, A., Schall, T.J., Galanaud, P., and Emilie, D. (1995). Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. J. Immunol. Baltim. Md 1950 *154*, 1870–1878.

Marques, R.E., Guabiraba, R., Russo, R.C., and Teixeira, M.M. (2013). Targeting CCL5 in inflammation. Expert Opin. Ther. Targets *17*, 1439–1460.

Martinez-Lemus, L.A. (2012). The Dynamic Structure of Arterioles. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. *110*, 5–11.

Martino, M.M., Tortelli, F., Mochizuki, M., Traub, S., Ben-David, D., Kuhn, G.A., Müller, R., Livne, E., Eming, S.A., and Hubbell, J.A. (2011). Engineering the Growth Factor Microenvironment with Fibronectin Domains to Promote Wound and Bone Tissue Healing. Sci. Transl. Med. *3*, 100ra89–ra100ra89.

Matsui, Y., Ikesue, M., Danzaki, K., Morimoto, J., Sato, M., Tanaka, S., Kojima, T., Tsutsui, H., and Uede, T. (2011). Syndecan-4 Prevents Cardiac Rupture and Dysfunction After Myocardial Infarction. Circ. Res. *108*, 1328–1339.

Matthews, H.K., Marchant, L., Carmona-Fontaine, C., Kuriyama, S., Larraín, J., Holt, M.R., Parsons, M., and Mayor, R. (2008). Directional migration of neural crest cells in vivo is regulated by Syndecan-4/Rac1 and non-canonical Wnt signaling/RhoA. Development *135*, 1771–1780.

Mencarelli, A., Graziosi, L., Renga, B., Cipriani, S., D'Amore, C., Francisci, D., Bruno, A., Baldelli, F., Donini, A., and Fiorucci, S. (2013). CCR5 Antagonism by Maraviroc Reduces the Potential for Gastric Cancer Cell Dissemination. Transl. Oncol. *6*, 784–793.

Mi, Z., Bhattacharya, S.D., Kim, V.M., Guo, H., Talbot, L.J., and Kuo, P.C. (2011). Osteopontin promotes CCL5-mesenchymal stromal cell-mediated breast cancer metastasis. Carcinogenesis *32*, 477–487.

Montecucco, F., Lenglet, S., Gayet-Ageron, A., Bertolotto, M., Pelli, G., Palombo, D., Pane, B., Spinella, G., Steffens, S., Raffaghello, L., et al. (2010). Systemic and Intraplaque Mediators of Inflammation Are Increased in Patients Symptomatic for Ischemic. Stroke *41*, 1394–1404.

Moore, K.J., Sheedy, F.J., and Fisher, E.A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. Nat. Rev. Immunol. *13*, 709–721.

Morgan, M.R., Hamidi, H., Bass, M.D., Warwood, S., Ballestrem, C., and Humphries, M.J. (2013). Syndecan-4 Phosphorylation Is a Control Point for Integrin Recycling. Dev. Cell *24*, 472–485.

Mortier, A., Van Damme, J., and Proost, P. (2012). Overview of the mechanisms regulating chemokine activity and availability. Immunol. Lett. *145*, 2–9.

Mostafavi-Pour, Z., Askari, J.A., Parkinson, S.J., Parker, P.J., Ng, T.T.C., and Humphries, M.J. (2003). Integrin-specific signaling pathways controlling focal adhesion formation and cell migration. J. Cell Biol. *161*, 155–167.

Multhaupt, H.A.B., and Couchman, J.R. (2012). Heparan Sulfate Biosynthesis: Methods for Investigation of the Heparanosome. J. Histochem. Cytochem. *60*, 908–915.

Multhaupt, H. a. B., Yoneda, A., Whiteford, J.R., Oh, E.-S., Lee, W., and Couchman, J.R. (2009). Syndecan signaling: when, where and why? J. Physiol. Pharmacol. Off. J. Pol. Physiol. Soc. *60 Suppl 4*, 31–38.

Muona, K., Mäkinen, K., Hedman, M., Manninen, H., and Ylä-Herttuala, S. (2012). 10-year safety follow-up in patients with local VEGF gene transfer to ischemic lower limb. Gene Ther. *19*, 392–395.

Murakami, M., and Simons, M. (2008). Fibroblast growth factor regulation of neovascularization: Curr. Opin. Hematol. *15*, 215–220.

Murakami, M., Horowitz, A., Tang, S., Ware, J.A., and Simons, M. (2002). PKC-delta regulates PKCalpha activity In a syndecan-4 dependent manner. J. Biol. Chem.

Navratilova, Z. (2006). Polymorphisms in CCL2&CCL5 chemokines/chemokine receptors genes and their association with diseases. Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacký Olomouc Czechoslov. *150*, 191–204.

Nibbs, R.J.B., and Graham, G.J. (2013). Immune regulation by atypical chemokine receptors. Nat. Rev. Immunol. *13*, 815–829.

Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, Rac, and Cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. Cell *81*, 53–62.

O'Connell, M.P., Fiori, J.L., Kershner, E.K., Frank, B.P., Indig, F.E., Taub, D.D., Hoek, K.S., and Weeraratna, A.T. (2009). Heparan Sulfate Proteoglycan Modulation of Wnt5A Signal Transduction in Metastatic Melanoma Cells. J. Biol. Chem. *284*, 28704–28712.

Oh, E.-S., Woods, A., Lim, S.-T., Theibert, A.W., and Couchman, J.R. (1998). Syndecan-4 Proteoglycan Cytoplasmic Domain and Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Coordinately Regulate Protein Kinase C Activity. J. Biol. Chem. *273*, 10624–10629.

Okina, E., Grossi, A., Gopal, S., Multhaupt, H. a. B., and Couchman, J.R. (2012). Alpha-actinin interactions with syndecan-4 are integral to fibroblast-matrix adhesion and regulate cytoskeletal architecture. Int. J. Biochem. Cell Biol. *44*, 2161–2174.

Pakianathan, D.R., Kuta, E.G., Artis, D.R., Skelton, N.J., and Hébert, C.A. (1997). Distinct but Overlapping Epitopes for the Interaction of a CC-Chemokine with CCR1, CCR3, and CCR5. Biochemistry (Mosc.) *36*, 9642–9648.

Pap, T., and Bertrand, J. (2013). Syndecans in cartilage breakdown and synovial inflammation. Nat. Rev. Rheumatol. *9*, 43–55.

Park, K.M., and Gerecht, S. (2014). Harnessing developmental processes for vascular engineering and regeneration. Development *141*, 2760–2769.

Park, C.R., You, D.-J., Kim, D.-K., Moon, M.J., Lee, C., Oh, S.-H., Ahn, C., Seong, J.Y., and Hwang, J.-I. (2013). CXCL14 enhances proliferation and migration of NCI-H460 human lung cancer cells overexpressing the glycoproteins containing heparan sulfate or sialic acid. J. Cell. Biochem. *114*, 1084–1096.

Partovian, C., Ju, R., Zhuang, Z.W., Martin, K.A., and Simons, M. (2008). Syndecan-4 Regulates Subcellular Localization of mTOR Complex2 and Akt Activation in a PKC α -Dependent Manner in Endothelial Cells. Mol. Cell *32*, 140–149.

Patel, J., Channon, K.M., and McNeill, E. (2013). The downstream regulation of chemokine receptor signalling: implications for atherosclerosis. Mediators Inflamm. *2013*, 459520.

Patel-Hett, S., and D'Amore, P.A. (2011). Signal transduction in vasculogenesis and developmental angiogenesis. Int. J. Dev. Biol. *55*, 353–363.

Pollok-Kopp, B., Schwarze, K., Baradari, V.K., and Oppermann, M. (2003). Analysis of Ligandstimulated CC Chemokine Receptor 5 (CCR5) Phosphorylation in Intact Cells Using Phosphositespecific Antibodies. J. Biol. Chem. *278*, 2190–2198.

Porat, Y., Assa-Kunik, E., Belkin, M., Krakovsky, M., Lamensdorf, I., Duvdevani, R., Sivak, G., Niven, M.J., and Bulvik, S. (2014). A novel potential therapy for vascular diseases: blood-derived stem/progenitor cells specifically activated by dendritic cells. Diabetes Metab. Res. Rev. n/a – n/a.

Prokoph, S., Chavakis, E., Levental, K.R., Zieris, A., Freudenberg, U., Dimmeler, S., and Werner, C. (2012). Sustained delivery of SDF-1 α from heparin-based hydrogels to attract circulating proangiogenic cells. Biomaterials *33*, 4792–4800.

Proudfoot, A.E.I., Power, C.A., Hoogewerf, A.J., Montjovent, M.-O., Borlat, F., Offord, R.E., and Wells, T.N.C. (1996). Extension of Recombinant Human RANTES by the Retention of the Initiating Methionine Produces a Potent Antagonist. J. Biol. Chem. *271*, 2599–2603.

Proudfoot, A.E.I., Fritchley, S., Borlat, F., Shaw, J.P., Vilbois, F., Zwahlen, C., Trkola, A., Marchant, D., Clapham, P.R., and Wells, T.N.C. (2001). The BBXB Motif of RANTES Is the Principal Site for Heparin Binding and Controls Receptor Selectivity. J. Biol. Chem. *276*, 10620–10626.

Qin, X., He, Z., Zhao, D., Li, L., and Yuan, L. (2011). The RANTES gene promoter polymorphisms are associated with the risk of atherothrombotic cerebral infarction in Northern Han Chinese. Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem. *412*, 1112–1115.

Rahbarghazi, R., Nassiri, S.M., Ahmadi, S.H., Mohammadi, E., Rabbani, S., Araghi, A., and Hosseinkhani, H. (2014). Dynamic induction of pro-angiogenic milieu after transplantation of marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental myocardial infarction. Int. J. Cardiol. *173*, 453–466. Rainczuk, A., Rao, J., Gathercole, J., and Stephens, A.N. (2012). The emerging role of CXC chemokines in epithelial ovarian cancer. Reproduction *144*, 303–317.

Rajagopalan, L., and Rajarathnam, K. (2006). Structural Basis of Chemokine Receptor Function—A Model for Binding Affinity and Ligand Selectivity. Biosci. Rep. *26*, 325–339.

Ranpura, V., Hapani, S., Chuang, J., and Wu, S. (2010). Risk of cardiac ischemia and arterial thromboembolic events with the angiogenesis inhibitor bevacizumab in cancer patients: A metaanalysis of randomized controlled trials. Acta Oncol. *49*, 287–297.

Ribatti, D., and Crivellato, E. (2012). "Sprouting angiogenesis", a reappraisal. Dev. Biol. 372, 157–165.

Ribatti, D., and Djonov, V. (2012). Intussusceptive microvascular growth in tumors. Cancer Lett. *316*, 126–131.

Roca, C., and Adams, R.H. (2007). Regulation of vascular morphogenesis by Notch signaling. Genes Dev. 21, 2511–2524.

Rodríguez-Manzaneque, J.C., Carpizo, D., Plaza-Calonge, M. del C., Torres-Collado, A.X., Thai, S.N.-M., Simons, M., Horowitz, A., and Iruela-Arispe, M.L. (2009). Cleavage of syndecan-4 by ADAMTS1 provokes defects in adhesion. Int. J. Biochem. Cell Biol. *41*, 800–810.

Rookmaaker, M.B., Verhaar, M.C., Boer, H.C. de, Goldschmeding, R., Joles, J.A., Koomans, H.A., Gröne, H.-J., and Rabelink, T.J. (2007). Met-RANTES reduces endothelial progenitor cell homing to activated (glomerular) endothelium in vitro and in vivo. Am. J. Physiol. - Ren. Physiol. *293*, F624–F630.

Roper, J.A., Williamson, R.C., and Bass, M.D. (2012). Syndecan and integrin interactomes: large complexes in small spaces. Curr. Opin. Struct. Biol. *22*, 583–590.

Rouet, V., Hamma-Kourbali, Y., Petit, E., Panagopoulou, P., Katsoris, P., Barritault, D., Caruelle, J.-P., and Courty, J. (2005). A Synthetic Glycosaminoglycan Mimetic Binds Vascular Endothelial Growth Factor and Modulates Angiogenesis. J. Biol. Chem. *280*, 32792–32800.

Salanga, C.L., and Handel, T.M. (2011). Chemokine oligomerization and interactions with receptors and glycosaminoglycans: the role of structural dynamics in function. Exp. Cell Res. *317*, 590–601.

Saoncella, S., Echtermeyer, F., Denhez, F., Nowlen, J.K., Mosher, D.F., Robinson, S.D., Hynes, R.O., and Goetinck, P.F. (1999). Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in a Rhodependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *96*, 2805.

Schappi, J.M., Krbanjevic, A., and Rasenick, M.M. (2014). Tubulin, actin and heterotrimeric G proteins: Coordination of signaling and structure. Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr. *1838*, 674–681.

Schwab, A., Fabian, A., Hanley, P.J., and Stock, C. (2012). Role of Ion Channels and Transporters in Cell Migration. Physiol. Rev. *92*, 1865–1913.

Seneviratne, A., Hulsmans, M., Holvoet, P., and Monaco, C. (2013). Biomechanical factors and macrophages in plaque stability. Cardiovasc. Res. *99*, 284–293.

Shi, Q., Jiang, J., and Luo, G. (2013). Syndecan-1 Serves as the Major Receptor for Attachment of Hepatitis C Virus to the Surfaces of Hepatocytes. J. Virol. *87*, 6866–6875.

Shimamura, M., Nakagami, H., Taniyama, Y., and Morishita, R. (2014). Gene therapy for peripheral arterial disease. Expert Opin. Biol. Ther. 1–10.

Shin, J., Lee, W., Lee, D., Koo, B.-K., Han, I., Lim, Y., Woods, A., Couchman, J.R., and Oh, E.-S. (2001). Solution Structure of the Dimeric Cytoplasmic Domain of Syndecan-4⁺,[‡]. Biochemistry (Mosc.) *40*, 8471–8478.

Silvestre-Roig, C., Winther, M.P. de, Weber, C., Daemen, M.J., Lutgens, E., and Soehnlein, O. (2014). Atherosclerotic Plaque Destabilization Mechanisms, Models, and Therapeutic Strategies. Circ. Res. *114*, 214–226.

Simon Davis, D.A., and Parish, C.R. (2013). Heparan Sulfate: A Ubiquitous Glycosaminoglycan with Multiple Roles in Immunity. Front. Immunol. *4*.

Singh, R., Lilladr Jr, J.W., and Singh, S. (2011). Chemokines: key players in cancer progression and metastasis. Front. Biosci. Sch. Ed. *3*, 1569.

Slimani, H., Charnaux, N., Mbemba, E., Saffar, L., Vassy, R., Vita, C., and Gattegno, L. (2003a). Interaction of RANTES with syndecan-1 and syndecan-4 expressed by human primary macrophages. Biochim. Biophys. Acta *1617*, 80–88.

Slimani, H., Charnaux, N., Mbemba, E., Saffar, L., Vassy, R., Vita, C., and Gattegno, L. (2003b). Binding of the CC-chemokine RANTES to syndecan-1 and syndecan-4 expressed on HeLa cells. Glycobiology *13*, 623–634.

Sluimer, J.C., and Daemen, M.J. (2009). Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. J. Pathol. *218*, 7–29.

Son, H., Lim, Y., Kim, J., Park, H., Choi, S., Han, I., Kim, W.-S., Park, S., Bae, Y., and Oh, E.-S. (2006). Protein kinase C α can undergo membrane localization via an alternative phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate-dependent pathway. Arch. Biochem. Biophys. 454, 1–6.

Song, M., Jang, H., Lee, J., Kim, J.H., Kim, S.H., Sun, K., and Park, Y. (2014). Regeneration of chronic myocardial infarction by injectable hydrogels containing stem cell homing factor SDF-1 and angiogenic peptide Ac-SDKP. Biomaterials *35*, 2436–2445.

Soria, G., and Ben-Baruch, A. (2008). The inflammatory chemokines CCL2 and CCL5 in breast cancer. Cancer Lett. *267*, 271–285.

Soria, G., Lebel-Haziv, Y., Ehrlich, M., Meshel, T., Suez, A., Avezov, E., Rozenberg, P., and Ben-Baruch, A. (2012). Mechanisms Regulating the Secretion of the Promalignancy Chemokine CCL5 by Breast Tumor Cells: CCL5's 40s Loop and Intracellular Glycosaminoglycans. Neoplasia N. Y. N *14*, 1.

Stefanadis, C., Toutouzas, K., Stefanadi, E., Lazaris, A., Patsouris, E., and Kipshidze, N. (2007). Inhibition of plaque neovascularization and intimal hyperplasia by specific targeting vascular endothelial growth factor with bevacizumab-eluting stent: An experimental study. Atherosclerosis *195*, 269–276.

Stenmark, K.R., Yeager, M.E., El Kasmi, K.C., Nozik-Grayck, E., Gerasimovskaya, E.V., Li, M., Riddle, S.R., and Frid, M.G. (2013). The Adventitia: Essential Regulator of Vascular Wall Structure and Function. Annu. Rev. Physiol. *75*, 23–47.

Suffee, N., Hlawaty, H., Meddahi-Pelle, A., Maillard, L., Louedec, L., Haddad, O., Martin, L., Laguillier, C., Richard, B., Oudar, O., et al. (2012). RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans. Angiogenesis *15*, 727–744.

Sutton, A., Friand, V., Brulé-Donneger, S., Chaigneau, T., Ziol, M., Sainte-Catherine, O., Poiré, A., Saffar, L., Kraemer, M., Vassy, J., et al. (2007a). Stromal Cell–Derived Factor-1/Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 12 Stimulates Human Hepatoma Cell Growth, Migration, and Invasion. Mol. Cancer Res. *5*, 21–33.

Sutton, A., Friand, V., Papy-Garcia, D., Dagouassat, M., Martin, L., Vassy, R., Haddad, O., Sainte-Catherine, O., Kraemer, M., Saffar, L., et al. (2007b). Glycosaminoglycans and their synthetic mimetics inhibit RANTES-induced migration and invasion of human hepatoma cells. Mol. Cancer Ther. *6*, 2948–2958.

Takabatake, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Matsusaka, T., Kurihara, H., Koni, P.A., Nagasawa, Y., Hamano, T., Matsui, I., Kawada, N., et al. (2009). The CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Axis Is Essential for the Development of Renal Vasculature. J. Am. Soc. Nephrol. *20*, 1714–1723.

Takakura, N. (2011). Role of intimate interactions between endothelial cells and the surrounding accessory cells in the maturation of blood vessels. J. Thromb. Haemost. *9*, 144–150.

Tammali, R., Reddy, A.B.M., Srivastava, S.K., and Ramana, K.V. (2011). Inhibition of aldose reductase prevents angiogenesis in vitro and in vivo. Angiogenesis *14*, 209–221.

Tkachenko, E., Lutgens, E., Stan, R.-V., and Simons, M. (2004). Fibroblast growth factor 2 endocytosis in endothelial cells proceed via syndecan-4-dependent activation of Rac1 and a Cdc42-dependent macropinocytic pathway. J. Cell Sci. *117*, 3189–3199.

Tkachenko, E., Rhodes, J.M., and Simons, M. (2005). Syndecans New Kids on the Signaling Block. Circ. Res. *96*, 488–500.

Tkachenko, E., Elfenbein, A., Tirziu, D., and Simons, M. (2006). Syndecan-4 Clustering Induces Cell Migration in a PDZ-Dependent Manner. Circ. Res. *98*, 1398–1404.

Tsai, H.-T., Yang, S.-F., Chen, D.-R., and Chan, S.-E. (2012). CCL5-28, CCL5-403, and CCR5 genetic polymorphisms and their synergic effect with alcohol and tobacco consumptions increase susceptibility to hepatocellular carcinoma. Med. Oncol. Northwood Lond. Engl. *29*, 2771–2779.

Ustyuzhanina, N.E., Bilan, M.I., Ushakova, N.A., Usov, A.I., Kiselevskiy, M.V., and Nifantiev, N.E. (2014). Fucoidans: pro- or antiangiogenic agents? Glycobiology cwu063.

Vangelista, L., Secchi, M., and Lusso, P. (2008). Rational design of novel HIV-1 entry inhibitors by RANTES engineering. Vaccine *26*, 3008–3015.

Velasco-Velazquez, M., and Pestell, R.G. (2013). The CCL5/CCR5 axis promotes metastasis in basal breast cancer. Oncoimmunology 2.

Veldkamp, C.T., Seibert, C., Peterson, F.C., De la Cruz, N.B., Haugner, J.C., III, Basnet, H., Sakmar, T.P., and Volkman, B.F. (2008). Structural Basis of CXCR4 Sulfotyrosine Recognition by the Chemokine SDF-1/CXCL12. Sci. Signal. *1*, ra4.

Vilela, M.C., Mansur, D.S., Lacerda-Queiroz, N., Rodrigues, D.H., Lima, G.K., Arantes, R.M.E., Kroon, E.G., da Silva Campos, M.A., Teixeira, M.M., and Teixeira, A.L. (2009). The chemokine CCL5 is

essential for leukocyte recruitment in a model of severe Herpes simplex encephalitis. Ann. N. Y. Acad. Sci. *1153*, 256–263.

Vives, R.R., Seffouh, A., and Lortat-Jacob, H. (2014). Post-synthetic regulation of HS structure: the yin and yang of the Sulfs in cancer. Mol. Cell. Oncol. *3*, 331.

Voyvodic, P.L., Min, D., Liu, R., Williams, E., Chitalia, V., Dunn, A.K., and Baker, A.B. (2014). Loss of Syndecan-1 Induces a Pro-inflammatory Phenotype in Endothelial Cells with a Dysregulated Response to Atheroprotective Flow. J. Biol. Chem. *289*, 9547–9559.

Walter, M.N.M., Wright, K.T., Fuller, H.R., MacNeil, S., and Johnson, W.E.B. (2010). Mesenchymal stem cell-conditioned medium accelerates skin wound healing: An in vitro study of fibroblast and keratinocyte scratch assays. Exp. Cell Res. *316*, 1271–1281.

Wang, Z., and Huang, H. (2013). Platelet factor-4 (CXCL4/PF-4): An angiostatic chemokine for cancer therapy. Cancer Lett. *331*, 147–153.

Wang, H., Jin, H., Beauvais, D.M., and Rapraeger, A.C. (2014). Cytoplasmic Domain Interactions of Syndecan-1 and Syndecan-4 with $\alpha 6\beta 4$ Integrin Mediate HER2- and EGFR-dependent Motility and Survival. J. Biol. Chem.

Wang, X., Sharp, J.S., Handel, T.M., and Prestegard, J.H. (2013). Chapter Twenty - Chemokine Oligomerization in Cell Signaling and Migration. In Progress in Molecular Biology and Translational Science, Jesús Giraldo and Francisco Ciruela, ed. (Academic Press), pp. 531–578.

Wang, Z., Collighan, R.J., Gross, S.R., Danen, E.H.J., Orend, G., Telci, D., and Griffin, M. (2010). RGDindependent Cell Adhesion via a Tissue Transglutaminase-Fibronectin Matrix Promotes Fibronectin Fibril Deposition and Requires Syndecan-4/2 and α 5 β 1 Integrin Co-signaling. J. Biol. Chem. *285*, 40212–40229.

Weber, C., Weber, K.S., Klier, C., Gu, S., Wank, R., Horuk, R., and Nelson, P.J. (2001). Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells. Blood *97*, 1144–1146.

Wessel, F., Winderlich, M., Holm, M., Frye, M., Rivera-Galdos, R., Vockel, M., Linnepe, R., Ipe, U., Stadtmann, A., Zarbock, A., et al. (2014). Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. Nat. Immunol. *15*, 223–230.

White, G.E., Iqbal, A.J., and Greaves, D.R. (2013). CC Chemokine Receptors and Chronic Inflammation—Therapeutic Opportunities and Pharmacological Challenges. Pharmacol. Rev. *65*, 47–89.

Whiteford, J.R., Behrends, V., Kirby, H., Kusche-Gullberg, M., Muramatsu, T., and Couchman, J.R. (2007). Syndecans promote integrin-mediated adhesion of mesenchymal cells in two distinct pathways. Exp. Cell Res. *313*, 3902–3913.

Wilcox-Adelman, S.A., Denhez, F., and Goetinck, P.F. (2002). Syndecan-4 Modulates Focal Adhesion Kinase Phosphorylation. J. Biol. Chem. *277*, 32970–32977.

Winnik, S., Lohmann, C., Siciliani, G., von Lukowicz, T., Kuschnerus, K., Kraenkel, N., Brokopp, C.E., Enseleit, F., Michels, S., Ruschitzka, F., et al. (2013). Systemic VEGF inhibition accelerates experimental atherosclerosis and disrupts endothelial homeostasis – implications for cardiovascular safety. Int. J. Cardiol. *168*, 2453–2461.

Woodfin, A., Voisin, M.-B., and Nourshargh, S. (2007). PECAM-1: A Multi-Functional Molecule in Inflammation and Vascular Biology. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. *27*, 2514–2523.

Woodham, E.F., and Machesky, L.M. (2014). Polarised cell migration: intrinsic and extrinsic drivers. Curr. Opin. Cell Biol. *30*, 25–32.

World Health Organization (2014). World health statistics 2014. ([S.I.]: World Health Organization).

Xie, J., Wang, J., Li, R., Dai, Q., Yong, Y., Zong, B., Xu, Y., Li, E., Ferro, A., and Xu, B. (2012). Syndecan-4 over-expression preserves cardiac function in a rat model of myocardial infarction. J. Mol. Cell. Cardiol. *53*, 250–258.

Xue, M., Ge, Y., Zhang, J., Wang, Q., Hou, L., Liu, Y., Sun, L., and Li, Q. (2012). Anticancer Properties and Mechanisms of Fucoidan on Mouse Breast Cancer In Vitro and In Vivo. PLoS ONE *7*, e43483.

Yahiaoui, L., Gvozdic, D., Danialou, G., Mack, M., and Petrof, B.J. (2008). CC family chemokines directly regulate myoblast responses to skeletal muscle injury. J. Physiol. *586*, 3991–4004.

Yang, X., Qiao, D., Meyer, K., and Friedl, A. (2009). Signal Transducers and Activators of Transcription Mediate Fibroblast Growth Factor–Induced Vascular Endothelial Morphogenesis. Cancer Res. *69*, 1668–1677.

Yellowley, C. (2013). CXCL12/CXCR4 signaling and other recruitment and homing pathways in fracture repair. BoneKEy Rep. 2.

Zhang, Y., Pasparakis, M., Kollias, G., and Simons, M. (1999). Myocyte-dependent Regulation of Endothelial Cell Syndecan-4 Expression ROLE OF TNF-α. J. Biol. Chem. *274*, 14786–14790.

Zhang, Y., Li, J., Partovian, C., Sellke, F.W., and Simons, M. (2003). Syndecan-4 modulates basic fibroblast growth factor 2 signaling in vivo. Am. J. Physiol. - Heart Circ. Physiol. *284*, H2078–H2082.

Zhou, J.J., Wang, Y.M., Lee, V.W., Phoon, R.K., Zhang, G.Y., Wang, Y., Tan, T.K., Hu, M., Wang, L.D., Saito, M., et al. (2012). DEC205-DC targeted DNA vaccines to CX3CR1 and CCL2 are potent and limit macrophage migration. Int. J. Clin. Exp. Med. *5*, 24–33.

Ziemba, B.P., Li, J., Landgraf, K.E., Knight, J.D., Voth, G.A., and Falke, J.J. (2014). Single-Molecule Studies Reveal a Hidden Key Step in the Activation Mechanism of Membrane-Bound Protein Kinase C- α . Biochemistry (Mosc.) *53*, 1697–1713.

Zittermann, S.I., Capurro, M.I., Shi, W., and Filmus, J. (2010). Soluble glypican 3 inhibits the growth of hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. Int. J. Cancer *126*, 1291–1301.

Zlotnik, A., and Yoshie, O. (2012). The Chemokine Superfamily Revisited. Immunity 36, 705–716.

Annexes

Matériels et Méthodes

I. Matériels

1. Solutions

A. Solutions de lavage et d'incubation

Pour les expériences de cytométrie en flux, toxicité, microscopie confocale, adhérence, étalement, migrations, invasion et angiogenèse différentes solutions de lavage, de saturation ou d'incubation ont été utilisées.

Solutions de lavage		
Nom	Composition	
Phosphate buffer saline	NaCl (150 mM), H ₂ NaPO ₄ (29 mM), HNa ₂ PO ₄ (0.02 mM), pH	
(PBS)	7.4	
PBS/BSA 0.1%	NaCl (150 mM), H ₂ NaPO ₄ (29 mM), HNa ₂ PO ₄ (0.02 mM), BSA	
	(0.1%), pH 7.4	
	Solution de saturation	
Nom	Composition	
PBS/BSA 1%	NaCl (150 mM), H ₂ NaPO ₄ (29 mM), HNa ₂ PO ₄ (0.02 mM), BSA	
	(1%), pH 7.4	
Solutions d'incubation		
Nom	Composition	
Phosphate buffer saline	NaCl (150 mM), H ₂ NaPO ₄ (29 mM), HNa ₂ PO ₄ (0.02 mM), pH	
(PBS)	7.4	
PBS/BSA 0.1%	NaCl (150 mM), H ₂ NaPO ₄ (29 mM), HNa ₂ PO ₄ (0.02 mM), BSA	
	(0.1%), pH 7.4	

B. Solutions de Western Blot et de Pull Down

Pour les expériences de western blot et de pull down différents tampons de lyse, solutions de lavage, de saturation ou d'incubation ont été utilisées.

Solutions pour Western Blot		
Nom Composition		
Tampon de lyse	Tris (20 mM), NaCl (150 mM), NP40 (1%), PMSF (10 mM),	
	Aprotinine (20 μg/mL), Iodoacetamide (5 mM),	
Ophenanthroline (25 mM), Orthovanadate (1 mM), pH 8		

Gel de charge	Tris (50 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (6%), APS (0.4%),
	Temed (0.1%), pH 6.8
Gel de migration	Tris (375 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (10%), APS
	(0.4%), Temed (0.1%), pH 8.8
Migration	Tris (25 mM), Glycine (82 mM), SDS (0.1%), pH 8.3
Transfert Tris glycine saline	Tris (25 mM), Glycine (82 mM), SDS (0.1%), Ethanol (20%)
(TGS)	
Coloration Rouge ponceau	Rouge ponceau (0.1%)
Lavage Tris buffer saline	Tris (20 mM), NaCl (137 mM), BSA (0.5%), Tween20 (0.1%),
(TBS/BSA)	рН 7.6
Saturation (TBS/BSA/MLK)	Tris (20 mM), NaCl (137 mM), BSA (2.5%), Tween20 (0.1%),
	Lait (2.5%), pH 7.6
Incubation (TBS/BSA)	Tris (20 mM), NaCl (137 mM), BSA (0.5%), Tween20 (0.1%),
	nH 7 6
	p117.0
	Solutions pour Pull Down
Nom	Solutions pour Pull Down Composition
Nom Tampon de lyse/lavage (MLB)	Solutions pour Pull Down Composition Mg ²⁺ Lysis/Wash buffer, Glycérol (10%), Aprotinine (10
Nom Tampon de lyse/lavage (MLB)	Solutions pour Pull Down Composition Mg ²⁺ Lysis/Wash buffer, Glycérol (10%), Aprotinine (10 μg/mL), Leupeptine (10 μg/mL), Orthovanadate (1 mM)
Nom Tampon de lyse/lavage (MLB) Gel de charge	Solutions pour Pull Down Composition Mg ²⁺ Lysis/Wash buffer, Glycérol (10%), Aprotinine (10 μg/mL), Leupeptine (10 μg/mL), Orthovanadate (1 mM) Tris (50 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (6%), APS (0.4%),
Nom Tampon de lyse/lavage (MLB) Gel de charge	Solutions pour Pull Down Composition Mg ²⁺ Lysis/Wash buffer, Glycérol (10%), Aprotinine (10 μg/mL), Leupeptine (10 μg/mL), Orthovanadate (1 mM) Tris (50 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (6%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 6.8
Nom Tampon de lyse/lavage (MLB) Gel de charge Gel de migration	Solutions pour Pull Down Composition Mg ²⁺ Lysis/Wash buffer, Glycérol (10%), Aprotinine (10 μg/mL), Leupeptine (10 μg/mL), Orthovanadate (1 mM) Tris (50 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (6%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 6.8 Tris (375 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (10%), APS
Nom Tampon de lyse/lavage (MLB) Gel de charge Gel de migration	Solutions pour Pull Down Composition Mg ²⁺ Lysis/Wash buffer, Glycérol (10%), Aprotinine (10 μg/mL), Leupeptine (10 μg/mL), Orthovanadate (1 mM) Tris (50 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (6%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 6.8 Tris (375 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (10%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 8.8
Nom Tampon de lyse/lavage (MLB) Gel de charge Gel de migration Migration	Solutions pour Pull Down Composition Mg ²⁺ Lysis/Wash buffer, Glycérol (10%), Aprotinine (10 μg/mL), Leupeptine (10 μg/mL), Orthovanadate (1 mM) Tris (50 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (6%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 6.8 Tris (375 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (10%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 8.8 Tris (25 mM), Glycine (82 mM), SDS (0.1%), pH 8.3
Nom Tampon de lyse/lavage (MLB) Gel de charge Gel de migration Migration Transfert (TGS)	Solutions pour Pull Down Composition Mg ²⁺ Lysis/Wash buffer, Glycérol (10%), Aprotinine (10 μg/mL), Leupeptine (10 μg/mL), Orthovanadate (1 mM) Tris (50 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (6%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 6.8 Tris (375 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (10%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 8.8 Tris (25 mM), Glycine (82 mM), SDS (0.1%), Ethanol (20%)
Nom Tampon de lyse/lavage (MLB) Gel de charge Gel de migration Migration Transfert (TGS) Coloration Rouge ponceau	Solutions pour Pull Down Composition Mg ²⁺ Lysis/Wash buffer, Glycérol (10%), Aprotinine (10 μg/mL), Leupeptine (10 μg/mL), Orthovanadate (1 mM) Tris (50 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (6%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 6.8 Tris (375 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (10%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 8.8 Tris (25 mM), Glycine (82 mM), SDS (0.1%), pH 8.3 Tris (25 mM), Glycine (82 mM), SDS (0.1%), Ethanol (20%) Rouge ponceau (0.1%)
Nom Tampon de lyse/lavage (MLB) Gel de charge Gel de migration Migration Transfert (TGS) Coloration Rouge ponceau Lavage (PBST)	Solutions pour Pull Down Composition Mg ²⁺ Lysis/Wash buffer, Glycérol (10%), Aprotinine (10 μg/mL), Leupeptine (10 μg/mL), Orthovanadate (1 mM) Tris (50 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (6%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 6.8 Tris (375 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (10%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 8.8 Tris (25 mM), Glycine (82 mM), SDS (0.1%), pH 8.3 Tris (25 mM), Glycine (82 mM), SDS (0.1%), Ethanol (20%) Rouge ponceau (0.1%) PBS, Tween20 (0.05%)
Nom Tampon de lyse/lavage (MLB) Gel de charge Gel de migration Migration Transfert (TGS) Coloration Rouge ponceau Lavage (PBST) Saturation (PBST/MLK)	Solutions pour Pull Down Composition Mg ²⁺ Lysis/Wash buffer, Glycérol (10%), Aprotinine (10 μg/mL), Leupeptine (10 μg/mL), Orthovanadate (1 mM) Tris (50 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (6%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 6.8 Tris (375 mM), SDS (0.1%), Acrylamide/Bis (10%), APS (0.4%), Temed (0.1%), pH 8.8 Tris (25 mM), Glycine (82 mM), SDS (0.1%), pH 8.3 Tris (25 mM), Glycine (82 mM), SDS (0.1%), Ethanol (20%) Rouge ponceau (0.1%) PBS, Tween20 (0.05%) PBS, Tween (0.05%), Lait (3%)

C. Colorants

Pour les expériences de cytométrie en flux, toxicité, adhérence, étalement, migrations, invasion, angiogenèse, arrêt et transmigration monocytaire différentes colorations ont été utilisées.

Colorants visibles				
Nom	Cible	Concentration	Fournisseur	
Hematoxyline	Noyau	0.5%	Roth	
Crystal Violet	Noyau	0.05%	Sigma-Aldrich	
p-nitrophenylphosphate (pNPP)	Phosphatase		Sigma-Aldrich	
bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-	Mitochondrie	1 mg/mL	Sigma-Aldrich	
2,5-diphenyl tetrazolium (MTT)				
Flu	orochromes			
Nom Cible Concentration Fournisseur				
4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI)	Noyau	1 μg/mL	Roth	
5-(and-6)-(((4-Chloromethyl) Benzoyl)	Cytoplasme	10 µM	Invitrogen	
Amino) Tetramethylrhodamine (CMTMR)				
Cell Proliferation Dye (CPD)	Protéine	5 μΜ	eBioscience	
Phalloïdine-Alexa Fluor 568	Cytosquelette	7.5 U/mL	Invitrogen	
	d'actine			

2. Modèles cellulaires A. HUV-EC-Cs

Nous avons utilisé une lignée de cellules endothéliales matures humaines, les Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUV-EC-Cs, N°CRL-1730, ATCC). Les cellules endothéliales ont été cultivées dans du milieu ECBM2 (PromoCell) supplémenté avec 12% de sérum de veau fœtal (SVF, Lonza), 5 ng/mL d'EGF, 0.5 ng/mL de VEGF, 10 ng/ml de FGF-2, 10 ng/ml d'IGF-1, 0.2 µg/mL d'hydrocortisone, 1 µg/mL d'acide ascorbique, 22.5 µg/mL d'héparine et 1% de pénicilline-streptomycine (Lonza) (ECBM2 12%).

Les cellules sont cultivées à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% de CO_2 et le milieu de culture cellulaire est renouvelé deux fois par semaine.

B. MM6

Nous avons utilisé une lignée monocytaire, les mono mac 6 (MM6, Institute for Immunology, University of Munich, Germany). Les monocytes ont été cultivés dans du RPMI 1640 (ATCC) supplémenté avec 10% de SVF (Lonza) et 1% de pénicilline-streptomycine (Lonza). Les cellules sont cultivées à 37°C sous atmosphère contrôlée à 5% de CO_2 et le milieu est renouvelé deux fois par semaine.

3. Protéines et molécules synthétiquesA. Cytokines et facteurs de croissances

Pour toutes nos expériences, nous avons travaillé avec différentes cytokines, chimiokines et facteurs de croissance.

Protéine	Poids	Concentration / Modification	Fournisseur
	moléculaire		
RANTES/CCL5	7.8 kDa	3 nM	R&D
R47E-	7.8 kDa	3 nM. Arginine 47 mutée en acide	L. Martin du
RANTES/CCL5		glutamique. Déficient fixation aux GAG.	CEA de Saclay
3Ala-	7.8 kDa	3 nM. Arginines 44, 47 et lysine 45 mutées	L. Martin du
RANTES/CCL5		en alanines. Déficient fixation aux GAG.	CEA de Saclay
E66A-	7.8 kDa	3 nM. Acide glutamique 66 muté en	L. Martin du
RANTES/CCL5		alanine. Déficient dans l'oligomérisation.	CEA de Saclays
MCP-1/CCL2	13 kDa	3 nM	L. Martin du
			CEA de Saclays
TNF-α	17.5 kDa	1 ng/mL	Gibco
FGF-2	16.3 kDa	20 ng/mL	Sigma-Aldrich

B. Inhibiteurs et activateurs pharmacologiques siRNA et enzymes

Pour les expériences de toxicité, microscopie confocale, adhérence, étalement, migration, angiogenèse, arrêt et transmigration monocytaire, différents inhibiteurs, siRNA et enzymes ont été utilisés.

Inhibiteurs et activateur pharmacologiques				
Nom Cible Concentration Fournisseur				
Gö6976	ΡΚС-α/β1	1 µM	Sigma-Aldrich	
RottlerinePKC-δ1 μMSigma-Aldrich				

Cantharidic acid	PP1/2A	1 μΜ	Sigma-Aldrich	
Y27632	Rho Kinase	1 µM	Sigma-Aldrich	
SP600125	JNK/SAPK	1 μΜ	Sigma-Aldrich	
PD98059	МАРК	1 μΜ	Sigma-Aldrich	
NSC	Rac1	1 μΜ	Calbiochem	
ML141	Cdc42	10 µM	Calbiochem	
TPA	Activateur des PKC	0.5 μM	Sigma-Aldrich	
	siRN	A		
Nom	Cible	Concentration	Fournisseur	
siRNA SDC-4	ARNm SDC-4	300 nM	Eurogentec	
siRNA CCR1	ARNm CCR1	300 nM	Sigma-Aldrich	
siRNA CCR5	ARNm CCR5	300 nM	Sigma-Aldrich	
SNC	siRNA control	300 nM	Eurogentec	
	Enzymes			
Nom	Cible	Concentration	Fournisseur	
C3 exoenzyme	RhoA/RhoG	10 ng/mL	Sigma-Aldrich	
transferase				
Héparitinase I	Chaînes HS	20 mU/mL	Sigma-Aldrich	
Héparitinase III	Chaînes HS	10 mU/mL	Sigma-Aldrich	
Chondroïtinase ABC	Chaînes CS	33 mU/mL	Sigma-Aldrich	

C. Anticorps

Pour les expériences de cytométrie en flux, microscopie confocale, et western blot différents anticorps ont été utilisés.

Cytométrie en flux			
Cible	Clone	Concentration	Fournisseur
SDC-4	Mouse IgG2a, clone 5G9	10 μg/mL	Santa Cruz
Chaînes HS	Mouse IgM, clone F58-	5 μg/mL	Seikagaku Biobusiness
	10E4		Corporation
ICAM-1	Mouse IgG1, clone P2A4	1 μg/mL	Millipore
PECAM-1	Mouse IgG1, clone JC70	1 μg/mL	Santa Cruz
E-sélectine	Mouse IgG2a, clone	1 μg/mL	Santa Cruz
	CTB202		
VCAM-1	Rat IgG1, clone M/K-2	1 μg/mL	Santa Cruz

Isotype	Mouse IgG1	1 μg/mL	BD Biosciences
			Pharmigen
lsotype	Mouse IgG2a	1 μg/mL ou 10 μg/mL	BD Biosciences
			Pharmigen
lsotype	Mouse IgM	5 μg/mL	BD Biosciences
			Pharmigen
lsotype	Rat lgG1	1 μg/mL	BD Biosciences
			Pharmigen
Mouse IgG	Goat-Alexa Fluor 647	10 μg/mL	Invitrogen
Mouse IgM	Rat-APC, clone II/41	5 μg/mL	BD Biosciences
			Pharmigen
Rat IgG	Goat-Alexa Fluor 647	10 μg/mL	Invitrogen
	Micros	copie confocale	
Cible	Clone	Concentration	Fournisseur
Intégrine	Mouse IgG1, clone N-20	10 μg/mL	Santa Cruz
β1			
lsotype	Mouse IgG1	10 μg/mL	BD Biosciences
			Pharmigen
Mouse IgG	Goat-Alexa Fluor 555	10 μg/mL	Invitrogen
	W	estern Blot	
Cible	Clone	Concentration	Fournisseur
SDC-4	Rabbit IgG, clone H-140	1 μg/mL	Santa Cruz
pSDC-4	Goat IgG, clone S179	0.5 μg/mL	Santa Cruz
Rac1	Mouse IgG2a, clone 23A8	1 μg/mL	Millipore
ΡΚС-α	Mouse IgG2b, clone	0.5 μg/mL	BD Biosciences
	3/ΡΚCα		Pharmigen
lsotype	Rabbit IgG	1 μg/mL	R&D Systems
lsotype	Goat IgG	0.5 μg/mL	Santa Cruz
lsotype	Mouse IgG2a	1 μg/mL	BD Biosciences
			Pharmigen
Isotype	Mouse IgG2b	0.5 μg/mL	BD Biosciences
			Pharmigen
Mouse IgG	Donkey-HRP	0.16 µg/mL	Jackson
			ImmunoResearch
Rabbit IgG	Donkey-HRP	0.16 μg/mL	Jackson
			ImmunoResearch
Goat IgG	Donkey-HRP	0.2 μg/mL	Santa Cruz

4. Plasmides

Les plasmides codant pour les différentes protéines sauvages ou mutées utilisées (SDC-4, PKC- α , PKC- δ , Rac1, Cdc42, RhoA) ont été obtenus par transformation et amplification bactérienne puis purifiés par extraction plasmidique.

Fluorochrome EGFP, $\lambda_{\text{excitation}}$ = 488 nm, $\lambda_{\text{émission}}$ = 507 nm			
Plasmide (abréviation)	Protéine exprimée	Modification	
pEGFP-N3 (N3)	EGFP		
pEGFP-N3-SDC-4 (SDC-	SDC-4-EGFP fusionné en		
4)	C-terminal du SDC-4		
pEGFP-N3-SDC-4-	S179A-SDC-4-EGFP	Sérine 179 mutée en alanine. SDC-	
S179A (S179A)	fusionné en C-terminal du	4 non phosphorylable sur l'acide	
	SDC-4	amine 179.	
pEGFP-N3-SDC-4-	L188QQ-SDC-4-EGFP	Tyrosine 188 et lysines 189 et 190	
L188QQ (L188QQ)	fusionné en C-terminal du	mutées en leucine, glutamine et	
	SDC-4	glutamine. SDC-4 avec domaine de	
		fixation du PIP2 muté.	
pEGFP-N3-SDC-4-	A198del-SDC-4-EGFP	Alanine 198 délétée. SDC-4 sans	
A198del (A198del)	fusionné en C-terminal du	domaine de fixation des protéines	
	SDC-4	à domaine PDZ.	
Fluorochr	ome DsRed2, $\lambda_{\text{excitation}} = 563$	nm, $\lambda_{\text{émission}}$ = 582 nm	
Plasmide (abréviation)	Protéine exprimée	Modification	
pDsRed2 (DsRed2)	DsRed2		
pDsRed2-PKC-α (PKC-	PKC-α-DsRed2 fusionné en		
α)	N-terminal de la PKC- α		
pDsRed2-PKC-α-	K368M-PKC-α-DsRed2	Lysine 368 mutée en méthionine.	
K368M (K368M)	fusionné en N-terminal de	PKC- α muté dans le domaine	
	la PKC-α	kinase le rendant inactif.	
Fluorochrome mCherry, $\lambda_{excitation}$ = 587 nm, $\lambda_{émission}$ = 610 nm			
Plasmide (abréviation) Protéine exprimée		Modification	
pmCherry-N1	mCherry		
(mcherry)			
pmCherry-N1-PKC-δ	PKC-δ-mCherry fusionné		
(ΡΚС-δ)	en C-terminal de la PKC-δ		

II. Méthodes

1. Construction plasmidique

Pour surexprimer le SDC-4, nous avons construit un plasmide codant pour le SDC-4. L'ADNc du SDC-4 (OriGene) a été inséré dans le plasmide pEGFP-N3 (Clontech) entre les sites de restriction EcoRI et KpnI, permettant la formation d'une protéine de fusion SDC-4-EGFP en C-terminal intracellulaire.

Pour obtenir les mutations spécifiques du SDC-4, nous avons effectué une PCR de mutagenèse dirigée avec le QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

Nous avons incubé le plasmide pEGFP-N3-SDC-4 (50 ng) avec les primers sens et antisens (125 ng) de chaque mutation, du dNTPmix (1 μ L) et de la PfuUltra HF DNA polymerase (2.5 U) dans le tampon de réaction (Tris-HCL (10 mM), EDTA (1 mM), pH 7.5) puis la PCR de mutagenèse a été effectuée (1 étape de 30 secondes à 95°C, 18 cycles de 3 étapes (30 secondes à 95°C, 1 minute à 55°C, 6 minutes à 68°C)) avec un thermocycleur prime thermal cycler (Techne). Les produits de PCR ont enfin été digérés avec l'enzyme DpnI pendant 1 heure.

Les plasmides codants pour les différents SDC-4 (N3, SDC-4, S179A, L188QQ, A198del) ont été transformés dans des bactéries E.coli XL1-Blue Supercompetent cells (Stratagene). Les bactéries (50 μ L) ont été incubées avec le plasmide (10 ng) pendant 30 minutes dans la glace (adsorption du plasmide à la surface de la bactérie). Le mélange a été incubé 45 secondes dans un bain marie à 42°C (ouverture de pores dans la membrane de la bactérie et entrée du plasmide) puis replacé 5 minutes dans la glace (fermeture des pores). Les bactéries ont été incubées 1 heure à 37°C et 200 tour/minute dans du milieu SOC (tryptone (2%), extrait de levure (0.5%), NaCl (10 mM), KCl (2.5 mM), MgCl₂ (10 mM), MgSO₄ (10 mM), glucose (20 mM)). Les bactéries ont ensuite été déposées sur une boite de Pétri contenant du milieu LB Agar (tryptone (1%), extrait de levure (0.5%), NaCl (10 mM), agar (1.5%)) supplémenté en kanamycine (1 μ g/mL) une nuit à 37°C. Le plasmide contenant le gène de résistance à la kanamycine, seules les bactéries transformées pourront se développer.

Après une nuit à 37°C, des colonies de bactéries apparaissent sur la boite de Pétri (bactéries tranformées avec le plasmide). Plusieurs colonies sont récupérées et amplifiées dans 5 mL de milieu de miniculture LB Broth Base (tryptone (1%), extrait de levure (0.5%), NaCl (10 mM)) supplémenté en kanamycine (1 µg/mL) une nuit à 37°C sous agitation.

Après une nuit, des bactéries (2 mL) sont conservées à 4°C (pour les amplifier en maxiculture) et les bactéries restantes (3 mL) sont centrifugées à 10 000 g pendant 5 minutes afin d'extraire l'ADN plasmidique à l'aide du kit Qiagen plasmid purification (Qiagen). Une résine chargée positivement (DEAE-cellulose) fixe l'ADN plasmidique par interaction ionique avec les groupements phosphates chargés négativement de l'ADN. L'ADN est ensuite purifié par lavages successifs avec des tampons de concentration croissante en NaCl.

Le culot bactérien est resuspendu dans du tampon P1 (300 µL, Tris-Cl (50 mM), EDTA (10 mM), pH 8) supplémenté en RNaseA (100 µg/mL). Les bactéries sont lysées par ajout de tampon P2 (300 µL, NaOH (200 mM), SDS (1%)) pendant 5 minutes. La lyse est neutralisée par ajout de tampon P3 (300 µL, acétate de potassium (3 M), pH 5.5) pendant 5 minutes dans la glace. Les débris sont éliminés par centrifugation à 14 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est déposé sur une colonne échangeuse d'ion préalablement équilibrée avec du tampon QBT (1 mL, NaCl (750 mM) MOPS (50 mM), isopropanol (15%), Triton X-100 (0.15%), pH 7). L'ADN plasmidique fixé à la colonne est lavé deux fois avec du tampon QC (2 mL, NaCl (1 M) MOPS (50 mM), isopropanol (15%), pH 7) puis élué avec du tampon QF (800 µL, NaCl (1.5 M), Tris-Cl (50 mM), isopropanol (15%), pH 8.5). L'ADN plasmidique est précipité par ajout d'isopropanol (560 µL) et centrifugation à 14 000 g pendant 30 minutes. Le culot d'ADN plasmidique est lavé avec de l'éthanol (70%, 1 mL) puis centrifugé à 14 000 g pendant 10 minutes. Le culot d'ADN plasmidique est lavé avec de l'éthanol (70%, 1 mL) puis centrifugé à 14 000 g pendant 10 minutes. Le culot d'ADN plasmidique est finalement resuspendu dans du tampon TE (Tris (10 mM), EDTA (1 mM), pH 8, 30 µL).

Afin de vérifier l'expression du plasmide par les différentes colonies bactériennes, une digestion enzymatique avec les enzymes de restrictions EcoRI et KpnI est effectuée et analysée sur gel d'agarose (1%). Le plasmide est présent si on observe une bande à 4 700 paires de bases (plasmide vide) et une bande à 600 paires de bases (ADNc du SDC-4). Les séquences nucléotidiques des plasmides SDC-4 sauvage et mutés sont analysées par séquençage par la société Beckman Coulter Genomics.

Les colonies bactériennes ayant été validées par gel d'agarose et séquençage sont amplifiées dans 100 mL de milieu de miniculture LB Broth Base supplémenté en kanamycine (1 µg/mL) une nuit à 37°C sous agitation à partir des bactéries issues de la miniculture.

Après une nuit, les bactéries sont centrifugées et le culot bactérien est resuspendu dans du tampon P1 (10 mL) supplémenté en RNaseA (100 μ g/mL). Les bactéries sont lysées par ajout de tampon P2 (10 mL) pendant 5 minutes. La lyse est neutralisée par ajout de tampon P3 (10 mL) pendant 20 minutes dans la glace. Les débris sont éliminés par deux centrifugations successives à 14 000 g pendant 30 minutes puis 15 minutes. Le surnageant contenant l'ADN plasmidique est déposé sur une colonne échangeuse d'ion préalablement équilibrée avec du tampon QBT (10 mL). L'ADN plasmidique fixé à la colonne est lavé deux fois avec du tampon QC (30 mL) puis élué avec du tampon QF (15 mL). L'ADN plasmidique est précipité par ajout d'isopropanol (10.5 mL) et centrifugation à 14 000 g pendant 30 minutes à 4°C. Le culot d'ADN plasmidique est lavé avec de l'éthanol (70%, 5 mL) puis centrifugé à 14 000 g pendant 10 minutes. Le culot d'ADN plasmidique est finalement suspendu dans du tampon TE (100 μ L).

La présence du plasmide est vérifiée sur gel d'agarose (1%) après digestion enzymatique et la concentration d'ADN plasmidique est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre à 260 nm selon la loi de Beer-Lambert (DO=ɛ.l.c).

Les plasmides pmCherry-N1-SDC-4 (SDC-4-mCherry) et pmCherry-N1-PKC- δ (PKC- δ) ont été obtenus de la même manière à partir d'un plasmide pmCherry-N1 (mCherry) fourni par l'équipe du Pr. Saito (Biosignal Research Center, Université de Kobe, Japon).

Le plasmide pDsRed2-PKC- α -K368M (K368M) a été obtenu par mutagenèse dirigée à partir d'un plasmide pDsRed2-PKC- α (PKC- α) fourni par l'équipe du Pr. Saito.

Le plasmide pDsRed2 (DsRed2) nous a été fourni par l'équipe du Pr. Saito.

2. Transfection

Les HUV-EC-Cs ont été transfectées par nucléofection. Ce procédé consiste en un choc électrique permettant de déstabiliser la membrane plasmique et l'enveloppe nucléaire des cellules afin que le plasmide codant pour la protéine d'intérêt puisse être délivré directement dans le noyau de la cellule.

Les HUV-EC-Cs ont été décollées à l'aide d'une solution de PBS/trypsine/EDTA (0.05/0.02%). Les cellules sont comptées et la quantité de cellule nécessaire est centrifugée à 100 g pendant 10 minutes. Le culot cellulaire est repris dans une solution de nucléofection (Amaxa cell line nucleofector solution V, Lonza) à raison de 10^6 cellules/100 µL auxquels est ajouté le plasmide (5 µg) ou le siRNA (300 nM). La solution contenant les cellules et le plasmide (100 µL) est déposée dans une cuve de nucléofection et les cellules sont transfectées avec le protocole V-001 de l'Amaxa nucleofector device II (Lonza). Les cellules transfectées sont récupérées et cultivées à une concentration de 10^6 cellules/mL dans du milieu ECBM2 12%. Après 8 heures, les cellules mortes sont éliminées par remplacement du milieu ECBM2 12%. Pour toutes les expériences, les cellules sont utilisées 24 heures après la transfection (Figure 1).



Figure 1 : Nucléofection

Les cellules incubées en présence de plasmide sont soumises à un choc électrique entraînant le transfert du plasmide dans le noyau de la cellule.

3. Cytométrie en flux

Nous avons utilisé la cytométrie en flux pour évaluer l'efficacité de transfection de nos cellules transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del. En effet, les différents plasmides utilisés permettent l'expression de protéines fluorescentes (EGFP) détectées par le cytomètre, nous permettant de déterminer le pourcentage de cellules transfectées par chaque plasmide.

Les cellules ont été analysées 24 heures après la transfection. Les cellules transfectées ont été lavées au PBS, fixées avec du paraformaldéhyde (PFA 1%) puis lavées au PBS/BSA (0.1%) trois fois. Les cellules ont été détachées à l'aide d'un grattoir et transférées dans un tube adapté au cytomètre. La fluorescence des cellules a été détectée en FL-1 (plasmide EGFP, $\lambda_{\text{excitation}}$ = 488 nm, $\lambda_{\text{émission}}$ = 507 nm) et les cellules considérées transfectées sont les cellules EGFP positives, permettant d'obtenir un pourcentage de transfection de chaque plasmide.

Nous avons également utilisé la cytométrie en flux pour déterminer la quantité de différents ligands à la membrane des cellules suivant différents traitements. Nous avons utilisés un anticorps spécifique d'un ligand donné révélé par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome. Le fluorochrome est détecté par le cytomètre, déterminant l'intensité de fluorescence pour chaque cellule et permettant ainsi de comparer la quantité de fluorochrome, et donc d'antigène présent à la surface des cellules.

Pour l'expression des chaînes HS ou du SDC-4, les cellules ont été analysées 24 heures après la transfection. Les cellules transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del ont été lavées au PBS, fixées avec du PFA (1%), saturées avec du PBS/BSA (1%) puis lavées au PBS/BSA (0.1%) trois fois. Les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires anti-HS (F58-10E4) ou anti-SDC-4 (5G9) ou avec leur isotype respectif (mouse IgM ou IgG2a) pendant 1 heure à 4°C. Les cellules ont été lavées au PBS/BSA (0.1%) trois fois puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome spécifique de l'anticorps primaire (rat-APC ou goat-Alexa Fluor 647) pendant 30 minutes. Les cellules ont été lavées au PBS/BSA 0.1% trois fois, détachées à l'aide d'un grattoir et transférées dans un tube adapté au cytomètre en flux. La fluorescence des cellules a été détectée en FL-1 (plasmide EGFP, $\lambda_{\text{excitation}} = 488$ nm, $\lambda_{\text{émission}} = 507$ nm) et FL-4 (APC, $\lambda_{\text{excitation}} = 650$ nm, $\lambda_{\text{émission}} = 660$ nm ou Alexa Fluor 647, $\lambda_{\text{excitation}} = 652$ nm, $\lambda_{\text{émission}} = 665$ nm). La détermination de la quantité de ligands à la surface membranaire a été analysée par comparaison de la médiane

de l'intensité de fluorescence des cellules transfectées (EGFP positives) révélé par l'anticorps choisi ou par son isotype spécifique.

Pour l'expression des molécules d'adhérence (ICAM-1, PECAM-1, E-sélectine, VCAM-1), les cellules transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del ont été stimulées au TNF-α (1 ng/mL) 32 heures après la transfection pendant 16 heures à 37°C et 5% de CO₂ puis traitées ou non avec RANTES/CCL5 (3 nM) pendant 2 heures à 37°C et 5% de CO₂. Les cellules transfectées ont été lavées au PBS, fixées avec du PFA (1%), saturées avec du PBS/BSA (1%) puis lavées au PBS/BSA (0.1%) trois fois. Les cellules ont été incubées avec les anticorps primaires anti-ICAM-1 (P2A4) anti-PECAM-1 (JC70), anti-E-sélectine (CTB202) ou anti-VCAM-1 (M/K-2) ou avec leur isotype respectif (mouse IgG1 ou IgG2a ou rat IgG1) pendant 1 heure à 4°C. Les cellules ont été lavées au PBS/BSA (0.1%) trois fois puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome spécifique de l'anticorps primaire (goat-Alexa Fluor 647) pendant 30 minutes. Les cellules ont été lavées au PBS/BSA (0.1%) trois fois, détachées à l'aide d'un grattoir et transférées dans un tube adapté au cytomètre. La fluorescence des cellules a été détectée en FL-1 (plasmide EGFP, $\lambda_{\text{excitation}}$ = 488 nm, $\lambda_{\text{émission}}$ = 507 nm) et FL-4 (Alexa Fluor 647, $\lambda_{\text{excitation}}$ = 652 nm, $\lambda_{\text{émission}}$ = 665 nm). La détermination de la quantité de ligands à la surface membranaire a été analysée par comparaison de la médiane de l'intensité de fluorescence des cellules transfectées par les différents plasmides (EGFP positives) révélé par l'anticorps choisi ou par son isotype spécifique.

4. Viabilité / toxicité

Afin d'analyser les voies de signalisation intracellulaire, des inhibiteurs pharmacologiques ont été utilisés. Les inhibiteurs pharmacologiques pouvant affecter la viabilité des cellules, nous avons évalué la toxicité de chaque inhibiteur à différentes concentrations par un test MTT. Le MTT est réduit en formazan violet par la déshydrogénase mitochodriale permettant un dosage de la quantité de cellules vivantes. Dans un plaque 96 puits, 5 000 cellules transfectées par le plasmide SDC-4 ont été incubées ou non 24 heures après la transfection avec différentes doses d'inhibiteur pendant 24 heures à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées avec du PBS puis incubées avec du MTT (1 mg/mL) pendant 3 heures à 37°C. Les cellules ont enfin été lysées avec du DMSO afin d'obtenir une solution violette homogène. Un dosage de la densité optique à 570 nm par spectrophotométrie permet une estimation de la viabilité cellulaire. Les concentrations d'inhibiteurs pour lesquelles les densités optiques sont significativement inférieures à la densité optique de cellules en absence d'inhibiteur sont considérées comme toxiques. La concentration d'inhibiteur utilisée est la plus forte concentration non toxique.
5. Microscopie confocale

La microscopie confocale est un type de microscopie à fluorescence permettant d'analyser l'objet étudié en trois dimensions. L'avantage de la microscopie confocale est qu'il est possible de réaliser des « tranches » de cellules dans la profondeur (axe Z) permettant de déterminer avec précision la localisation spatiale de la fluorescence. Le microscope confocal est un microscope inversé, ce qui permet l'étude de cellules fixées mais aussi vivantes.

Afin de confirmer que les cellules transfectées par le plasmide codant pour le SDC-4-EGFP sauvage ou muté permettaient une expression membranaire du SDC-4, nous avons analysé la localisation membranaire des SDC-4-EGFP à l'aide d'un marqueur membranaire, l'intégrine β 1. Les cellules transfectées ont été lavées au PBS, fixées avec du PFA (1%), saturées avec du PBS/BSA (1%) puis lavées au PBS/BSA (0.1%) trois fois. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps primaire anti-intégrine β 1 (N-20) ou son isotype (mouse lgG1) pendant 1 heure à 4°C. Les cellules ont été lavées au PBS/BSA (0.1%) trois fois puis incubées avec un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome spécifique de l'anticorps primaire (goat-Alexa Fluor 555) pendant 30 minutes. Les cellules ont été lavées au PBS/BSA (0.1%) trois fois, puis montées entre lame et lamelles. La fluorescence des SDC-4 sauvages ou muté a été détectée à l'aide de l'EGFP ($\lambda_{excitation} = 488$ nm, $\lambda_{émission} = 507$ nm) et le marquage membranaire intégrine β 1 à l'aide du fluorochrome Alexa Fluor 555 ($\lambda_{excitation} = 553$ nm, $\lambda_{émission} = 568$ nm). Le double marquage des cellules (SDC-4-EGFP visible en vert et intégrine β 1-Alexa Fluor 555 visible en rouge) nous a permis de localiser l'expression des SDC-4 et de confirmer leur adressage membranaire.

Nous avons également étudié la translocation membranaire des PKC- α et PKC- δ . En effet, pour être activées ces deux PKC nécessitent une translocation membranaire. Pour étudier ce mécanisme, nous avons co-transfecté les HUV-EC-Cs avec un plasmide codant pour l'EGFP seule ou fusionnée (N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del) et avec un plasmide codant pour une protéine fluorescente rouge seule ou fusionnée (DsRed2, PKC- α , mCherry ou PKC- δ). Directement après la transfection, les cellules co-transfectées sont déposées dans une boite de Pétri à fond en verre à raison de 50 000 cellules/200µL de milieu. Les cellules co-transfectées ont été incubées ou non 24 heures après la transfection avec RANTES/CCL5 (3 nM) ou TPA (0.5 µM) pendant 15 minutes pour les cellules exprimant la PKC- α ou 30 minutes pour les cellules exprimant la PKC- α ou mutés a été détectée à l'aide de l'EGFP ($\lambda_{excitation} = 488$ nm, $\lambda_{émission} = 507$ nm) et la fluorescence de la PKC- α à l'aide du DsRed2 ($\lambda_{excitation} = 563$ nm, $\lambda_{émission} = 582$ nm) ou de la

PKC-δ à l'aide du mCherry ($\lambda_{\text{excitation}} = 587 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{émission}} = 610 \text{ nm}$). Le double marquage des cellules (SDC-4-EGFP visible en vert et PKC-α ou PKC-δ visible en rouge) nous a permis de détecter la translocation membranaire de la PKC-α ou PKC-δ en temps réel.

Parallèlement nous avons étudié le mécanisme de translocation, et donc d'activation, de la PKC- α et de la PKC- δ . La PKC- α , contrairement à la PKC- δ est décrite comme une PKC dépendante du calcium pour son activation, or il a été montré que le SDC-4 pouvait activer la PKC- α en absence de calcium, nous avons donc utilisé des milieux dépourvus de calcium. Pour ce faire, nous avons incubé les cellules co-transfectées avec de l'EGTA (0.1 μ M) ou du Bapta-AM (10 μ M) pendant 1 heure à 37°C, deux chélateurs de calcium, puis nous les avons stimulées avec RANTES/CCL5 (3 nM) pendant 15 minutes et étudié la translocation membranaire de la PKC- α .

Nous avons également étudié l'implication des RCPG de RANTES/CCL5 dans la translocation membranaire de la PKC- α en transfectant les cellules avec le SDC-4-EGFP, la PKC- α -DsRed2 et le siRNA CCR1, CCR5 ou control (300 nM).

Nous avons étudié l'importance des chaînes HS du SDC-4 dans la translocation membranaire de la PKC- α et de la PKC- δ par stimulation des cellules co-transfectées par les mutants GAG-déficients de RANTES/CCL5 (R47E-RANTES/CCL5 ou 3-Ala-RANTES/CCL5, 3 nM) pendant 15 minutes pour la PKC- α ou 30 minutes pour la PKC- δ ou en pré-incubant les cellules co-transfectées avec des enzymes de dégradation des GAG (héparitinase I à 20 mU/mL, héparitinase III à 10 mU/mL et chondroïtinase ABC à 33 mU/mL) pendant 2 heures avant la stimulation par RANTES/CCL5.

Nous avons voulu déterminer l'implication de la PKC- δ dans la translocation membranaire de la PKC- α et inversement en pré-incubant les cellules co-transfectées SDC-4/PKC- α avec un inhibiteur pharmacologique de la PKC- δ (Rottlerine, 1 μ M) ou SDC-4/PKC- δ avec un inhibiteur pharmacologique de la PKC- α (Gö6976, 1 μ M) pendant 2 heures avant la stimulation par RANTES/CCL5.

Nous avons par ailleurs étudié l'implication du SDC-4 dans la morphologie des HUV-EC-Cs après traitement par RANTES/CCL5. Les cellules transfectées par le SDC-4 sauvage ou mutant couplé à l'EGFP ont été stimulées 24 heures après la transfection avec RANTES/CCL5 sauvage (3 nM) ou muté (R47E-RANTES/CCL5 ou 3-Ala-RANTES/CCL5, 3 nM) pendant 15 minutes et la morphologie des cellules a été analysée en temps réel sous microscopie confocale. L'aire cellulaire avant et après la stimulation par RANTES/CCL5 a été déterminée et la différence a été quantifiée à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health). La formation de filopodes et lamellipodes ainsi que la migration directionnelle des cellules ont été analysées avant et après la stimulation par RANTES/CCL5.

Nous avons également étudié l'implication de voies de signalisation intracellulaire dans la formation de filopodes et lamellipodes induites par l'axe SDC-4-RANTES/CCL5. Pour ce faire, nous avons co-transfecté les HUV-EC-Cs avec le plasmide SDC-4-EGFP et le plasmide Rac1-mCherry ou avec le plasmide SDC-4-mCherry et les plasmides RhoA-EGFP ou Cdc42-EGFP. Après 24 heures, les cellules ont été stimulées par RANTES/CCL5 (3 nM) pendant 15 minutes et la morphologie des cellules a été analysée en temps réel sous microcopie confocale.

Pour finir, nous avons étudié la morphologie des cellules transfectées avec le SDC-4 sous flux. Directement après la transfection, les cellules sont déposées à une densité de 400 000 cellules dans une chambre de flux (Ibidi) dans de l'ECBM2 12% à 37°C. Les HUV-EC-Cs transfectées par le SDC-4 sauvage ou mutant couplé à l'EGFP ont été stimulées au TNF- α (1 ng/mL) 32 heures après la transfection pendant 16 heures à 37°C puis traitées ou non avec RANTES/CCL5 (3 nM) pendant 2 heures à 37°C. Les cellules ont ensuite été soumises à un flux laminaire constant (0.67 dyn/cm²) pendant 10 minutes et la morphologie des cellules a été analysée en temps réel sous microscopie confocale. La formation de filopodes a été analysée avant et après le flux (Figure 2).

Nous avons étudié l'importance de l'interaction entre RANTES/CCL5 et les chaînes GAG dans la formation de filopodes sous flux. Les HUV-EC-Cs transfectées par le SDC-4 sauvage couplé à l'EGFP ont été stimulées au TNF- α (1 ng/mL) 32 heures après la transfection pendant 16 heures à 37°C puis traitées avec les mutants GAG-déficients de RANTES/CCL5 (R47E-RANTES/CCL5 ou 3-Ala-RANTES/CCL5, 3 nM) pendant 2 heures. La formation des filopodes a été analysée avant et après 10 minutes de flux laminaire (0.67 dyn/cm²) (Figure 2).

Les photographies et vidéos en temps réel des cellules ont été obtenues à l'aide du logiciel Zen (Carl Zeiss, MicroImaging, GmbH, Jena, Allemagne) analysées à l'aide du logiciel Scion Imager (National Institutes of Health).



Figure 2 : Système de culture en flux sous confocal

Les HUV-EC-Cs transfectées sont déposées dans une chambre de flux. Au bout de 32 heures, les cellules sont stimulées au TNF- α pendant 16 heures puis traitées ou non avec RANTES/CCL5 pendant 2 heures. La chambre de flux est disposée sur un microscope confocal et branché avec des tubulures d'entrée et de sortie. Les cellules sont soumises à un flux laminaire constant pendant 10 minutes et la morphologie des cellules est enregistrée en temps réel à l'aide du microscope confocal.

6. Expression génique : Transcription réverse - Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (RT-qPCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique permettant l'amplification d'un fragment d'ADN à l'aide de d'une amorce « sens » et d'une amorce « anti-sens » d'une vingtaine de nucléotides. Les amorces vont reconnaître la séquence complémentaire dans l'ADN et permettre l'amplification du fragment d'ADN contenu entre les deux amorces. Le fragment d'ADN peut être quantifié en temps réel par PCR quantitative (qPCR). La qPCR va utiliser soit des amorces fluorescentes (Taqman) soit des fluorochromes se fixant entre les ADN double brin (SYBRGreen) afin d'obtenir une quantification des fragments d'ADN amplifiés. La quantification reste néanmoins relative à un gène contrôle, dit « de ménage », dont l'expression est censée rester stable entre les différentes conditions étudiées. La transcription réverse (RT) est une technique utilisée pour analyser l'expression génique. Elle va permettre de transformer l'ARNm en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide d'une transcriptase inverse. Tous les ARNm vont être rétro-transcrits en ADNc.

La RT-PCR est l'association de ces deux techniques. Les ARNm sont rétro-transcrits en ADNc (RT) puis le fragment d'ADN d'intérêt est amplifié (PCR). Cela permet d'étudier l'expression d'un gène. Nous avons utilisé une RT-qPCR de type Taqman pour étudier l'expression génique des protéines EXT-1 et EXT-2.

Avant de procéder à la RT-qPCR, il est nécessaire d'extraire et de purifier les ARN des cellules.

A. Extraction des ARN

L'ARN de 2.10⁶ cellules HUV-EC-Cs transfectées par les plasmides N3 ou SDC-4 a été extrait 24 heures après la transfection en utilisant le kit RNeasy plus (Qiagen). Une résine chargée positivement fixe l'ARN par interaction ionique avec les groupements phosphates chargés négativement de l'ARN. L'ARN est ensuite purifié par lavages successifs avec des tampons de concentration croissante en NaCl.

Les cellules transfectées sont décollées, centrifugées puis le culot cellulaire est lysé dans du tampon RLT- β -mercaptoéthanol (1%) à l'aide d'une seringue. Le lysat est déposé dans la gDNA eliminator spin column qui va fixer l'ADN génomique, puis la colonne est centrifugée à 10 000 g pendant 30 secondes. L'éluat (ARN) est homogénéisé avec un volume d'éthanol (70%), déposé sur la RNeasy spin column qui va fixer l'ARN, puis la colonne est centrifugée à 10 000 g pendant 30 secondes. L'éluat est éliminé et la colonne est lavée avec du tampon RW1 et centrifugée à 10 000 g pendant 30 secondes. L'éluat est éliminé et la colonne est lavée avec du tampon RW1 et centrifugée à 10 000 g pendant 30 secondes. L'éluat est éliminé et la colonne est lavée avec du tampon RPE-éthanol (80%), centrifugée à 10 000 g pendant 30 secondes puis lavée une deuxième fois avec du tampon RPE-éthanol (80%) et centrifugée à 10 000 g pendant 2 minutes. La colonne est centrifugée à 10 000 g pendant 1 minute afin d'enlever toute trace de tampon puis l'ARN est élué avec de l'eau RNase-free (sans RNase, 30 μ L) par centrifugation à 10 000 g pendant 1 minute. L'ARN est enfin dosé par spectrophotométrie à 260 nm selon la loi de Beer-Lambert (DO= ϵ .Lc).

B. Transcription réverse (RT)

Les ARN extraits sont rétro-transcrits en ADNc à l'aide du High capacity cDNA reverse transcription kit (Applied biosystems). Les ARN (1-2 μ g) sont incubés avec du tampon RT, un mélange de dNTP (4 mM), des amorces aléatoires pour RT et la rétro-transcriptase multiscribe (2 U/mL). La solution est incubée à 25°C pendant 10 minutes puis la réaction est effectuée à 37°C pendant 2 heures.

C. Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel (qPCR)

Les fragments d'ADNc rétro-transcrits d'intérêt sont amplifiés par qPCR taqman. L'ADNc est incubé avec le taqman gene expression master mix (Applied biosystem) et avec l'amorce spécifique fixée à la sonde fluorescente (Applied biosystems). La qPCR (1 cycle de 2 étapes (2 minutes à 95°C, 10 minutes à 95°C), 40 cycles de 2 étapes (15 secondes à 95°C, 6 minutes à 60°C)) est réalisée avec un Stepone plus real-time PCR system (Applied biosystems). Nous avons analysé l'expression des gènes EXT-1 et EXT-2 en utilisant la GAPDH comme gène contrôle.

7. Expression protéique A. Western Blot

Le western blot est une technique permettant l'analyse de l'expression protéique. Les protéines sont extraites des cellules puis séparées selon leur poids moléculaire. La quantité relative de protéine est déterminée à l'aide d'anticorps spécifiques ciblant la protéine d'intérêt et d'anticorps secondaires couplés à la péroxydase. La péroxydase est mise en contact avec son substrat permettant une détection de la présence et de la quantité relative de la protéine d'intérêt. Nous avons utilisé le western blot pour analyser l'expression du SDC-4, du SDC-4 phosphorylé sur la sérine 179 (pSDC-4) et de la PKC- α .

a. Extraction des protéines / Kit de fractionnement

Les protéines de 2.10⁶ cellules HUV-EC-Cs transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del ont été extraites 24 heures après la transfection soit en fraction

totale avec un tampon de lyse soit en utilisant le subcellular protein fractionation kit for cultured cells (Pierce) afin d'obtenir différentes fractions subcellulaires. Les cellules transfectées ont été stimulées ou non par RANTES/CCL5 (3 nM), le FGF-2 (20 ng/mL) ou le TPA (0.5 μ M) pendant 15 minutes à 37°C.

Pour la fraction totale, les cellules stimulées ou non sont lavées puis lysées directement dans le tampon de lyse sur de la glace. Le lysat est récupéré, soniqué et centrifugé. Le surnageant contenant les protéines est enfin dosé à l'aide du BCA protein assay kit (Pierce) par spectrophotométrie à 570 nm.

Pour obtenir un fractionnement, les cellules stimulées ou non sont décollées puis centrifugées. Les cellules sont ensuite lavées dans du PBS froid, une partie des cellules est récupérée pour obtenir la fraction totale comme décrit précédemment et l'autre partie des cellules est centrifugée à 500 g pendant 5 minutes à 4°C pour faire le fractionnement. Le culot cellulaire est incubé avec le tampon CEB pendant 10 minutes à 4°C sous agitation puis centrifugé à 500 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant (fraction cytoplasmique) est récupéré et le culot est incubé avec le tampon MEB pendant 15 minutes à 4°C sous agitation puis centrifugé à 3 000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant (fraction membranaire) est récupéré et les concentrations protéiques des différentes fractions (totale, cytoplasmique, membranaire) sont dosées.

b. Migration SDS-page

Les protéines extraites (10 µg pour la PKC- α et 22 µg pour les SDC-4 et pSDC-4) sont incubées avec du bleu de Laemmli (Tris-HCl (62.5 mM), glycérol (25%), SDS (2%), Bromophenol Blue (0.01%)) pour les charger négativement et du β -mercaptoéthanol (4%) pour rompre les ponts disulfures puis chauffé à 95°C pendant 5 minutes.

Les protéines ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire sont ensuite déposées dans les puits d'un gel d'acrylamide vertical composé d'un gel de charge à 6% suivi d'un gel de migration à 10% plongé dans la solution de migration. Le gel est ensuite soumis à un ampérage constant de 30 mA par gel, formant un courant électrique avec le pôle négatif « en haut » et le pôle positif « en bas ». Le courant négatif va repousser les protéines (chargées négativement) vers le bas du gel, permettant leur migration. Le gel de charge permet à toutes les protéines de migrer quelque soit leur taille jusqu'à l'intersection entre les gels de charge et de migration afin qu'elles migrent à partir du même point de départ. Plus les protéines sont petites, plus elles migreront facilement à travers les mailles d'acrylamide du gel, permettant une séparation des protéines en fonction de leur taille. La migration est arrêtée lorsque le front de migration est arrivé en bas du gel. Les protéines ne sont pas visibles à ce moment, seules les protéines du marqueur de poids moléculaire sont visibles (Figure 3).



Figure 3 : Migration des protéines en western blot

Les protéines sont déposées dans les puits du gel de charge (1) puis soumises à un courant électrique permettant la migration des protéines jusqu'à l'intersection des gels de charge et de migration (2). La migration va continuer vers le pôle positif (+) jusqu'à ce que le front de migration soit arrivé en bas du gel de migration. Les protéines sont ainsi séparées selon leur taille et le marqueur de poids moléculaire (PM) nous indique la taille des protéines (3).

c. Transfert

Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées du gel d'acrylamide à une membrane de nitrocellulose. Le gel et la membrane sont mis en contact dans un système entre deux buvards et deux mousses. Le système est plongé dans un tampon de transfert (TGS) et soumis à un voltage constant de 100 V pendant 1 heure, formant un

courant électrique avec le pôle négatif « en dessous » du gel et le pôle positif « au dessus » de la membrane. Le courant négatif va repousser les protéines du gel vers la membrane, permettant leur transfert (Figure 4).



Figure 4 : Transfert des protéines en western blot

Le gel d'agarose contenant les protéines est mis en contact avec une membrane de nitrocellulose en « sandwich » entre deux buvards et deux mousses (1). Le courant est allumé et les protéines du gel vont migrer du pôle négatif (-) au pôle positif (+) et ainsi être transférées sur la membrane de nitrocellulose (2).

A la fin du transfert, les protéines présentes sur le gel ont été transférées sur la membrane. Afin de vérifier que le transfert a fonctionné, la membrane est incubée dans une solution de rouge ponceau (0.1%) qui se fixe aux protéines permettant une coloration rouge des protéines ayant été transférées sur la membrane. La coloration est ensuite retirée par trois lavages successifs avec du tampon de lavage (TBS/BSA) pendant 10 minutes sous agitation.

d. Saturation / Incubation des anticorps

Afin de réduire les fixations non spécifiques des anticorps, la membrane est saturée avec le tampon de saturation (TBS/BSA/MLK) pendant 1 heure sous agitation puis une nuit sous agitation à 4°C.

Le lendemain, la membrane est lavée trois fois avec du tampon de lavage (TBS/BSA) pendant 10 minutes sous agitation puis la membrane est incubée avec l'anticorps primaire spécifique (SDC-4, pSDC-4 ou PKC- α) ou son isotype (rabbit IgG, goat IgG ou mouse IgG2b respectivement) à différentes concentrations (1 µg/mL, 0.5 µg/mL ou 0.5 µg/mL respectivement) dans du tampon d'incubation (TBS/BSA) pendant 2 heures sous agitation. La membrane est lavée trois fois avec du tampon de lavage (TBS/BSA) pendant 10 minutes sous agitation puis la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire spécifique (anti-rabbit (0.16 µg/mL), anti-goat (0.2 µg/mL) ou anti-mouse (0.16 µg/mL) respectivement) couplé à la péroxydase (HRP) dans du tampon d'incubation (TBS/BSA) pendant 1 heure sous agitation. La membrane est enfin lavée trois fois avec du tampon de lavage pendant 10 minutes sous agitation.

e. Révélation

Afin de détecter la présence et la quantité relative de protéines, la membrane est incubée pendant 1 minute dans de l'ECL western blot detection (Pierce) contenant le substrat de la péroxydase (luminol) qui émettra de la lumière. La membrane est mise en contact avec un film photographique et la lumière captée par le film est révélé à l'aide d'un bain dans une solution de révélateur puis de fixateur (Figure 5).





Les protéines d'intérêt présentes sur la membrane de nitrocellulose sont reconnues par l'anticorps primaire spécifique de la protéine (1). L'anticorps primaire est reconnu par un anticorps secondaire couplé à la péroxydase (HRP) spécifique de l'anticorps primaire (2). La péroxydase va être mise en contact de son substrat (luminol) et produire de la lumière qui va être captée par un film photographique permettant la détection de la protéine d'intérêt (3).

La quantité relative de protéines présentes est déterminée par mesure de la densité optique à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health).

B. Pull Down

Le pull down est une technique permettant l'analyse de l'activité d'une protéine. Elle consiste en la purification de la forme activée d'une protéine (forme lié au GTP, à l'ATP) à l'aide de billes magnétiques suivie d'un western blot. Nous avons étudié l'activité de Rac1 à l'aide du kit Rac1 activation magnetic beads pulldown assay (Millipore).

a. Purification des formes actives des protéines

Les protéines de 2.10⁶ cellules HUV-EC-Cs transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del ont été extraites 24 heures après la transfection. Les cellules transfectées ont été stimulées ou non par RANTES/CCL5 (3 nM) pendant 15 minutes à 37°C.

Les cellules stimulées ou non sont lavées deux fois dans du PBS froid puis lysées directement dans le tampon MLB sur de la glace. Le lysat est récupéré et centrifugé à 14 000 g pendant 5 minutes à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est incubé avec les billes Pak-1 PDB magnetic beads (10 μ g) pendant 45 minutes à 4°C sous agitation. Les billes ayant fixé Rac1-GTP sont lavées trois fois avec le tampon MLB froid pour retirer toute les autres protéines (dont Rac1-GDP). Les billes sont finalement resuspendues dans du bleu de Laemmli (40 μ L).

b. Western Blot

Les étapes de western blot après le pull down Rac1 sont similaires à celles décrites précédemment. Les billes (40 μ L) sont chauffées à 95°C pendant 5 minutes avec du DTT (50 mM) et la solution est déposée sur deux gels d'acrylamide pour le marquage avec l'anticorps anti-Rac1 ou avec l'isotype mouse lgG2a.

La migration et le transfert sont identiques au western blot classique. La saturation se fait par deux incubations successives de tampon de saturation (PBST/MLK) puis l'incubation avec l'anticorps anti-Rac1 ou son isotype mouse IgG2a (1 μ g/mL) se fait dans du tampon d'incubation (PBST/MLK) la nuit à 4°C sous agitation. Le lendemain, après trois lavages de 10 minutes sous agitation avec le tampon de lavage (PBST), les membranes sont incubées avec l'anticorps secondaire spécifique anti-mouse couplé à l'HRP (0.16 μ g/mL) pendant 90 minutes sous agitation dans du tampon d'incubation (PBST/MLK). Les membranes sont lavées trois fois pendant 10 minutes sous agitation avec du tampon de lavage (PBST) puis la révélation est effectuée comme décrit précédemment.

8. Effets cellulaires impliqués dans l'angiogenèse

L'angiogenèse est un processus complexe composé de plusieurs effets cellulaires tels que l'adhérence et l'étalement des cellules à un support, la migration et l'invasion des cellules sur et à travers un support ou encore l'allongement cellulaire.

A. Adhérence

Les cellules HUV-EC-Cs transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del ont été décollées au PBS/EDTA (10 mM) 24 heures après la transfection. Les cellules transfectées ont été stimulées ou non par RANTES/CCL5 ou par un mutant GAG-déficient (R47E-RANTES/CCL5, 3Ala-RANTES/CCL5, 3 nM) et 12 500 cellules/puits d'une plaque 96 puits sont déposées sur un support de plastique ou de fibronectine (100 µg/mL) pendant 2, 5, 10 ou 15 minutes à 37°C. Parallèlement, les cellules ont été prétraitées ou non avec un inhibiteur pharmacologique de la PKC- α , PKC- δ ou RhoA/RhoG (Gö6976 1 µM, Rottlerine 1 µM ou C3 exoenzyme 10 ng/mL respectivement) dans de l'ECBM2 12% pendant 2 heures à 37°C.

Les cellules ont ensuite été lavées au PBS puis incubées avec une solution de pnitrophenyl phosphate, un substrat des phosphatases alcalines, supplémenté en Triton X100 (0.2%) pendant 30 minutes à 37°C. La quantité relative de cellules est ensuite quantifiée par spectrophotométrie à 415 nm.

B. Etalement

Les cellules HUV-EC-Cs transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del ont été décollées 24 heures après la transfection. Dans un labtek 8 puits en verre, 5 000 cellules transfectées ont été stimulées ou non par RANTES/CCL5 (3 nM) sont déposées sur un support de fibronectine (100 μ g/mL) dans de l'ECBM2 12% pendant 2 heures à 37°C.

Les cellules ont ensuite été lavées au PBS, fixées au PFA (1%) puis perméabilisées avec du PBS/Triton X100 (0.02%) pendant 2 minutes. Les cellules ont été lavées avec du PBS/BSA (0.1%) trois fois puis incubées pendant 1 heure avec de la phalloïdine couplé à l'Alexa Fluor (7.5 U/mL, $\lambda_{\text{excitation}}$ = 578 nm, $\lambda_{\text{émission}}$ = 600 nm) permettant de mettre en évidence le cytosquelette d'actine. Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS/BSA (0.1%) puis montées entre lame et lamelle.

Les cellules ont été photographiées sous microscopie à fluorescence (AXIOPHOT, Zeiss) et l'aire cellulaire a été quantifiée à l'aide du logiciel Scion Imager (National Institutes of Health).

C. Migrations / Invasion a. Migration en Blessure

Directement après la transfection, les cellules transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del sont déposées à 150 000 cellules par puits dans une plaque 24 puits dans de l'ECBM2 12% à 37°C. Après 24 heures, les cellules sont incubées avec du milieu ECBM sans facteurs de croissance ni SVF pendant 8 heures pour synchroniser les cellules dans un même cycle cellulaire. La monocouche de cellules transfectées ainsi formée est blessée avec un cône (largeur 1.5 mm). Les cellules décollées sont éliminées par rinçage au PBS et les cellules sont incubées ou non avec RANTES/CCL5 (3 nM) dans du milieu ECBM2 12% pendant 16 heures à 37°C.

Aux temps t = 0 (juste après la blessure) et t = 16 heures (à la fin de l'expérience), cinq photos de la blessure sont prises en microscopie à contraste de phase. La distance entre les deux bords de la blessure est mesurée et la distance parcourue par chaque front de migration entre les temps t = 0 et t = 16 heures est quantifiée.

b. Migration / Invasion en Boyden

Les cellules HUV-EC-Cs transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del ou co-transfectées avec le plasmide K368M ont été décollées 24 heures après la transfection. Les cellules transfectées ont été déposées dans une chambre supérieure (avec un fond poreux) d'une chambre de Boyden sur un support de fibronectine (100 µg/mL) pour la migration (50 000 cellules) ou de Matrigel (matrice extracellulaire de synthèse, 320 µg/mL) pour l'invasion (150 000 cellues) pendant 24 heures à 37°C. Dans la chambre inférieure, est placée une solution d'ECBM2 12% supplémentée ou non par RANTES/CCL5 (3 nM) ou par un mutant GAG-déficient (R47E-RANTES/CCL5 ou 3Ala-RANTES/CCL5, 3 nM).

Parallèlement, pour la migration les cellules ont été prétraitées ou non avec un inhibiteur pharmacologique de la PKC- α , PKC- δ , PP1/2A, Rho Kinase, JNK/SAPK, MAPK, Rac1, Cdc42 ou RhoA/RhoG (Gö6976, Rottlerine, Cantharidic acid, Y27632, SP600125, PD98059, NSC à 1 μ M, ML141 à 10 μ M ou C3 exoenzyme à 10 ng/mL respectivement) ou avec des enzymes de dégradation des GAG (héparitinase I à 20 mU/mL, héparitinase III à 10 mU/mL et chondroïtinase ABC à 33 mU/mL) dans de l'ECBM2 12% pendant 2 heures à 37°C.

Après 24 heures de migration ou d'invasion, les cellules dans la chambre supérieure sont retirées par grattage et les cellules ayant migré de l'autre côté de la surface poreuse sont fixées à l'éthanol pendant 20 minutes, marquées à l'hémalun (0.5%) pendant une nuit, lavées puis quantifiées sous microscopie à contraste de phase (Figure 6).



Figure 6 : Migration / Invasion en chambre de Boyden

Les cellules transfectées sont déposées dans la chambre supérieure d'un système de chambre de Boyden dont le fond poreux est recouvert de fibronectine (migration) ou de matrigel (invasion). Une solution de chimioattraction est déposée dans la chambre inférieure afin d'attirer les cellules (1). Les cellules vont traverser le fond poreux de la chambre supérieure (2). Après 24 heures, les cellules de la chambre supérieure sont éliminées par retournement puis grattage au coton-tige et les cellules ayant migré de l'autre coté de la chambre sont fixées, colorées et comptées (3).

D. Angiogenèse in vitro

Les cellules HUV-EC-Cs transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del ont été décollées 24 heures après la transfection. Dans un labtek 8 puits en verre, 12 500 cellules transfectées ont été stimulées ou non par RANTES/CCL5 (3 nM) ou par un mutant GAG-déficient (R47E-RANTES/CCL5 ou 3Ala-RANTES/CCL5, 3 nM) et déposées sur un support de Matrigel (1 mg/mL) pendant 24 heures à 37°C.

Parallèlement, les cellules ont été prétraitées ou non avec un inhibiteur pharmacologique de la PKC- α , PKC- δ , PP1/2A, Rac1 ou Cdc42 (Gö6976, Rottlerine, Cantharidic acid, NSC à 1 μ M ou ML141 à 10 μ M respectivement) dans de l'ECBM2 12% pendant 2 heures à 37°C.

Après 24 heures, les cellules ont été lavées au PBS, fixées au PFA (1%), marquées au crystal violet (0.05%) pendant une nuit, lavées puis montées entre lame et lamelle.

Les cellules ont été photographiées sous microscopie à contraste de phase et la longueur cellulaire a été quantifiée à l'aide du logiciel Scion Imager (National Institutes of Health).

9. Effets cellulaires impliqués dans le recrutement cellulaire

Le recrutement monocytaire nécessite plusieurs étapes parmi lesquelles l'arrêt de monocytes sur une couche de cellules endothéliales, l'étalement des monocytes et la transmigration des monocytes à travers la monocouche endothéliale.

A. Arrêt monocytaire en statique

Directement après la transfection, les HUV-EC-Cs transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del sont déposées à une densité de 300 000 cellules dans un puits de labtek 8 puits dans de l'ECBM2 12% à 37°C. Après 24 heures, les cellules sont colorées au CMTMR (10 μ M, $\lambda_{excitation}$ = 555 nm, $\lambda_{émission}$ = 575 nm) pendant 20 minutes. Les cellules ont été stimulées au TNF- α (1 ng/mL) 32 heures après la transfection pendant 16 heures à 37°C puis traitées ou non avec RANTES/CCL5 (3 nM) pendant 2 heures à 37°C. Les monocytes, préalablement marqués au DAPI (1 μ g/mL, $\lambda_{excitation}$ = 310 nm, $\lambda_{émission}$ = 456 nm), sont ensuite déposés à une densité de 200 000 cellules sur la monocouche d'HUV-EC-Cs pendant 30 minutes à 37°C.

Parallèlement, les HUV-EC-Cs ont été prétraitées ou non avec un inhibiteur pharmacologique de la PKC- α , PKC- δ , Rac1 ou RhoA/RhoG (Gö6976, Rottlerine, NSC à 1 μ M ou C3 exoenzyme à 10 ng/mL respectivement) dans de l'ECBM2 12% pendant 2 heures à 37°C.

Après 30 minutes de co-culture, le surnageant est retiré, les cellules sont fixées au PFA (1%) puis montées entre lame et lamelle.

La totalité du puits a été photographiée (12 photos) sous microscopie à fluorescence (AXIOPHOT, Zeiss) et la quantité de monocytes adhérés a été quantifiée (Figure 7).



Figure 7 : Arrêt monocytaire en statique

Les HUV-EC-Cs transfectées sont déposées dans un labtek. Au bout de 24 heures, les cellules sont marquées au CMTMR, stimulées au TNF- α au bout de 32 heures pendant 16 heures puis traitées ou non avec RANTES/CCL5 pendant 2 heures (1). Les MM6 préalablement marqués au DAPI sont déposés sur la monocouche endothéliale (2). Après 30 minutes d'adhérence, les MM6 sont éliminés et les monocytes ayant adhéré aux HUV-EC-Cs sont fixés et comptés (3).

B. Arrêt monocytaire dynamique en flux

Directement après la transfection, les HUV-EC-Cs transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del sont déposées à une densité de 400 000 cellules dans une chambre de flux (Ibidi) dans de l'ECBM2 12% à 37°C. Après 24 heures, les cellules sont colorées au CMTMR (10 μ M, $\lambda_{excitation} = 555$ nm, $\lambda_{émission} = 575$ nm) pendant 20 minutes. Les cellules sont stimulées au TNF- α (1 ng/mL) 32 heures après la transfection pendant 16 heures à 37°C puis traitées ou non avec RANTES/CCL5 (3 nM) pendant 2 heures à 37°C. Les monocytes, préalablement marqués au DAPI (1 μ g/mL, $\lambda_{excitation} = 310$ nm, $\lambda_{émission} = 456$ nm), sont ensuite passés à une concentration de 10⁶ cellules/mL sous flux laminaire constant (0.67 dyn/cm²) sur la monocouche d'HUV-EC-Cs pendant 10 minutes.

Parallèlement, les HUV-EC-Cs ont été prétraitées ou non avec un inhibiteur pharmacologique de la PKC- α ou RhoA/RhoG (Gö6976, 1 μ M ou C3 exoenzyme à 10 ng/mL respectivement) dans de l'ECBM2 12% pendant 2 heures à 37°C.

Après 10 minutes de flux, le surnageant est retiré et les cellules sont fixées au PFA (1%).

La totalité de la chambre a été photographiée (24 photos) sous microscopie à fluorescence (AXIOPHOT, Zeiss) et la quantité de monocytes arrêtés a été quantifiée.

C. Transmigration monocytaire

Directement après la transfection, les HUV-EC-Cs transfectées par les plasmides N3, SDC-4, S179A, L188QQ ou A198del sont déposées à une densité de 250 000 cellules dans la chambre supérieure d'une chambre de Boyden sur un support de fibronectine (100 µg/mL). Après 32 heures, les cellules ont été stimulées au TNF- α (1 ng/mL) pendant 16 heures à 37°C puis traitées ou non avec RANTES/CCL5 (3 nM) pendant 2 heures à 37°C. 500 000 monocytes, préalablement marqués au CPD (5 µM, $\lambda_{excitation}$ = 647 nm, $\lambda_{émission}$ = 670 nm), sont ensuite déposés sur la monocouche d'HUV-EC-Cs pendant 2 heures à 37°C. Dans la chambre inférieure, une solution d'ECBM2 12% supplémentée ou non par MCP-1/CCL2 (3 nM) est déposée.

Après 2 heures de transmigration, les monocytes de la chambre inférieure ayant transmigrés sont récupérés, fixés au PFA (1%) puis quantifiés en cytométrie en flux en FL-4 à l'aide du CPD (5 μ M, $\lambda_{excitation}$ = 647 nm, $\lambda_{émission}$ = 670 nm) (Figure 8).



Figure 8 : Transmigration monocytaire

Les HUV-EC-Cs transfectées sont déposées dans la chambre supérieure d'un système de chambre de Boyden dont le fond poreux est recouvert de fibronectine. Au bout de 32 heures, les cellules sont stimulées au TNF- α pendant 16 heures puis traitées ou non avec RANTES/CCL5 pendant 2 heures (1). Les MM6 préalablement marqués au DAPI sont déposés sur la monocouche endothéliale et une solution de chimioattraction est déposée dans la chambre inférieure (2). Après 2 heures de transmigration, les MM6 ayant traversé la monocouche d'HUV-EC-Cs se retrouvent dans la chambre inférieure, ils sont récupérés et comptés en cytométrie en flux (3).

10. Analyse statistique

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm erreur standard à la moyenne (SEM). La différence statistique a été déterminée par une analyse de variance (ANOVA) réalisé avec le logiciel Statview (Abacus concepts). La différence entre deux groupes est considérée significative si la valeur de p < 0.05.

Communications

I. Communitations Orales

1. Groupe Français des Glycosciences, 25^{ème} journée, Paris, France (12-15/05/2014)

SYNDECAN-4 ORCHESTRATES RANTES/CCL5-INDUCED ENDOTHELIAL CELL MIGRATION AND ADHERENCE BY MODULATION OF INTRACELLULAR SIGNALING.

Loic Maillard¹, V. Friand¹, N. Suffee¹, H. Hlawaty¹, O. Haddad¹, F. Chmilewsky¹, O. Oudar¹, N. Saito², T. Ueyama², D.Letourneur¹, N. Charnaux^{1,3}, A. Sutton^{1,3}

¹INSERM U1148, UFR SMBH, Université Paris 13, PRES Paris Sorbonne Cité, Bobigny, France, ²Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan, ³Service de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, APHP, Bondy, France

Background : Angiogenesis contribute to the atheroma plaque progression by providing a source of intraplaque hemorrhage. Angiogenic growth factors and pro-inflammatory chemokines have been demonstrated in atherosclerotic lesions where they could contribute to angiogenesis. We previously described that the binding of the chemokine RANTES/CCL5 to its G protein-coupled receptors, CCR1 and CCR5, and to proteoglycans, such as syndecan-1 and -4, may exert a pro-angiogenic effect both *in vitro* and *in vivo* (Suffee et al. 2012, Angiogenesis). Syndecan-4 could also interact with the extracellular environment through the glycosaminoglycanes chains linked to the protein core. Furthermore, syndecan-4 has been demonstrated to play major role in cell migration via the activation of PKCalpha and in cell adhesion via the activation of PKCdelta leading to cytoskeleton rearrangement.

Aim : The aim of our study is to determine if the syndecan-4 intracellular domains may participate to RANTES/CCL5-induced endothelial cell migration and adherence by inducing transduction signaling.

Methods: We constructed plasmids encoding for syndecan-4, S179A-syndecan-4 or L188QQ-syndecan-4. S179A syndecan-4 leads to the constitutive activation of PKCalpha whereas L188QQ-syndecan-4, a mutant deficient in the PIP2 binding site, decreased the PKCalpha activation. We evaluated the effect of RANTES/CCL5 on transfected HUVECC cell migration and adherence. The effect of RANTES/CCL5 on syndecan-4 signaling was assessed by pharmacological inhibition and membrane translocation observed by confocal microscopy.

Results : Overexpression of syndecan-4 or S179A-syndecan-4 mutant leads to an increase of RANTES/CCL5-induced HUVECC migration and adherence by inducing signaling as PKCalpha/delta activation. In contrast, cell transfection with the L188QQ-syndecan-4 mutant reduced drastically this RANTES/CCL5-induced effect.

Conclusions : Our results suggest that the syndecan-4 represents a functional co-receptor for the chemokine RANTES/CCL5. Moreover, the targeting of PKCalpha activation may represent a therapeutic strategy to reduce the formation of early atheroma plaques.

2. Glucidoc, 4^{ème} rencontre, Landéda, France (08-10/04/2013)

L'ACTIVATION DE LA PKCα MEDIEE PAR LE DOMAINE INTRACELLULAIRE DU SYNDECANE-4 REGULE LA MIGRATION DE CELLULES ENDOTHELIALES INDUITE PAR RANTES/CCL5.

Loïc Maillard¹, Nadine Suffee¹, Naoaki Saito², Véronique Friand¹, Loïc Martin³, Hanna Hlawaty¹, Oualid Haddad¹, Fanny Chmilewsky¹, Olivier Oudar¹, Nathalie Charnaux^{1,4}, Angela Sutton^{1,4}.

¹INSERM U1148, UFR SMBH, Université Paris 13, PRES Paris Sorbonne Cité, Bobigny, France, ²Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan, ³DIEP, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France ⁴Service de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, APHP, Bondy, France

Contexte: L'angiogenèse contribue à la progression de la plaque d'athérome favorisant des hémorragies intraplaque. Il a été montré que des chimiokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissances pro-angiogeniques contribuent à l'angiogenèse dans les lésions athérosclérotiques. Nous avons précédemment montré que la liaison de la chimiokine RANTES/CCL5 à ses récepteurs couplés aux protéines G et aux protéoglycanes transmembranaires à chaînes glycosaminoglycaniques de type héparane sulfate syndécane-1 et syndécane-4 (SDC-4) joue un rôle pro-angiogénique *in vitro* et *in vivo* (Suffee et al. 2012). L'utilisation d'un mutant de RANTES/CCL5 déficient dans sa liaison aux glycosaminoglycanes, [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5, entraine une baisse des effets pro-angiogeniques de RANTES/CCL5 (Suffee et al. 2012). Il a également été montré que la migration de cellules endothéliales induite par le FGF-2 est dépendante du SDC-4 (Horowitz et al. 2002) par l'intermédiaire de la protéine kinase C α (PKC α) et implique la voie de signalisation RhoA (Kirkpatrick et al. 2007).

<u>**But</u>**: Le but de notre étude est de déterminer si le SDC-4 agit comme un co-récepteur fonctionnel de RANTES/CCL5 en induisant une signalisation intracellulaire impliquée dans ses effets pro-angiogéniques.</u>

<u>Méthode</u>: Nous avons construit des plasmides codant pour le SDC-4, le mutant S179A entrainant une activation constitutive de la PKC α , ou les mutants L188QQ déficient dans le site de liaison au PIP2, et A198del déficient dans le site de liaison aux protéines à domaine PDZ, diminuant l'activation de la PKC α . Nous avons évalué les effets de RANTES/CCL5 sur l'étalement, la migration et la formation de réseaux vasculaires de cellules endothéliales HUVECC transfectées par ces différents SDC-4. L'implication de RANTES/CCL5 dans l'activation de la PKC α , régulée par le SDC-4, a été étudiée à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques et l'observation de la translocation à la membrane de la PKC α par microscopie confocale.

<u>Résultats</u>: La sur-expression du SDC-4 ou du mutant S179A entraîne une augmentation de l'activation de la PKC α , l'étalement, la migration et la formation de réseaux vasculaires de cellules endothéliales induits par RANTES/CCL5. En revanche, la transfection par les mutants L188QQ ou A198del réduit tous ces effets.

<u>**Conclusions</u>:** Nos résultats suggèrent que le SDC-4 est un co-récepteur fonctionnel de RANTES/CCL5. De plus, cibler l'activation de la PKC α par le SDC-4 peut représenter une stratégie thérapeutique pour réduire la formation de plaques d'athérome vulnérables.</u>

3. Journée Biologie et Interface, Bobigny, France (29/04/2014)

IMPLICATION DES DOMAINES INTRACELLULAIRE DU SYNDECANE-4 DANS LES EFFETS BIOLOGIQUES INDUITS PAR LA CHIMIOKINE RANTES/CCL5 SUR DES CELLULES ENDOTHELIALES.

Loic Maillard¹, V. Friand¹, N. Suffee¹, H. Hlawaty¹, O. Haddad¹, F. Chmilewsky¹, O. Oudar¹, N. Saito², T. Ueyama², D.Letourneur³, N. Charnaux^{1,4}, A. Sutton^{1,4}

¹INSERM U1148, UFR SMBH, Université Paris 13, PRES Paris Sorbonne Cité, Bobigny, France, ²Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan, ³INSERM U1148, Université Paris 13, PRES Paris Sorbonne Cité, Paris, ⁴Service de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, APHP, Bondy, France

Contexte : Certains facteurs de croissances et chimiokines pro-angiogéniques sont retrouvés dans les lésions athérosclérotiques où ils contribuent à déstabiliser la plaque d'athérome. Nous avons précédemment montré que la chimiokine RANTES/CCL5 pouvait se fixer à ses récepteurs classiques couplés aux protéines G (RCPG) et à des protéoglycanes transmembranaires, les syndécanes (SDC) 1 et 4. Cette liaison entraîne des effets pro-angiogéniques (Suffee et al. 2012). Le SDC-4 joue un rôle dans la migration cellulaire et il a été montré que les acides aminés S¹⁷⁹, Y¹⁸⁸QQ et A¹⁹⁸ permettent une signalisation intracellulaire impliquant la PKC α en réponse au FGF-2 (Horowitz et al. 2002).

<u>But</u> : Le but de notre étude est de déterminé si les domaines intracellulaire du SDC-4 sont impliqués dans les effets pro-angiogéniques de RANTES/CCL5 via une signalisation intracellulaire.

Méthode : Nous avons construit des plasmides codant pour le Syndécane-4 sauvage ou muté : S179A qui conduit à une activation constitutive de la PKCα et deux mutants déficients dans l'activation de la PKCα, L188QQ sans site de liaison avec le PIP2 et A198del sans site de liaison aux protéines à domaine PDZ. L'impact de ces mutants a été évalué dans les effets pro-angiogéniques de RANTES/CCL5 sur des cellules endothéliales et l'implication de la PKCα a été étudiée par inhibition pharmacologique et par microscopie confocale.

<u>Résultats</u>: La surexpression du Syndécane-4 sauvage ou S179A entraine une augmentation des effets pro-angiogéniques induits par RANTES/CCL5 par l'activation de la PKC α alors que la transfection avec les mutants L188QQ et A198del réduisent les effets induits par RANTES/CCL5.

<u>Conclusions</u>: Nos résultats suggèrent que le Syndécane-4 représente un co-récepteur fonctionnel pour la chimiokine RANTES/CCL5. De plus, le ciblage de l'activation de la PKCa

pourrait représenter une stratégie thérapeutique pour réduire la formation de plaque d'athérome vulnérable.

4. Colloque des doctorants d'ERASME, Villetaneuse, France (11/04/2013)

LE DOMAINE INTRACELLULAIRE DU SYNDECANE-4 REGULE LA MIGRATION INDUITE PAR RANTES/CCL5 DE CELLULES ENDOTHELIALES PAR L'ACTIVATION DE LA PKC α

Loic Maillard¹, V. Friand¹, N. Suffee¹, H. Hlawaty¹, O. Haddad¹, F. Chmilewsky¹, O. Oudar¹, N. Saito², T. Ueyama², D.Letourneur³, N. Charnaux^{1,4}, A. Sutton^{1,4}

¹INSERM U1148, UFR SMBH, Université Paris 13, PRES Paris Sorbonne Cité, Bobigny, France, ²Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan, ³INSERM U1148, Université Paris 13, PRES Paris Sorbonne Cité, Paris, ⁴Service de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, APHP, Bondy, France

Contexte: L'angiogenèse contribue à la progression de la plaque d'athérome favorisant des hémorragies intraplaque. Il a été montré que des chimiokines pro-inflammatoires et des facteurs de croissances pro-angiogeniques contribuent à l'angiogenèse dans les lésions athérosclérotiques. Nous avons précédemment montré que la liaison de la chimiokine RANTES/CCL5 à ces récepteurs couplés aux protéines G et aux syndécane-1 et -4 joue un rôle pro-angiogénique *in vitro* et *in vivo* (Suffee et al. 2012).

<u>**But</u>**: Le but de notre étude est de déterminer si le syndécane-4 agit comme un co-récepteur fonctionnel de RANTES/CCL5 en induisant une signalisation intracellulaire impliquée dans ses effets pro-angiogéniques.</u>

<u>Méthode</u>: Nous avons construit des plasmides codant pour le syndécane-4 ou les mutants S179A, entrainant une activation constitutive de la PKC α , ou L188QQ, déficient dans le site de liaison au PIP2, diminuant l'activation de la PKC α . Nous avons évalué les effets de RANTES/CCL5 sur l'étalement, la migration et la formation de réseaux vasculaires de cellules HUVECC transfectées. L'implication de RANTES/CCL5 dans l'activation de la PKC α , régulée par le syndécane-4, a été étudiée par l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et l'observation de la translocation à la membrane de la PKC α sous microscopie confocale.

<u>**Résultats</u>**: La sur-expression du syndécane-4 ou du mutant S179A entraîne une augmentation de l'activation de la PKC α , l'étalement, la migration et la formation de réseaux vasculaires d'HUVECC induits par RANTES/CCL5. En revanche, la transfection par le mutant L188QQ réduit tous ces effets.</u>

Conclusions: Nos résultats suggèrent que le syndécane-4 est un co-récepteur fonctionnel de RANTES/CCL5. De plus, cibler l'activation de la PKCα peut représenter une stratégie thérapeutique pour réduire la formation de plaques d'athérome vulnérables.

П. **Communitations Affichées**

1. European Atherosclerosis Society, 82^{ème} congrès, Madrid, Espagne (31/05-03/06/2014) et Nouvelle Société Française d'athérosclérose, 10^{ème} congrès. Biarritz, France (19-21/06/2014)



Syndecan-4 intracellular domain orchestrates RANTES/CCL5-induced monocyte arrest on endothelial cell monolayer under flow

Loic Maillard¹, V. Friand¹, N. Suffee¹, H. Hlawaty¹, O. Haddad¹, E. Desbois¹, S. Bakhouche¹, F. Chmilewsky¹, C. Laguillier-Morizot^{1,2}, E. Guyot^{1,2}, B. Richard¹, O. Oudar¹, N. Saito³, T. Ueyama³, D.Letourneur¹, N. Charnaux^{1,2}, A. Sutton^{1, 2} ¹Inserm U1148, UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Bobigny, France, ²Service de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, APHP, Bondy, France, ³Laboratory of Molecular Pharmacology, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan



European Atherosclerosis Society, 81^{ème} congrès, Lyon, France (02-05/06/2013) et Journée de l'Ecole doctorale Galilée, Villetaneuse, France (14/05/2013)



Autre publication

ORIGINAL PAPER

RANTES/CCL5-induced pro-angiogenic effects depend on CCR1, CCR5 and glycosaminoglycans

N. Suffee · H. Hlawaty · A. Meddahi-Pelle · L. Maillard · L. Louedec · O. Haddad · L. Martin · C. Laguillier · B. Richard · O. Oudar · D. Letourneur · N. Charnaux · A. Sutton

Received: 12 January 2012/Accepted: 10 June 2012 © Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract Atherosclerosis involves angiogenesis and inflammation with the ability of endothelial cells and monocytes to respond to chemokines. We addressed here by in vitro and in vivo approaches, the role of the chemokine Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted (RANTES)/CCL5 on angiogenesis through its receptors CCR1, CCR5, syndecan-1 (SDC-1), syndecan-4 (SDC-4) and CD-44. Our data demonstrate that RANTES/ CCL5 is pro-angiogenic in a rat subcutaneous model. This RANTES/CCL5-activity may be related to the in vitro promotion of endothelial cell migration, spreading and neovessel formation. RANTES/CCL5-mediated angiogenesis depends at least partly on Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) secretion by endothelial cells, since this effect is decreased when endothelial cells are incubated with anti-VEGF receptor antibodies. RANTES/CCL5induced chemotaxis is mediated by matrix metalloproteinase-9. We demonstrate that specific receptors of RANTES/CCL5 such as G protein-coupled receptors

N. Suffee · H. Hlawaty · A. Meddahi-Pelle · L. Maillard · O. Haddad · C. Laguillier · B. Richard · O. Oudar · D. Letourneur · N. Charnaux · A. Sutton (🖂) INSERM, U698, Bio-ingenierie Cardiovasculaire; UFR SMBH, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, 74 Rue Marcel Cachin, 93017 Bobigny, France e-mail: angela.sutton@jvr.aphp.fr

L. Louedec

INSERM, U698, Bio-ingenierie Cardiovasculaire, Hopital X. Bichat, 75018 Paris, France

L. Martin DIEP, CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France

C. Laguillier \cdot N. Charnaux \cdot A. Sutton Laboratoire de Biochimie, Hôpital Jean Verdier, AP-HP, Bondy, France

Published online: 30 June 2012

CCR1 and CCR5, and heparan sulfate proteoglycans, SDC-1, SDC-4 or CD-44, play a major role in RANTES/CCL5induced angiogenic effects. By the use of two RANTES/ CCL5 mutants, [E66A]-RANTES/CCL5 with impaired ability to oligomerize, and [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 mutated in the main RANTES/CCL5-glycosaminoglycan (GAG) binding site, we demonstrate that chemokine oligomerization and binding to GAGs are essential in RAN-TES/CCL5-induced angiogenic effects. According to these results, new therapeutic strategies based on RANTES/ CCL5 can be proposed for neo-angiogenesis after vascular injury. Mutants of RANTES/CCL5 may also represent an innovative approach to prevent the angiogenesis associated with the formation of atherosclerotic plaque.

 $\label{eq:keywords} \begin{array}{l} \mbox{RANTES} \cdot \mbox{Angiogenesis} \cdot \mbox{Endothelial cells} \cdot \\ \mbox{Glycosaminoglycan} \cdot \mbox{VEGF} \cdot \mbox{MMP} \end{array}$

Introduction

Attraction and adhesion of immune cells to the endothelium and subsequent transmigration are thought to be important steps in the initiation and development of the inflammatory response associated with the development of atherosclerosis [1, 2]. Sprouting angiogenesis involves matrix metalloproteinases ensuring the degradation of the endothelial basement membrane, cell migration and formation of a space within the matrix to constitute the lumen [3]. The coordination of angiogenesis and inflammation process is achieved by the ability of endothelial cells and leukocytes to respond to chemokines which are small chemotactic cytokines that enhance direct leukocyte recruitment to inflammatory sites [2]. Some chemokines have been shown to contribute to angiogenesis by

Des Springer

stimulating endothelial cell branching and the formation of numerous long vascular sprouts in angiogenesis assays. The interaction of Stromal cell-Derived Factor-1 (SDF-1)/ CXCL12 with CXCR4, its G protein-coupled receptor (GPCR), on endothelial cells further amplifies angiogenesis by inducing more Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) release from CXCR4-bearing endothelial cells [4].

Chemokines induced leukocyte firm adhesion and transendothelial migration through their binding to their specific GPCRs and to glycosaminoglycans (GAGs) [5]. Interaction of chemokines with GAGs seems essential for their functionality, enables localized gradients to form at inflammatory sites and facilitates chemokine retention on cell surfaces [6]. The chemokines induce leukocyte arrest under flow conditions through a shear-resistant decoration of endothelial cell surfaces [7]. Among them, the chemokine RANTES/CCL5 (Regulated on Activated Normal T Cell Expressed and Secreted) is a soluble chemokine of 7.8 kDa secreted by many cell types, such as endothelial cells, macrophages, vascular smooth muscle cells, and platelets [8, 9]. Platelet P-selectin was shown to trigger RANTES/ CCL5 deposition on an endothelial cell monolayer and subsequent monocyte arrest. Moreover, the blockade of RANTES/CCL5 receptors leads to a decrease of neointima formation and macrophage infiltration [10]. Binding of RANTES/CCL5 to GAGs is crucial for its pro-inflammatory activity [11]. Mutation in the main GAG binding domain in RANTES/CCL5 has been shown to switch the [44AANA47]-RANTES/CCL5 chemokine to a potent antiinflammatory molecule in murine models of inflammatory diseases [12-14]. These observations were attributed to an impaired chemokine oligomerization on the endothelial cell surface that is crucial for its in vivo function. Indeed, RANTES/CCL5 forms higher order oligomers at micromolar concentrations [11]. [E66A]-RANTES/CCL5 is another mutant characterized by a substitution of the acidic residue at position 66 leading to a disaggregated RANTES/ CCL5 resulting in the generation of dimers and impaired ability to oligomerize and to promote leukocyte adhesion on the endothelium [15].

The role of RANTES/CCL5 oligomerization in the promotion of biological effects have been previously demonstrated through in vitro and in vivo studies [11, 15]. Whereas the efficiency of monomeric or dimeric forms of RANTES/ CCL5 to activate cell chemotaxis was described in vitro, Johnson et al. [16] demonstrated that the functionality of RANTES/CCL5 was associated with its oligomeric form in vivo. It could be related to the absence of monomeric or dimeric RANTES/CCL5 binding to GAGs in vivo [11].

RANTES/CCL5 has been detected in plasma samples of patients with cardiovascular diseases [17] and is involved in cardiac inflammatory disorders after organ transplantation or arterial injury [18]. The expression of the RANTES/

D Springer

CCL5 receptors, CCR1 and CCR5, on various cell types implicated in atherosclerosis further illustrates their role in this disease [18]. Moreover, the chemokines RANTES/ CCL5, Macrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α)/ CCL3 and MIP-1 β /CCL4 that bind to CCR1 and CCR5 are present in atherosclerotic lesions [19]. Chemokines may exert their regulatory activity on angiogenesis directly or as a consequence of leukocyte infiltration and/or the induction of growth factor expression [20].

In this study, we showed that the chemokine RANTES/ CCL5 has pro-angiogenic properties. The activity of RANTES/CCL5 was demonstrated in vivo in a rat model of angiogenesis, and in vitro by its ability to promote cellular effects associated with angiogenesis, such as human umbilical vein endothelial cell proliferation, spreading and migration through GPCR activation and binding to GAGs.

Materials and methods

Materials

RANTES/CCL5, biotinylated RANTES/CCL5 at residue 1 (B-RANTES/CCL5), [E66A]-RANTES/CCL5, a dimeric mutant, and [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 that contains three neutral amino acid substitutions within putative basic GAG-binding domains [13, 15] were synthesized by L. Martin and C. Vita (CEA Saclay, Gif-sur-Yvette, France) as previously described [21].

Antibodies and reagents

The following monoclonal (mAb) and polyclonal (pAb) antibodies were used at 5 µg/mL for 2D angiogenesis assay, migration and spreading: mouse mAbs anti-CCR1 (IgG2b), anti-CCR5 (IgG2b), goat pAbs anti-VEGF-R1 (IgG) and anti-VEGF-R2 (IgG) were from R&D Systems (Minneapolis, USA); mouse mAbs anti-syndecan-1 (SDC-1) (IgG1, clone DL-101), anti-syndecan-4 (SDC-4) (IgG2a, clone 5G9), anti-metalloproteinase (MMP)-9 (IgG1, clone 2C3), anti-CCR5 (IgG1, clone D6); rabbit pAbs anti-MMP-2 (IgG, clone H-76), anti-CCR1 (IgG, clone H-52); and goat pAbs anti-CD-44 (IgG) were from Santa Cruz, Biotechnology TEBU (Le Perray-en-Yvelines, France). Isotype controls were from BD Biosciences Pharmingen (Le Pont de Claix, France). Cells were then labeled with FITClabeled goat anti-mouse Ig (BD Bioscience Pharmingen) fixed in 1 % paraformaldehyde (PFA) from Sigma-Aldrich (Lyon, France) and analyzed on a FACScan (Becton-Dickinson, Le Pont de Claix, France). Low molecular weight heparin (reference 3149) and β -D-xyloside were from Sigma-Aldrich.

Angiogenesis

In vivo angiogenesis assay

The animal protocol was approved by the Bichat University Institutional Animal Care and Use Committee. Twenty-eight adult male Wistar rats (weighing 200–250 g, purchased from Janvier, CERJ, Laval, France) were anesthetized by intraperitoneal injection of sodium pentobarbital solution (30 mg/kg, Ceva Santé animal, France).

Fifty-six nitrocellulose discs of 8 mm diameter (VWR, Fontenay-sous-Bois, France) were sterilized overnight using ultraviolet light. The discs were divided into 7 groups and were soaked for 30 min with 20 μL of treatment solutions: RANTES/CCL5 (1 or 10 nM); VEGF (2 mM); [44ANAA47]-RANTES/CCL5 (10 nM); [E66A]-RANTES/ CCL5 (10 nM); phosphate buffer saline (PBS) as vehicle control or bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) as unrelated protein (1.6 ng/mL corresponding to the same protein quantity than 10 nM RANTES) used as negative controls. The disc implantation was performed in the subcutaneous space of the left and right sides of abdominal wall according to a permutation strategy in order to implant for each treatment 4 discs in the left side and 4 discs in the right side (n = 8 discs per treatment) and to avoid a same combination of treated disc in the left and right sides of two rats. Rats were euthanized by an over dose of pentobarbital at day 25 post-surgery, thus implants were removed with the surrounding tissue (20 mm diameter). The discs were divided into two parts: the half of the disc was fixed in paraformaldehyde 4 % and embedded in paraffin for histology and immunohistochemistry studies, the other half was stored in -80 °C to measure the levels of proteins secreted by ELISA assay.

Histology and immunohistochemistry

Seven µm-paraffin sections of implants were stained with Masson's trichrome and Toluidin blue to quantify the functional neo-vessels and digital photos were taken using OLYMPUS CK40.

Additional 7 µm disc-sections were immunostained with antibodies anti-endothelial cell marker CD31 (1:100, Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA, respectively), anti-SDC-4 (dilution 1:50, clone 5G9, Santa Cruz), anti-CD-44 (dilution 1:100, clone H-CAM, Santa Cruz), anti-SDC-1 (dilution 1:100; IgG1, clone DL-101, Santa Cruz) overnight at 4 °C. All the immunolabelling were revealed by an Alexa fluor 555 conjugated secondary antibody (1:100, Molecular Probe, Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Endothelial cell marker labeling with isolectin-B4 (dilution 1:20; Abd Serotec, Colmar, France) was revealed by Alexa fluor 555 conjugated streptavidin. All sections were also incubated with 1 mg/mL 4,6-diamidino-2-phenylindole hydrochloride (DAPI) solution (SigmaAldrich). Representative immunohistochemistry photomicrographs were taken using a Zeiss Axiophot microscope (Zeiss, AXIOPHOT, N°/MicMac, Le Pecq, France). Concerning CCR1 and CCR5 immunostaining, slides were pretreated with 10 mmol/L citrate buffer, pH 6.0. Slides were then stained with an anti-CCR1 Ab (dilution 1:100, clone H-52, Santa Cruz), anti-CCR5 (dilution 1:100, clone D-6, Santa Cruz). Slides were counterstained in hemalum (Sigma-Aldrich, Lyon, France), developed using secondary antibodies biotinylated IgG and 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, DAKO). Sections were coverslipped with aqueousbased mounting medium and observed with an optic microscope Leica Microsystem SAS, Nanterre, France.

Stability of RANTES/CCL5 retention in the nitrocellulose disc

The discs were sterilized before biotinylated RANTES/ CCL5 deposition. After 30 min, the discs were incubated in the culture medium for 30 min, 1 h, 7, 14 and 25 days in order to measure RANTES/CCL5 concentration in the culture medium by ELISA (R&D System, France). In parallel, the discs were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C, then cut in 7 µm sections using a cryostat (CM 1900; Leica Microsystem, Wetzlar, Germany). The disc sections were incubated with streptavidin-Alexa fluor 488 (1:100, Invitrogen) to reveal biotinylated RANTES/CCL5 by confocal microscopy (Zeiss LSM510, Le Pecq, France).

Cell culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUV-EC-C, N° CRL-1730, ATCC) were cultured in Endothelial Cell Basal Media 2 (PromoCell, Heidelberg, Germany) supplemented with 10 % fetal calf serum (Biological Industries, Israel), and a mix from PromoCell containing EGF (5.0 ng/mL), Hydrocortisone (0.2 μ g/mL), VEGF (0.5 ng/mL), bFGF (10 ng/mL), R3 IGF-1 (20 ng/mL), Ascorbic Acid (1 μ g/mL), Heparin (22.5 μ g/mL), 1 %, penicillin–streptomycin and L-Glutamine (1 %). Cells were divided two to three times per week at a sub cultivation ratio of 1:3. As the cells have a life expectancy of 50–60 population doublings, all the experiments were performed with cells at a passage ranging from 25 to 35.

Flow cytometry analysis

To analyze by flow cytometry the presence of CCR1, CCR5, SDC-1, SDC-4, CD-44, VEGF-R1 and VEGF-R2 at the HUV-EC-C membrane, the cells were incubated with specific antibodies described above. Cells were incubated with biotinylated RANTES/CCL5 (at 20 or 40 nM). It was previously tested that such biotinylation does not modify

Springer

RANTES/CCL5 binding properties to various cells [22]. In parallel, cells were pre-incubated for 2 h at 37 °C with anti-CCR1 antibodies (either mouse mAb IgG2b from R&D System at 5 µg/mL or rabbit polyclonal IgG from Santa Cruz at 1 µg/mL), anti-CCR5 (either mouse mAb IgG2b from R&D System at 5 µg/mL or mouse mAb IgG1 from Santa Cruz at 1 µg/mL), monoclonal antibodies anti-SDC-1, anti-SDC-4, anti-CD-44, anti-VEGF-R1, anti-VEGF-R2 (from Santa Cruz, all at 5 µg/mL), or their respective isotypes at the same concentration. The binding of RANTES/CCL5 was analyzed by flow cytometry with avidin-FITC. Reactivity was compared to avidin-FITC (R&D System).

RANTES/CCL5, VEGF, MMP-2 and MMP-9 quantifications by enzyme-linked immunosorbent assay

After a mechanical grinding of the discs at day of removal in a PBS/NaCl 1 M solution, followed by a 10,000g centrifugation for 5 min, protein levels were determined with the BCA Protein Assay Reagent (Pierce). RANTES/CCL5, MMP-2 and MMP-9 levels in disc supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to manufacturer's instructions (R&D System). VEGF concentrations in both disc supernatant and endothelial cell conditioned media were also assessed with an ELISA assay (R&D System).

In vitro angiogenesis assay

2D-angiogenesis assay was performed with 2×10^4 cells/ well seeded on rat tail collagen-coated 8-well Labtek and treated for 24 h with 3 nM RANTES/CCL5 pre-incubated or not for 2 h with 1 µg/mL heparin, [44AANA47]-RAN-TES/CCL5 or [E66A]-RANTES/CCL5. Alternatively, endothelial cells were pre-treated either with following monoclonal antibodies for 2 h: anti-CCR1, anti-CCR5, anti-SDC-1, anti-SDC-4, polyclonal antibodies anti-CD-44, anti-VEGF-R1, anti-VEGF-R2, their respective isotypes, or with 2 mM β -D-xyloside (β DX), an inhibitor of GAG synthesis, for 72 h. Alternatively, cells were pre-treated with anti-VEGF-R1 or anti-VEGF-R2 antibodies or their respective isotypes and incubated for 24 h with 2 mM VEGF. The vascular sprouts were fixed with 4 % PFA and stained with 1 % Cristal violet (Sigma-Aldrich) and photographed in phase contrast microscopy (OLYMPUS CK40) after 24 h. The average length and area of 40 vascular sprouts were evaluated using the Scion Imager System (Scion Image Software and National Institutes of Health, Release Beta 3b Software).

3D-angiogenesis assay was performed on collagen gelcoated 24-well plates containing endothelial cell spheroids

De Springer

which were prepared according to the procedure described by Korff et al. [23], and experiments were performed according to manufacturer's instructions (PromoCell). Endothelial cell spheroids were incubated for 24 h with VEGF (2 mM) [24, 25], 3 nM RANTES/CCL5, [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 or [E66A]-RANTES/CCL5.

The cell spheroids were photographed with phase contrast microscopy (OLYMPUS CK40) after 24 h. The average length and the number of vascular sprouts per spheroid were estimated for each experimental condition using Image J analysis system (NCBI).

Cell migration

Cell migration was measured from 2×10^5 endothelial cells with Bio-coat cell migration chambers (Becton-Dickinson) [26] or by wound healing assay [27]. Briefly, inserts of Bio-coat cell migration chamber were coated with fibronectin (100 µg/mL, Santa Cruz Biotechnology, TEBU). Three nM RANTES/CCL5 or [44AANA4 RANTES/CCL5 or [E66A]-RANTES/CCL5 or 2 mM VEGF were added in the lower chamber. In parallel, 2×10^5 cells were pre-incubated or not for 2 h with the following antibodies: anti-CCR1, anti-CCR5, anti-SDC-1, anti-SDC-4, anti-CD-44, anti-VEGF-R1, anti-VEGF-R2, anti-MMP-2 or anti-MMP-9. Alternatively, cells were treated with 2 mM BDX for 72 h, or RANTES/CCL5 was preincubated with 1 µg/mL heparin. The in vitro migratory activity of endothelial cells was also measured using a wound migration assay. Cells were treated with 0.03, 0.3 or 3 nM RANTES/CCL5 and the distance between cells at both sides of the wound was measured after photography under phase contrast microscopy (OLYMPUS CK40) at time 0 or 24 h. Each wound healing assay was divided into five equal independent microscope fields, and three photographs were taken per field (15 images at each time point). Each condition per experiment was done in triplicate (45 images at each time point for one experiment). The cell migration was observed as the cell movement at both sites of the wound into the middle of the scratch. The cell migration was measured as the half of the distance between initial position of the front of the wound edge and the final position of the migrated cells 24 h later. Each independent experiment per time point was reproduced 3 times.

Gelatin zymographic assay

Endothelial cells were treated with 3 nM RANTES/CCL5 or [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 or [E66A]-RANTES/ CCL5 for 24 h. Gelatinolytic activities of MMP-2 and





Fig. 1 RANTES/CCL5-induced neovessel formation in an in vivo disc angiogenesis model. a Eight mm diameter-nitrocellulose discs were pre-incubated with BSA (negative control, 1.6 ng/mL) or VEGF (2 mM) or RANTES/CCL5 (1 or 10 nM) and then subcutaneously implanted for 25 days into 6 weeks-old Wistar rats. After 25 days, discs were harvested, sectioned in paraffin and stained in Masson's trichrome reagent. *Bar* = 75 µm. Microvessels are indicated by *black arrows*. b Immunohistochemistry staining of endothelial cells around the subcutaneous nitrocellulose disc. Endothelial cells were stained with isolectin-B4 antibodies (*red*) and indicated with *white arrows*.

MMP-9 were measured in cell conditioned media as previously described [28].

Spreading test

 2×10^4 endothelial cells were serum-deprived for 24 h and seeded on an 8-well Labtek. Cells were incubated for 2 h with 3 nM RANTES/CCL5, preincubated or not with

(upper image). L = lumen. $Bar = 50 \ \mu\text{m}$. Lower image represents the control isotype. **c** The number of countable microvessels was quantified after Masson's trichrome staining and images were obtained by optic microscopy. Vessels were counted by two independent observers. Results are expressed as mean \pm SEM of counted vessels. **P* < 0.05 versus BSA negative control. **d** Histochemistry staining with toluidin blue in order to characterize red blood cells indicated by *black arrows*. L = lumen. *Bar* = 25 μ m. (Color figure online)

1 µg/mL heparin, or [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 or [E66A]-RANTES/CCL5 or 2 mM VEGF. Alternatively, cells were either pre-treated for 2 h with anti-CCR1, anti-CCR5, anti-SDC-1, anti-SDC-4, anti-CD-44, anti-VEGF-R1, anti-VEGF-R2, or their respective isotypes, or for 72 h with β DX. Cells were stained with Alexa Fluor 568 phalloidin (1:200, Invitrogen) and observed with a fluorescence microscope (Zeiss, AXIOPHOT, N°/MicMac, France S.A)

Deringer



Fig. 2 Binding of RANTES/CCL5 to endothelial cells depends on G protein coupled receptors. a Immunohistochemistry staining of CCR1 or CCR5 expression on endothelial cells around the subcutaneously implanted nitrocellulose disc. Endothelial cells were immunolabelled with anti-CCR1 or anti-CCR5 antibodies or with their control isotypes, then with HRP-labeled secondary antibodies and the nuclei were stained with hemalum. CCR1 or CCR5 expression by endothelial cells was indicated with *black arrows*. L = lumen. *Bar* = 30 µm. b Flow cytometry analysis of CCR1 and CCR5 on endothelial cells. Endothelial cells with the isotype and then with Alexa Fluor-488 (AF-488)

[21]. Ten fields of stained cells were photographed and cell areas expressed in square inches were evaluated on 30 cells with the Scion Imager. Histograms represent mean of cell areas \pm SEM of three different experiments.

labeled secondary antibodies. Data shown are representative of three independent experiments. c RANTES/CCL5 binds to HUV-EC-C cells in a dose-dependent manner. Endothelial cells were incubated with 20 or 40 nM biotinylated RANTES/CCL5 (B-RANTES) and the binding was analyzed by flow cytometry with avidin-FITC. Reactivity was compared to avidin-FITC. Data shown are representative of three independent experiments. d Inhibition of biotinylated RANTES/ CCL5 binding by preincubating endothelial cells with anti-CCR1, anti-CCR5 antibodies or the isotypes. The binding of B-RANTES/ CCL5 was analyzed by flow cytometry with avidin-FITC. Reactivity was compared to avidin-FITC

Statistical analysis

For the determination of statistical significance, an ANOVA test was performed with the Statview software

De Springer



Fig. 3 CCR1 and CCR5 are involved in RANTES/CCL5-induced angiogenic effects. a Representative phase contrast photographs of endothelial vascular sprouts in a 3D angiogenesis assay (*left panel*): $Bar = 200 \ \mu$ m. Data shown are representative of 3 independent experiments. Length of endothelial vascular sprouts in a 3D-angiogenic assay (*right panel*) are expressed as mean of vascular sprout length in 3D assay \pm SEM for three independent experiments. *P < 0.05 versus untreated cells (UT). b RANTES/CCL5 increased endothelial vascular sprout length in a 2D-angiogenic assay (*left panel*): The results are expressed as mean of vascular sprout length \pm SEM for three independent experiments. *P < 0.05 versus untreated cells (UT). RANTES/CCL5-induced angiogenic effect in a 2D assay depends on CCR1 and CCR5 (*right panel*). The length of endothelial vascular sprout formed by cells treated with specific control isotypes was arbitrary set to 100 %. The results reated with anti-CCR1 or control cells.

*P < 0.05 versus isotypes. c RANTES/CCL5 induced endothelial cell migration (*left panel*). Results are expressed as mean ± SEM of endothelial cells counted by field for three independent experiments. *P < 0.05 versus untreated cells. RANTES/CCL5-induced endothelial cell migration in the presence of specific antibodies anti-CCR1 or anti-CCR5 is shown as a percentage of migrated cells pre-incubated with the isotype. *P < 0.05 versus isotype. d RANTES/CCL5 at 3 nM induced endothelial cell spreading (*left panel*). Results are expressed as mean ± SEM of endothelial cell areas, expressed in *square* inches, measured by field for three independent experiments. *P < 0.05 versus untreated cells areas, expressed in spread-ing depends on CCR1 and CCR5 (*right panel*). RANTES/CCL5-induced cells yreading of endothelial cells pre-incubated with the isotype was arbitrary set to 100 %. *P < 0.05 versus endothelial cells pre-incubated with the isotype was arbitrary set to 100 %. *P < 0.05 versus endothelial cells pre-incubated with the isotype was arbitrary set to 100 %. *P < 0.05 versus endothelial cells pre-incubated with the isotype was arbitrary set to 100 %. *P < 0.05 versus endothelial cells pre-incubated with the isotype was arbitrary set to 100 %. *P < 0.05 versus endothelial cells pre-incubated with the isotype was arbitrary set to 100 %. *P < 0.05 versus endothelial cells pre-incubated with the isotype

0.03 0.3

+ anti-CCR1

> + anti-CCR1

> > anti-CCR1

anti-CCR5

+ anti-CCR5

anti-CCR5

RANTES (nM)

Springer



O Springer

Angiogenesis

◄ Fig. 4 RANTES/CCL5-induced biological effects depend on VEGF, MMP-2 and MMP-9. a VEGF, MMP-2 and MMP-9 levels were measured by ELISA in the supernatant of disc preincubated with vehicle or VEGF (2 mM) or RANTES/CCL5 (10 nM). *P < 0.05 versus vehicle. b HUV-EC-C cells expressed VEGF receptors VEGF-R1 and VEGF-R2 as assessed by flow cytometry. Data shown are representative of three independent experiments. c VEGFor RANTES/CCL5-induced migration of cells pre-incubated with the specific control isotype was arbitrary set to 100 %. VEGF- or RANTES/CCL5-induced cell migration in the presence of anti-VEGF-R1 and -VEGF-R2, anti-MMP-2 or anti-MMP-9 antibodies, is shown as a percentage of control. ${}^{\&}P < 0.05$ versus control cells preincubated with isotypes and treated with VEGF, *P < 0.05 versus control cells pre-incubated with isotypes and treated with RANTES/ CCL5. d VEGF- or RANTES/CCL5-induced cell spreading in the presence of anti-VEGF-R1 and anti-VEGF-R2, anti-MMP-2 or anti-MMP-9 antibodies was compared to cell spreading in the presence of the control isotypes. VEGF- or RANTES/CCL5-induced cell spreading of endothelial cells pre-incubated with the control specific isotype was arbitrary set to 100 %. $^{\&}P < 0.05$ versus control cells preincubated with isotypes and treated with VEGF, *P < 0.05 versus control cells pre-incubated with isotypes and treated with RANTES/ CCL5. e Vascular sprouts in a 2D-angiogenic assay after cell treatment with RANTES/CCL5 were photographed in phase contrast microscopy. Bar = 25 µm (left panel). VEGF- or RANTES/CCL5induced endothelial vascular sprout length in the presence of anti-VEGF-R1, anti-VEGF-R2, anti-MMP-2 or anti-MMP-9 antibodies was compared to endothelial vascular sprout in the presence of the isotype (right panel). VEGF- or RANTES/CCL5-induced vascular sprout formation by endothelial cells pre-incubated with the control specific isotype was arbitrary set to 100 %. $^{\&}P < 0.05$ versus control cells pre-incubated with isotypes and treated with VEGF, *P < 0.05versus control cells pre-incubated with isotypes and treated with RANTES/CCL5. f RANTES/CCL5 increased both MMP-2 and MMP-9 pro-forms in endothelial cell conditioned medium representative gelatin zymography showing pro-MMP-9 (97 kDa) and pro-MMP2 (72 kDa) activities after a 24 h-incubation of endothelial cells with RANTES/CCL5 (lower panel). Histograms represent pro-MMP-2 or pro-MMP-9 forms assessed by gelatin zymography (upper panel). Results were expressed as mean \pm SEM (n = 3) in arbitrary units (AU). ***P < 0.001 versus untreated cells (UT)

(StatView 4.5 Abacus Concepts, Berkeley, USA). A P value of < 0.05 was used as the criterion of statistical significance.

Results

RANTES/CCL5 induces vessel formation in a rat-disc angiogenesis model

We used a rat angiogenesis model, in which a nitrocellulose disc was implanted in subcutaneous pocket. Before its subcutaneous implantation, the nitrocellulose disc was incubated or not with the chemokine RANTES/CCL5 at 1 or 10 nM concentrations. Negative controls included discs incubated either with vehicle control (PBS) or with BSA (1.6 ng/mL). Despite the interactions between BSA and numerous biomolecules, it may represent a more appropriate negative control than a protein-free buffer such as PBS [29]. RANTES/CCL5 induced the formation of large vessels with irregular shapes, whereas those obtained in the disc treated with protein-free PBS vehicle control or BSA were long and thin (Fig. 1a). The angiogenic effect of RANTES/CCL5 was confirmed by a specific immunostaining for the vascular markers, isolectin-B4 or CD31 (Fig 1b and data not shown). Quantitative analysis on histological slides by two different observers demonstrated that the chemokine at 1 and 10 nM significantly increased the number of vessels by 42 ± 3 % and by 63 ± 5 % respectively as compared to vehicle (n = 3, P < 0.05, Fig. 1c). The counted vessels comprise vessels with a lumen and collapsed ones. However, a quantitative analysis on isolectin-B4 stained slides revealed that less than 6 ± 1 % of vascular structures were collapsed corresponding to a non significant part of the counted vessels (n = 3, data not shown). Moreover, the mean area of the vessels surrounding the discs incubated with 10 nM RAN-TES/CCL5 was twofold higher than around the vehicleincubated ones, and was similar to that around 2 mM VEGFincubated discs used as positive controls [30] (data not shown; n = 3, P < 0.05 for RANTES/CCL5 or VEGF vs. vehicle). The functionality of the neo-formed micro-vessels was evidenced by the presence of red blood cells stained with toluidine blue within the vessel lumen (Fig. 1d).

GPCRs are essential for RANTES/CCL5 proangiogenic effect

As RANTES/CCL5 acts on cells through binding to GPCRs, CCR1 and CCR5, we examined the expression of these receptors on the disc-sections. Immunohistochemical staining with anti-CCR1 or anti-CCR5 Abs revealed that endothelial cells of neo-formed vessels expressed CCR1 and CCR5 as compared to the control isotype (Fig. 2a). To raise the question whether the pro-angiogenic properties of the chemokine RANTES/CCL5 was a direct effect, we used a cellular model of human endothelial cells. These cells secreted the chemokine RANTES/CCL5 in their conditioned medium. The daily production was estimated at 30 ± 2 ng/mL, corresponding to 3.75 nM (n = 3).

Endothelial cells expressed CCR1, CCR5, as assessed by flow cytometry assay using two different antibodies against each receptor (Fig. 2b and data not shown). Biotinylated RANTES/CCL5 binds to endothelial cells in a dose dependent manner (Fig. 2c). This binding was mostly inhibited by anti-CCR5 antibodies, whereas anti-CCR1 antibodies only slightly affected RANTES/CCL5 binding to endothelial cell membrane (Fig. 2d).

Indeed, the binding of RANTES/CCL5 was significantly decreased by 23 ± 7 % using mouse mAb IgG2b anti-CCR5 or by 27 ± 6 % using mouse mAb IgG1 anti-CCR5

Description Springer
(n = 3, P < 0.05, data not shown) whereas the binding of RANTES/CCL5 was unchanged by mouse mAb IgG2b anti-CCR1 as it decreased RANTES/CCL5 binding by only 5 ± 3 % and was slightly but significantly reduced by 16 ± 4 % using pAb rabbit anti-CCR1 (n = 3, P < 0.05).

Vascular sprout formation was assessed in a 3D-angiogenesis assay that contains endothelial cell spheroids included in collagen. RANTES/CCL5 increased the number and the length of formed vessels (Fig. 3a left panel). Regarding vascular sprout number, RANTES/CCL5 at 3 nM increased by 2.6-fold the number of the formed vessels as compared to untreated (n = 3, P < 0.05, data not shown) and appeared to be twofold more efficient than VEGF (60 \pm 6 % vs. 30 \pm 5 % increase respectively, n = 3, P < 0.05, data not shown). Furthermore, RANTES/CCL5 at 3 nM increased by 37 \pm 3 % the length of the formed vessels (n = 3, P < 0.05, Fig. 3a right panel), conversely to lower RANTES/CCL5 and VEGF appeared to exert a similar effect (n = 3, Fig. 3a right panel).

In a 2D-angiogenesis assay, 3 nM RANTES/CCL5 significantly increased the area of the formed vascular sprout as compared to untreated cells (n = 3, P < 0.05, data not shown), as well as their length (n = 3, P < 0.05, Fig. 3b left panel), in contrast to lower chemokine concentrations. Interestingly, RANTES/CCL5-induced 2D-angiogenic effects were significantly inhibited when cells were pre-incubated with anti-CCR1 or anti-CCR5 antibodies. Incubation of endothelial cells with anti-CCR1 or anti-CCR5 antibodies. Incubation of endothelial cells with anti-CCR1 or anti-CCR5 antibodies reduced the area of the neo-formed vascular sprout after RANTES/CCL5 stimulation by 75 ± 11 % or 75 ± 5 % respectively (n = 3, P < 0.05, data not shown), and their length by 51 ± 8 % or 64 ± 10 % respectively (n = 3, P < 0.05, Fig. 3b right panel) as compared to the control isotype.

In this cellular model, RANTES/CCL5 at 3 nM increased endothelial cell migration by 50 ± 3 % as compared to control, whereas lower concentrations did not have any effect in a Boyden chamber chemotaxis assay (n = 3, P < 0.05, Fig. 3c left panel). At the same concentration, the chemokine RANTES/CCL5 significantly increased by 23 ± 4 % the induction of cell migration as compared to untreated cells in a wound healing assay (n = 3, P < 0.05, data not shown). RANTES/CCL5 at 3 nM significantly increased endothelial cell spreading by 26 ± 1 %, as compared to untreated cells (n = 3, P < 0.05, Fig. 3d). RANTES/CCL5-induced cell migration and spreading were inhibited when cells were preincubated with anti-CCR1 or anti-CCR5 antibodies (Fig. 3c, d right panels). Indeed, RANTES/CCL5-induced chemotactic effect was abolished by anti-CCR5 and reduced by anti-CCR1 antibodies (99 ± 9 % and 53 ± 8 % inhibition respectively; n = 3, P < 0.05, Fig. 3c right panel). RANTES/CCL5-mediated cell spreading was inhibited when cells were pre-incubated with anti-CCR1 or

Des Springer

anti-CCR5 antibodies ($48 \pm 5\%$ or $56 \pm 4\%$ inhibition respectively; n = 3, P < 0.05, Fig. 3d right panel).

RANTES/CCL5 angiogenic effects depend on VEGF endothelial cell secretion

As chemokines such as SDF-1/CXCL12 or MCP-1/CCL2 have been demonstrated to up-regulate VEGF expression [31, 32], we investigated the effect of RANTES/CCL5 on VEGF secretion. VEGF protein levels were measured by an ELISA assay in disc supernatants or in endothelial cell conditioned media. VEGF protein levels were 33 % higher in RANTES/CCL5-disc supernatants than in vehicle-disc supernatants (210 \pm 85 vs. 158 \pm 11 pg/mL, P < 0.05, Fig. 4a). In endothelial cell conditioned media, VEGF protein levels measured by ELISA were 25 % higher after cell stimulation with RANTES/CCL5 (52.2 \pm 3.2 vs. 41.9 ± 5.6 pg/mL, P < 0.05, data not shown). The incubation of endothelial cells with anti-CCR1 or anti-CCR5 antibodies diminished by respectively 92 ± 12 % or 64 ± 8 % (n = 3, P < 0.05, data not shown) the secretion of VEGF following 3 nM RANTES/CCL5 stimulation, suggesting that VEGF secretion induced by the chemokine depends on its binding to CCR1 and CCR5.

RANTES/CCL5-mediated in vitro effects were assessed when cells were incubated with anti-VEGF receptor (VEGF-R1 and VEGF-R2) Abs. We detected by flow cytometry the presence of VEGF-R1 and VEGF-R2 receptors at the cell membrane of HUV-EC-C cells (Fig. 4b). We previously verified the efficacy and specificity of functional blockade of cellular exogenous VEGF effects by anti-VEGF-R1 and anti-VEGF-R2 Abs in migration, spreading and 2D angiogenesis assays (Fig. 4ce). When pre-incubating endothelial cells with anti-VEGF-R1 or anti-VEGF-R2 Abs, RANTES/CCL5-mediated cell migration (Fig. 4c) and RANTES/CCL5-mediated cell spreading (Fig. 4d) were unaffected. In contrast, anti-VEGF-R1 Abs decreased by 88 ± 21 % or anti-VEGF-R2 Abs decreased by 77 \pm 16 % the vascular sprout length in 2D-angiogenesis assay induced by RANTES/CCL5 (n = 3, P < 0.05, Fig. 4e). These data suggest that VEGF does not participate in RANTES/CCL5-induced endothelial cell spreading or migration but is involved in the RANTES/CCL5-proangiogenic effects by promoting the vascular network formation.

Involvement of matrix metalloproteinases MMP-9 and MMP-2 in RANTES/CCL5-induced angiogenic effects

As assessed by an ELISA assay, MMP-2 and MMP-9 protein levels were measured in vehicle- or VEGF- or RANTES/CCL5-treated disc supernatants. Figure 4a

Angiogenesis



Fig. 5 Binding of RANTES/CCL5 to endothelial cells involved proteoglycans. a Immunohistochemistry staining of SDC-1, SDC-4 or CD-44 proteins on endothelial cells around the subcutaneously implanted nitrocellulose disc. Endothelial cells were immunolabelled with anti-SDC-1, anti-SDC-4, anti-CD-44 antibodies (*red*) or with their respective control isotypes and the nuclei were stained with DAPI. SDC-1, SDC-4 or CD-44 expression by endothelial cells was indicated with *white arrows*. L = lumen. *Bar* = 25 µm. b Flow cytometry analysis of SDC-1, SDC-4 and CD-44 on endothelial cell surface. Endothelial cells were incubated with anti-SDC-1, anti-SDC- 4 and anti-CD-44 antibodies or with the respective isotypes and then with Alexa Fluor-488 (AF-488) labeled secondary antibodies. Data shown are representative of three independent experiments. c Inhibition of biotinylated RANTES/CCL5 (B-RANTES) binding by preincubating endothelial cells with anti-SDC-1, anti-SDC-4 or anti-CD-44 antibodies or with their respective isotypes. The binding of biotinylated RANTES/CCL5 (at 40 nM) was analyzed by flow cytometry with avidin-FITC. Reactivity was compared to avidin-FITC. (Color figure online)

demonstrated that RANTES/CCL5 at 10 nM, as well as VEGF, increased significantly MMP-9 level as compared to vehicle whereas MMP-2 level was unaffected (Fig. 4a). RANTES/CCL5 also significantly induced the secretion of both MMP-2 and MMP-9 pro-forms in endothelial cell conditioned medium as assessed by gelatin zymography (n = 3, P < 0.001, Fig. 4f). The pre-incubation of cells with anti-MMP-9 antibodies reduced endothelial cell

Des Springer





migration by 73 \pm 9 % (n = 3, *P* < 0.05, Fig. 4c) while anti-MMP-2 antibody had no significant effect (11 \pm 6 % inhibition, n = 3, Fig. 4c). Cell spreading induced by RANTES/CCL5 was significantly reduced by 35 \pm 13 % with anti-MMP-2 antibodies and by 73 \pm 6 % with anti-MMP-9 antibodies (n = 3, *P* < 0.01, Fig. 4d) as compared to specific isotypes. RANTES/CCL5-induced vascular sprout formation also required these MMPs as the vascular sprout length was significantly inhibited by 46 \pm 12 % with anti-MMP2 antibodies and by 67 \pm 9 % with anti-MMP-9 antibodies (n = 3, *P* < 0.05, Fig. 4e).

RANTES/CCL5-heparan sulfate proteoglycan interaction and endothelial cell migration

As heparan sulfate proteoglycans are RANTES/CCL5 receptors, we examined the expression of syndecan-1 (SDC-1), syndecan-4 (SDC-4) or CD-44 on the disc-sections. Immunohistochemical staining revealed that SDC-1, SDC-4 and CD-44 are expressed by endothelial cells of neo-formed vessels (Fig. 5a).

Expression of the heparan sulfate proteoglycans CD-44, SDC-1, SDC-4 was evidenced by flow cytometry at the

D Springer

Angiogenesis

◄ Fig. 6 Proteoglycans and glycosaminoglycans are involved in RAN-TES/CCL5-induced biological effects. a-c The effects of proteogly-cans SDC-1, SDC-4 and CD-44 in RANTES/CCL5-mediated cellular effects were assessed by the comparison between the inhibitions observed after cell incubation with specific antibodies or with control isotypes. RANTES/CCL5-induced biological effects of cells preincubated with the control specific isotypes were arbitrary set to 100 %. The results for antibodies-treated cells were expressed as a percentage of control cells. a RANTES/CCL5-increased length of endothelial vascular sprout formed in a 2D assay depends on proteoglycans. *P < 0.05 versus isotypes. b RANTES/CCL5-induced endothelial cell migration is dependent on SDC-1, SDC-4 and CD-44. *P < 0.05; **P < 0.01 versus isotypes, c RANTES/CCL5-induced endothelial cell spreading. *P < 0.05 versus endothelial cells preincubated with specific isotypes. d-f The effects of glycosaminoglycans in RANTES/CCL5-mediated cellular effects were assessed after RANTES/CCL5 pre-incubation with heparin (1 µg/mL) or cell preincubation with β -D-xyloside (β DX). The results for cells stimulated by RANTES/CCL5 in the presence of heparin were expressed as a percentage of cells stimulated by RANTES/CCL5 in the absence of heparin. Similarly, the results for cells treated with β -D-xyloside and stimulated by RANTES/CCL5 were expressed as a percentage of control untreated cells stimulated by RANTES/CCL5. d RANTES/CCL5-increased endothelial vascular sprout length depends on glycosaminoglycans. *P < 0.05 versus control cells e Results of RANTES/CCL5-induced cell migration were expressed as cell number/field. *P < 0.05 versus untreated cells, migrated towards control medium (in the absence of RANTES/CCL5). $^{\$}P < 0.05$ versus control untreated cells migrated towards RAN-TES/CCL5. f RANTES/CCL5-increased area of endothelial cells on spreading assay depends on glycosaminoglycans. *P < 0.05 cells stimulated by RANTES/CCL5 pre-incubated with heparin versus cells stimulated by RANTES/CCL5. *P < 0.05 cells treated with β p-xyloside and stimulated by RANTES/CCL5 versus control untreated cells stimulated by RANTES/CCL5

membrane of the endothelial cells (Fig. 5b). RANTES/ CCL5 binding to endothelial cells was inhibited by the cell pre-incubation with anti-SDC-1, anti-SDC-4 or anti-CD44 Abs (Fig. 5c). Inhibition of RANTES/CCL5 binding by specific antibodies has been quantified: RANTES/CCL5 binding to endothelial cells was decreased slightly but significantly by 20 \pm 3 % after cell pre-incubation with anti-SDC-1 Abs or by 13 \pm 4 % after cell pre-incubation with anti-SDC-4 Abs or by 14 \pm 8 % after cell pre-incubation with anti-SDC-4 Abs or by 14 \pm 8 % after cell pre-incubation

Incubation of endothelial cells with anti-SDC-1, SDC-4 or CD-44 blocking antibodies reduced both the length and the area of the neo-formed vascular sprout in a 2D-angiogenesis model after RANTES/CCL5 induction (Fig. 6a and data not shown). More precisely, as compared to their respective isotypes, anti-SDC-1, anti-SDC-4 or anti-CD-44 antibodies decreased significantly the vascular sprout area by 58 ± 7 %, 52 ± 13 % or 58 ± 7 %, respectively (n = 3, P < 0.05, data not shown), and the vascular sprout length by 27 ± 3 %, 44 ± 7 % or 78 ± 10 % respectively (n = 3, P < 0.05, Fig. 6a). These results highlighted the major role played by these proteoglycans in RANTES/CCL5-induced angiogenic effects.

RANTES/CCL5-induced cell migration was completely abolished by pre-incubating the chemokine with anti-SDC-4 antibodies (100 ± 4 % inhibition; n = 3, P < 0.01), and decreased by anti-SDC-1 or anti-CD-44 antibodies (82 ± 8 % or 67 ± 13 % inhibition respectively, n = 3, P < 0.05, Fig. 6b).

RANTES/CCL5-mediated cell spreading was inhibited when cells were pre-incubated with anti-SDC-1 (28 \pm 3 %) or anti-SDC-4 (34 \pm 2 %) antibodies (n = 3, P < 0.05, Fig. 6c). Anti-CD-44 antibody had no effect on HUV-EC-C cell spreading (Fig. 6c).

RANTES/CCL5-mediated effects depend on glycosaminoglycans

RANTES/CCL5 is a heparin-binding protein and we addressed whether the GAG-RANTES/CCL5 interaction plays a role in mediating the biological effects mediated by the chemokine. Endothelial cell treatment with β -D-xyloside (β DX) reduced both the length and the area of the neoformed vascular sprouts in a 2D-angiogenesis model induced by RANTES/CCL5 by $51 \pm 3 \%$ (n = 3, P < 0.05, Fig. 6d) and by 55 \pm 6 % (n = 3, P < 0.05, data not shown), as compared to control cells. Similarly, the pre-incubation of the chemokine with heparin (1 µg/ mL) reduced the length and the area of the neo-formed vascular sprout induced by RANTES/CCL5 by 62 \pm 3 % (n = 3, P < 0.05, Fig. 6d) and by $60 \pm 4\%$ (n = 3, P < 0.05, Fig. 6d)P < 0.05, data not shown) respectively. Heparin or treatment with β DX alone did not affect the length or the area of the neo-formed vascular sprout in a 2D-angiogenesis assay (data not shown).

When the cells were pre-treated with β DX, endothelial cell chemotaxis towards RANTES/CCL5 was totally abolished (n = 3, P < 0.05, Fig. 6e). The pre-incubation of RANTES/CCL5 with heparin (1 µg/mL) abolished the RANTES/CCL5-induced migration of endothelial cells (n = 3, P < 0.01, Fig. 6e). None of these compounds significantly affected the basal migration (data not shown).

When the cells were pre-treated with β DX, endothelial cell spreading induced by RANTES/CCL5 was reduced by 49 ± 5 % (n = 3, *P* < 0.05, Fig. 6f). The pre-incubation of RANTES/CCL5 with heparin decreased the RANTES/CCL5-induced spreading of endothelial cells by 46 ± 2 % (n = 3, *P* < 0.05, Fig. 6f). Heparin or treatment with β DX alone did not affect the spreading of endothelial cells (data not shown).

RANTES/CCL5 mutants as a new therapeutic approach

As GAGs play major roles in mediating RANTES/CCL5 effects, we hypothesized that GAG-deficient RANTES/

D Springer

CCL5 mutants could be efficient in inhibiting the chemokine biological effects.

In a 2D angiogenesis assay, [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/ CCL5 had no effect on vascular sprout length (Fig. 7a) but increased significantly the number of the formed vascular sprout by only 15 ± 2 % (n = 3, P < 0.05, Fig. 7b) as compared to untreated cells. The number of vascular sprout was 2/3 lowered after incubation with [E66A]-RANTES/ CCL5 compared to RANTES/CCL5 (n = 3, P < 0.05, Fig. 7b), and the dimeric mutant was unable to increase the length of the vascular sprout (n = 3, P < 0.05, Fig. 7a).

[⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 increased endothelial chemotaxis by 34 ± 16 % relative to the medium alone (n = 3, P < 0.05, Fig. 7c), corresponding to a 52 ± 8 % decrease compared to RANTES/CCL5 (n = 3, P < 0.05, Fig. 7c). No effect on the endothelial cell migration was observed after [E66A]-RANTES/CCL5 treatment (n = 3, P < 0.05, Fig. 7c). The lower chemotactic effect of [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 or [E66A]-RANTES/CCL5 mutants may rely on their lower efficiency to induce MMP-2 and MMP-9 pro-forms in endothelial conditioned medium as assessed by gelatin zymography (data not shown). Moreover, [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 and [E66A]-RANTES/CCL5 had no effect on endothelial cell spreading (Fig. 7d).

The effects of [44AANA47]-RANTES/CCL5 and [E66A]-RANTES/CCL5 mutants were then evaluated in vivo in the angiogenesis model (Fig. 7e). [44AANA47]-RANTES/CCL5 at 10 nM increased the number of vessels located around the disc by 19 ± 8 % as compared to vehicle and appeared 3.3-fold less efficient than RANTES/ CCL5 (Fig. 7f). [E66A]-RANTES/CCL5 did not modify the number of the vessels as compared to vehicle (n = 3,P < 0.05, Fig. 7e). The mean vessel area incubated with either [44AANA47]-RANTES/CCL5 or [E66A]-RANTES/ CCL5 was decreased by 59 ± 10 % or 38 ± 11 % respectively as compared to RANTES/CCL5-incubated disc (n = 3, P < 0.05, data not shown). Histochemical analysis (Fig. 7e) and isolectin-B4 immunostaining (data not shown) revealed that [44AANA47]-RANTES/CCL5 or [E66A]-RANTES/CCL5 induced the formation of small vessels with regular shapes located around the discs as compared to those observed for discs incubated with RANTES/CCL5. Taken together, these data demonstrated that these mutants were less efficient than RANTES/CCL5 to induce microvessels neoformation as observed in vivo both at the macroscopic and microscopic levels.

Discussion

The role of angiogenesis in cardiovascular diseases is complex: It occurs in the atherosclerotic plaque, where it is

De Springer

suggested to contribute to plaque progression and destabilization [33]. Angiogenesis is also important for neovascularization of ischaemic tissues [5].

RANTES/CCL5 is secreted by many cell types such as platelets, endothelial cells, smooth muscle cells, macrophages and activated T cells. Through its binding to the GPCR CCR1, CCR3 or CCR5, this chemokine is known for its role in the homing and activation of inflammatory cells and is therefore involved in targeting inflammatory cell recruitments into damaged or inflamed tissue. RAN-TES/CCL5 has been also implicated in a variety of pathological processes, including atherosclerosis and inflammatory diseases [9, 34]. The pro-angiogenic role of RANTES/CCL5 in cancer has been suggested. RANTES/ CCL5 increases breast cancer progression and may act in a paracrine manner to support the metastatic process by its ability to increase vascularity [35]. Apart from the tumoral pathology, few articles have investigated the putative effects of RANTES/CCL5 in angiogenesis and controversy still exists about the role of this chemokine [36]. RANTES/ CCL5 proangiogenic effects have been evoked. Indeed, it was demonstrated that RANTES/CCL5 is required for angiogenesis following peripheral ischemia in a rat hind limb ischemia model [37]. Ambati et al. [38] reported that CCR5-deficient mice experienced a sustained inhibition of corneal neovascularization after chemical and mechanical denudation of corneal epithelium, an effect correlated with reduced VEGF expression. These studies mentioned above are in sharp contrast with data reported by Barcelos et al. [19] in which exogenous RANTES/CCL5 reduced angiogenesis in mice at day 14 in a disc-induced inflammatory angiogenesis assay, Furthermore, Cochain et al. [39] did not evidence any control of the RANTES/CCL5-CCR5 axis on post-ischemic vessel growth.

Our data demonstrate both in vivo and in vitro an angiogenic effect of the chemokine RANTES/CCL5. Whereas inhibition of CCR5 reduced importantly the RANTES/CCL5 binding conversely to CCR1, antibody inhibition of CCR1 or CCR5 affected in the same extent the RANTES/CCL5-induced neo-vascular sprout formation in a 2D-angiogenesis assay (about 75 % inhibition) as well as endothelial cell spreading (about 50 % inhibition). In contrast, CCR5 seemed to play a major role in RAN-TES/CCL5-induced cell migration as this effect was almost abolished after cell incubation with anti-CCR5 antibody whereas CCR1 appeared to be a less essential GPCR for the chemotactic effect of RANTES/CCL5. Whereas it is well established that blockade of RANTES/CCL5 receptors is associated with a decrease in atherosclerosis process, the specific roles of CCR1 and CCR5 are not well documented [40]. In transgenic mice models, CCR5 genetic deletion protected against neointima formation, reduced atherosclerotic lesion extent, favored the stability of the plaque,











Fig. 7 RANTES/CCL5 mutants are less efficient than RANTES/ CCL5 to induce pro-angiogenic effects, **a**, **b** After endothelial cell incubation with VEGF (2 mM) or RANTES/CCL5 or [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 or [E66A]-RANTES/CCL5 (each at 3 nM), cells were submitted to a 2D angiogenesis assay to measure the length (**a**) or the number (**b**) of the neo-formed vascular sprouts. The results are expressed as mean \pm SEM of vascular sprout length measured in μ m (**a**) or as mean \pm SEM of number vascular sprout by field (**b**) for three independent experiments. **P* < 0.05 versus untreated cells (UT). **P* < 0.05 versus cells treated with RANTES/CCL5 (3 nM), **c** Endothelial cell migration induced by RANTES/CCL5 (3 ch AIANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 or [E66A]-RANTES/CCL5 (each at 3 nM) was assessed by a Boyden chamber assay. Results were expressed as mean \pm SEM of endothelial cells counted by field for three independent experiments. **P* < 0.05 versus untreated cells (UT) migrated toward medium, **P* < 0.05 versus untreated cells migrated toward

RANTES/CCL5 (3 nM). **d** Endothelial cell spreading induced by RANTES/CCL5 or [⁴⁺AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 or [E66A]-RAN-TES/CCL5 (each at 3 nM) was assessed by a Boyden chamber assay. Results were expressed as mean ± SEM of endothelial cell areas (square inches) counted by field for three independent experiments. **P* < 0.05 versus untreated cells (UT), ⁸*P* < 0.05 versus untreated cells stimulated by RANTES/CCL5 (3 nM), e Nitrocellulose discs containing vehicle or RANTES/CCL5 or [¹⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 or [E66A]-RANTES/CCL5 (each at 10 nM) were implanted subcutaneously in rats. Histochemistry analysis was performed with Masson's trichrome at the day of removal. Microvessels are indicated by *black arrows. Bar* = 50 µm. **f** Histograms represent the mean ± SEM of eapillary number around the disc quantified according to the disc treatment with vehicle or RANTES/CCL5 (cach at 10 nM). **P* < 0.05 versus vehicle; ⁸*P* < 0.05 versus RANTES/CCL5

Description Springer

In contrast, lack of CCR1 had no effect on neointimal area but increased atherosclerotic plaque development [40]. In a recent study, Son et al. [41] demonstrated that binding of CCL23 to CCR1 was essential for the induction of MMP-2 activity and the invasion of vascular endothelial cells. It is well known that MMPs play a major role for endothelial cell migration and invasion process. To ensure endothelial cell invasion through the tissue space occupied by the extracellular matrix, MMPs play a pivotal role in extracellular matrix degradation. We previously reported the upregulation of MMP in response to the chemokines in several cell lines [42]. Our study highlighted the effects of MMPs in vitro, particularly MMP-9, in endothelial cell spreading, migration and 2D-angiogenesis. We confirmed the involvement of MMP-9 in vivo as its level was largely increased in disc supernatants after RANTES/CCL5 treatment.

Our data also demonstrate that RANTES/CCL5 proangiogenic effects depend, at least partly on VEGF secreted by endothelial cells. VEGF represents the pivotal growth factor involved in angiogenesis and previous studies described an interaction between VEGF and some chemokines. Indeed, the existence of a regulatory loop between VEGF and CXCL12/CXCR4 supports the crucial role of the chemokine SDF-1/CXCL12 in the regulation of angiogenesis [43]. An additional mechanism could rely on the RANTES/CCL5-induced homing of endothelial progenitor circulating cells. It was previously demonstrated that platelet aggregation releases chemokines such as RANTES/CCL5. Platelets can enhance neovascularization at least partly by RANTES/CCL5-enhanced CD34+ cell adhesion [44]. In addition to the role of RANTES/CCL5 in the induction and modulation of inflammation, RANTES/ CCL5 stimulates the homing and participation of endothelial progenitor cells in renal vascular regeneration [45].

RANTES/CCL5 pro-angiogenic activity relies on its binding to its proteoglycan receptors, SDC-1, SDC-4 and CD-44, as described for other cells [46, 47]. The role of chemokine oligomerization and binding to GAGs in the pro-angiogenic activity of RANTES/CCL5 was also demonstrated by the use of the GAG-binding deficient and nonaggregating mutant [44AANA47]-RANTES/CCL5 [11, 16, 48] and of [E66A]-RANTES/CCL5, a dimeric form of RANTES/CCL5. Here, both mutants display a reduced ability to induce the migration of endothelial cells and the vascular network formation. Interestingly, [44AANA47]-RANTES/CCL5 and [E66A]-RANTES/CCL5 led to a reduced number of vessels and to a lower area in comparison with RANTES/CCL5 in the disc angiogenesis model. Johnson et al. [16] reported that [44AANA47]-RANTES/CCL5 mutant functions as a dominant-negative inhibitor in a number of inflammatory models. It was also previously demonstrated in vitro that both RANTES/CCL5

D Springer

mutants are fully competent in activating CCR5 and the [⁴⁴AANA⁴⁷]-RANTES/CCL5 is about 100-fold less effective in activating CCR1 [15, 49].

RANTES/CCL5 is involved in atherosclerotic plaque formation [9]. Therefore, targeting RANTES/CCL5 cellular effects may serve as a potential therapeutic strategy for i/prevention in pathological development, ii/cardiovascular disease treatment. On the one hand, the positive effects of RANTES/CCL5 to induce neoangiogenesis and the formation of vascular sprout may be of interest to preserve the capacity for angiogenesis during anti-atherosclerotic therapy as neovascularization is required to restore blood flow to ischemic tissues after vessel occlusion. New strategies could be proposed with RANTES/CCL5 in specific ischemic experimental models such as ischemic hindlimb muscle of rat or cardiac ischemia. On the other hand, mutants of RANTES/CCL5 such as [44AANA47]-RANTES/CCL5 and [E66A]-RANTES/CCL5, by decreasing monocyte adhesion and arrest, may be helpful to inhibit the progression of intimal hyperplasia, restenosis and atherosclerosis.

Acknowledgments This work was supported by the Direction de la Recherche et des Enseignements Doctoraux (Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche), the University Paris 13 and INSERM. N. Suffce was supported by a fellowship from Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France).

Conflict of interest None.

References

- Braunersreuther V, Mach F, Steffens S (2007) The specific role of chemokines in atherosclerosis. Thromb Haemost 97:714–721
- Tedgui A, Mallat Z (2006) Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. Physiol Rev 86:515–581
- genic and regulatory pathways. Physiol Rev 86:515–581
 Van Hinsbergh V, Koolwijk P (2008) Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. Cardiovasc Res 78:203–221
- Salcedo R, Oppenheim JJ (2003) Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. Microcirculation 10:359–370
- Khurana R, Simons M, Martin JF, Zachary IC (2005) Role of angiogenesis in cardiovascular disease: a critical appraisal. Circulation 112:1813–1824
- Charo IF, Ransohoff RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. N Engl J Med 354:610–621
- Baltus T, von Hundelshausen P, Mause SF, Buhre W, Rossaint R, Weber C (2005) Differential and additive effects of plateletderived chemokines on monocyte arrest on inflamed endothelium under flow conditions. J Leukoe Biol 78:435–441
- Hayes IM, Jordan NJ, Towers S et al (1998) Human vascular smooth muscle cells express receptors for CC chemokines. Arterioscler Thromb Vasc Biol 18:397–403
- Pattison JM, Nelson PJ, Huie P, Sibley RK, Krensky AM (1996) RANTES chemokine expression in transplant-associated accelerated atherosclerosis. J Heart Lung Transplant 15:1194–1199

Angiogenesis

- Von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, Proudfoot AE, Nelson PJ, Ley K, Weber C (2001) RANTES RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. Circulation 103:1772–1777
- Proudfoot AE, Handel TM, Johnson Z et al (2003) Glycosaminoglycan binding and oligomerization are essential for the in vivo activity of certain chemokines. Proc Natl Acad Sci USA 100: 1885–1890
- Braunersreuther V, Pellieux C, Pelli G et al (2010) Chemokine CCL5/RANTES inhibition reduces myocardial reperfusion injury in atherosclerotic mice. J Mol Cell Cardiol 48:789–798
- Segerer S, Johnson Z, Rek A et al (2009) The basic residue cluster (55)KKWVR(59) in CCL5 is required for in vivo biologic function. Mol Immunol 46:2533–2538
- Solari R, Offord RE, Remy S et al (1997) Receptor-mediated endocytosis of CC-chemokines. J Biol Chem 272:9617–9620
- Baltus T, Weber KS, Johnson Z, Proudfoot AE, Weber C (2003) Oligomerization of RANTES is required for CCR1-mediated arrest but not CCR5-mediated transmigration of leukocytes on inflamed endothelium. Blood 102:1985–1988
- Johnson Z, Kosco-Vilbois MH, Herren S et al (2004) Interference with heparin binding and oligomerization creates a novel antiinflammatory strategy targeting the chemokine system. J Immunol 173:5776–5785
- Parissis JT, Adamopoulos S, Venetsanou KF, Mentzikof DG, Karas SM, Kremastinos DT (2002) Serum profiles of CC chemokines in acute myocardial infarction: possible implication in postinfarction left ventricular remodeling. J Interferon Cytokine Res 22:223–229
- Veillard NR, Kwak B, Pelli G, Mulhaupt F, James RW, Proudfoot AE, Mach F (2004) Antagonism of RANTES receptors reduces atherosclerotic plaque formation in mice. Circ Res 94:253–261
- Barcelos LS, Coelho AM, Russo RC et al (2009) Role of the chemokines CCL3/MIP-1 alpha and CCL5/RANTES in disc-induced inflammatory angiogenesis in mice. Microvasc Res 78:148–154
- Bernardini G, Ribatti D, Spinetti G et al (2003) Analysis of the role of chemokines in angiogenesis. J Immunol Methods 273:83–101
- Charni F, Friand V, Haddad O et al (2009) Syndecan-1 and syndecan-4 are involved in RANTES/CCL5-induced migration and invasion of human hepatoma cells. Biochim Biophys Acta 1790:1314–1326
- Vita C, Drakopoulou E, Ylisastigui L et al (2002) Synthesis and characterization of biologically functional biotinylated RANTES. J Immunol Methods 266:53–65
- Korff T, Augustin HG (1998) Integration of endothelial cells in multicellular spheroids prevents apoptosis and induces differentiation. J Cell Biol 143:1341–1352
- 24. Davis GE, Camarillo CW (1996) An alpha 2 beta 1 integrindependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. Exp Cell Res 224:39–51
- Bayless KJ, Davis GE (2003) Sphingosine-1-phosphate markedly induces matrix metalloproteinase and integrin-dependent human endothelial cell invasion and lumen formation in three-dimensional collagen and fibrin matrices. Biochem Biophys Res Commun 12:903–913
- Sutton A, Friand V, Brule-Donneger S et al (2007) Stromal cellderived factor-1/chemokine (C-X-C motif) ligand 12 stimulates human hepatoma cell growth, migration, and invasion. Mol Cancer Res 5:21–33
- Hlawaty H, Suffee N, Sutton A et al (2011) Low molecular weight fucoidan prevents intimal hyperplasia in rat injured thoracic aorta through the modulation of matrix metalloproteinase-2 expression. Biochem Pharmacol 81:233–243

- Feldman LJ, Mazighi M, Scheuble A et al (2001) Differential expression of matrix metalloproteinases after stent implantation and balloon angioplasty in the hypercholesterolemic rabbit. Circulation 103(25):3117–3122
- Park BH, Song KJ, Yoon SJ et al (2011) Acceleration of spinal fusion using COMP-angiopoietin 1 with allografting in a rat model. Bone 49:447–454
- Elcin AE, Elcin YM (2006) Localized angiogenesis induced by human vascular endothelial growth factor-activated PLGA disc. Tissue Eng 12:959–968
- Willard M, Liang K, Yoon Y, Kang S, Shim H (2007) CXCR4/ CXCL12 axis promotes VEGF-mediated tumor angiogenesis through Akt signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun 359:716–722
- 32. Varney ML, Olsen KJ, Mosley RL, Singh RK (2005) Paracrine regulation of vascular endothelial growth factor-a expression during macrophage-melanoma cell interaction: role of monocyte chemotactic protein-1 and macrophage colony-stimulating factor. J Interferon Cytokine Res 11:674–683
- 33. Jain RK, Finn AV, Kolodgie FD et al (2007) Antiangiogenic therapy for normalization of atherosclerotic plaque vasculature: a potential strategy for plaque stabilization. Nat Clin Pract Cardiovasc Med 4:491–502
- Von Luettichau I, Nelson PJ, Pattison JM et al (1996) RANTES chemokine expression in diseased and normal human tissues. Cytokine 8:89–98
- Azenshtein E, Luboshits G, Shina S (2002) The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. Cancer Res 62:1093–1102
- Suffee N, Richard B, Hlawaty H, Oudar O, Charnaux N (2011) Angiogenic properties of the chemokine RANTES/CCL5. Biochem Soc Trans 39:1649–1653
- Westerweel PE, Rabelink TJ, Rookmaaker MB, Gröne HJ, Verhaar MC (2008) RANTES is required for ischaemia-induced angiogenesis, which may hamper RANTES-targeted anti-atherosclerotic therapy. Thromb Haemost 99:794–795
- Ambati BK, Anand A, Joussen AM, Kuziel WA, Adamis AP, Ambati J (2003) Sustained inhibition of corneal neovascularization by genetic ablation of CCR5. Invest Ophthalmol Vis Sci 44:590–593
- Cochain C, Rodero MP, Vilar J (2010) Regulation of monocyte subset systemic levels by distinct chemokine receptors controls post-ischaemic neovascularization. Cardiovasc Res 88:186–195
- Zernecke A, Shagdarsuren E, Weber C (2008) Chemokines in atherosclerosis: an update. Arterioscler Thromb Vasc Biol 28: 1897–1908
- Son KN, Hwang J, Kwon BS, Kim J (2006) Human CC chemokine CCL23 enhances expression of matrix metalloproteinase-2 and invasion of vascular endothelial cells. Biochem Biophys Res Commun 340:498–504
- 42. Brule S, Charnaux N, Sutton A, Ledoux D, Chaigneau T, Saffar L, Gattegno L (2006) The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metallo-proteinase-9. Glycobiology 16:488–501
- Romagnani P, Lasagni L, Annunziato F, Serio M, Romagnani S (2004) CXC chemokines: the regulatory link between inflammation and angiogenesis. Trends Immunol 25:201–209
- Von Hundelshausen P, Petersen F, Brandt E (2007) Plateletderived chemokines in vascular biology. Thromb Haemost 97:704–713
- 45. Rookmaaker MB, Verhaar MC, de Boer HC et al (2007) Met-RANTES reduces endothelial progenitor cell homing to activated (glomerular) endothelium in vitro and in vivo. Am J Physiol Renal Physiol 293:624–630

Springer

- 46. Charnaux N, Brule S, Chaigneau T et al (2005) RANTES (CCL5) Charnaux N, Brule S, Chaigneau T et al (2005) RANTES (CCL5) induces a CCR5-dependent accelerated shedding of syndecan-1 (CD138) and syndecan-4 from HeLa cells and forms complexes with the shed ectodomains of these proteoglycans as well as with those of CD44. Glycobiology 15:119–130
 Slimani H, Charnaux N, Mbemba E, Saffar L, Vassy R, Vita C, Gattegno L (2003) Interaction of RANTES with syndecan-1 and syndecan-4 expressed by human primary macrophages. Biochim Biophys Acta 1617:80–88
- 48. Martin L, Blanpain C, Garnier P, Wittamer V, Parmentier M, Vita
- Martin L, Bianpain C, Garnier P, Witamer V, Parmenuer M, vita C (2001) Structural and functional analysis of the RANTES-glycosaminoglycans interactions. Biochemistry 40:6303–6318
 Proudfoot AE, Fritchley S, Borlat F et al (2001) The BBXB motif of RANTES is the principal site for heparin binding and controls receptor selectivity. J Biol Chem 276:10620–10626

Deringer

Résumé

L'athérosclérose est caractérisée par la formation d'une plaque d'athérome au niveau de la paroi d'un vaisseau sanguin. L'infiltration monocytaire participe à la phase précoce du développement de la plaque d'athérome. Le risque de rupture de la plaque est accru suite à sa néo-vascularisation. La chimiokine Regulated upon Activation, Normal T-cell, Expressed and Secreted (RANTES/CCL5) est impliquée dans le recrutement monocytaire. De plus, elle exerce un effet pro-angiogénique de manière dépendante de sa fixation aux glycosaminoglycanes (GAG) endothéliaux. Les syndécanes (SDC) sont des protéoglycanes transmembranaires à chaînes GAG exprimés par les cellules endothéliales. Le but de cette étude est de déterminer l'implication du domaine intracellulaire du SDC-4 dans l'angiogenèse et le recrutement monocytaire induits par la chimiokine RANTES/CCL5. Des mutants intracellulaires du SDC-4 ont été développés pour étudier le rôle de la PKC- α , de la liaison du PIP2 ou de protéines à domaine PDZ dans l'angiogenèse et le recrutement monocytaire induits par RANTES/CCL5. Nos résultats montrent que la chimiokine RANTES/CCL5 stimule l'angiogenèse et le recrutement monocytaire par le biais d'une signalisation intracellulaire induite par le domaine intracellulaire du SDC-4, activant notamment la PKC- α . Le développement de thérapies ciblant l'activation du SDC-4 pourrait permettre de réguler les effets physiopathologiques exercés par RANTES/CCL5.

Mots clés : Syndécane-4, RANTES/CCL5, PKC-α, angiogenèse, recrutement monocytaire.

Abstract

Atherosclerosis is a pathology characterized by the formation of an atheroma plaque in the blood vessel wall. Monocyte infiltration participates to the early phase of atheroma plaque development. Plaque rupture is induced by its neovascularization. The chemokine Regulate upon Activation, Normal T-cell, Expressed and Secreted (RANTES/CCL5) is involved in monocyte recruitment. Moreover, RANTES/CCL5 induces angiogenesis through its binding to endothelial glycosaminoglycans (GAG) chains. Syndecans (SDC) are transmembrane proteoglycans with GAG chains expressed at the membrane of endothelial cells. The aim of this study is to analyze the involvement of SDC-4 intracellular domain in RANTES/CCL5induced angiogenesis and monocyte recruitment. SDC-4 intracellular mutants were developed to analyze the role of PKC- α , PIP2 binding or PDZ domain proteins in RANTES/CCL5-induced angiogenesis and monocyte recruitment. Our data show that RANTES/CCL5 induces angiogenesis and monocyte recruitment through intracellular signaling, including the activation of PKC- α , mediated by SDC-4 intracellular domain. The development of new therapeutic strategy targeting SDC-4 activation may counteract RANTES/CCL5 physiopathological effects.

Keywords : Syndecan-4, RANTES/CCL5, PKC-α, angiogenesis, monocyte recruitment.