

UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE
ECOLE DOCTORALE des Sciences de la vie et de la
santé (62)

UMR_S 1076 INSERM, Vascular Research Center of Marseille

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Pathologie Humaine

Spécialité : Physiopathologie vasculaire et nutrition

Marie NOLLET

Etude de l'implication de CD146/CD146 soluble dans
l'angiogenèse et le développement tumoral : génération de
nouveaux anticorps à visée thérapeutique

Soutenue le 22/12/2017 devant le jury :

Pr Françoise Dignat-George, Marseille	Président
Dr Catherine Boisson-Vidal, Paris	Rapporteur
Dr Gilles Pagès, Nice	Rapporteur
Dr Franck Peiretti, Marseille	Examineur
Dr Olivier Peyruchaud, Lyon	Examineur
Dr Marcel Blot-Chabaud, Marseille	Directeur de thèse

Résumé

CD146 est une molécule d'adhésion appartenant à la superfamille des immunoglobulines qui existe sous trois formes, deux isoformes membranaires et une forme soluble. Elle a été découverte initialement dans les cellules de mélanome humain où son expression est un marqueur de mauvais pronostic. Depuis elle a été décrite dans de nombreux types de cancer (prostate, sein, rein, poumon non à petites cellules, ...). Elle est aussi exprimée sur l'ensemble de l'endothélium vasculaire.

Dans la première partie de ce travail, nous avons montré que CD146 soluble provient du clivage de l'ectodomaine des isoformes longue et courte de CD146 respectivement par ADAM 10 et Tace (ADAM 17). De plus, nous avons identifié deux autres isoformes de CD146 soluble provenant d'un épissage alternatif, I10-sCD146 et I5-13-sCD146. Ces différentes formes de CD146 soluble agissent sur l'endothélium vasculaire en stimulant l'angiogenèse.

Dans la seconde partie du travail, nous avons généré un anticorps anti-CD146 capable de détecter CD146 dans les cellules cancéreuses mais pas dans les cellules qui l'expriment dans les conditions physiologiques (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses). Nous avons montré que cet anticorps présente un intérêt diagnostique et un intérêt thérapeutique. Son mécanisme d'action implique une internalisation de la molécule CD146, ce qui permet d'envisager une utilisation en médecine personnalisée.

Abstract

CD146 is an adhesion molecule belonging to the immunoglobulin superfamily that exists as three forms, two membrane isoforms and a soluble form. It was originally discovered in human melanoma cells where its expression is a marker of poor prognosis. Since it has been described in many types of cancer (prostate, breast, kidney, non-small cell lung cancer, ...). It is also expressed throughout the vascular endothelium.

In the first part of the study, we showed that soluble CD146 originates from the shedding of the ectodomain of the long and short isoforms of CD146 by ADAM 10 and Tace (ADAM 17) respectively. In addition, we identified two other isoforms of soluble CD146 generated by alternative splicing, I10-sCD146 and I5-13-sCD146. These different forms of soluble CD146 display effects on the vascular endothelium by stimulating angiogenesis.

In the second part of the study, we generated an anti-CD146 antibody able to detect CD146 in cancer cells but not in cells that express the molecule in physiological conditions (endothelial cells, smooth muscle cells). We have shown that this antibody displays both diagnostic and therapeutic interests. Its mechanism of action involves the internalization of CD146, allowing a potential use in personalized medicine.

Remerciements

Je remercie le Pr Françoise Dignat-George, directrice de l'unité INSERM UMR_S 1076, de m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de son unité de recherche. Je la remercie également de me faire l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie le Dr Catherine Boisson-Vidal et le Dr Gilles Pagès d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse. Je remercie également le Dr Franck Peiretti et le Dr Olivier Peyruchaud qui ont accepté d'examiner ce travail.

Je remercie le Dr Marcel Blot-Chabaud de m'avoir accueillie dans son équipe et d'avoir dirigé cette thèse. Je tiens à lui exprimer ma profonde reconnaissance pour ses conseils, son soutien et sa confiance, pour son optimisme et sa disponibilité tout au long de ce travail.

Je remercie les membres de l'équipe CD146 présents et passés : Nathalie, Alexandrine, Richard merci pour tous tes précieux conseils en biologie moléculaire, Aurélie, Karim, Jimmy, Sylvie, Amel, Waël, Marie, Xavier, Lucie, Alexandre, Amandine, pour leur aide et leurs précieux conseils.

Je remercie également l'ensemble des membres du VRCM : les membres de Cérimed : Anaïs, Benjamin, Laure, Samantha, Michel, Philippe, Guillaume ; Stéphanie qui m'a appris comment faire des sphéroïdes ; Stéphane pour son aide en cytométrie en flux ; Célia et Annick qui sont toujours là pour nous aider ; Catherine ; Christine et Aïcha qui ont toujours un mot gentil ; Claire ; Corinne ; Sylvie C. ; Edwige ; ...

Je remercie le Dr Valérie Pierrefite-Carle et le Dr Alice Carrier pour m'avoir initiée à la recherche durant mes stages de Master et pour m'avoir toujours soutenue.

Je remercie aussi Anne-Line, Estelle, Léa, Sylvie B., Marie, Amandine, Mathilde, Lucie, Jimmy, Loris, Stéphane, Xavier, Eva et Fiona grâce à qui j'ai passé de très bons moments au labo, mais également en dehors à l'apéro, au sport et aux calanques ... que de fous rires et de bons souvenirs avec vous : la licorne, le poulpe, ...

Je tiens également à remercier mes parents qui ont toujours été là pour moi, mes sœurs : Magali, Emilie et Clémence qui m'ont soutenue tout au long de ma thèse et dont je suis très

fière. Merci à ma petite Fanny qui est toujours là pour nous donner le sourire et nous faire rire avec ses grimaces. Merci à ma mamie, mes tantes Domi et Nicole, ma cousine et marraine Bénédicte, mon cousin Sébastien et mon parrain Thierry.

Merci à mes fidèles amis qui sont toujours là pour moi : ma petite Audrey et Cédric, Maud, Manue, Ludo, Simon, Sylvain et Jérémy.

Table des matières

Résumé	2
Abstract	3
Abréviations	11
Introduction	18
Objectifs	15
Partie 1 : Angiogenèse et vasculogenèse physiologique et pathologique	19
I. Généralités.....	19
1) Les vaisseaux sanguins	19
a. Structure des vaisseaux sanguins	19
b. Les cellules et les microparticules endothéliales dans la circulation	23
2) La vasculogenèse, l'artériogenèse et l'angiogenèse	29
II. Angiogenèse physiologique	31
1) Vasodilatation et perméabilité vasculaire	31
2) La dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire	32
3) La prolifération et la migration des cellules endothéliales vasculaires	32
4) La maturation des vaisseaux et la formation du lumen	32
5) La régulation de l'angiogenèse.....	33
a. Les activateurs de l'angiogenèse.....	34
b. Les inhibiteurs de l'angiogenèse.....	40
III. Angiogenèse pathologique	41
1) Pathologie cancéreuse.....	41
a. Généralités	41
b. Les mécanismes moléculaires et cancer.....	44
c. Les évènements cellulaires et cancer	47
d. Angiogenèse et développement cancéreux	49
e. Thérapeutique	51
2) Pathologie de l'ischémie aigüe des membres inférieurs.....	55
a. Généralités	55
b. Mécanismes de revascularisation post-ischémique.....	56
3) Athérosclérose	65
a. Généralités	65

b.	Structure de la plaque d'athérome	65
c.	Angiogenèse et athérosclérose	67
4)	Sclérodermie	69
a.	Généralités	69
b.	Manifestations cliniques	70
c.	Fibrose.....	71
d.	Lésions endothéliales	72
Partie 2 : Implication de CD146 en physiologie et en pathologie.....		74
I.	Historique	74
II.	Description et structure	75
1)	Description génomique.....	75
2)	Description protéique	76
a.	Généralités	76
b.	Les différentes isoformes membranaires	77
c.	La forme soluble	78
III.	Localisation	81
1)	Localisation sur les cellules endothéliales.....	81
2)	Localisation sur les cellules cancéreuses.....	82
3)	Localisation sur les cellules immunitaires.....	82
4)	Localisation médullaire	83
5)	Localisation au niveau des cellules musculaires lisses et des péricytes	84
6)	Localisation au niveau des trophoblastes	85
7)	Localisation dans le système nerveux central.....	86
IV.	Fonctions physiologiques de CD146/CD146 soluble.....	86
1)	Rôle dans l'angiogenèse	86
2)	Rôle dans la perméabilité cellulaire et la transmigration endothéliale.....	88
V.	Fonctions dans les pathologies cancéreuses.....	89
1)	Expression de CD146 dans le mélanome	89
a.	Le mélanome.....	89
b.	Le traitement du mélanome.....	94
c.	CD146 dans le mélanome	95
2)	Implication de CD146 dans le processus tumoral	96
3)	CD146 en thérapie	99

4) CD146 en imagerie	101
VI. Fonctions dans les autres pathologies.....	102
1) Pathologies ischémiques.....	102
2) Pathologies obstétricales.....	105
3) Pathologies inflammatoires	107
a. Les pathologies inflammatoires cutanées	107
b. Les pathologies inflammatoires rénales	107
4) Athérosclérose	108
VII. Partenaires et voies de signalisation	109
1) Les partenaires de CD146.....	109
2) Les facteurs induisant CD146.....	110
3) Les voies de signalisation cellulaire induites par CD146.....	112
Résultats	114
Partie 1: Identification des enzymes impliquées dans le clivage des deux isoformes membranaires de CD146 et de deux nouvelles isoformes de CD146 soluble générées par épissage alternatif	115
Partie 2 : Génération d'un nouvel anticorps anti-CD146 capable de cibler spécifiquement la forme tumorale de la molécule	163
Conclusion et perspectives	199
Références bibliographiques	202

Liste des illustrations

Figure 1 : Structure d'un vaisseau sanguin	20
Figure 2 : Composition cellulaire de l'adventice	22
Figure 3 : L'endothélium un tissu dynamique	23
Figure 4 : Différentes méthodes de culture des PECs.....	27
Figure 5 : Représentation schématique des molécules portées par les microparticules endothéliales et leurs effets biologiques.....	28
Figure 6 : La vasculogenèse, l'angiogenèse et l'artériogenèse	30
Figure 7 : L'angiogenèse bourgeonnante	30
Figure 8 : Liste non exhaustive des inhibiteurs et des activateurs de l'angiogenèse	34
Figure 9 : La famille des VEGFRs et les récepteurs associés	37
Figure 10 : Cascade d'évènements favorisant l'apparition d'une tumeur.....	42
Figure 11 : Les 11 caractéristiques du cancer	44
Figure 12 : Le « switch angiogénique »	50
Figure 13 : Stratégies ciblant les cellules non endothéliales et endothéliales afin d'inhiber l'angiogenèse tumorale	53
Figure 14 : Rôle des PECs dans le processus de revascularisation ischémique.....	60
Figure 15 : Utilisation thérapeutique de PECs dans les pathologies ischémiques	61
Figure 16 : Schéma des principales ligatures de l'artère fémorale dans les modèles d'ischémie des membres inférieurs.....	62
Figure 17 : Reperfusion au cours du temps du membre ischémique selon les différents protocoles	63
Figure 18 : L'angiogenèse dans la plaque d'athérome.....	68
Figure 19 : Représentation schématique du gène codant pour CD146 et de la protéine résultante	75
Figure 20 : Organisation de la région promotrice de CD146.....	76
Figure 21 : séquence protéique de CD146	77
Figure 22 : Séquence courte et longue chez l'homme, la souris et le poulet.....	78
Figure 23 : Schématisation des différents groupes de métalloprotéases	80
Figure 24 : Localisation et fonctions des isoformes de CD146 dans les cellules endothéliales	81
Figure 25 : Expression de CD146 sur les lymphocytes	82
Figure 26 : Expression de CD146 sur les cellules NK de souris.....	83
Figure 27 : Visualisation de la vascularisation par microangiographie.	87
Figure 28 : Histopathologie des différentes étapes du modèle de Clark	91
Figure 29 : Evénements et changements moléculaires dans la progression du mélanome	92
Figure 30 : Schéma des effets induits par CD146 soluble sur les cellules cancéreuses.....	98
Figure 31 : Les anticorps inhibiteurs associés aux différentes isoformes durant la croissance tumorale et l'angiogenèse.....	101
Figure 32 : Imagerie TEP avec du ⁶⁴ Cu-NOTA-YY146 dans des souris xéno greffées avec des cellules de glioblastome	102

Figure 33 : Effet de l'injection de CD146 soluble ou de cellules endothéliales progénitrices surexprimant l'isoforme courte ou longue de CD146 sur la reperfusion sanguine dans un modèle d'ischémie de la patte	104
Figure 34 : Effet de l'injection de PECs prétraités avec du CD146 soluble sur la reperfusion sanguine dans un modèle d'ischémie de la patte.....	105
Figure 35 : schéma récapitulatif des partenaires et des voies de signalisation médiées par CD146	111
Figure 36 : Mécanisme d'action de CD146 soluble sur les cellules endothéliales	113

Abréviations

5-FU : 5-fluorouracil

AA : acide aminé

ADAMs : a disintegrin and metalloproteinase

ADAMTS : A Disintegrin And Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs

ADN : acide désoxyribonucléique

Amot : Angiomotine

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

Ang : angiopoiétine

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

AVC : Accident Vasculaire Cérébral

BAD : Bcl-2-Associated Death promoter

Bid : BH3-interacting domain death agonist

BS-1 : *Bandeirae Simplicifolia*

CACs : Circulating Angiogenic Cells

CCL: Chemokine ligand

CCl₄ : carbonate tétrachloride

CD : Cluster of Differentiation

CDK: Cyclin Dependant Kinase

CEC : Cellule Endothéliale Circulante

CFU-ECs : Colony-Forming Unit-Endothelial Cell

CML : cellules musculaires lisses

CO₂ : Dioxyde de Carbone

CRE : C-AMP Response Element

CREB : C-AMP Response Element-binding protein

ECFCs : Endothelial Colony Forming Cells

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EMP : Microparticule Endothéliale

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases
ET : endothéline
FDA : Food and Drug Administration
FGF-b : Fibroblast Growth Factor- basic
Flk : fetal liver kinase 1
flt : fms-like tyrosine kinase
FT : Facteur tissulaire
GTP : Guanosine TriPhosphate
HGF : Hepatocyte Growth Factor
HIF : Hypoxia Inducible Factor
HMVEC : Human MicroVascular Endothelial Cells
HRE : Hypoxia Response Elements
HSP27 : Heat Shock Protein 27
HUVECs : Human umbilical vein endothelial cells
IAMI : Ischémie Aigüe des Membres Inférieurs
ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule
IGF : Insulin-like Growth Factor
IL: interleukine
IMT : Intima Media Thickness
JNK : c-Jun amino-terminale Kinase
KDR : Kinase insert Domain-containing Receptor
LAK : Lymphokine Activated Killer
LDL : Low Density Protein
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases
MCAM : Melanoma Cell Adhesion Molecule
MCP : Monocyte Chemoattractant Protein
MITF : Microphthalmia associated Transcription Factor
MMP : métalloprotéase de la matrice
MRP1/ABCC1 : Mitochondrial 37S Ribosomal Protein1/ATP Binding Cassette subfamily C member 1
MT-MMPs : les MMPs transmembranaires
NER : Nucleotide Excision Repair
NFκB : Nuclear Factor kappa B
NK : Natural Killer

NO : monoxyde d'azote
NOF : Neurite Outgrowth Factor
NRP : neuropiline
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PA : Activateur du Plasminogène
PAI : Inhibiteur de l'Activateur du Plasminogène
PBMC : Cellule Mononuclée du Sang Périphérique
PDGF : Platelet-Derived Growth Factor
PDGFR : Platelet-Derived Growth Factor Receptor
PEC : Progéniteur endothelial circulant
PECAM-1 : Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PHA : phytohémagglutinine
PKC : Protéine Kinase C
PIGF : Placenta Growth Factor
PPAR α : Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α
PS : phosphatidylserine
PS-1 : préséniline-1
PTEN : Phosphatase and TENsin homologue
RB: rétinoblastome
RCPG : Récepteurs à sept domaines transmembranaires Couplés aux Protéines G
RhoGDI1 : Rho guanine nucleotide dissociation inhibitory factors 1
ROS : Reactive Oxygen Species
SCLC : Small cell lung cancer
SDF-1: Stromal cell-Derived Factor 1
Sendo-1 : endothelial associated antigen 1
siRNA: small interfering RNA
SR-A1 : Scavenger Receptor-A1
SSc: sclérodémie systémique
STAT : Signal Transducers and Activators of Transcription
TEK : Tunica Intima Endothelial Cell Kinase
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TGF- β : Transforming Growth Factor- beta
TIMP : Tissue inhibitors of metalloproteinases
TNF- α : tumor necrosis factor- α

tPA : Activateur du Plasminogène de type tissulaire

UEA-1 : Ulex Europeus Agglutinin-1

u-PA : Activateur du Plasminogène de type urokinase

uPAR : uPA Receptor

UV: ultraviolet

VCAM-1 : Vascular cell adhesion protein 1

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: VEGF Receptor

vWF : Facteur de von Willebrand

W-RAMP : Wnt5a-mediated Receptor–Actin–Myosin Polarity

Objectifs et production scientifique

La molécule CD146, qui existe sous deux isoformes, est exprimée à la fois par les cellules endothéliales et cancéreuses. De plus, notre équipe a montré que les cellules exprimant CD146 sont capables de sécréter une forme soluble de la molécule qui présente une activité pro-angiogénique. Celle-ci est générée par un mécanisme de clivage des formes membranaires.

Toutefois, au début de mon travail de thèse, les enzymes impliquées dans ce clivage des formes membranaires n'étaient pas connues et le fait que d'autres isoformes de CD146 soluble puissent être générées par épissage alternatif n'avait pas été exploré. De plus, aucun anticorps dirigé contre CD146 n'était capable de reconnaître spécifiquement la forme tumorale, tous les anticorps reconnaissant à la fois la forme « physiologique » et la forme tumorale.

Ceci nous a amené à émettre deux hypothèses :

I/ La première hypothèse est que **dans les cellules endothéliales, il existerait différentes formes de CD146 soluble générées par le clivage de l'ectodomaine de CD146 et par épissage alternatif.**

Les objectifs de ma thèse pour cette première partie ont donc été :

- 1- D'étudier les métalloprotéases impliquées dans le clivage des deux isoformes de CD146 membranaire.
- 2- D'identifier des formes solubles de CD146 provenant d'un épissage alternatif.
- 3- D'étudier l'effet de ces différentes formes solubles dans l'angiogenèse.

II/ La deuxième hypothèse est que **la molécule CD146 tumorale pourrait présenter des caractéristiques différentes de CD146 non cancéreux et ainsi être la cible d'une stratégie anti-tumorale.**

Les objectifs de ma thèse pour cette seconde partie ont donc été :

- 1- De générer un anticorps anti-CD146 spécifique de la forme tumorale.
- 2- D'étudier l'intérêt diagnostique de cet anticorps.
- 3- D'étudier l'intérêt thérapeutique de cet anticorps et son mécanisme d'action.

Les travaux ont permis la rédaction de deux publications et deux brevets :

Article 1: Identification of two novel pro-angiogenic spliced variants of soluble CD146 with differential expression and regulation: involvement in systemic sclerosis.

Marie Nollet*, Alexandrine Foucault-Bertaud*, Richard Bachelier, Anais Moyon, Indumathi Somasundaram, Amel Essaadi, Franck Peiretti, Aurélie S. Leroyer, Benjamin Guillet, Brigitte Granel, Françoise Dignat-George, Nathalie Bardin, and Marcel Blot-Chabaud. Soumis à Circulation Research.

Article 2: A novel anti-CD146 antibody specifically targets cancer cells by internalizing the molecule.

Marie Nollet, Jimmy Stalin, Anaïs Moyon, Waël Traboulsi, Amel Essaadi, Stéphane Robert, Nausicaa Malissen, Richard Bachelier, Laurent Daniel, Alexandrine Foucault-Bertaud, Caroline Gaudy-Marqueste, Romaric Lacroix, Aurélie S. Leroyer, Benjamin Guillet, Nathalie Bardin, Françoise Dignat-George, and Marcel Blot-Chabaud. Oncotarget, 2017.

Brevet n°1: Human soluble CD146 proteins, preparation and uses thereof

Marie Nollet, Richard Bachelier, Nathalie Bardin, Françoise Dignat-George, Marcel Blot-Chabaud. N° de dépôt: EP17306271.

Brevet n°2: Anti-CD146 antibodies and uses thereof

Marie Nollet, Jimmy Stalin, Benjamin Guillet, Nathalie Bardin, Françoise Dignat-George, Marcel Blot-Chabaud. N° de dépôt : EP17306348.

En dehors de mes deux sujets principaux, j'ai également contribué à six autres publications et une revue publiées ou en cours de soumission :

Article 3: Targeting soluble CD146 with a neutralizing antibody inhibits vascularization, growth and survival of CD146-positive tumors.

Stalin J, **Nollet M**, Garigue P, Fernandez S, Vivancos L, Essaadi A, Muller A, Bachelier R, Foucault-Bertaud A, Fugazza L, Leroyer AS, Bardin N, Guillet B, Dignat-George F, Blot-Chabaud M. Oncogene, 2016; 35(42): 5489-5500.

Article 4: Soluble CD146 boosts therapeutic effect of endothelial progenitors through proteolytic processing of short CD146 isoform.

Stalin J, Harhour K, Hubert L, Garrigue P, Nollet M, Essaadi A, Muller A, Foucault-Bertaud A, Bachelier R, Sabatier F, Pisano P, Peiretti F, Leroyer AS, Guillet B, Bardin N, Dignat-George F, Blot-Chabaud M. Cardiovascular Research, 2016; 111(3):240-51.

Article 5: Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in systemic sclerosis.

Kaspi E, Heim X, Granel B, Guillet B, Stalin J, Nollet M, Bertaud-Foucault A, Robaglia-Schlupp A, Roll P, Cau P, Leroyer A, Bachelier R, Benyamine A, Dignat-George F, Blot-Chabaud M, Bardin N. Journal of Allergy Clinical Immunology, 2017; S0091-6749(17)30930-2.

Article 6: Soluble CD146 is a predictive marker of pejorative evolution and of sunitinib efficacy in clear cell renal cell carcinoma

Dufies M, Nollet M, Ambrosetti D, Viotti J, Borchiellini D, Parola J, Helley-Russick D, Ravaud A, Bernhard J-C, Bardin N, Dignat-George F, Rioux-Leclercq N, Oudard S, Negrier S, Ferrero J-M, Chamorey E, Blot-Chabaud M*, and Pagès G*. Theranostics, 2017.

Article 7: 30 years of research on therapeutic and diagnostic antibodies to CD146: potential use for detection and treatment of tumors

Stalin J, Nollet M, Dignat-George F, Bardin N and Blot-Chabaud M. Revue. Antibodies, 2017.

Article 8: MicroRNA-21 coordinates soluble CD146 effects to maintain the stemness phenotype of endothelial progenitors isolated from peripheral blood

Essaadi A, Nollet M, Moyon A, Foucault-Bertaud A, Bachelier R, Leroyer AS, Sarlon G, Guillet B, Dignat-George F, Bardin N, and Blot-Chabaud M. Soumis à Scientific reports.

Article 9: Early prediction of tissue regeneration by angiotensin targeting positron emission tomography

Moyon A, Garrigue P, Balasse L, Fernandez S, Brige P, Nollet M, Stalin J, Bouhleb A, Hache G, Sabatier F, Blot-Chabaud M, Dignat-George F, Guillet B, Soumis à Nature Communication.

Introduction

Partie 1: Angiogenèse et vasculogenèse physiologique et pathologique

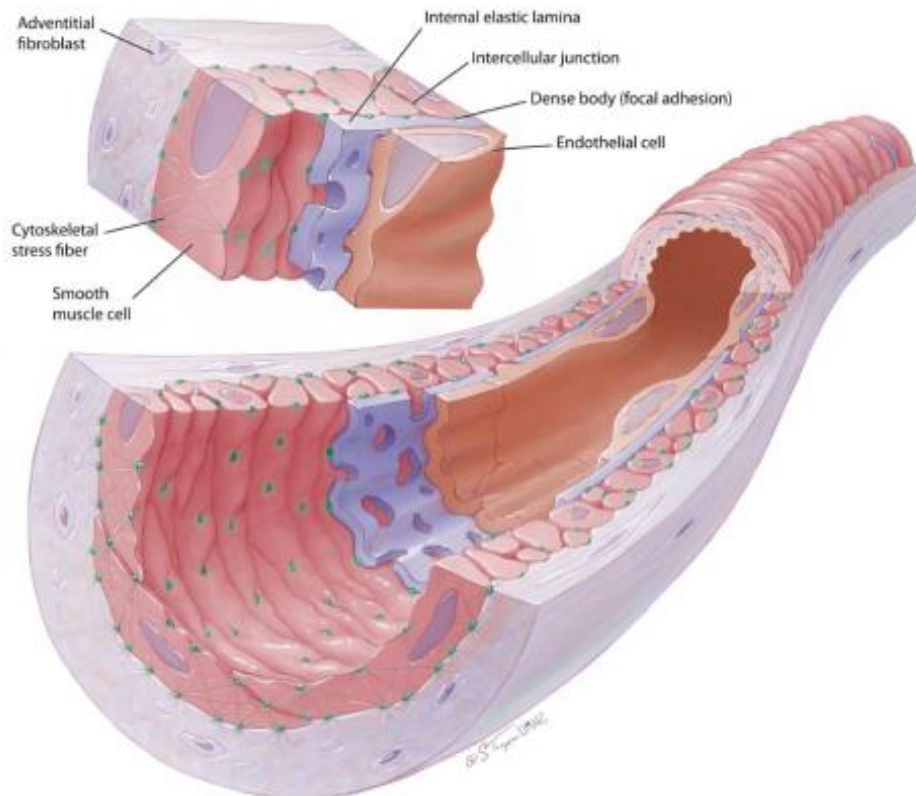
I. Généralités

1) Les vaisseaux sanguins

a. Structure des vaisseaux sanguins

Le système vasculaire est composé d'un système artériel et d'un système veineux. Il permet d'apporter aux tissus un flux sanguin riche en nutriments et en oxygène par l'intermédiaire du système artériel et d'évacuer les déchets cellulaires et le CO₂ via le système veineux. La paroi des vaisseaux sanguins peut être divisée en trois couches tissulaires : l'intima qui est constituée d'une monocouche de cellules endothéliales, la média qui est constituée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses et l'adventice qui est constituée de fibroblastes, de cellules immunitaires et de la matrice extracellulaire (1) (Figure 1).

Figure 1 : Structure d'un vaisseau sanguin



(D'après Martinez-Lemus et al., *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2012)

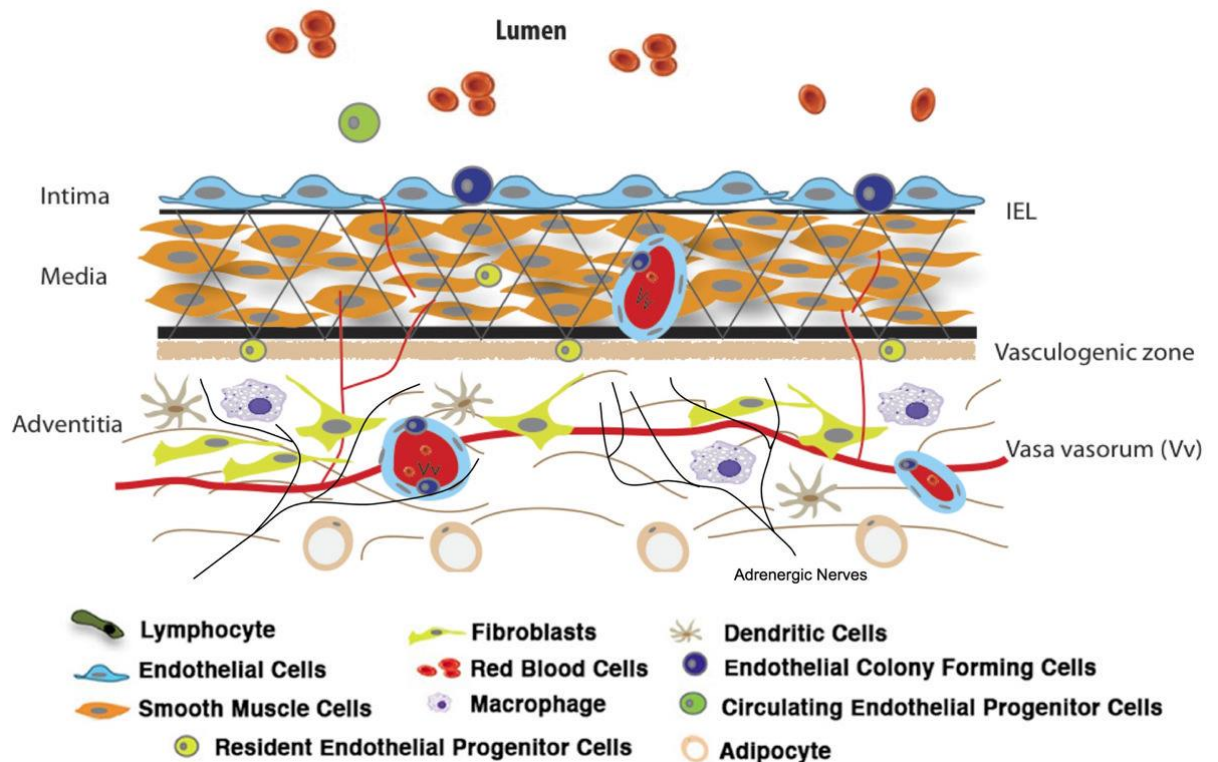
L'intima correspond à la couche interne de la paroi vasculaire. Elle est constituée d'une couche de cellules endothéliales qui est en contact direct avec le sang et les cellules circulantes. Le flux sanguin entraîne un réarrangement du cytosquelette d'actine des cellules endothéliales dans le sens du flux ce qui entraîne une polarisation des cellules endothéliales et permet 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 (2). Dans un état quiescent, l'endothélium forme une barrière semi-perméable pour le transport de petites molécules solubles, peptides et protéines. Une fois activé par différents facteurs (inflammation, perturbation du flux sanguin, infection), l'endothélium participe au passage de cellules immunitaires vers le tissu par un mécanisme de transmigration (1). Afin d'assurer un débit sanguin optimal, l'endothélium sécrète des facteurs de croissance vaso-actifs tels que le TGF- β (Transforming Growth Factor- β) ou le FGF-b (basic Fibroblast Growth Factor). 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 de 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 les protéoglycanes des cellules endothéliales et la lame basale riche en fibronectine, laminine et collagène (1).

La média est séparée de l'intima par une limitante élastique interne. Elle est composée de plusieurs couches de péricytes pour les capillaires ou de cellules musculaires lisses pour les gros vaisseaux ce qui permet de préserver la structure des vaisseaux sanguins. Le nombre de couches de cellules dépend du diamètre du vaisseau. Chaque couche de cellules repose sur une lame basale (fibronectine et collagène de type IV) et sur des fibres élastiques. L'association entre la matrice extracellulaire et les cellules musculaires lisses est impliquée dans la participation de ces cellules contractiles à la vasomotricité du vaisseau et donc à la pression du flux sanguin (1).

L'adventice est séparée de l'intima par une limitante élastique externe. Elle est constituée de fibroblastes, de cellules immunitaires et progénitrices, de fibres élastiques et de collagène. Elle 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 (3) (Figure 2).

Figure 2 : Composition cellulaire de l'adventice



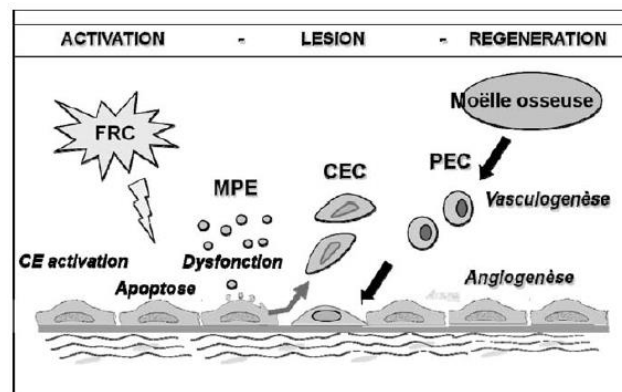
Contrairement à l'intima et la média qui sont composés respectivement de cellules endothéliales et de cellules musculaires lisses, l'adventice est composée de différents types cellulaires : fibroblastes, cellules progénitrices résidentes, cellules de l'immunité (cellules dendritiques, macrophages et lymphocytes T), cellules endothéliales et nerfs adrénergiques du vasa vasorum (D'après Stenmark et al., 2013).

Dans les artères et les veines de diamètre supérieur à 0.5 mm, il y a 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 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 média par le système nerveux sympathique (ou système nerveux adrénergique) contrôlant la contraction ou la relaxation du vaisseau et régulant ainsi le flux sanguin. Lors d'un stress environnemental du vaisseau sanguin (stimulus inflammatoire, hormonal, hypoxie...), les cellules résidentes de l'adventice sont les premières à répondre aux stimuli. Elles vont proliférer, produire et sécréter des facteurs tels que l'angiotensine-2, PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) et le TGF- β (3) (Figure 2).

b. Les cellules et les microparticules endothéliales dans la circulation

L'endothélium est un tissu dynamique, en équilibre avec un compartiment circulant, reflétant les processus de lésion et de régénération de l'arbre vasculaire. Ce compartiment circulant est composé, entre autres, des cellules endothéliales circulantes (CEC), des microparticules endothéliales (EMP) et des progéniteurs endothéliaux (PEC) (4) (Figure 3).

Figure 3 : L'endothélium un tissu dynamique



Les lésions d'origine mécanique ou l'exposition aux facteurs de risque cardio-vasculaire (FRC) altèrent les fonctions régulatrices de l'endothélium qui progresse vers la dysfonction et la mort par apoptose.

La rupture de l'intégrité de l'endothélium est associée à un large spectre de réponses incluant le détachement de cellules endothéliales matures (CEC) et la libération des microparticules endothéliales (MPE). En réponse à la lésion, les progéniteurs endothéliaux (PEC), recrutés à partir de la moelle osseuse, sont capables de se différencier en cellules matures et de restaurer l'intégrité endothéliale. Ces réponses endothéliales peuvent être intégrées dans une triade dynamique « activation/lésion/régénération » (Sabatier et al., La revue de médecine interne, 2011).

i. Les cellules endothéliales circulantes

Dans les années 1970, c'est sur des critères morphologiques que les CECs ont été décrites dans le sang périphérique par les Dr Bouvier et Lhadovec. Cependant, l'existence de ces cellules a fait l'objet d'un réel débat pendant de longues années en raison du manque de spécificité des critères morphologiques utilisés pour leur identification. Ceci a conduit notre laboratoire à rechercher des marqueurs de surface spécifiquement endothéliaux. Ainsi, le développement d'anticorps monoclonaux dirigés contre les cellules endothéliales, tel que HEC 19 et S-Endo1, a permis de démontrer de façon définitive l'existence des CECs. Grâce au développement d'anticorps monoclonaux spécifiques, les CECs ont été caractérisées sur des critères immunologiques en 1992, chez des patients subissant une angioplastie coronaire, et ainsi

identifiées comme un marqueur du traumatisme secondaire à l'agression mécanique de l'endothélium (5). Les CECs sont définies comme des cellules matures détachées de la paroi vasculaire (6). Elles présentent une taille hétérogène (de 10 à 50 μm), expriment des marqueurs endothéliaux (vWF, CD31, CD144, CD146) mais n'expriment pas les marqueurs leucocytaires (7). Elles sont incapables de donner naissance à des colonies de cellules à haut potentiel prolifératif. Les CECs appartiennent à la catégorie des événements rares présents dans le sang périphérique. Chez le sujet normal, des valeurs de CECs inférieures à dix cellules par millilitre ont été rapportées de manière consensuelle grâce à une immuno-séparation magnétique (IMS) (8). Le détachement des cellules endothéliales de la paroi vasculaire résulte de mécanismes multiples et non exclusifs parmi lesquels on peut citer une agression mécanique de la paroi vasculaire, une altération des propriétés d'adhérence aux cellules adjacentes, une protéolyse accrue de la matrice, une levée de l'inhibition de contact des cellules endothéliales pouvant conduire soit à une apoptose (phénomène d'Anoikis), soit à l'activation de réponses prolifératives, comme observé dans l'angiogenèse tumorale (8). Une élévation du nombre de CECs a été rapportée dans différentes pathologies associées à des altérations de l'endothélium telles que les pathologies cardiovasculaires, mais aussi en relation avec la plupart des facteurs de risque cardiovasculaire comme le diabète, l'hypertension et l'insuffisance rénale chronique. À côté de ces pathologies, des valeurs élevées de CECs ont été mentionnées au cours des maladies auto-immunes à composante vasculaire, au cours des pathologies hématologiques et infectieuses mais aussi en transplantation et en cancérologie. Le nombre de CECs est corrélé aux marqueurs évaluant la fonctionnalité de l'endothélium et aux marqueurs plasmatiques traduisant une lésion (vWF) ou une activation proinflammatoire (E-sélectine) et procoagulante (FT) (9–11). Au-delà de leur rôle de marqueur d'une lésion endothéliale, l'intérêt pronostic des CECs a été rapporté dans des situations pathologiques comme les syndromes coronaires aigus, l'hémodialyse ou le choc septique où des valeurs élevées de CECs sont prédictives de mortalité ou de complications vasculaires majeures.

ii. Les progéniteurs endothéliaux circulants

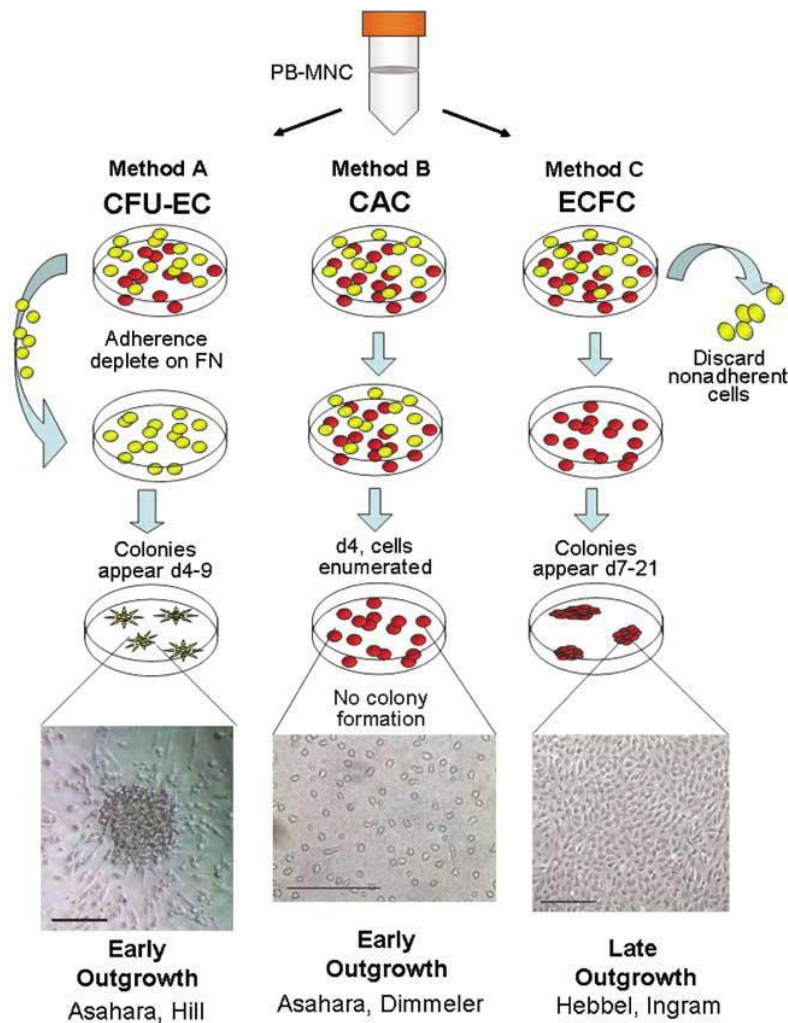
En 1997, Asahara et Isner découvrent l'existence d'une population cellulaire immature qu'ils nommeront "progéniteurs endothéliaux circulants" (PEC). Ces PECs sont isolés à partir de sang périphérique adulte. Ils ont un pouvoir de différenciation *ex vivo* en cellules endothéliales (12). Les auteurs ont décrit un système de culture cellulaire où des cellules sanguines mononuclées

sont isolées en fonction de l'expression des marqueurs VEGFR-2 ou CD34, puis sont mises en culture sur des matrices de collagène ou de fibronectine. Ces cellules prolifèrent en 4 semaines et finissent par se différencier en cellules adhérentes qui possèdent les mêmes caractéristiques que les cellules endothéliales. Les PECs expriment des marqueurs endothéliaux tels que le CD31, VEGFR-2, Tie-2, E-selectine, lectine UEA-1, vWf, eNOS et ont la capacité d'incorporer le LDL acétylé. La découverte des PECs a révolutionné le concept de l'angiogenèse post-natale et a remis en question celui de la néo-vascularisation chez l'adulte, impliquant de ce fait non seulement la prolifération et la migration des cellules endothéliales matures mais aussi l'intervention d'un mécanisme proche de la vasculogenèse. Depuis cette publication, de nombreux travaux confirment l'existence de ces progéniteurs endothéliaux circulants chez l'homme (13). Des études ont montré que les PECs expriment un marqueur commun avec les cellules hématopoïétiques, la protéine CD133. L'expression de ce marqueur disparaît rapidement une fois les cellules mises en culture (14). En dehors du sang périphérique, les PECs ont été identifiés et isolés à partir de la moelle osseuse (13) et du sang de cordon ombilical humain (15).

Trois méthodes différentes ont été décrites pour la culture des PECs. Dans la première méthode, les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ou du sang de cordon ombilical sont cultivées dans des plaques avec de la fibronectine, de la gélatine ou du collagène. Pour réduire le nombre des cellules endothéliales différenciées (CEC) et des macrophages adhérents, les cellules non-adhérentes sont retirées 48 heures après la mise en culture. Des colonies apparaissent au bout de 4 à 9 jours, contenant des cellules rondes au centre, entourées de cellules proliférantes en périphérie. Ces colonies ont été nommées CFU-ECs (pour Colony-Forming Unit-EC). Après 7 jours de culture, ces cellules expriment CD34, CD31, VEGFR-2, Tie-2 et E-sélectine. Le nombre de CFU-ECs dans le sang périphérique adulte varie entre 50 et 500 cellules/ml (16). La seconde méthode est une technique largement utilisée et méthodologiquement semblable à la première. Les PBMCs sont cultivées dans un milieu de culture endothélial pendant 4 jours et les cellules non-adhérentes sont ensuite éliminées (17). Les cellules adhérentes obtenues présentent les caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles des cellules endothéliales. Elles lient les lectines BS-1 (*Bandeirae simplicifolia*) et UEA-1 (*Ulex Europeus Agglutinin-1*), elles ont le potentiel d'incorporer le LDL acétylé et elles expriment les marqueurs endothéliaux CD31, VEGFR-2, vWf, VE-cadhérine et Tie-2/TEK (*Tunica Intima Endothelial Cell Kinase*) (18–20). Elles ont été nommées CACs pour "Circulating Angiogenic Cells". Bien qu'elles ne génèrent pas de colonies en culture, ces CACs

semblent morphologiquement analogues aux cellules périphériques des colonies CFU-ECs (19). Les CACs peuvent être obtenues en plus grand nombre que les CFU-ECs, environ 2 % de l'ensemble de la population des cellules mononuclées (17). La troisième méthode de culture aboutit à un type différent de PECs nommé ECFCs pour "Endothelial Colony Forming Cells". Les cellules mononuclées dérivées du sang périphérique adulte ou du sang de cordon ombilical sont cultivées dans des plaques avec du collagène de type I dans un milieu de culture endothélial en présence de facteurs de croissance. Après élimination des cellules non-adhérentes lors des étapes de lavage et de changement de milieu, des colonies ECFCs en forme de pavé apparaissent entre 7 et 21 jours (5 à 7 jours s'il s'agit des cellules mononuclées de sang de cordon ombilical). Ces cellules possèdent les mêmes caractéristiques phénotypiques que les cellules endothéliales en culture et sont capables de former de nouveaux vaisseaux (21). Les ECFCs apparaissent beaucoup plus tardivement que les CFU-ECs et les CACs. Aussi elles ont été nommées "Late EPC", tandis que les CFU-ECs et les CACs ont été nommées "Early EPC" (22). Il a été démontré que ces ECFCs possèdent un fort potentiel clonogénique. De plus, elles sont les seules capables de former de nouveaux vaisseaux dans un modèle d'implant de fibronectine/collagène chez des souris immunodéficientes (16). Le nombre d'ECFCs est estimé entre 0.05 et 0.2 cellules par millilitre dans le sang périphérique adulte et entre 2 et 5 cellules par millilitre dans le sang de cordon ombilical (15) (Figure 4).

Figure 4 : Différentes méthodes de culture des PECs.



Les CFU-ECs (méthode A) sont des cellules mononuclées générant des colonies endothéliales entre 4 et 9 jours.

Les CACs (méthode B) sont des cellules adhérentes obtenues par culture des cellules mononuclées après 4 à 7 jours. Elles ne forment pas de colonies.

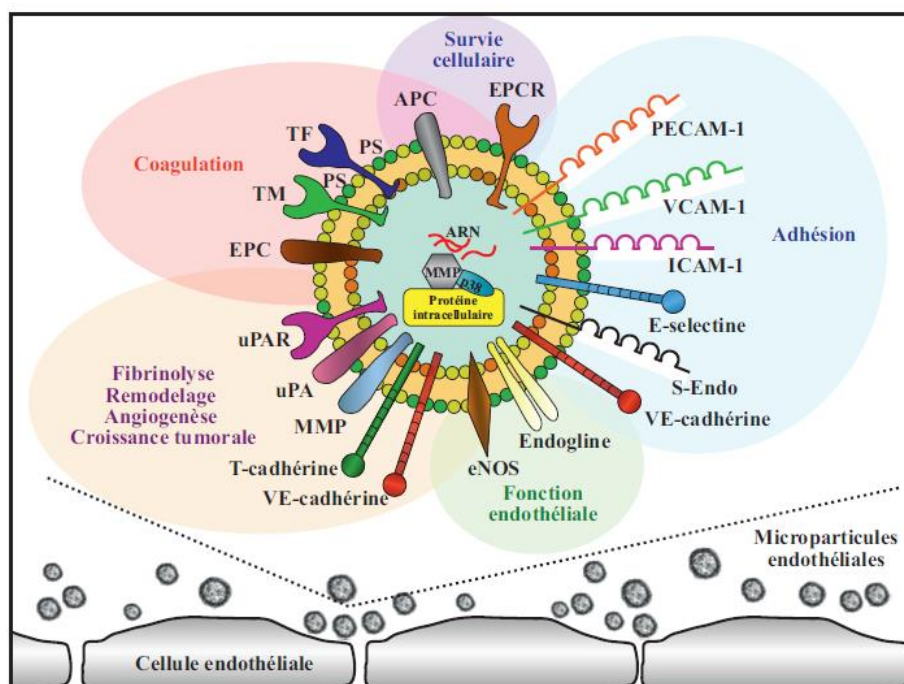
Les ECFCs (méthode C) sont issues de cellules mononuclées adhérentes cultivées dans des conditions de culture endothéliale. Elles forment des colonies qui apparaissent entre 7 et 21 jours (d'après Prater et al., Leukemia, 2007).

iii. Les microparticules endothéliales

Les microparticules endothéliales (EMP) font entre 0.1 et 1 μ m. Elles proviennent de la membrane plasmique des cellules endothéliales et portent à leur surface des marqueurs endothéliaux comme VE-cadherin, PECAM-1, ICAM-1, endogline, E-selectin, CD146 ou α -intégrine (23) (Figure 5). La eNOS ainsi que le VEGFR-2 ont été identifiés sur les EMPs (24) mais leurs activités n'ont pu être mises en évidence. Pour identifier de manière spécifique les microparticules (MPs) d'origine endothéliale dans le sang circulant, il est indispensable

d'utiliser des marqueurs spécifiques pour les analyses en cytométrie en flux. Les EMPs s'accumulent au cours du temps dans le milieu de culture de cellules endothéliales, aussi bien en condition basale que suite à différents stimuli. De plus, la présence d'EMPs a été identifiée dans le plasma humain et murin (25,26), l'humeur vitrée de la chambre antérieure de l'œil (27), l'urine ainsi que dans les lésions inflammatoires comme les plaques d'athérosclérose ou les tissus ischémiques (24,28). Comme pour les autres types de MPs, les EMPs expriment la phosphatidylserine (PS) à leur surface et lient l'annexine-V en présence de calcium. La composition protéique des EMPs dépend du stimulus qui permet leur production. Elles proviennent principalement de la membrane plasmique, de la fraction cytosolique, du cytosquelette ou des mitochondries (29). Les EMPs, ainsi que les autres types de MPs, peuvent contenir du matériel nucléaire comme de l'ADN, de l'ARN ou encore des micro-ARN qui pourront être transférés aux cellules cibles (30–32). Le taux plasmatique d'EMPs augmente dans des pathologies telles que le diabète de type 1 et 2, les syndromes coronariens aigus, le purpura thrombotique thrombocytopenique et l'hypertension artérielle (33).

Figure 5 : Représentation schématique des molécules portées par les microparticules endothéliales et leurs effets biologiques



EPCR : récepteur endothéliale à la protéine C ; PECAM-1 : molécule d'adhésion cellule plaquette-cellule endothéliale 1 ; VCAM-1 : molécule d'adhésion des cellules vasculaires-1 ; ICAM1 : molécule d'adhésion intercellulaire 1 ; E-selectin : sélectine endothéliale ; S-Endo : CD146; VE-cadherin : cadhérine vasculaire endothéliale ; eNOS : NO synthase endothéliale ; MMP : métalloprotéinase matricielle ; uPA : activateur de plasminogène de type urokinase ; uPAR : récepteur de l'activateur de plasminogène de type urokinase ; EPC : protéine C endothéliale ; TM : thrombomoduline (d'après Dignat George et Boulanger, ATVB, 2011).

2) La vasculogénèse, l'artériogénèse et l'angiogénèse

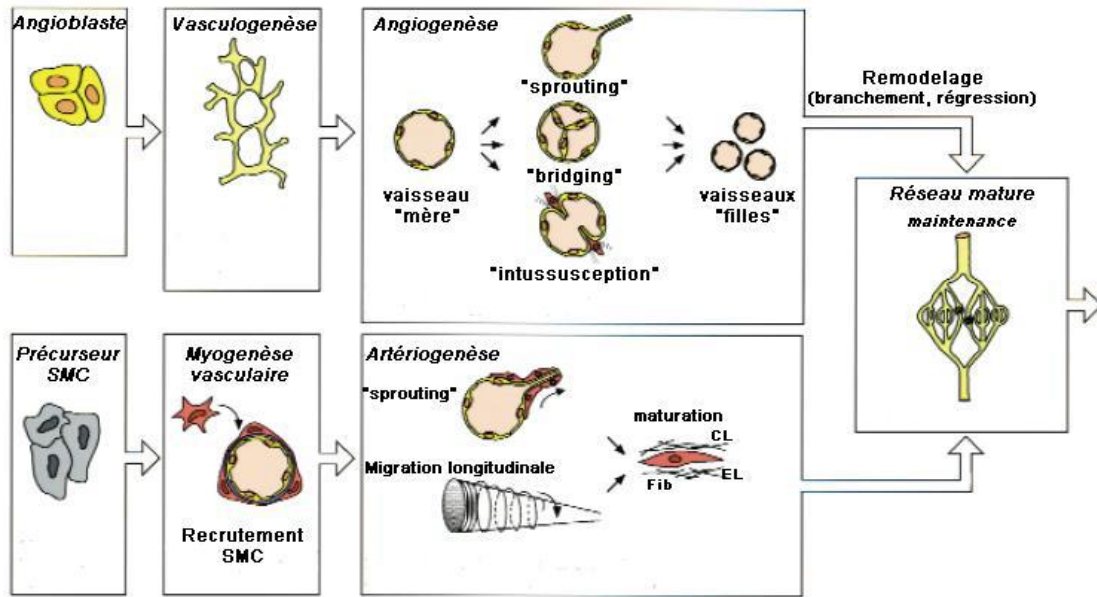
Il existe plusieurs processus de formation des vaisseaux sanguins (Figure 6) :

✓ **La vasculogénèse** : c'est la migration, la différenciation des précurseurs hémangioblastiques et angioblastiques, et l'association des cellules progénitrices vasculaires pour former des vaisseaux sanguins primitifs.

✓ **L'angiogénèse** : c'est la croissance, l'extension de l'arbre vasculaire préexistant. Il existe trois mécanismes d'angiogénèse : le bourgeonnement (sprouting), l'intussusception c'est à dire l'élargissement et la séparation des vaisseaux déjà formés, et la septation (bridging) où les cellules poussent à l'intérieur des vaisseaux pour former des canaux vasculaires séparés (34). L'angiogénèse bourgeonnante est le mécanisme le plus étudié. Il nécessite plusieurs étapes (Figure 7). Le début de l'angiogénèse a lieu suite à un stimulus angiogénique local, se caractérisant par une vasodilatation et une augmentation de la perméabilité des vaisseaux sanguins grâce à la disparition des jonctions d'adhésion. Puis une dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire environnante permet une migration ainsi qu'une prolifération des cellules endothéliales qui finissent par s'assembler en tubes. Il s'agit alors de vaisseaux primitifs. Ces vaisseaux, lors de la maturation, peuvent devenir des capillaires suite à une différenciation et une apposition de cellules mésenchymateuses spécialisées (les péricytes) ou bien devenir des vaisseaux de plus grand calibre (artères et veines) après la mise en place d'une paroi composée de plusieurs couches de cellules musculaires lisses disposées de manière concentrique ou longitudinale (Figure 7).

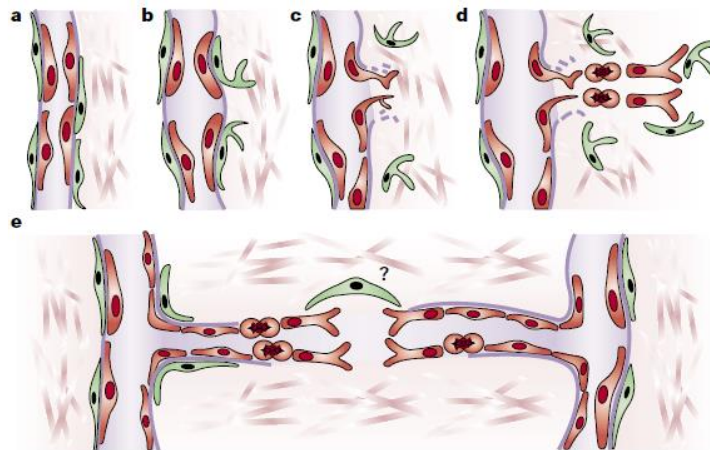
✓ **L'artériogénèse** : c'est l'épaississement pariétal, la prolifération des cellules musculaires lisses et des péricytes pour former un réseau vasculaire mature.

Figure 6 : La vasculogénèse, l'angiogénèse et l'artériogénèse



*Pendant la vie embryonnaire, les angioblastes s'assemblent en un réseau primitif (vasculogénèse) qui se développe ensuite et se remodèle (angiogénèse). Les cellules musculaires lisses (SMC) recouvrent les cellules endothéliales durant la myogénèse vasculaire et il y a une stabilisation des vaisseaux durant l'artériogénèse.
Fib = fibrilline ; Cl = collagène ; El = élastine (D'après Carmeliet et al., Nat. Med., 2000).*

Figure 7 : L'angiogénèse bourgeonnante



*a/ Les vaisseaux sanguins proviennent de capillaires préexistants.
b/ Tout d'abord, les pericytes (en vert) se détachent et les vaisseaux sanguins se dilatent puis la membrane basale et la matrice extracellulaire sont dégradées.
c/ Les cellules endothéliales (en rouge) migrent dans l'espace périvasculaire par chemoattraction des stimuli angiogéniques.
d/ Ensuite, les cellules endothéliales prolifèrent et migrent.
e/ Les cellules endothéliales adhèrent les unes avec les autres pour former un lumen. Il y a ensuite formation d'une membrane basale et fixation des péricytes. Les bourgeons capillaires formés fusionnent avec d'autres bourgeons pour construire de nouveaux systèmes circulatoires.
(D'après Bergers and Benjamin, Nat. Rev. Cancer, 2003)*

Pendant l'embryogenèse, l'origine de l'organe définit le processus de néo-vascularisation. En effet, la vasculogénèse est le mécanisme prépondérant dans les ébauches d'organes constitués d'endoderme (le poumon, le pancréas, la rate) et de mésoderme, alors que l'angiogénèse est prédominante dans les organes composés de mésoderme et d'ectoderme (le cerveau et les reins) (35).

Pendant la vie adulte, la néo-vascularisation s'effectue principalement par angiogénèse, mais des précurseurs de cellules endothéliales, des angioblastes, ont été identifiés dans le sang périphérique et dans la moelle osseuse chez l'adulte, ils participent également à la néo-vascularisation (36). Après la naissance, l'angiogénèse contribue à la croissance des organes. Durant la vie adulte les vaisseaux sont majoritairement quiescents et l'angiogénèse a alors lieu uniquement durant le cycle ovarien, dans le placenta lors de la gestation, au cours d'une inflammation (aiguë et chronique), lors des processus de réparation tissulaire ou lors d'une ischémie tissulaire (cœur, membres, cerveau) (37,38).

Récemment, il a été montré que CD146 agit comme un récepteur du VEGF-C afin de réguler la lymphangiogénèse et en particulier le bourgeonnement lymphatique. Les auteurs ont étudié le rôle de CD146 dans la lymphangiogénèse ainsi que le développement du système lymphatique en utilisant des modèles *in vitro* et *in vivo*. Ils suggèrent que CD146 active p38 kinase lorsqu'il est stimulé par VEGF-C et régule le bourgeonnement lymphatique. Il peut aussi activer ERK afin d'induire l'expression de la régulation de VEGF-C conduisant à la prolifération et à la migration des cellules endothéliales lymphatiques (39).

II. Angiogenèse physiologique

1) Vasodilatation et perméabilité vasculaire

L'angiogénèse bourgeonnante commence par une vasodilatation, un processus impliquant le NO (monoxyde d'azote). La perméabilité vasculaire augmente en réponse à l'induction par le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) permettant ainsi une extravasation des protéines plasmatiques qui serviront de matrice lors de la migration des cellules endothéliales. La formation de fenestrations et d'organelles vésiculo-vacuolaires, la modification des propriétés des membranes cellulaires lors de l'activation des Src kinases et la redistribution des molécules

d'adhésion intercellulaire (PECAM-1 et VE-cadhérine) expliquent cette augmentation de la perméabilité (37,40).

2) La dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire et la membrane basale sont ensuite dégradées suite à l'activation de protéases dont l'activateur de plasminogène de type urokinase (u-PA), les métalloprotéinases matricielles (MMP-2, 3 et 9), la chymase et l'héparanase (37), et l'inhibition de leurs inhibiteurs (TIMP-2, Angiopoïétine-1 (Ang1), PAI-1). Lors de la dégradation de la matrice extracellulaire, des facteurs de croissance pro-angiogéniques, qui sont normalement séquestrés dans la matrice, sont libérés (VEGF, FGF et IGF-1). La dégradation de la matrice et de la membrane basale rend possible la migration des cellules endothéliales dans la matrice interstitielle (37,41).

3) La prolifération et la migration des cellules endothéliales vasculaires

Les cellules endothéliales vont migrer et proliférer en fonction du gradient de chimiokines établi par les stimulants pro-angiogéniques. Les cellules endothéliales migrantes s'allongent et s'alignent les unes avec les autres afin de former un bourgeon capillaire dont la longueur est régulée par la division des cellules (42). L'activation de PI3K/Akt favorise la survie et la prolifération cellulaire à travers la modulation de nombreux régulateurs du cycle cellulaire dont la cycline D1, p27 and Bcl-X2. De plus, les voies de signalisation MAPK (ERK1/2, p38 and JNK) régulent l'effet des facteurs de croissance et la prolifération des cellules endothéliales. L'expression des intégrines à la surface des cellules endothéliales facilite l'adhésion à la matrice cellulaire durant la migration. L'expression des intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha\beta5$ est augmentée dans les cellules endothéliales en prolifération, et par la stimulation avec FGF-b et VEGF (43).

4) La maturation des vaisseaux et la formation du lumen

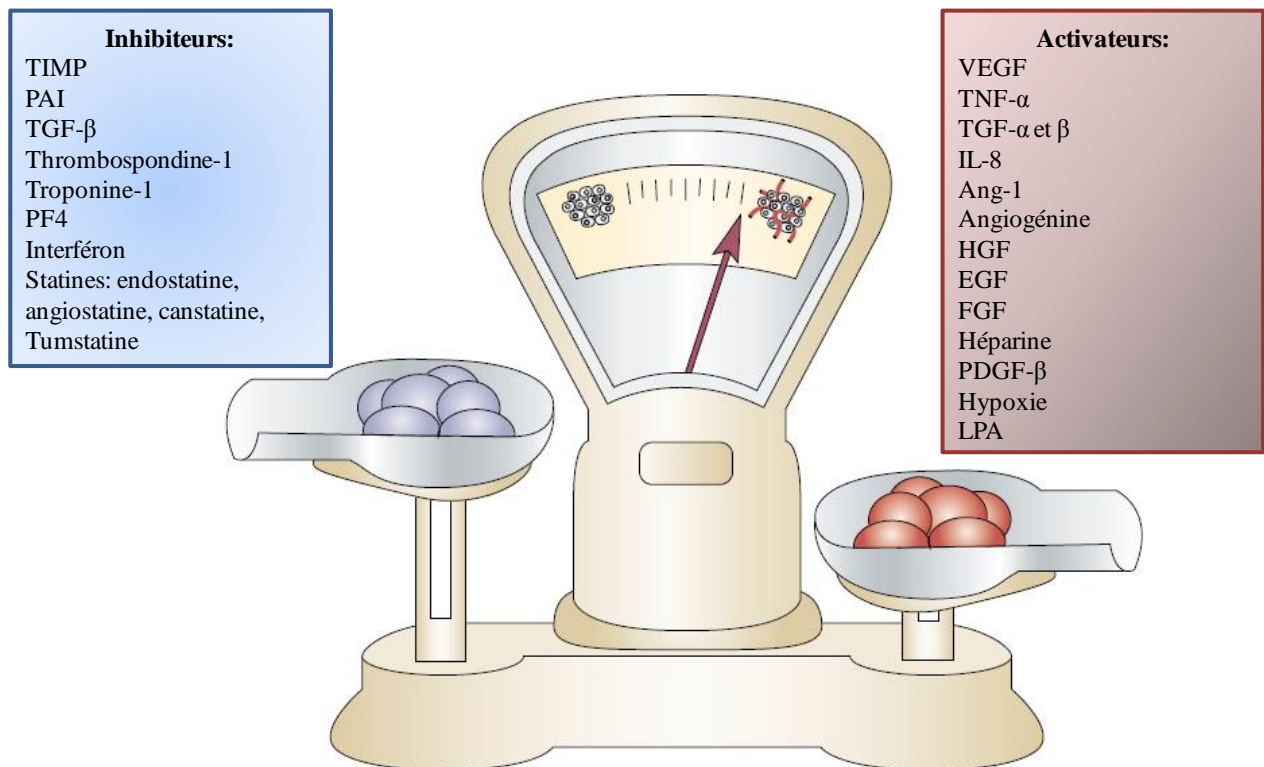
Les cellules endothéliales se rassemblent sous forme de tubes puis il y a formation d'un lumen soit par un processus de canalisation intracellulaire qui correspond à la fusion de vésicules cytoplasmiques, soit par un processus de canalisation intercellulaire qui correspond à l'apposition d'une membrane de deux cellules distinctes (43). La formation du lumen est régulée par différents facteurs dont le VEGF et les intégrines $\alpha\beta3$ et $\alpha5\beta1$ (44).

La stabilisation des néo-vaisseaux est une étape importante dans la finalisation du processus angiogénique. Ceci est en partie réalisé grâce à la production de facteurs qui favorisent une morphologie capillaire différenciée et stable. L'Ang1 est produite de manière constitutive dans la plupart des tissus adultes, et elle active son récepteur, Tie2. L'activation de Tie2 favorise la quiescence des cellules endothéliales à travers les voies MAPK et PI3K/Akt qui induisent la survie cellulaire, mais pas la prolifération des cellules endothéliales (43). Cette quiescence des cellules endothéliales formant les néo-vaisseaux leur permet de survivre des années, ce qui les rend moins sensibles à la déstabilisation et à la régression. Il existe de nombreux facteurs pro-angiogéniques qui améliorent la survie des cellules endothéliales (VEGF, Ang-1, $\alpha\beta3$) en supprimant p53, p21, p16, p27 et Bax et en activant de façon variable PI3K/AKT, p42/44 MAPK, Bcl-2 et les voies A1 et survivine (37).

5) La régulation de l'angiogenèse

Chez l'adulte, le réseau vasculaire est quiescent en condition physiologique. Une balance d'activateurs et d'inhibiteurs contrôle finement le processus d'angiogenèse (Figure 8). Des changements dans l'équilibre de ces régulateurs peuvent entraîner un défaut ou un excès d'angiogenèse.

Figure 8 : Liste non exhaustive des inhibiteurs et des activateurs de l'angiogénèse



(Adapté de Bergers and Benjamin, *Nat. Rev. Cancer*, 2003)

a. Les activateurs de l'angiogénèse

Les facteurs pro-angiogéniques stimulent la prolifération et la migration des cellules endothéliales. La dégradation de la membrane basale qui est nécessaire à l'invasion et à la migration des cellules endothéliales vasculaires requiert l'activité des enzymes protéolytiques de type PA (Activateur du Plasminogène) et MMPs (métalloprotéinases matricielles). Les molécules d'adhésion et les intégrines régulent les interactions cellule-cellule et cellule-matrice (45).

i. Les enzymes protéolytiques

La protéolyse extracellulaire est nécessaire pour l'angiogénèse car elle permet la dégradation de la lame basale sous-endothéliale, l'invasion de la matrice extracellulaire et la formation d'un lumen au sein des néo-vaisseaux. Elle est également impliquée dans la régulation de l'activité de certaines cytokines, soit en activant des formes latentes comme le TGF β , soit en permettant le relargage de cytokines liées à la matrice extracellulaire telles que FGF-b. Elle joue aussi un rôle de régulateur négatif. En effet, elle permet la formation de

fragments protéiques ayant une activité anti-angiogénique comme l'endostatine qui est formée à partir du collagène XVIII.

La protéolyse extracellulaire est réalisée par les MMPs et les PAs.

➤ **Les MMPs :** C'est une famille d'enzymes capable de dégrader la plupart des composants de la matrice extracellulaire dont les collagénases (MMP-1, 8, 13 et 18), les gélatinases (MMP-2 et 9), les matrilysines (MMP-7 et 26) et les stromélysines (MMP-3, 10 et 11) (45). Les MMPs sont principalement sécrétées sous forme latente mais il existe aussi des MMPs transmembranaires, les MT-MMPs. L'activité de ces MMPs peut être régulée grâce à des inhibiteurs, les TIMPs (Tissue inhibitors of metalloproteinases) et au fait qu'elles sont sécrétées sous forme latente.

➤ **Les PAs :** Les activateurs du plasminogène (PA) permettent la transformation du plasminogène (pro-enzyme) en plasmine (forme active) qui est principalement impliquée dans la fibrinolyse mais qui peut dégrader d'autres composants de la matrice extracellulaire en activant certaines MMPs (MMP-1, 3 et 9). Ces PA sont des sérine-protéases de type tissulaire (tPA) ou urokinase (uPA). L'activité de ces PA peut être régulée par des inhibiteurs spécifiques, les PAIs (PA Inhibitors) et un récepteur cellulaire de l'uPA, l'uPAR (uPA Receptor). L'uPA, l'uPAR et le PAI-1 jouent un rôle dans la dégradation matricielle mais aussi dans l'adhérence cellulaire en interagissant avec la vitronectine et l'intégrine $\alpha\beta3$.

ii. Les facteurs angiogéniques

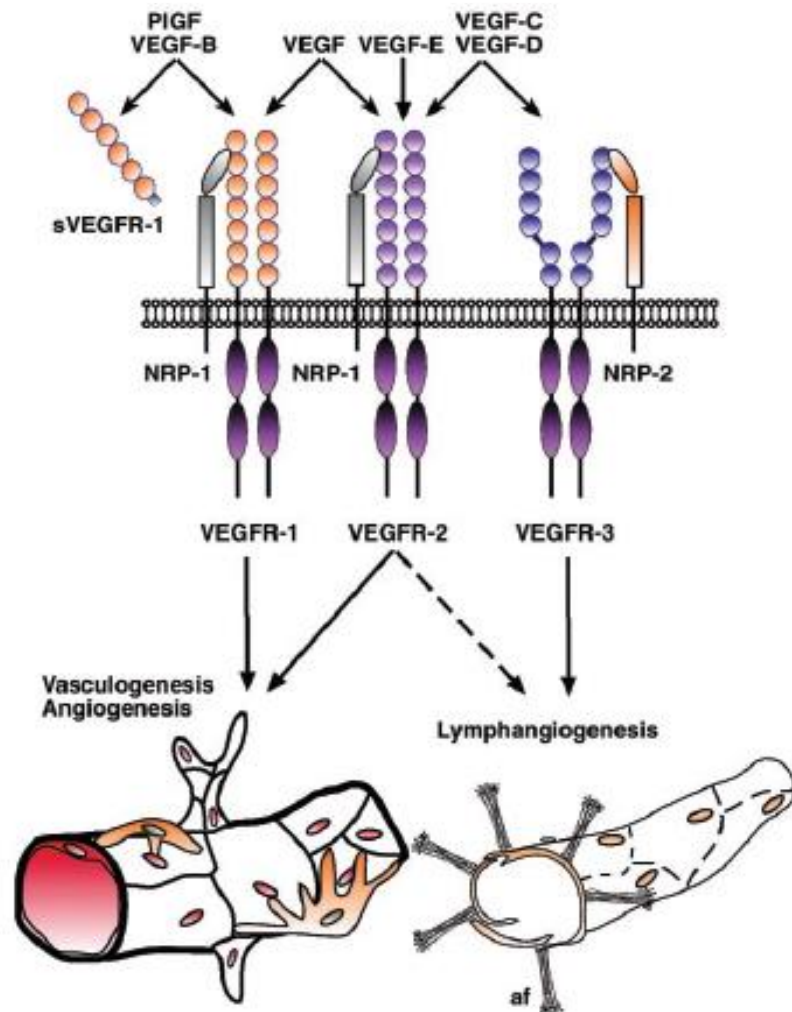
Le VEGF et l'angiopoïétine sont les deux seuls facteurs angiogéniques connus qui soient capables d'agir sélectivement sur les cellules endothéliales.

➤ **VEGF :** Le VEGF est une glycoprotéine dimérique de 34 à 45kDa. Les dimères sont liés par un pont disulfure (46). Il existe 6 membres de la famille du VEGF : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E et le PlGF (Placenta Growth Factor). Le VEGF a d'abord été étudié pour sa capacité à induire l'épanchement vasculaire ainsi que la perméabilité vasculaire mais il est principalement impliqué dans l'angiogenèse. VEGF-A est impliqué dans le maintien de l'angiogenèse alors que VEGF-C et -D sont impliqués dans la lymphangiogenèse (47) (Figure 24). Chez l'homme, le gène VEGF-A se compose de 8 exons. L'épissage alternatif induit de multiples variants qui se différencient par leur capacité à interagir avec la matrice extracellulaire et NRP-1, et leur capacité à lier l'héparine et l'héparine-sulfate. Les isoformes

les plus représentées sont composées de 121, 145, 165, 189 et 206 AA (acides aminés) et sont appelés VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 et VEGF206 (47,48). Le VEGF165, auquel il manque l'exon 6, est l'isoforme prédominante et l'isoforme qui stimule le plus l'angiogenèse. Il peut se lier à la fois à l'héparine et à la matrice extracellulaire. Récemment un variant a été identifié, VEGF165b, il a le même nombre d'AA que le VEGF165, mais il a 6 AA différents au niveau de l'exon 8 dans la région C-terminale. La région C-terminale de VEGF165 est nécessaire pour déterminer la signalisation mitogène, donc les changements dans cette région sont susceptibles d'influencer sa fonction. Les auteurs ont qualifié ce nouveau cadre de lecture ouvert d'exon 9 (47,49). Contrairement aux autres isoformes de VEGF qui stimulent l'angiogenèse, le VEGF165b est une forme inhibitrice endogène du VEGF qui diminue la prolifération induite par le VEGF et la migration des cellules endothéliales. Bien que le VEGF165b puisse se lier à VEGFR-2, cela n'entraîne pas la phosphorylation ou l'activation des voies de signalisation en aval (47,49).

Le VEGF se lie à trois récepteurs à activité tyrosine kinase : VEGFR-1 ou Flt-1 (fms-like tyrosine kinase 1), VEGFR-2 ou Flk-1 (fetal liver kinase 1) ou KDR (kinase insert domain-containing receptor) et VEGFR-3 ou Flt-4. VEGFR-1 et -2 sont principalement trouvés dans l'endothélium vasculaire alors que VEGFR-3 est majoritairement présent sur l'endothélium lymphatique. Ces récepteurs ont tous un domaine extracellulaire, une région transmembranaire unique et une séquence consensus tyrosine kinase interrompue par un domaine d'insertion de kinase. Plus récemment, la neuropiline-1 (NRP-1) a été découverte comme étant un co-récepteur n'ayant pas de domaine intracellulaire tyrosine kinase et qui doit donc agir en conjonction avec d'autres récepteurs pour induire la signalisation du VEGF. Il peut être associé avec VEGFR-1 et -2. La neuropiline-2 (NRP-2) peut également se lier au VEGF-C en interagissant avec VEGFR-3 (47) (Figure 9).

Figure 9 : La famille des VEGFRs et les récepteurs associés



(D'après Jussila et Alitalo, *Physiol rev.*, 2002)

Le VEGFR-2 a été décrit comme étant le médiateur majeur des effets du VEGF (angiogenèse, perméabilité). Après liaison avec le VEGF, le VEGFR-2 transmet des signaux mitogéniques, alors que le VEGFR-1 et le VEGFR-2 induisent des signaux migratoires. Le VEGFR-1 a une double activité, selon les conditions. Il peut agir comme un récepteur antagoniste qui séquestre le VEGF et empêche donc son interaction avec le VEGFR-2, mais il peut également jouer un rôle dans l'hématopoïèse, le recrutement des monocytes et autres dérivés de la moelle osseuse qui sont des promoteurs de l'angiogenèse. Il est impliqué dans l'induction de MMPs, la libération paracrine des facteurs de croissance des cellules endothéliales et semble jouer un rôle dans le développement de certains cancers (50). Les VEGF-C et -D sont des ligands du VEGFR-3 qui est exprimé dans les cellules endothéliales de l'embryon. Durant le développement, son expression à la surface des vaisseaux sanguins

diminue pour finalement se restreindre à l'endothélium lymphatique chez l'adulte (47). *In vitro*, le VEGF stimule la prolifération des cellules endothéliales, la production d'enzymes protéolytiques extracellulaires et la formation de structures multicellulaires pourvues de lumière ressemblant à des capillaires sanguins. L'expression du VEGF est fortement augmentée dans plusieurs types cellulaires par l'hypoxie. Il joue donc un rôle important dans les premières phases de l'angiogenèse. Cependant, le VEGF n'est probablement pas suffisant pour induire l'angiogenèse, la présence d'autres régulateurs positifs de l'angiogenèse, et/ou la perte de régulateurs négatifs, est requise pour le déclenchement d'une réponse néo-vasculaire complète. La famille des VEGFs est impliquée non seulement dans l'angiogenèse, mais également dans la régulation de la lymphangiogenèse. Ainsi, le VEGF-C, qui se lie aux VEGFR-2 et -3, est capable d'induire la formation de néo-vaisseaux de type vasculaire ou lymphatique.

En tant qu'agent angiogénique, le VEGF augmente la perméabilité vasculaire, ce qui favorise l'extravasation des protéines plasmatiques ainsi que la formation d'une matrice extracellulaire extrêmement favorable à la migration des cellules de l'endothélium et du stroma. Il stimule la production des activateurs du plasminogène (uPA et tPA), du collagène interstitiel ainsi que de l'inhibiteur-1 de l'activateur du plasminogène (PAI-1). De plus, il met en place un système équilibré de protéolyse qui permet de remodeler des composés de la matrice extracellulaire qui sont indispensables à l'angiogenèse. Le VEGF a été décrit comme étant un activateur de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales grâce à de nombreuses voies de signalisation dont les voies incluant MAPK, p38, JNK et ERK ainsi que les membres de la famille des RhoGTPases (46). Il est décrit comme un facteur de survie des cellules de l'endothélium grâce à l'activation de la voie PI3K/Akt et grâce à son association avec l'intégrine $\alpha\beta3$ et l'activation de la kinase d'adhésion focale (43).

➤ **Angiopoïétine** : L'Angiopoïétine 1 (Ang1) et 2 (Ang2) ainsi que leurs récepteurs Tie1 et Tie2 sont des protéines principalement produites par les cellules endothéliales et les cellules murales qui sont essentielles dans la formation et la stabilisation des vaisseaux sanguins (41). Ang1 se lie au récepteur à activité tyrosine kinase Tie2 qui est présent sur la membrane plasmique des cellules endothéliales. L'interaction entre Ang1 et Tie2 entraîne la phosphorylation de Tie2 favorisant ainsi l'interaction entre les cellules endothéliales et murales (51). Ang2, un deuxième ligand de Tie2, inhibe la phosphorylation de Tie2 induite par Ang1. C'est un facteur pro-angiogénique qui, en antagonisant la fonction stabilisatrice d'Ang1, rend l'endothélium vasculaire plus susceptible de répondre à d'autres facteurs angiogéniques comme le VEGF. Une étude a montré que le VEGF, le FGF-b et l'hypoxie induisent, dans les cellules

endothéliales, l'expression d'Ang2 (51). L'induction de l'expression d'Ang2, en inhibant le signal stabilisateur d'Ang1, a pour but de faciliter le bourgeonnement de nouveaux vaisseaux dans les premières phases d'activation de l'angiogenèse. En revanche, dans la phase de maturation des bourgeons vasculaires nouvellement formés, des facteurs stabilisateurs comme TGF- β peuvent diminuer, dans les cellules endothéliales, l'expression d'Ang2, permettant ainsi le rétablissement du signal stabilisateur d'Ang1.

➤ **TGF- β** : C'est une cytokine sécrétée sous forme d'un précurseur inactif qui va être activée par protéolyse. Elle est exprimée dans les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. Ses effets pro- ou anti-angiogéniques dépendent du contexte et de sa concentration. En effet, à faible concentration elle est pro-angiogénique et augmente la régulation de la production de facteurs angiogéniques alors qu'à forte concentration elle inhibe la prolifération et la migration des cellules endothéliales en favorisant la reconstruction de la membrane basale ainsi que la différenciation des cellules mésenchymateuses en cellules murales (41).

➤ **FGF** : C'est une famille composée de 23 membres dont les FGF-a et -b qui stimulent l'angiogenèse en activant la voie p38 MAPK au niveau des cellules endothéliales. Cette famille a une haute affinité pour l'héparine ce qui la protège des enzymes protéolytiques et permet sa séquestration dans la matrice extracellulaire (45).

➤ **PDGF** : C'est une famille composée de 4 membres, le PDGF-A, -B, -C et -D, qui se lie à des récepteurs à activité tyrosine kinase, PDGFR- α et - β , présents sur les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses. PDGF est inactif sous forme monomérique et devient actif en formant des homodimères (PDGF-AA, -BB, -CC et -DD) (52). La production de PDGF-B par les cellules endothéliales stimule la prolifération et la croissance des cellules progénitrices mésenchymateuses exprimant PDGFR- β et permet leur recrutement autour des néo-vaisseaux. Le PDGF-C permet le développement du réseau vasculaire pendant l'embryogenèse et chez l'adulte lors des phénomènes de cicatrisation et d'angiogenèse des tissus avasculaires. PDGF-D stimule l'angiogenèse tumorale (53).

➤ **Intégrines** : Les intégrines sont constituées de sous-unités α et β qui sont associées de façon non-covalente. C'est une famille de récepteurs d'adhésion cellulaire. Les cellules endothéliales expriment des intégrines qui jouent un rôle dans l'attachement de ces cellules à la matrice extracellulaire. Parmi les intégrines, l' $\alpha\beta$ 3 a un rôle important dans l'angiogenèse où elle sert de récepteur aux protéines extracellulaires (vitronectine, la laminine, le fibrinogène

et la fibronectine) portant le tri-peptide Arg-Gly-Asp (RGD) (45). Son rôle dans l'angiogenèse n'est pas limité à la liaison à la matrice extracellulaire. En effet, elle lie également la forme active de MMP-2 sur les vaisseaux sanguins en condition angiogénique ce qui lui permet de réguler la dégradation locale de la matrice extracellulaire et d'aider à la migration des cellules par l'adhésion à la matrice (46).

➤ **L'hypoxie** : Elle stimule la formation de nouveaux capillaires et le recrutement de précurseurs endothéliaux. Ces effets sont médiés par l'activation de facteurs de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor) qui régulent de nombreuses protéines ayant un rôle dans la croissance des cellules endothéliales, la vaso-régulation et l'attraction des cellules. Parmi les protéines régulées se trouvent le VEGF, VEGFR-1, VEGFR-2, neuropiline-1, Ang2, PDGF-BB, IL-8, TGF- β , Tie-2, NOS, etc... (34). Il y a formation d'un dimère HIF-1 α -HIF-1 β qui va se lier à des régions HRE (Hypoxia Response Elements). En condition normoxique, HIF-1 α a une demi-vie extrêmement courte puisqu'elle est inférieure à 5 minutes. En effet, elle est ubiquitinée puis dégradée par le protéasome. A l'inverse, en condition hypoxique, ce phénomène est inhibé, conduisant à une augmentation de la demi-vie (43).

b. Les inhibiteurs de l'angiogenèse

Il existe deux sortes de molécules inhibitrices de l'angiogenèse : les facteurs endogènes comme la thrombospondine-1 et les fragments protéolytiques de molécules endogènes tel que l'angiostatine (54).

➤ **La thrombospondine-1** : C'est le principal inhibiteur de l'angiogenèse qui est produit de façon constitutive par les cellules normales. Sa régulation est dépendante du suppresseur de tumeur p53. Elle se lie et active CD36 à la surface des cellules endothéliales ce qui permet d'inhiber l'angiogenèse tumorale en agissant directement sur la migration, la prolifération et la survie des cellules endothéliales (54).

➤ **L'angiostatine** : C'est un fragment protéolytique du plasminogène de 38kDa. Les cellules tumorales humaines sécrètent des protéases qui coupent le plasminogène en plasmine (42). Elle est décrite comme inhibant l'angiogenèse et réduisant la croissance tumorale ainsi que la dissémination métastatique (55).

III. Angiogenèse pathologique

Des changements dans l'équilibre entre les activateurs et les inhibiteurs de l'angiogenèse peuvent induire un excès ou une insuffisance d'angiogenèse pouvant mener à de nombreuses pathologies telles que la croissance tumorale, la dissémination métastatique, le sarcome de Kaposi, l'arthrite rhumatoïde, le psoriasis, l'endométriose, la rétinopathie proliférative, et l'obésité lors d'une angiogenèse excessive ou la maladie d'Alzheimer, l'athérosclérose, l'ostéoporose, la maladie de Crohn, l'œdème lymphatique, l'ischémie myocardique et périphérique, la fibrose pulmonaire et le diabète lors d'une angiogenèse insuffisante (37).

1) Pathologie cancéreuse

a. Généralités

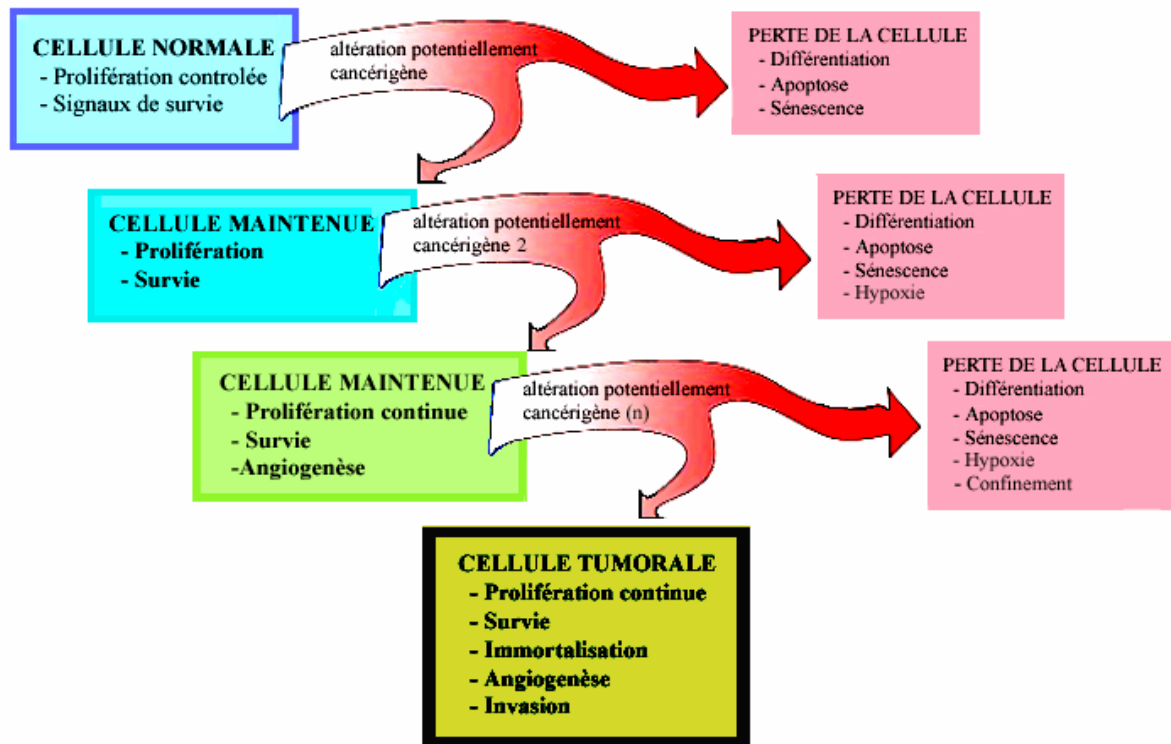
Le cancer constitue l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Selon l'OMS, il y a eu 14 millions de nouveaux cas en 2012 et 8.8 millions de morts en 2015. Les principaux types de cancer sont le cancer du poumon (1.69 millions de décès), le cancer du foie (788 000 décès), le cancer colorectal (774 000 décès), le cancer de l'estomac (754 000 décès) et le cancer du sein (571 000 décès). La lutte contre le cancer est donc un enjeu majeur de santé publique. La recherche s'articule autour de trois axes majeurs qui sont étroitement liés :

- 1/ Quelles sont les origines et les causes du cancer ?
- 2/ Quelles sont les mécanismes moléculaires, cellulaires et physiologiques qui interviennent dans la tumorigenèse ?
- 3/ Quelles thérapies peut-on mettre en œuvre afin de guérir les patients souffrant d'un cancer ?

Au niveau cellulaire, le cancer est défini comme une pathologie ayant pour origine des altérations génétiques des cellules somatiques entraînant des modifications moléculaires, cellulaires et physiologiques qui vont permettre aux cellules de proliférer de façon incontrôlée. Il existe 2 catégories de gènes ciblés par les altérations génétiques dans les cancers : les oncogènes qui sont des gènes qui, lorsqu'ils subissent une modification, vont coder pour des protéines qui favorisent le développement de la tumeur, et les gènes suppresseurs de tumeurs qui sont normalement actifs et régulent le fonctionnement d'une cellule normale non-cancéreuse. Des mutations dans les cellules cancéreuses peuvent aboutir à la perte ou l'altération de l'expression de ces gènes. En condition normale, lorsqu'une mutation se produit,

la cellule dispose de systèmes de surveillance et de réparation de l'ADN, et les cellules mutantes sont éliminées par apoptose (Figure 10).

Figure 10 : Cascade d'évènements favorisant l'apparition d'une tumeur



La tumorigénèse est un processus à étapes. Dans certains types de cancers comme celui du colon, les étapes sont visibles d'un point de vue anatomique et pathologique. Les altérations génétiques vont modifier la physiologie des cellules par étapes successives. En suivant cette idée, Hanahan et Weinberg ont proposé, en 2000, que la formation d'une tumeur nécessite l'apparition de 6 propriétés cellulaires (56) :

- 1- **Une autosuffisance en signaux de croissance** : la tumeur produit elle-même des signaux de croissance afin d'avoir une indépendance par rapport à son microenvironnement.
- 2- **Une insensibilité aux inhibiteurs de croissance** : le cycle cellulaire peut être bloqué, les cellules tumorales possédant des systèmes d'échappement à ces signaux, afin de proliférer librement.
- 3- **Un échappement à l'apoptose** : les cellules tumorales deviennent insensibles aux signaux apoptotiques ce qui contribue à leur expansion.
- 4- **Un potentiel de réplification illimité** : les cellules tumorales acquièrent une autonomie en signaux de croissance, une insensibilité aux inhibiteurs de croissance et une résistance à l'apoptose ce qui leur permet une prolifération illimitée.

5- **Une initiation de l'angiogenèse** : lorsque la tumeur a une taille importante, son irrigation doit augmenter afin d'apporter aux cellules les nutriments et l'oxygène pour survivre. Elle initie donc la formation de néo-vaisseaux par angiogenèse.

6- **L'invasion des tissus et la formation de métastases** : le détachement de cellules tumorales durant le développement de la tumeur est à l'origine de la formation de tumeurs secondaires dans d'autres organes.

Ces 6 propriétés sont communes à un grand nombre voire à la totalité des tumeurs. Elles ont été complétées par 5 autres propriétés en 2011 (57) :

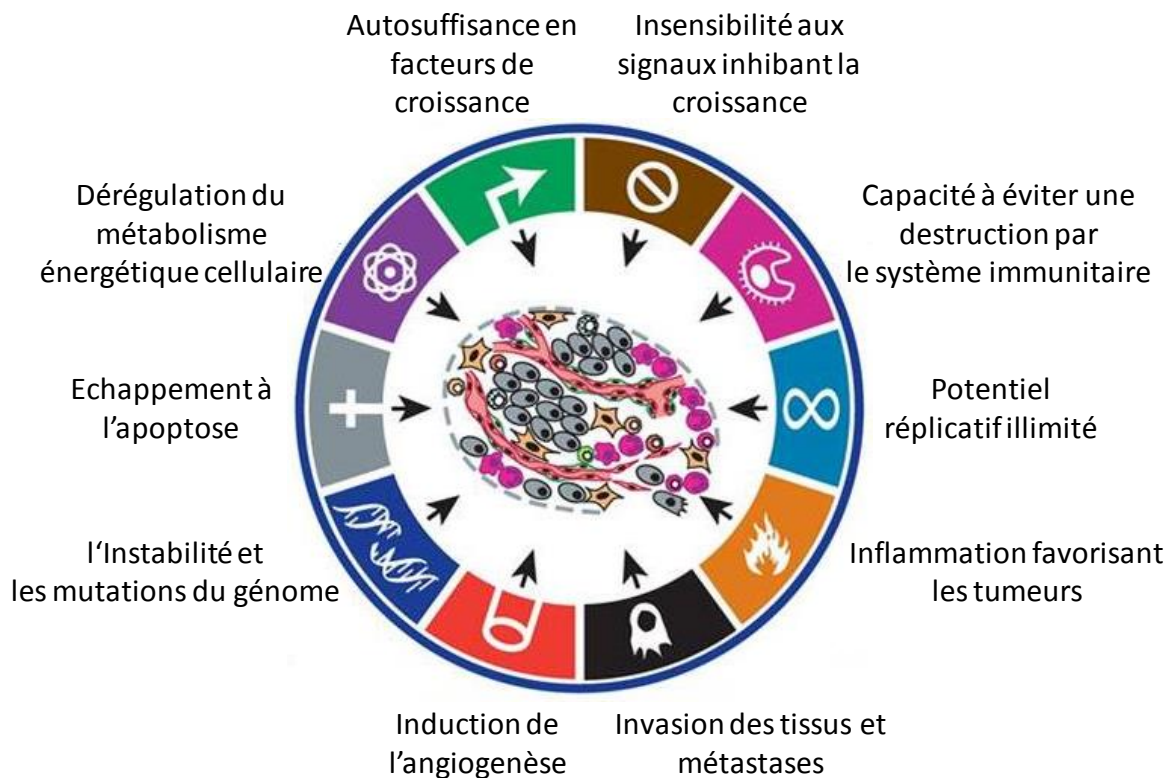
7- **La dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire** : les cellules acquièrent la capacité de modifier, ou de reprogrammer, le métabolisme cellulaire afin de soutenir plus efficacement la prolifération néoplasique.

8- **La capacité à éviter une destruction par le système immunitaire** : les cellules cancéreuses acquièrent la capacité à échapper à une destruction immunologique, en particulier par les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules NK.

9- **L'inflammation favorisant les tumeurs** : certaines tumeurs sont fortement infiltrées par des cellules du système immunitaire et elles génèrent des conditions inflammatoires dans les tissus proches (58). Une telle réponse immunitaire est généralement comprise comme une tentative du système immunitaire d'éliminer la tumeur, mais l'inflammation des tumeurs a également l'effet paradoxal de favoriser la tumorigenèse et la progression tumorale. Les cellules inflammatoires peuvent sécréter des substances chimiques, qui sont activement mutagènes pour les cellules cancéreuses proches, accélérant leur évolution vers des états plus dangereux.

10- **L'instabilité et les mutations du génome** : l'instabilité génomique découle directement de l'inactivation ou de la perturbation de l'activité des gènes de réparation de l'ADN et conduit à la progression tumorale.

Figure 11 : Les 11 caractéristiques du cancer



(D'après Hanahan and Weinberg, *Cell*, 2011)

b. Les mécanismes moléculaires et cancer

i. Les oncogènes

Les oncogènes ou proto-oncogènes sont des gènes susceptibles de devenir, suite à une modification quantitative ou qualitative, un gène transformant. Il s'agit d'un gène capable de conférer de façon expérimentale un phénotype cancéreux à une cellule eucaryote normale. L'altération d'un allèle est suffisante pour entraîner une activation anormale. Il existe 6 grandes classes d'oncogènes en fonction des oncoprotéines qu'ils codent :

- Les facteurs de croissance qui assurent une boucle de régulation autocrine comme les proto-oncogènes codants pour la famille des FGFs.
- Les récepteurs transmembranaires de facteurs de croissance comme le proto-oncogène erb-B qui code pour le récepteur à l'EGF.
- Les protéines G ou protéines membranaires liant la GTP comme les proto-oncogènes de la famille *ras*.
- Les protéines à activité tyrosine kinase membranaires.
- Les protéines kinases cytosoliques.

- Les protéines à activité nucléaire qui contrôlent la transcription de gènes cibles en interagissant avec l'ADN comme le proto-oncogène *erbA* codant pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes et les proto-oncogènes *c-myc*, *fos* et *jun*.

Les mécanismes d'activation des oncogènes sont multiples :

- **L'intégration virale** : elle peut se faire par un mécanisme d'intégration chimérique, par l'insertion d'un ADN viral au niveau d'un gène régulateur aboutissant à un gène chimérique à l'origine de la synthèse d'une protéine hybride ou par insertion au hasard du virus qui possède ses propres séquences activatrices.

- **Les mutations ponctuelles** : ces mutations ont lieu dans une séquence codante pour un proto-oncogène, aboutissant à une modification fonctionnelle de l'oncoprotéine. Les mutations faux-sens entraînant la substitution d'un AA (acide aminé) par un autre sont capables d'activer des proto-oncogènes en oncogènes, en touchant par exemple un site catalytique ou en entraînant une activation substitutive de la protéine.

- **Les délétions** : les délétions aboutissent le plus souvent à une perte de fonction et peuvent parfois entraîner une activation anormale si elles modifient une région régulatrice.

- **Le réarrangement structural** : des altérations chromosomiques telles que l'inversion ou la translocation peuvent entraîner la formation d'un gène hybride qui est généré par la fusion de régions codantes et conduire à la synthèse de protéines chimériques non-fonctionnelles.

- **Les amplifications géniques** : l'amplification correspond à une augmentation anormale du nombre de copies d'un gène dans une cellule. Ces copies surnuméraires se trouvent alors soit sous forme intégrée dans un chromosome, soit sous forme de mini-chromosomes surnuméraires appelés les chromosomes double-minute. Cette amplification génique entraîne généralement une augmentation du niveau de l'expression d'un gène.

- **Les dérégulations de l'expression et la stabilisation d'un ARNm codant pour une oncoprotéine** : les proto-oncogènes, lors de translocations chromosomiques, peuvent être déconnectés de leur environnement moléculaire normal et placés sous le contrôle inapproprié d'autres séquences à l'origine d'une modification de leur expression.

ii. *Les gènes suppresseurs de tumeurs*

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes qui sont aptes à inhiber la croissance cellulaire lorsqu'ils sont introduits par transfection dans les cellules tumorales. Cette propriété s'explique par la capacité de ces gènes à réguler négativement le cycle cellulaire et à induire

l'apoptose. Ces gènes ont une action cellulaire récessive, c'est-à-dire qu'une altération des 2 allèles est nécessaire à l'obtention d'une perte d'activité de la protéine correspondante. De ce fait, deux étapes sont nécessaires : une première étape de mutation somatique (cancer sporadique) ou germinale (cancer héréditaire) et une deuxième étape de mutation somatique.

Le mécanisme d'action de ces gènes est relativement simple. Ils agissent principalement en phase G1/S. Cette transition G1/S est sous la dépendance des facteurs de transcription de la famille E2F qui contrôlent l'expression de gènes indispensables à la phase S de synthèse de l'ADN. Les protéines de la famille E2F existent soit sous forme libre, soit sous forme inactive complexée à la protéine RB. L'aptitude de la protéine RB à fixer les facteurs de transcription E2F dépend de son état de phosphorylation. En effet, lorsque la protéine RB est non phosphorylée, elle est active et peut fixer les facteurs E2F, il en résulte un blocage de la transition G1/S. Lorsque la protéine RB est phosphorylée, elle devient inactive et est incapable de fixer la protéine E2F qui, libérée, permet la transition G1/S. La phosphorylation de RB est elle-même sous la dépendance de complexes protéiques jouant le rôle de verrous moléculaires au niveau de la transition entre les différentes phases du cycle. Ces complexes sont composés d'unités régulatrices, les cyclines, et d'unités catalytiques, les kinases dépendantes de cyclines ou CDK (Cyclin Dependant Kinase). L'association de ces deux unités constitue le complexe actif. Les complexes cyclines/CDK sont eux-mêmes régulés par des protéines inhibitrices (p15, p16, p18, p19, p21, p27 et p57), qui agissent en se fixant sur les CDKs, et donc en empêchant la constitution du complexe actif. Le gène p21, inhibiteur universel de CDK, est régulé par la protéine p53 au niveau transcriptionnel. Les gènes RB, p16 et p53 interviennent sur la même voie biologique, qui régule la transition G1/S. La protéine p53 régule la transcription de nombreux gènes dont certains (*bax*) régulent l'apoptose.

Les altérations moléculaires à l'origine de la perte de fonction des gènes suppresseurs dans les tumeurs solides sont variées. Il peut s'agir de mutations ponctuelles, de délétions, d'insertions ou d'anomalies de méthylation des promoteurs inhibant la transcription. La voie biologique contrôlant le cycle cellulaire au niveau de la transition G1/S et passant par les gènes suppresseurs p53, p16 et RB, est la voie la plus fréquemment altérée dans les cancers.

iii. Les gènes de réparation de l'ADN

Il existe une troisième catégorie de gènes dont l'altération intervient dans la cancérogenèse : les gènes de réparation de l'ADN. Ils interviennent indirectement dans ce processus.

Les systèmes de réparation sont répartis en 2 catégories en fonction de l'origine de la mutation :

- **Le système de réparation des mésappariements (mismatch repair) :** il intervient lorsque les mutations de l'ADN résultent d'erreurs de la réplication (dérage de l'ADN polymérase). Il comprend les gènes hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6. L'altération constitutionnelle de ces gènes est à l'origine du cancer colorectal familial non associé à une polypose colique qui représente une des premières causes de cancer colorectal héréditaire.

- **Le système de réparation NER (Nucleotide Excision Repair) :** il s'agit d'un système de réparation de mutations induites par des carcinogènes environnementaux (UV, carcinogènes chimiques). L'altération constitutionnelle des gènes du système excision-resynthèse prédispose à des maladies caractérisées par une hypersensibilité aux rayonnements UV tel que le Xeroderma Pigmentosum.

c. Les évènements cellulaires et cancer

La mort cellulaire programmée permet d'équilibrer la mort cellulaire et la survie des cellules normales. L'apoptose, l'autophagie et la nécrose sont les trois morts cellulaires programmées possibles qui se distinguent par des différences morphologiques (59).

L'apoptose est caractérisée par des changements biochimiques et morphologiques spécifiques des cellules, incluant un rétrécissement cellulaire, une condensation et une fragmentation nucléaire, des invaginations membranaires et une perte d'adhésion aux cellules adjacentes ou à la matrice extracellulaire (60). Les changements biochimiques incluent un clivage de l'ADN chromosomique, une externalisation des phosphatidylsérines et un nombre important de substrats intracellulaires clivés par protéolyse spécifique (61).

Le terme autophagie englobe un ensemble de mécanismes de dégradation de constituants cellulaires par le lysosome. Une autophagie basale et constitutive existe dans toutes les cellules, permettant le nettoyage et l'élimination des dommages. Ce processus permet ainsi d'éliminer des protéines de longue vie, des organelles endommagées et des agrégats protéiques. L'autophagie semble jouer un rôle double vis-à-vis du cancer : suppresseur de tumeur dans les étapes précoces de la tumorigenèse, mais plutôt pro-tumoral et pro-survie dans les tumeurs avancées (62).

La nécrose implique un gonflement cellulaire, une dysfonction des organites et une lyse de la cellule (63). Cette mort cellulaire programmée peut jouer un rôle important pendant la

préservation de l'homéostasie tissulaire et l'élimination des cellules endommagées. Ce mécanisme est très impliqué dans le cancer (59).

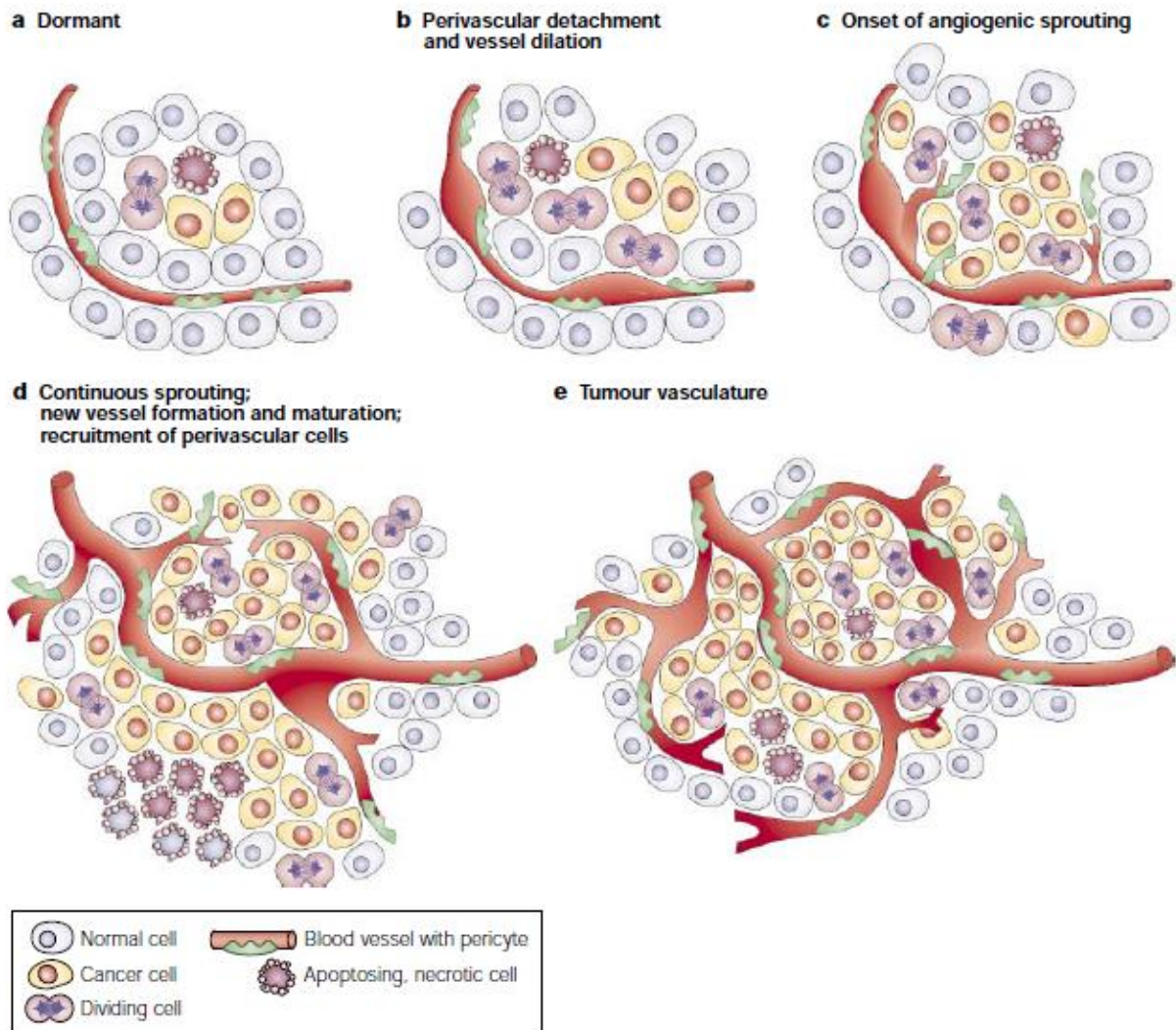
Deux phases indispensables et distinctes sont nécessaires à l'apparition du cancer. Durant la première phase, l'apparition des mutations somatiques transforme une cellule normale en cellule cancéreuse ayant un pouvoir prolifératif important. La deuxième étape, précoce, concerne l'interaction des cellules cancéreuses avec le stroma. Les cellules cancéreuses stimulent la modification du stroma, le recrutement de vaisseaux sanguins ainsi que la production de cytokines et de facteurs de croissance par les cellules du stroma (64).

En condition physiologique, le stroma joue un rôle majeur dans le développement et le maintien de la polarité des cellules épithéliales via l'émission de signaux (chémokines, etc...) qui leur permet de se polariser. La perte de polarité en condition pathologique génère une augmentation de la prolifération et du processus de tumorigenèse (65). Le stroma tumoral est caractérisé par tout ce qui est présent au sein de la tumeur et qui n'est pas une cellule tumorale. Il comprend les éléments acellulaires de la matrice extracellulaire, les médiateurs solubles (facteurs de croissance, enzymes) ainsi que les cellules non-cancéreuses de la tumeur (cellules inflammatoires, endothéliales et fibroblastes). Il sert de charpente fibreuse à la tumeur et assure ses apports nutritifs via l'angiogenèse. Il est sous la dépendance du tissu tumoral. Il y a un stroma constitué au minimum des vaisseaux et d'une matrice extracellulaire d'abondance variable dans toutes les tumeurs solides. En effet, la tumeur ne peut croître seule, elle a besoin d'un tissu hôte avec lequel elle entretient d'étroites relations (66). Elle possède une structure et des fonctions qui sont créées et maintenues par une interaction dynamique entre le microenvironnement et les cellules tumorales. De plus, le stroma modifie le pouvoir prolifératif ainsi que le pouvoir invasif des cellules tumorales (67). La modification des interactions stroma-cellules épithéliales peut moduler le comportement des cellules épithéliales et provoquer leur transformation tumorale (68). Le stroma peut donc favoriser ou, à l'inverse, bloquer le développement tumoral (69). Le niveau d'activation du stroma joue un rôle important dans l'apparition et le développement tumoral (70). Le développement de la tumeur est étroitement lié à la stromagenèse qui est parallèle à la tumorigenèse (71) et qui possède de nombreuses ressemblances avec le processus de réparation tissulaire (58). Dans les stades initiaux du développement tumoral, le stroma freine la tumorigenèse (72). Au contraire, dans les stades tardifs, celui-ci a un rôle de soutien de la croissance tumorale (73).

d. Angiogenèse et développement cancéreux

Folkman a émis une hypothèse, en 1971, selon laquelle la croissance des tumeurs et des métastases pourrait dépendre de l'angiogenèse (74). En effet, la tumeur est approvisionnée en oxygène et nutriments via les nouveaux vaisseaux sanguins qui permettent ainsi son expansion à des tailles supérieures au mm³. Ces vaisseaux permettent l'élimination des déchets métaboliques et fournissent également des cytokines et des facteurs de croissance qui sont des stimulants directs de la croissance des cellules cancéreuses. La progression tumorale est ainsi caractérisée par deux phases, une première phase pré-vasculaire puis une seconde phase dite vasculaire. Ce passage de la phase pré-vasculaire à la phase vasculaire est nommé « switch angiogénique ». Ce « switch angiogénique » peut être initié par des signaux tels que ceux du stress métabolique (pH faible, hypoglycémie ou pression partielle d'O₂ faible), par des signaux mécaniques tels que la pression générée par des cellules en prolifération, une réponse inflammatoire/immunitaire (infiltration de cellules immunitaires dans le tissu cancéreux) ou bien par des mutations génétiques (délétion de gènes suppresseurs de tumeurs régulant la production de facteurs angiogéniques et activation d'oncogènes). La phase pré-vasculaire qui se caractérise par une croissance exacerbée de la tumeur est suivie par un plateau. Durant cette période, le taux de cellules en apoptose contrebalance le nombre de cellules en prolifération. La phase vasculaire est caractérisée par une croissance exponentielle, une invasion tissulaire et une dissémination métastatique. Durant cette phase l'augmentation rapide de la croissance de la tumeur s'explique principalement par une diminution du taux de cellules apoptotiques (75) (Figure 12).

Figure 12 : Le « switch angiogénique »



Le « switch angiogénique » est une étape discrète dans le développement de la tumeur qui peut se produire à différents stades de la progression tumorale, selon la nature de la tumeur et son microenvironnement. La plupart des tumeurs commencent à croître en tant que nodules avasculaires (dormants) (a) jusqu'à ce qu'ils atteignent un niveau stable de cellules en prolifération et en apoptose. L'initiation de l'angiogenèse, ou le « switch angiogénique », doit se produire pour assurer une croissance exponentielle de la tumeur. Elle commence par le détachement périvasculaire et la dilatation des vaisseaux (b), suivie par le bourgeonnement angiogénique (c), la formation et la maturation de nouveaux vaisseaux et le recrutement de cellules périvasculaires (d). La formation des vaisseaux sanguins se poursuit aussi longtemps que la tumeur grandit, et les vaisseaux sanguins alimentent spécifiquement les zones hypoxiques et nécrotiques de la tumeur pour leur fournir des nutriments essentiels et de l'oxygène (e) (D'après Bergers and Benjamin, Nature reviews, 2003).

Les vaisseaux tumoraux peuvent se former par angiogenèse mais aussi par vasculogenèse. Durant ce processus, il y a une mobilisation des précurseurs endothéliaux de la moelle osseuse qui sont transportés via le réseau sanguin et incorporés dans les nouveaux vaisseaux sanguins

en formation. De nombreux facteurs angiogéniques tels que le VEGF, le PlGF et l'Ang-1 stimulent ce processus. Les vaisseaux tumoraux et normaux diffèrent à plusieurs niveaux. Morphologiquement, les vaisseaux tumoraux sont hétérogènes, dilatés, tortueux avec des branchements excessifs, de forme irrégulière et possèdent des terminaisons aveugles. Le flux sanguin à l'intérieur de ces vaisseaux est variable et chaotique ce qui génère la formation de zones hypoxiques et acides au sein de la tumeur. Au niveau ultra-structural les vaisseaux sont anormaux. Ils comportent de nombreuses ouvertures, une membrane basale discontinue ou absente ainsi que de larges jonctions inter-endothéliales. Ces cellules endothéliales anormales se chevauchent et occupent une partie du lumen. Il existe une hétérogénéité dans la maturité des vaisseaux (76). Les régions tumorales ne sont pas vascularisées de façon égale et la balance entre les molécules pro- et anti-angiogéniques diffère selon la région et le stade de la tumeur (77). Ceci se traduit par une vascularisation très hétérogène entre les tumeurs et à l'intérieur d'une même tumeur. L'angiogenèse est une composante essentielle de la croissance tumorale et elle joue un rôle important dans la dissémination métastatique.

e. Thérapeutique

L'endothélium tumoral constitue une cible intéressante pour la thérapie. En effet, chez l'adulte sain, les cellules endothéliales sont en majorité quiescentes. De ce fait, un traitement anti-angiogénique cible de façon quasi-exclusive les cellules endothéliales prolifératrices de la tumeur et limite la toxicité du traitement. Un grand nombre d'inhibiteurs angiogéniques sont en essai clinique. La famille du VEGF prédomine dans les cibles angiogéniques et le traitement anti-tumoral. En effet, la plupart des tumeurs, si ce n'est la totalité, sécrètent des niveaux élevés de VEGF (78). En 2004, la FDA (Food and Drug Administration) a approuvé aux Etats-Unis l'utilisation du Bevacizumab, un anticorps anti-VEGF, pour traiter les patients atteints de cancer colorectaux métastatiques en combinaison avec de la chimiothérapie basée sur le 5-FU (5-fluorouracil). Il est aussi utilisé dans le cancer du poumon et du sein. Le Bevacizumab est également étudié dans de nombreux essais cliniques chez des patients atteints d'autres types de cancer en administration combinée avec le Tarceva, une molécule ciblant la voie de signalisation d'EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique humain). Depuis, d'autres inhibiteurs anti-angiogéniques ont été approuvés par la FDA aux Etats-Unis et dans d'autres pays (www.cancer.net) :

- L'axitinib (Inlyta) est une possibilité de traitement pour le cancer du rein.

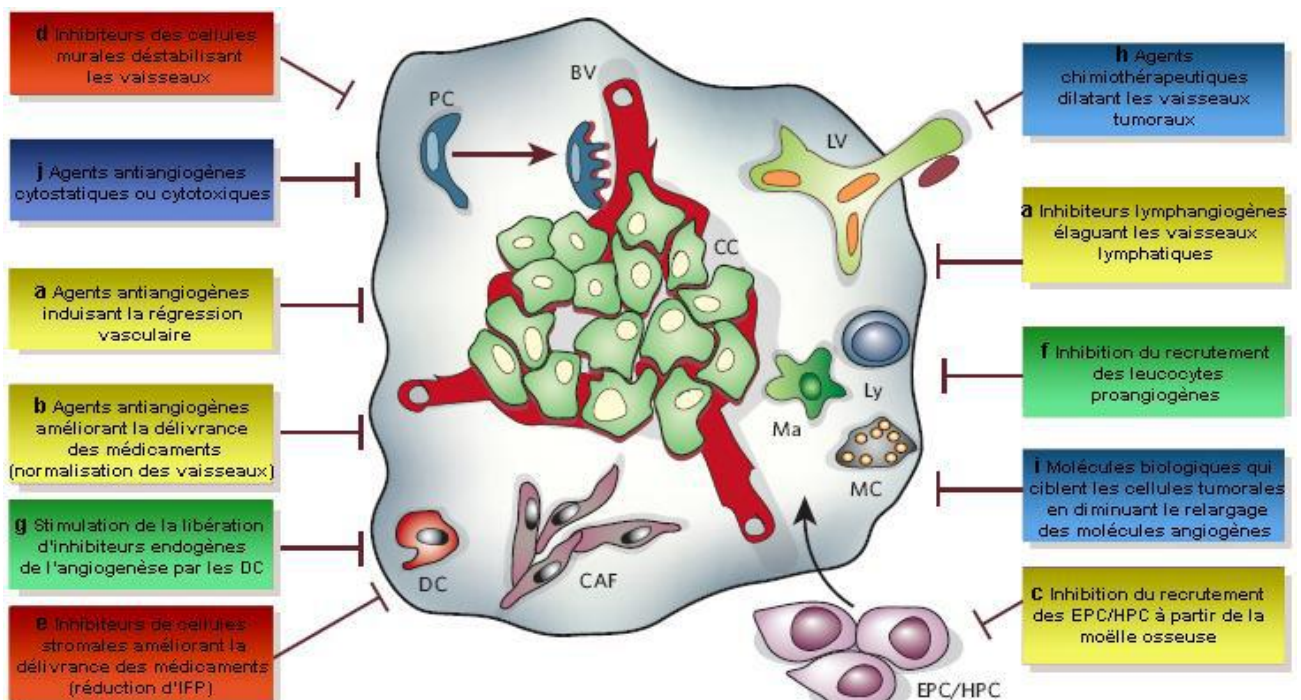
- Le bevacizumab (Avastin) est utilisé pour le cancer colorectal, le cancer du rein et le cancer du poumon.
- Le cabozantinib (Cometriq) et le vandetanib (Caprelsa) sont tous les deux utilisés pour le cancer médullaire de la thyroïde.
- L'everolimus (Afinitor, Zortress) est utilisé pour traiter le cancer du rein, le cancer du sein avancé et les tumeurs pancréatiques endocrines.
- Le lenalidomide (Revlimid) est un traitement pour le myélome multiple et les tumeurs impliquant des cellules qui produisent normalement des anticorps.
- Le pazopanib (Votrient) est utilisé pour traiter le cancer du rein et le sarcome avancé des tissus mous.
- Le ramucirumab (Cyramza) est utilisé pour traiter les cancers avancés de l'estomac, l'adénocarcinome de la jonction gastro-œsophagienne, le cancer colorectal et le cancer du poumon non à petites cellules.
- Le regorafenib (Stivarga) est utilisé pour le cancer colorectal et les tumeurs stromales gastro-intestinales.
- Le sorafénib (Nexavar) est une possibilité de traitement pour le cancer du rein, du foie et de la thyroïde.
- Le Sunitinib (Sutent) est utilisé pour traiter le cancer du rein, les tumeurs pancréatiques endocrines et les tumeurs stromales gastro-intestinales.
- Le thalidomide (Synovir, Thalomid) est un traitement pour le myélome multiple.
- Le ziv-aflibercept (Zaltrap) est également utilisé pour traiter le cancer colorectal.

La thérapie anti-angiogénique ne permet pas à elle seule d'éradiquer de façon définitive les tumeurs mais agit plutôt comme un régulateur de leur croissance. Elle est le complément idéal aux agents thérapeutiques cytotoxiques (chimiothérapie ou radiothérapie). De multiples études précliniques ont montré qu'une co-administration d'agents anti-angiogéniques et d'agents cytotoxiques conventionnels ou d'une radiothérapie augmente de façon considérable l'effet anti-tumoral global. Ceci a été confirmé cliniquement avec le Bevacizumab en combinaison avec une chimiothérapie basée sur le 5-FU (50). De plus, une chimiothérapie métronomique (c'est-à-dire une chimiothérapie délivrée à faible dose et à intervalles de temps réguliers et rapprochés) endommage préférentiellement les cellules endothéliales situées dans les vaisseaux tumoraux (79). Son efficacité peut être augmentée quand elle est administrée en combinaison avec des drogues anti-angiogéniques telles que des anticorps dirigés contre le VEGFR-2 ou le VEGF (80). Certaines tumeurs humaines peuvent acquérir une résistance aux antagonistes d'un

seul facteur anti-angiogénique. Une thérapie anti-angiogénique combinant différents inhibiteurs et ciblant différentes voies angiogéniques semble donc être une approche indispensable pour espérer une efficacité optimale.

A côté des agents anti-angiogéniques affectant de façon directe les cellules endothéliales, des stratégies ont été développées afin d'interférer avec des cellules non endothéliales (cellules stromales et murales, cellules hématopoïétiques et cellules tumorales) impliquées dans l'angiogenèse tumorale (Figure 13). Ainsi, le ciblage des vaisseaux tumoraux déjà établis représente une thérapie alternative, certainement complémentaire avec la thérapie anti-angiogénique. Des agents anti-vasculaires de type toxine ou cytokine sont délivrés de façon spécifique aux vaisseaux tumoraux grâce à des molécules telles que des anticorps, des peptides et des aptamères qui sont connus pour lier des marqueurs vasculaires spécifiquement exprimés sur l'endothélium vasculaire tumoral. Ces agents anti-vasculaires peuvent induire soit une hémorragie soit la formation d'un thrombus au sein de la tumeur et provoquent ainsi une réduction de la perfusion de la tumeur puis une nécrose (76). Les médicaments liés au 5,6-diméthylxhanténone-4-acide acétique (DMXAA) et le combrestatine A-43-O-phosphate (CA-4-P) utilisés en combinaison avec des thérapies conventionnelles sont, depuis 2005, testés en phase clinique (76).

Figure 13 : Stratégies ciblant les cellules non endothéliales et endothéliales afin d'inhiber l'angiogenèse tumorale



Les boîtes jaunes représentent des agents ciblant les précurseurs endothéliaux circulant (EPC) ; ils inhibent la lymphangiogenèse et l'angiogenèse des vaisseaux sanguins (a), induisent la régression (a) et la normalisation (b) des vaisseaux, et bloquent le recrutement des EPCs (c). Les boîtes rouges désignent des agents ciblant les cellules murales et stromales qui déstabilisent les vaisseaux (d), réduisent le relargage de facteurs pro-angiogéniques et/ou de cytokines, et diminuent la pression du fluide interstitiel ce qui a pour finalité d'améliorer la délivrance des médicaments.

Les boîtes vertes indiquent des agents ciblant les cellules hématopoïétiques et réduisant l'infiltration des EPCs dérivés de la moelle osseuse et de leucocytes matures (c, f) et stimulant ainsi la libération d'inhibiteurs endogènes de l'angiogenèse dans les cellules dendritiques (g). Les boîtes bleues désignent des agents ciblant les cellules cancéreuses qui améliorent la délivrance des médicaments par dilatation des vaisseaux tumoraux (h) et une diminution de la libération de facteurs angiogéniques (i) ; de plus, certains agents anti-angiogéniques sont aussi cytotoxiques pour les cellules tumorales (j).

BV : vaisseau sanguin ; CAF : fibroblaste activé par un carcinome ; DC : cellule dendritique ; LV : vaisseau lymphatique ; Ly : lymphocyte ; Ma : macrophage ; PC : péricytes ; MC : mastocyte (D'après Carmeliet, Nature, 2005).

L'arsenal thérapeutique disponible pour traiter certains cancers a été élargi grâce au développement des molécules anti-angiogéniques. Cependant, leur action ne se limite pas au niveau tumoral et des effets indésirables significatifs existent. Ils en existent plusieurs, dont des atteintes cardiovasculaires, qui se caractérisent par une hypertension artérielle pouvant être compensée par l'utilisation d'antihypertenseurs. Des complications plus graves ont été recensées comme des hémorragies et des événements thrombotiques. Une atteinte rénale majeure a également été observée chez des patients recevant des anti-angiogéniques. Ainsi, la protéinurie est significativement augmentée chez des patients traités avec du Bevacizumab, mais cela est souvent sans conséquence sur la poursuite du traitement anti-angiogénique. D'autres pathologies associées aux traitements ont été diagnostiquées telles que des insuffisances rénales aiguës, des glomérulopathies prolifératives et des néphrites interstitielles. Des atteintes cutanées ont été observées et de nombreux effets toxidermiques ont été diagnostiqués essentiellement pour le sunitinib et le sorafenib. Parmi les effets les plus fréquents des traitements anti-angiogéniques ont été décrits le syndrome main-pied, caractérisé par des brûlures ou des douleurs symétriques et souvent inflammatoires et érythémateuses en périphérie. D'autres pathologies ont été diagnostiquées, notamment des hémorragies sous-unguéales, ainsi que des décolorations ou dépigmentations capillaires. De plus, sous sorafenib, des éruptions maculo-papuleuses ont été décrites ainsi que des éruptions érythémateuses faciales et du cuir chevelu.

2) Pathologie de l'ischémie aigüe des membres inférieurs

a. Généralités

L'ischémie est définie comme étant la diminution ou l'arrêt de la circulation artérielle dans une région plus ou moins grande d'un tissu, d'un organe ou d'un membre. L'ischémie aigüe se caractérise par un arrêt brutal de la circulation sanguine par l'obstruction d'un tronc artériel principal ; ceci entraîne une privation en nutriments et en oxygène des tissus sous-jacents pouvant conduire à une nécrose du tissu et compromettre l'intégrité du membre ou sa fonction sans administration d'un traitement adéquat. Elle peut avoir différentes causes dont la rupture d'une plaque athéromateuse, une thrombose aigüe suite à une maladie artérioscléreuse préexistante, une embolie ayant pris naissance à partir du cœur, de l'aorte ou d'autres vaisseaux de gros diamètre ou bien un anévrisme disséquant. A l'inverse, l'ischémie est dite chronique si l'obstruction survient de manière progressive et insidieuse jusqu'à apparition des symptômes semblables à ceux d'une ischémie aigüe. Elle est causée principalement par un développement graduel d'une plaque athéromateuse.

L'accident vasculaire cérébral (AVC) et l'ischémie aigüe des membres inférieurs (IAMI) sont deux pathologies fréquentes et graves, représentant des problèmes de santé publique majeurs. Malgré les progrès qui ont été réalisés dans la prévention des facteurs de risque (hypertension artérielle, diabète, tabac, alcool, obésité, sédentarité, ...) et la prise en charge des complications dues à la thrombose, ces pathologies restent au premier plan de la mortalité et de la morbidité dans les pays développés. Ainsi, les traitements d'urgence ont pour finalité de limiter l'extension de la nécrose des tissus lésés afin de préserver les fonctions associées à ces tissus. Le défi de la recherche biomédicale actuelle est donc de proposer aux patients un traitement qui permette un rétablissement des fonctions altérées tout en favorisant une réparation tissulaire optimale.

L'IAMI (Ischémie Aigüe des Membres Inférieurs) se définit par une réduction ou un arrêt du flux artériel entraînant une privation en oxygène des tissus sous-jacents et pouvant aboutir à une nécrose tissulaire. Le diagnostic clinique et le traitement doivent être effectués le plus rapidement possible. Le pronostic dépend essentiellement de la collatéralité vasculaire préexistante, du temps d'ischémie et de la masse musculaire ischémiée. Les sites les plus atteints par ordre de décroissance sont la bifurcation fémorale, les artères fémorales et les artères iliaques. La tolérance des différents tissus à l'ischémie est variable. Ainsi, des lésions nerveuses peuvent apparaître dès la deuxième heure post-ischémie (81), tandis que le muscle squelettique

a une tolérance à l'ischémie d'environ 6 heures (82,83) et la peau a une viabilité de 24 à 48 heures. Les principaux facteurs pouvant influencer sur les lésions ischémiques sont la durée de l'ischémie et la température du membre, l'hypothermie ralentissant le métabolisme tissulaire (82). La reperfusion d'un membre inférieur ayant subi une ischémie doit avoir lieu dans les 4 à 6 heures, en l'absence de circulation sanguine collatérale préexistante, pour espérer sauver le membre. Cette durée correspond à la tolérance relative du muscle strié à l'ischémie qui semble liée à deux phénomènes : sa faible demande d'énergie au repos et ses importantes réserves métaboliques. Passé ce délai, la souffrance cellulaire provoque une lyse des cellules musculaires qui s'explique par la disparition des stocks d'ATP provoquant une inhibition des pompes Ca^{2+} -ATPase et Na^+/K^+ -ATPase et une augmentation de la concentration K^+ extracellulaire et $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ intracellulaire (84). Le sodium est à l'origine d'un appel osmotique intracellulaire, le calcium participe à la phosphorylation et à la protéolyse des protéines qui entraînent notamment une désorganisation du cytosquelette. Du calcium intracellulaire est également capté par les mitochondries, ce qui provoque l'augmentation de la perméabilité membranaire mitochondriale, avec l'ouverture des pores de transition et une libération de facteurs pro-apoptotiques (85). La lyse des cellules musculaires peut donc induire de nombreux troubles métaboliques qui ont des effets délétères tant au niveau cardiaque qu'au niveau cérébral et rénal. L'ischémie puis la reperfusion altèrent la membrane des capillaires, provoquant la formation d'un œdème tissulaire qui peut aboutir à un syndrome des loges aggravant l'ischémie tissulaire (84). Si l'œdème est trop important, les muscles vont être comprimés et l'ischémie persistera par un effet de garrot. De plus, l'accumulation dans les vaisseaux de globules rouges, la formation de thrombus plaquettaire, le gonflement des cellules endothéliales vasculaires et l'augmentation de la pression du tissu liée à l'œdème conduisent à une augmentation des résistances vasculaires dues à une non-réouverture des capillaires de la zone en ischémie (86).

b. Mécanismes de revascularisation post-ischémique

i. Facteurs de croissance angiogéniques

Le VEGF-A, souvent simplement désigné VEGF, est le membre de la famille VEGF le plus impliqué dans la régénération vasculaire. L'injection intra-artérielle de VEGF-A dans un modèle d'ischémie du membre inférieur chez le lapin augmente à la fois la quantité d'artérioles et de capillaires, montrant ainsi l'effet du VEGF sur la collatéralisation et l'angiogenèse (87,88). Il a également été montré que PlGF ou VEGF-B favorise la revascularisation post-ischémique

en agissant via VEGFR-1. Les souris invalidées pour le PlGF (*Pgf^{-/-}*) ont un développement normal mais présentent un défaut d'angiogenèse et de collatéralisation dans des contextes pathologiques comme l'ischémie. La transplantation de moelle osseuse normale dans ces souris *Pgf^{-/-}* est suffisante pour restaurer leurs capacités de revascularisation post-ischémique. Il semble donc que PlGF joue un rôle dans la mobilisation des cellules médullaires essentielles pour la croissance vasculaire (89). De plus, PlGF, via VEGFR-1, amplifie l'effet pro-angiogénique de VEGF-A en induisant la phosphorylation de VEGFR-2 et donc sa signalisation cellulaire (90). L'interaction VEGF-B/VEGFR-1 active également la revascularisation post-ischémique. En effet, l'administration intramusculaire de plasmides contenant du VEGF-B dans des souris ayant une ischémie du membre inférieur améliore la reperfusion de la patte ischémisée, et cet effet est aboli lors de l'injection simultanée d'un anticorps anti-VEGFR-1 (91). Cependant le mode d'action du VEGF-B reste mal défini. En effet, certaines études montrent que le VEGF-B a un effet direct sur l'angiogenèse en stimulant la croissance et la migration des cellules endothéliales, alors que d'autres études montrent qu'il participe essentiellement à la survie des cellules du vaisseau néoformé (92,93). Si les effets pro-angiogéniques du VEGF-A sont bien déterminés chez l'animal, les essais cliniques de phase II/III lancés chez l'homme afin de traiter diverses pathologies ischémiques, telles que l'artériopathie des membres inférieurs, la maladie artérielle périphérique ou la maladie de Buerger, à l'aide du VEGF-A sont décevants. En effet, aucun résultat positif n'a été obtenu suite à l'injection en intramusculaire d'adénovirus ou de plasmides contenant VEGF121 (essai RAVE) ou VEGF165 (essai GRONINGEN). Seule une étude en phase II, l'étude VEGF PVD, a montré un effet positif de l'injection d'une forte dose de VEGF165 à l'aide d'un adénovirus sur une petite cohorte de patients atteints de maladie vasculaire périphérique.

In vivo, la surexpression par thérapie génique de FGF-b dans un modèle murin d'ischémie critique périphérique améliore la revascularisation post-ischémique. Toutefois, l'action du FGF-b semble indirectement et partiellement dépendre du VEGF. En effet, l'utilisation d'anticorps anti-VEGF abolit son effet (94). De plus, les cellules endothéliales invalidées pour la voie de signalisation du FGF ne répondent plus au VEGF et présentent une diminution de l'expression de VEGFR-2. Le FGF stimule donc l'effet du VEGF en activant, via la voie Erk 1/2, l'expression de VEGFR-2 (95).

Une étude montre également qu'un co-traitement VEGF-A/PDGF-BB chez le lapin permet de potentialiser la perfusion du membre ischémique puisque, en plus de l'effet pro-angiogénique du VEGF-A, le PDGF-BB promeut la collatéralisation (96). Le PDGF-BB semble

également agir en synergie avec FGF-b puisque leur co-injection dans un modèle de rat ou de lapin ayant une ischémie du membre inférieur favorise la stabilisation sur le long terme du réseau vasculaire néoformé et le FGF-b stimule l'expression des récepteurs du PDGF-BB (PDGFR-a et -b) (97).

ii. Migration des progéniteurs endothéliaux circulants jusqu'aux tissus ischémiques

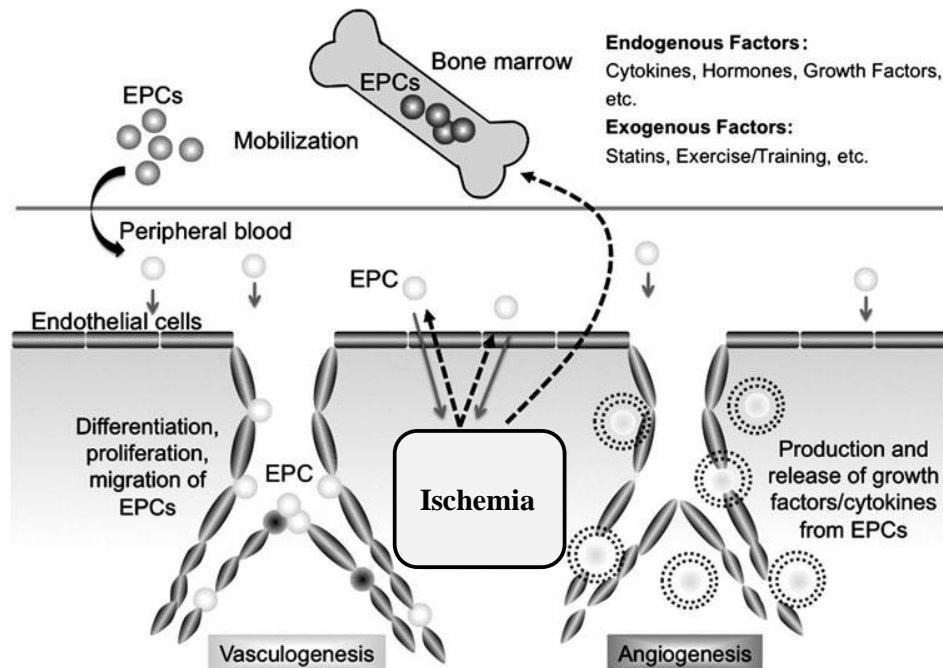
Les mécanismes impliqués dans la transmigration endothéliale des PECs au niveau des sites ischémiques sont peu connus. Ils dépendent des interactions entre les PECs et les cellules rencontrées lors de leur déplacement jusqu'au site, et des interactions entre les PECs et la matrice extracellulaire. Des travaux ont montré qu'*in vitro* l'intégrine beta 2 joue un rôle dans la transmigration des PECs (98). Il a été montré que la cathepsine L, une protéase hautement exprimée par les PECs, participe à la dégradation de la matrice extracellulaire et favorise la migration des cellules. Ainsi, les souris déficientes pour ce gène ont une diminution de la récupération fonctionnelle après une ischémie de la patte en comparaison aux souris sauvages (99). De plus, l'incorporation des PECs au site d'ischémie est perdue si les cellules sont déficientes en cathepsine L alors qu'elle est amplifiée si les PECs surexpriment cette protéine (99). Par ailleurs, les protéines MMP-2 et -9 sont cruciales pour l'invasion des PECs. En effet, une déficience de ces protéines entraîne une réduction de la dégradation de la matrice extracellulaire qui se traduit *in vivo* par un défaut de revascularisation suite à une ischémie des membres inférieurs chez la souris (100,101). Notre laboratoire a montré que l'activité protéolytique des PECs, qui leur confère un pouvoir migratoire, est liée à l'activation du système uPA/uPAR sur le site d'ischémie. L'expression de ces deux protéines est augmentée en présence de VEGF, qui traduit une activité pro-angiogénique et pro-vasculogénique des tissus ischémiques mais aussi en présence de TNF- α qui est le signe d'une inflammation. La formation d'uPA entraîne l'activation de la plasmine à partir de son précurseur le plasminogène et déclenche ainsi une cascade protéolytique qui fait intervenir les MMP-2 et -9 (102). Enfin, notre équipe a montré un rôle central de CD146 soluble et membranaire dans les mécanismes de revascularisation du tissu ischémique via une synthèse d'eNOS, de VEGFR-2 et d'uPA par les PECs, favorisant leur adhésion, leur migration ainsi que leur intégration dans le réseau préexistant (103,104).

Au niveau du site d'ischémie, il semble y avoir une différenciation des PECs en cellules endothéliales matures et fonctionnelles. En effet, les interactions cellulaires ainsi que la

libération de cytokines et les forces mécaniques qui s'exercent *in situ* conduisent les PECs à acquérir un phénotype mature. Il a été montré que la mise en culture de PECs issus de sang périphérique humain adulte sur une matrice de fibronectine induit, en présence de VEGF, l'expression de marqueurs phénotypiques qui sont caractéristiques des cellules endothéliales tels que eNOS, VEGFR-2 et PECAM (12).

Indépendamment de leur incorporation dans le tissu ischémique et de leur différenciation en cellules endothéliales, les PECs peuvent avoir une action paracrine. En effet, ils peuvent stimuler la revascularisation du tissu ischémique par une sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance qui provoquent une prolifération, une migration des cellules endothéliales matures locales ainsi que la formation de tubules vasculaires. Des travaux ont montré la capacité des PECs à sécréter des facteurs pro-angiogéniques tels que le HGF, le VEGF, eNOS, SDF-1 et IGF-1 (105,106). Des marquages immunohistochimiques ont montré que l'administration de PECs humains dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs chez le rat sécrétant du VEGF favorise la migration *in situ* des cellules endothéliales matures (99). Enfin, des travaux montrent la capacité des PECs à sécréter des facteurs de régulation de l'inflammation tels que le MCP-1 et l'IL-8 (103) et de l'hémostase tels que le facteur tissulaire et le PAI-1. De plus, des milieux de culture de PECs ayant subi une hypoxie protègent *in vitro* les cellules endothéliales de l'apoptose tout en leur conférant de meilleures propriétés angiogéniques (107). *In vivo*, l'administration de ce milieu de culture a produit un effet bénéfique similaire à l'injection des cellules, en améliorant la reperfusion et la motricité du membre ischémique et en stimulant le recrutement des PECs endogènes sur le site (107) (Figure 14).

Figure 14 : Rôle des PECs dans le processus de revascularisation ischémique



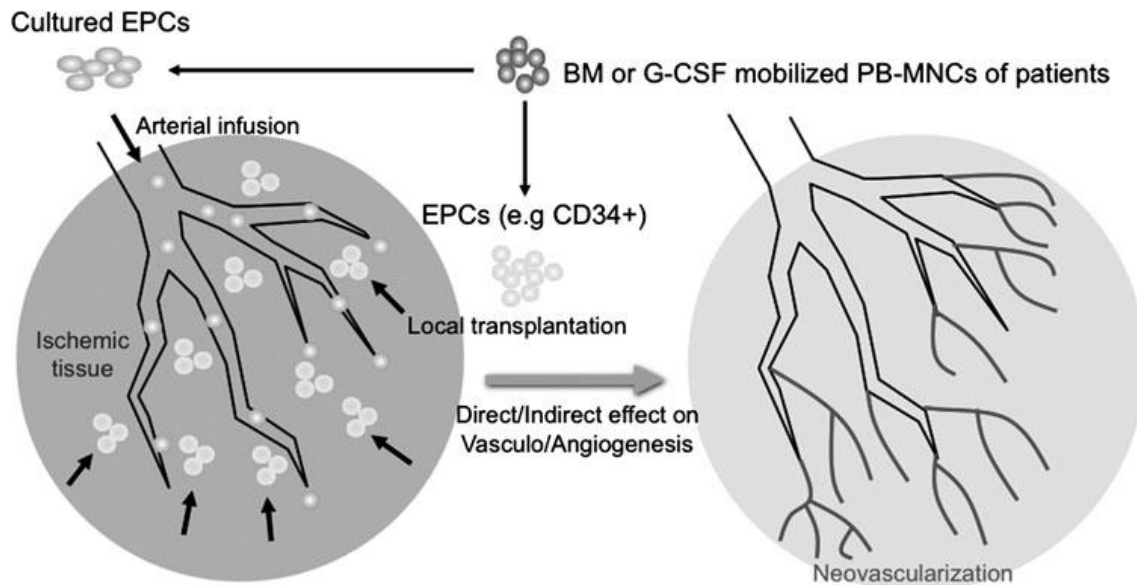
(D'après Alev et al., *Antioxid Redox Signal.*, 2011)

iii. Utilisation des progéniteurs endothéliaux circulants en thérapie cellulaire

Depuis une décennie, les termes de thérapie cellulaire et de médecine régénérative se sont répandus et suggèrent qu'un apport de cellules vivantes au sein d'un organisme peut participer à une amélioration de la fonction d'un tissu ou d'un organe altéré. La thérapie cellulaire recouvre l'ensemble des technologies s'appuyant sur un remplacement ou une régénération de cellules ou de tissus malades par une administration de cellules fonctionnelles et saines qui auront été sélectionnées, amplifiées et éventuellement modifiées *ex vivo* en utilisant des cellules souches ou progénitrices adultes. Ces cellules sont définies par deux critères : un auto-renouveau assurant un maintien à long terme de cette sous-population et une capacité à générer une descendance différenciée et fonctionnelle dans une voie déterminée. La découverte chez l'adulte de multiples populations cellulaires susceptibles de participer aux mécanismes de néo-vascularisation a permis le développement de la thérapie cellulaire avec une visée pro-angiogénique dans l'AVC et l'IAMI. Dans ce cadre pathologique, plusieurs variétés de populations cellulaires ont été utilisées lors d'études précliniques et cliniques : les cellules médullaires, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules mononuclées sanguines, les cellules CD34+ sélectionnées à partir du sang de cordon ombilical ou de sang périphérique

(PECs). Ces cellules ont été injectées dans la circulation sanguine ou localement dans le but de favoriser la revascularisation du tissu ischémié (Figure 15).

Figure 15 : Utilisation thérapeutique de PECs dans les pathologies ischémiées



(D'après Alev et al., *Antioxid Redox Signal.*, 2011)

Des études précliniques ont mis en évidence la capacité des PECs greffées à migrer jusqu'au site ischémié ainsi que leurs propriétés pro-angiogéniques *in vivo*. Bien qu'ayant des propriétés différentes, les CFU-ECs et les ECFCs ont des rôles complémentaires dans les mécanismes de protection et de restauration des tissus lésés lors d'un accident ischémié. Leurs effets ont été évalués sur différents modèles animaux d'AVC et d'IAMI.

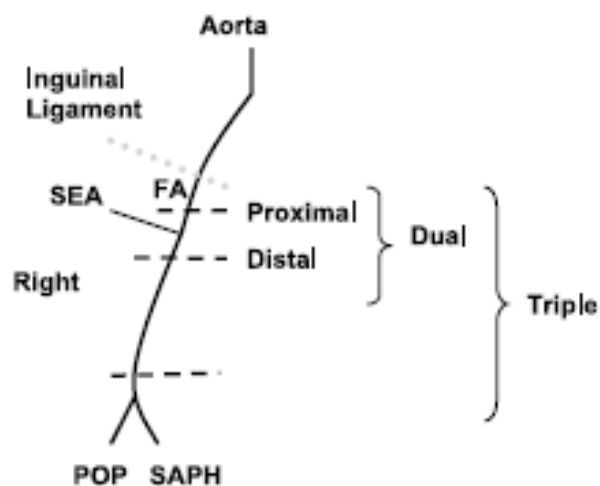
✓ **Modèles animaux d'IAMI :** Des modèles animaux ont été développés afin d'étudier l'ischémie-reperfusion des membres inférieurs. Ils diffèrent selon que la technique entraîne une hypoxie partielle et chronique, telle qu'elle peut survenir chez les patients âgés, ou une hypoxie profonde, s'apparentant à une ischémié critique ou aigüe.

Un premier modèle murin d'ischémie aigüe des membres inférieurs a été développé en provoquant une compression externe sur le membre inférieur (108). Sous anesthésie générale et sous contrôle d'une température maintenue entre 37 et 42°C, la méthode consiste à appliquer une pression circulaire de 200 mmHg pendant un délai de 1 à 6 heures puis d'observer, au retrait de la compression, une reperfusion sous 24 à 48 heures (109). Cette technique a permis une observation assez fine des conséquences cliniques et histologiques d'une ischémié aigüe sévère, suivie d'une reperfusion sans intervention chirurgicale (110). Elle a servi à étudier les effets des

héparines, qui sont utilisées en clinique lors d'une ischémie aiguë. Par contre, la relevance à l'homme est limitée puisque seules les compressions externes sont mimées dans ce modèle.

Le modèle d'ischémie des membres inférieurs le plus courant consiste à générer une ischémie unilatérale par ligature ou section chirurgicale de l'artère fémorale en utilisant le membre controlatéral comme contrôle (111). La ligature de l'artère fémorale peut se faire au niveau proximal en amont de l'artère épigastrique superficielle et au niveau distal en amont de la bifurcation des artères poplitée et saphène ou après l'artère épigastrique superficielle (112) (Figure 16).

Figure 16 : Schéma des principales ligatures de l'artère fémorale dans les modèles d'ischémie des membres inférieurs



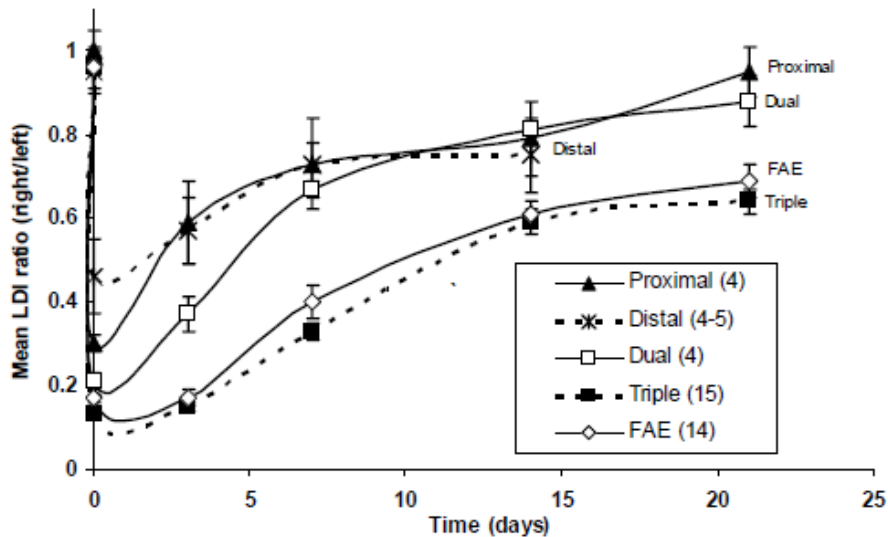
FA : artère fémorale, SEA : artère épigastrique superficielle, POP : artère poplitée, SAPH : artère saphène.

(D'après Shireman et al., Journal of Surgical Research, 2005)

Une mesure du niveau de perfusion des membres inférieurs est ensuite réalisée en imagerie par laser doppler afin d'évaluer la profondeur et la durée de l'ischémie. Seul le protocole de triple section et d'excision totale du segment artériel produit une ischémie profonde (un taux de perfusion de 20% au niveau du membre ischémique en comparaison au membre controlatéral à J1) mais aussi durable (taux de perfusion de 60% à J14 pour le membre ischémique). Le protocole de double section distale et proximale permet l'apparition d'une ischémie profonde mais elle n'empêche pas une reperfusion physiologique du muscle à J14 à un niveau semblable à celui observé par un protocole de simple section proximale (taux de perfusion de 80% au niveau du membre ischémique) (Figure 17). La reperfusion physiologique est liée à la compensation qui est exercée par le réseau vasculaire collatéral dont la contribution varie en

fonction du protocole choisi. Afin de simuler une ischémie chronique, il est possible d'effectuer une ligature distale de l'artère fémorale tout en laissant intactes les branches latérales (113).

Figure 17 : Reperfusion au cours du temps du membre ischémique selon les différents protocoles



(D'après Shireman et al., *Journal of Surgical Research*, 2005)

Un modèle d'ischémie aiguë sévère suivie d'une reperfusion a également été mis au point. Il consiste à créer une occlusion transitoire de l'aorte abdominale sous-rénale (109). Ce modèle d'ischémie-reperfusion aiguë sévère a contribué à l'élucidation des conséquences d'une occlusion aiguë de l'aorte abdominale distale qui peut survenir suite à une embolie cardiaque ou à une thrombose athéromateuse survenant dans un segment déjà rétréci.

Tous ces modèles ont contribué à l'étude des mécanismes de l'angiogenèse (114) et de l'artériogenèse (115) post-ischémiques, permettant de mettre à jour des cibles thérapeutiques potentielles.

✓ **Utilisation des PECs en thérapie cellulaire de l'IAMI** : En 1978, des chercheurs ont commencé à utiliser des cellules endothéliales autologues dans le traitement prothétique des lésions vasculaires périphériques. Ils ont implanté des prothèses en polyéthylène téréphtalate recouvertes de cellules endothéliales dans un modèle *in vivo* de chien. Quatre semaines après l'implantation ils ont pu observer que ces prothèses ont permis de maintenir la circulation sanguine dans le territoire ischémique en comparaison à des prothèses non-enduites de cellules (116). Cette étude a permis d'envisager le fait de favoriser la revascularisation post-ischémique grâce à des cellules endothéliales et à un support mécanique.

Depuis ces travaux, d'autres modèles animaux d'IAMI ont permis de montrer que les cellules endothéliales capables de proliférer, de migrer et de se différencier peuvent participer à la reconstruction vasculaire sans l'aide de support mécanique. Ainsi, une première étude a montré l'intérêt d'une injection intraveineuse de CFU-ECs issues de sang périphérique humain dans un modèle d'IAMI chez la souris nude et les auteurs ont conclu que ces cellules avaient, à elles seules, un pouvoir pro-angiogénique bénéfique en thérapeutique (19). Dans cette étude, la reperfusion sanguine du membre ischémique mesurée par écho-doppler est supérieure chez les souris recevant les CFU-ECs et est associée à une augmentation de la densité capillaire dans le muscle ischémié ainsi qu'à une diminution du taux d'amputation du membre, suggérant que les cellules ont permis la sauvegarde du membre en stimulant la revascularisation post-ischémique (19). Une autre étude portant sur un modèle d'IAMI chez le rat a montré la faisabilité et l'efficacité au niveau de la revascularisation et de la reperfusion du membre ischémié suite à la transplantation d'ECFCs issues de sang de cordon ombilical humain (117). Les auteurs ont montré, *in vitro*, qu'au bout de 3 jours les cellules sont capables de créer des contacts avec des cellules endothéliales matures et de former un réseau pseudo-vasculaire dans une matrice extracellulaire. Ils ont également montré, *in vivo*, que 2 semaines après leur injection dans le muscle ischémique, les ECFCs peuvent survivre et participer à la formation d'un réseau vasculaire les incluant (117). Bien qu'ayant des propriétés fonctionnelles et phénotypiques différentes *in vitro*, une injection *in vivo*, dans un modèle d'IAMI, de CFU-ECs ou d'ECFCs issues d'un même donneur ne montre pas de différence dans l'amélioration de la perfusion et de la revascularisation du muscle (118). Cependant, les CFU-ECs possèdent un effet positif autocrine sur la sécrétion de cytokines ainsi qu'un effet paracrine sur la stimulation des ECFCs. Un effet synergique est observé lors d'une transplantation conjointe de CFU-ECs et d'ECFCs dans un modèle expérimental d'IAMI. L'injection intramusculaire de ces cellules augmente la densité capillaire du muscle et diminue l'auto-amputation des animaux en comparaison avec des groupes recevant une injection unique d'ECFCs ou de CFU-ECs (22). Les deux types cellulaires ECFCs et CFU-ECs possèdent donc des propriétés bénéfiques complémentaires et synergiques. Mais les ECFCs sont disponibles en grand nombre dans le sang de cordon ombilical et sont caractérisées par une plus grande homogénéité phénotypique qui pourrait permettre une standardisation des protocoles. Une limite générale mise en évidence par les études précliniques de thérapie cellulaire est le très faible pourcentage de cellules survivantes à l'injection dans l'animal (119).

Néanmoins, l'incorporation des cellules injectées (ECFCs/CFU-ECs, ...) dans la néovascularisation demeure sujette à controverse. Des travaux expérimentaux montrent que les

cellules mobilisées dans le sang périphérique à partir de la moelle osseuse ne s'incorporent pas dans les nouveaux capillaires mais ont un rôle de soutien. Après transplantation, les cellules s'accumuleraient autour des vaisseaux collatéraux pour se différencier en fibroblastes, péricytes et leucocytes (120).

3) Athérosclérose

a. Généralités

En 1954, l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé) a défini l'athérosclérose comme étant « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la média ».

L'athérosclérose est l'une des principales causes de mortalité dans le monde et elle est à l'origine de la plupart des maladies cardiovasculaires. Selon le rapport des maladies mondiales non transmissibles établi en 2014 par l'OMS, les maladies cardiovasculaires ont représenté 17,5 millions de décès dans le monde en 2012, avec en premier lieu l'infarctus du myocarde (7.4 millions) suivi des accidents vasculaires cérébraux (6.7 millions). Ainsi, la prévention de l'athérosclérose représente l'un des enjeux majeurs de la santé publique. Il existe quatre facteurs de risque cardiovasculaire qui sont l'hypertension artérielle, la dyslipidémie, le diabète et le tabagisme. Ces facteurs de risque représentent des paramètres modifiables et constituent alors la principale prévention face à l'athérosclérose. A ces derniers s'ajoutent des facteurs de risque constitutionnels ou non modifiables tels que l'hérédité, le sexe et les facteurs environnementaux (la sédentarité, les facteurs psychosociaux).

b. Structure de la plaque d'athérome

L'athérosclérose correspond à un épaississement sous-endothélial de l'intima d'un vaisseau sanguin (plaque d'athérome), diminuant la lumière artérielle et entraînant une diminution de l'apport en oxygène et en nutriments des tissus en aval. Cette plaque d'athérome est formée par une infiltration de cellules immunitaires, de cellules musculaires lisses et de lipides. La formation de ces plaques d'athérome a lieu dans des zones privilégiées de l'artère où on retrouve une variation de la vitesse du flux sanguin et des forces de cisaillement telles que les bifurcations, les branchements et les segments courbes (121).

La physiopathologie de l'athérosclérose implique une première étape, les stries lipidiques, qui correspond à une accumulation de lipides et de cellules spumeuses. Les cellules spumeuses sont des macrophages et des cellules musculaires lisses qui ont internalisé au niveau de l'endothélium du cholestérol lié à la LDL (Low Density Protein) 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 (122). La modification des forces de cisaillement exercées sur l'endothélium va activer celui-ci par l'intermédiaire de nombreux mécano-senseurs (cytosquelette, glycocalix, 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 entraîner une infiltration et une rétention de lipides, principalement du cholestérol lié au LDL. Le changement des forces mécaniques va également permettre l'expression de chimiokines, dont MCP-1/CCL2 et RANTES/CCL5, qui vont former un gradient de chimio-attraction et attirer les cellules circulantes par interaction avec les RCPG (Récepteurs à sept domaines transmembranaires Couplés aux Protéines G) spécifiques des chimiokines qui sont exprimés à la surface des leucocytes (121). Le recrutement leucocytaire nécessite plusieurs étapes. Il y a tout d'abord un arrêt par roulement sur l'endothélium, puis un étalement et enfin une diapédèse. Les monocytes vont transmigrer à travers l'endothélium grâce à un gradient de chimio-attraction (MCP-1/CCL2, RANTES/CCL5 et Fractalkine/CX3CL1) formé par les cellules endothéliales, les macrophages et les 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 cholestérol LDL par l'intermédiaire de nombreux récepteurs, principalement les récepteurs CD3 et SR-A1 (Scavenger Receptor-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 (123,124). 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

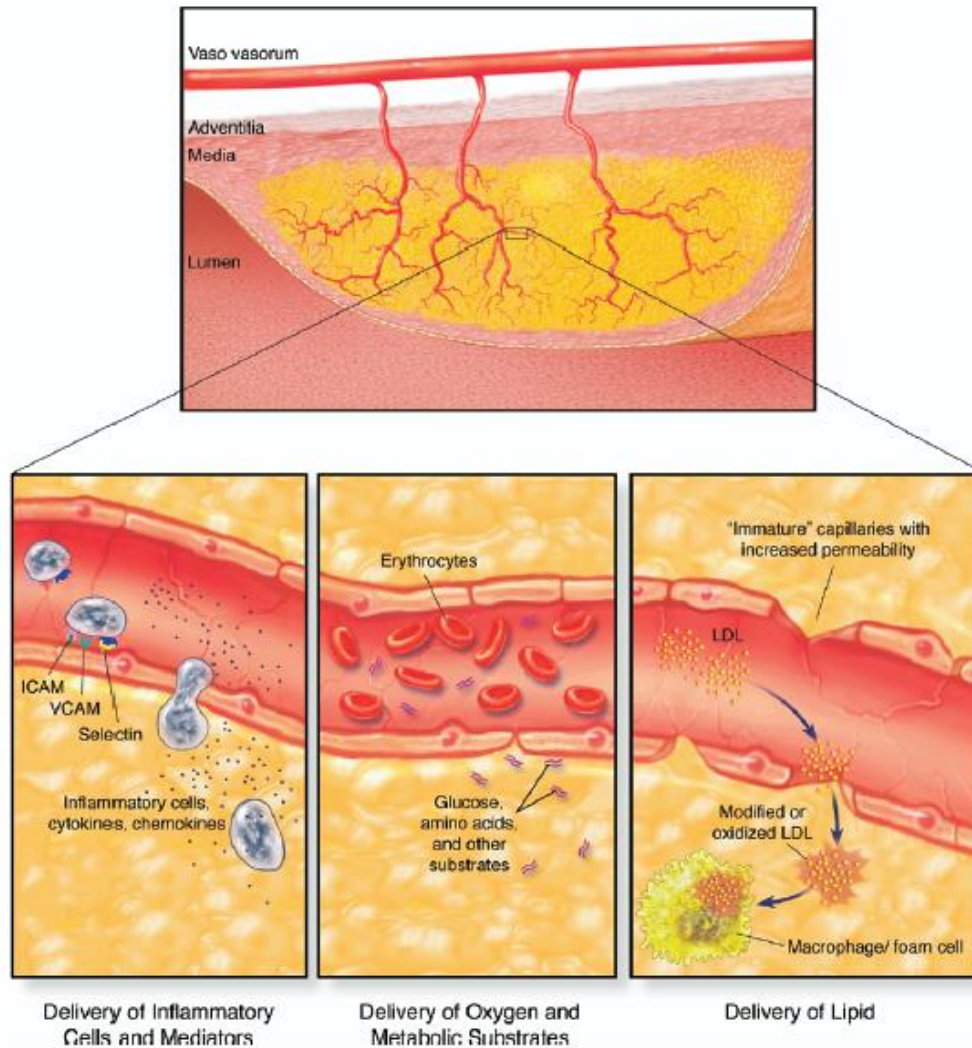
tels que le TNF- α par les lymphocytes cytotoxiques CD8+ infiltrant la plaque d'athérome. La dégradation de la matrice extracellulaire libère certains facteurs pro-apoptotiques qui vont induire l'apoptose des cellules musculaires lisses. La mort des macrophages joue un rôle important dans le développement de la plaque d'athérome. En effet, dans les stades précoces de l'athérosclérose, la mort des macrophages sera bénéfique puisqu'elle ralentira 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 (123–125). 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 (122–125).

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 media, 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 μm et la densité de vaisseaux entre 20 et 20000 μm^2 . 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 (125,126). Le risque de rupture de la plaque d'athérome est associé à 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 (125,126) (Figure 18).

Figure 18 : L'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-cholestérol, cellules immunitaires et à des hémorragies ayant pour conséquence la croissance et la déstabilisation de la plaque (D'après Doyle and Caplice, J. Am. coll. Cardiol., 2007).

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 engendre 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 (126). L'hypoxie va activer la voie 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-b, 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) (126). L'inflammation va également jouer un rôle dans la régulation de l'angiogenèse au sein de la plaque d'athérome. Le TNF- α , IL-6 et l'IL-1 β vont augmenter l'expression du VEGF par l'intermédiaire des voies Nuclear Factor kappa B (NF κ B), STAT-3 et Erk-MAPK (126).

4) Sclérodémie

a. Généralités

La sclérodémie systémique (SSc) est une maladie auto-immune systémique, caractérisée par des altérations des micro-vaisseaux et une fibrose cutanée, pouvant toucher divers organes, dont le cœur, les poumons, et l'appareil digestif.

Différents types cellulaires sont impliqués dans la sclérodémie :

- ✓ les fibroblastes qui synthétisent de manière accrue les composants de la matrice extracellulaire, comme le collagène, la fibronectine, les protéoglycanes.
- ✓ les cellules endothéliales qui libèrent des agents vasoconstricteurs, comme l'endothéline-1 et secrètent en moindre quantité des molécules vasodilatatrices, telles que le monoxyde d'azote et les prostaglandines.
- ✓ Les lymphocytes T, les lymphocytes B et les monocytes qui vont infiltrer les lésions précoces de la SSc. Au niveau des lésions cutanées, sont retrouvés préférentiellement des lymphocytes T CD4 activés qui secrètent des cytokines de la voie Th2, et des lymphocytes B. Ces cellules vont contribuer au processus de fibrose par la sécrétion d'IL-6, de TGF- β , de ROS et d'auto-anticorps (127).

b. Manifestations cliniques

La SSc est une maladie rare ayant une prévalence estimée à 1/6500 adultes environ avec une prédominance féminine, comme de nombreuses autres maladies auto-immunes (quatre femmes pour un homme environ). La maladie se manifeste habituellement entre 40 et 50 ans (www.orpha.net).

Il existe plusieurs formes de SSc (www.orpha.net) :

✓ La **SSc cutanée limitée** dans laquelle les atteintes fibreuses sont limitées aux mains, aux bras et au visage. Le syndrome de Raynaud représente longtemps le seul symptôme clinique. Il atteint préférentiellement les mains, de manière symétrique, et se caractérise par la succession d'une pâleur, d'un bleuissement et d'un engourdissement des doigts, suivis d'une rougeur intense et douloureuse, déclenchée par le froid ou le stress. Ces manifestations sont dues à une vasoconstriction des vaisseaux et peuvent s'étendre à d'autres zones du corps, telles que les pieds, le nez, la langue ou les oreilles. 95% des patients atteints de SSc sont concernés par ce syndrome. Il apparaît avant la fibrose (qui est présente dans 30-40% des cas) et d'autres complications, telles que l'hypertension artérielle pulmonaire (10% des cas). La prévalence est estimée à 1/12 500 adultes environ.

✓ La **SSc cutanée diffuse** évolue beaucoup plus rapidement, les zones de fibrose sont plus étendues et touchent de nombreux organes. La prévalence est estimée à 1/25 000 adultes environ.

✓ Une troisième forme appelée **SSc limitée** a aussi été observée. Les patients n'ont pas de fibrose de la peau, ils ont uniquement un phénomène de Raynaud mais ils sont exposés au risque d'atteinte viscérale (fibrose et obstruction des vaisseaux sanguins au niveau des poumons, du cœur et du tube digestif). Ils peuvent par la suite avoir un trouble de la motilité œsophagienne provoquant un reflux gastro-œsophagien voire une dysphagie, et ils peuvent être atteints de fibrose pulmonaire et d'hypertension pulmonaire artérielle.

Plusieurs critères cliniques et biologiques sont utilisés pour la classification de la SSc :

- les critères établis par l'association américaine du rhumatisme (ARA) (128): le critère majeur est la sclérodermie proximale et les critères mineurs sont la sclérodactylie, les ulcérations pulpaire digitales ou la perte de substance, et la fibrose pulmonaire basale bilatérale. Le diagnostic de SSc est établi si le critère majeur est présent ou si 2 critères mineurs parmi les 3 cités sont observés.

- les critères de classification publiés par LeRoy (129) : la SSc cutanée diffuse est caractérisée par le début du syndrome de Raynaud dans l'année précédant les modifications cutanées ; une atteinte cutanée du tronc et des membres ; la présence de grincement des tendons ; le développement d'une pathologie interstitielle pulmonaire ; une insuffisance rénale oligurique ; une maladie gastro-intestinale diffuse et une atteinte myocardique ; l'absence d'anticorps anti-centromère ; la présence d'anticorps anti-topoisomérase 1 chez 30% des patients et la présence de dilatations et de destructions capillaires à la capillaroscopie. La SSc cutanée limitée est caractérisée par un syndrome de Raynaud depuis des années, parfois des décennies ; une atteinte cutanée limitée aux mains, au visage, aux pieds, et aux avant-bras ou absente ; une incidence accrue d'hypertension artérielle pulmonaire primitive, de survenue tardive, avec ou sans maladie pulmonaire interstitielle, névralgie trigéménée, calcification sous cutanée, télangiectasies ; une incidence élevée d'anticorps anti-centromère dans 70-80% des cas et des anses capillaires dilatées à la capillaroscopie.

La prise en charge est surtout symptomatique. Le syndrome de Raynaud peut être traité par des inhibiteurs des canaux calciques. Des inhibiteurs de la pompe à protons sont donnés en cas de reflux gastrique. Des corticostéroïdes à faible dose associés à des agents immunosuppresseurs sont nécessaires en cas d'atteinte cutanée récente et sévère ou en cas de fibrose pulmonaire progressive. Des vasodilatateurs pulmonaires sont donnés en cas d'hypertension artérielle pulmonaire. Un suivi clinique régulier des patients est nécessaire avec une exploration fonctionnelle pulmonaire et une échocardiographie.

c. Fibrose

La SSc est caractérisée par un dépôt excessif de collagène qui s'accumule dans la peau et les différents organes. On parle alors de fibrose, en référence à l'aspect fibreux et rigide que confère l'excès de collagène au niveau des organes touchés. La fibrose peut également épaissir la paroi de certains vaisseaux et finir par les obstruer entraînant une ischémie des organes internes (cœur, reins, tube digestif...). La composition des dépôts s'accumulant au niveau du derme varie selon le stade de la maladie. Différents types de collagène, protéoglycanes et fibres élastiques sont présents précocement, puis le collagène de type I s'accumule dans les phases tardives (www.orpha.net). Cette accumulation de collagène et d'autres constituants de la matrice extracellulaire est due à une production excessive par les fibroblastes. Ces derniers ont la capacité de se différencier en myofibroblastes qui sont des cellules d'origine

mésenchymateuse possédant les caractéristiques des fibroblastes et des cellules musculaires lisses. Les myofibroblastes sécrètent de nombreuses cytokines, telles que le TGF- β , des molécules chimio-attractives des leucocytes et des ROS. Le TGF- β est une cytokine pro-fibrosante, qui stimule la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes et induit l'expression de son récepteur et de celui du PDGF (127). Le PDGF intervient dans la prolifération et la différenciation des cellules musculaires lisses en myofibroblastes et est impliqué dans les troubles vasculaires occlusifs, tels que l'athérosclérose ou l'hypertension artérielle pulmonaire (130).

d. Lésions endothéliales

L'atteinte vasculaire est centrale dans la SSc avec comme cible initiale l'endothélium qui est un tissu métaboliquement actif dont les fonctions fondamentales résultent d'un équilibre entre la production de molécules vasoconstrictrices et vasodilatatrices, et de molécules d'adhésion. Les perturbations tendent vers un état endothélial propice au vasospasme, pro-adhésif et pro-coagulant. Le spasme artériel et artériolaire (atteinte fonctionnelle) puis la prolifération myo-intimale (atteinte structurale) conduisent à une occlusion artériolaire progressive, expliquant la survenue précoce du syndrome de Raynaud. L'angiogenèse et la vasculogenèse sont fortement désorganisées au cours de la SSc et ne permettent pas de combattre l'ischémie tissulaire chronique. Ce défaut de vasculogenèse/angiogenèse est responsable du développement d'atteintes viscérales mettant en jeu le pronostic vital (131). La cause de ces perturbations est inconnue mais des facteurs infectieux, immunologiques et l'ischémie-reperfusion sont suspectés (132). L'augmentation des taux plasmatiques de facteur de von Willebrand, d'endothéline-1 et la présence d'agrégats plaquettaires circulants témoignent des lésions endothéliales. Par ailleurs, les péricytes entourant les vaisseaux ont la propriété de se différencier en cellules musculaires lisses, fibroblastes et myofibroblastes. Les péricytes situés au niveau de la lésion vasculaire expriment fortement le PDGFR. La prolifération de ces cellules entraîne l'épaississement de la paroi vasculaire et la perte des cellules endothéliales par apoptose (127). Enfin, plusieurs études ont rapporté une augmentation des PECs dans le sang des patients sclérodermiques (133–135). L'endothélium exerce ses actions régulatrices par la synthèse de nombreux médiateurs dont l'endothéline. Elle possède des actions physiologiques mais également de nombreux effets délétères en situation pathologique avec des propriétés vasoconstrictrice, inflammatoire, pro-fibrosante et d'hypertrophie vasculaire (136). Il existe 3 endothélines (ET-1, ET-2, ET-3) qui sont des

neuropeptides composés de 21 acides aminés dont la production est activée en situation hypoxique, après exposition au froid, aux contraintes mécaniques modérées, par l'angiotensine 2 et par différentes cytokines. De nombreux travaux ont montré des taux circulants élevés d'ET-1 dans la SSc et il est capable de stimuler la production de matrice extracellulaire par les fibroblastes (137). A l'opposé, le monoxyde d'azote d'origine endothéliale, qui est vasodilatateur, antiagrégant et inhibiteur de la prolifération des cellules musculaires lisses, peut être déficitaire à l'état basal puis être produit en excès lors de la phase inflammatoire de la maladie et participer aux phénomènes de cytotoxicité (138). Au cours de la SSc il existe des anomalies de l'angiogenèse. En effet, les concentrations sériques d'endostatine, qui inhibe l'angiogenèse, sont élevées et associées à la présence d'ulcérations digitales (139). Des élévations de VEGF, facteur d'activation de l'angiogenèse, ont été rapportées (140). Elles contrastent avec l'existence chez les patients d'un déficit d'angiogenèse qui favorise les ulcérations cutanées chroniques et qui est mis en évidence par les plages désertes observées en capillaroscopie. Les cellules musculaires lisses participent au dérèglement du contrôle du tonus vasculaire et pourraient être impliquées dans l'hyperréactivité microvasculaire qui caractérise la SSc (141). Ces cellules musculaires lisses prolifèrent dans la paroi vasculaire ce qui contribue à augmenter leur épaisseur et à réduire le diamètre des vaisseaux (127).

Partie 2: Implication de CD146 en physiologie et en pathologie

I. Historique

La molécule CD146 a initialement été découverte dans des cellules de mélanome humain en 1987 par l'équipe du Pr Johnson (142). Son expression est corrélée à la croissance tumorale et la dissémination des tumeurs (143). Ces données ont été obtenues grâce à l'utilisation d'un anticorps appelé MUC18. Cet anticorps a été généré par immunisation de souris avec un lysat cellulaire de mélanome métastasant. Il a permis d'identifier cette molécule de 113kDa, qui sera appelée dans un premier temps MCAM (Melanoma Cell Adhesion Molecule) et MUC18.

L'équipe du Pr Dignat-George a montré, en 1991, que cette molécule était aussi exprimée sur l'ensemble de l'endothélium vasculaire. Ces données ont été obtenues grâce à un anticorps monoclonal de souris appelé Sendo-1 (endothelial associated antigen 1) (7). Cet anticorps a été généré suite à l'immunisation d'une souris avec un lysat cellulaire d'HUVECs (cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine). Il a permis d'identifier cette molécule comme étant un marqueur des cellules endothéliales. Depuis, l'anticorps Sendo-1 est utilisé afin de marquer l'endothélium humain et ce, indépendamment de la taille du vaisseau et de sa situation anatomique au sein de l'arbre vasculaire (144,145).

Cette molécule a également deux homologues aviaires : la gicérine et HEMCAM. La gicérine est exprimée au cours du développement du système nerveux central. Elle a été décrite comme le ligand de NOF (Neurite Outgrowth Factor), une protéine de la matrice extracellulaire appartenant à la famille des laminines (146). HEMCAM est exprimée par les progéniteurs hématopoïétiques de la moelle osseuse embryonnaire (147).

En 1997, la molécule prend la dénomination officielle de CD146 (Cluster of Differentiation 146) suite à un rapport (*S-ENDO / MUC 18 pre-CD, Workshop Report*). Sous cette nouvelle dénomination est regroupé Sendo-1/MUC18/MCAM/gicérine/HEMCAM. Les anticorps disponibles ont été testés par les techniques d'ELISA, d'immunohistochimie et de

cytométrie en flux sur des lignées cellulaires de mélanome et de leucémie, sur des cellules endothéliales et sur des cellules de carcinome de colon.

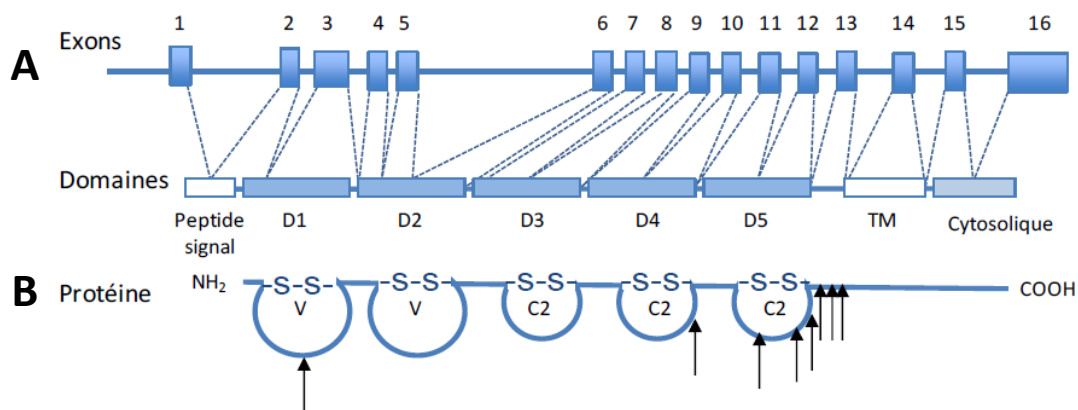
II. Description et structure

1) Description génomique

Chez l'homme, le gène MCAM est localisé au niveau du bras long du chromosome 11 (11q23.3) (148). En revanche, chez la souris, il est localisé sur le chromosome 9.

Le gène codant pour la protéine CD146 est constitué de 13759 paires de bases et de 16 exons. CD146 est composé de cinq domaines de type immunoglobuline, deux domaines variables et trois domaines constants de type C2, ainsi qu'un domaine transmembranaire et une partie intra-cytoplasmique (149) (Figure 19).

Figure 19 : Représentation schématique du gène codant pour CD146 et de la protéine résultante



A/ Structure du gène codant pour CD146 : organisation des introns, exons et domaines correspondants. D1 à D5 : domaines Ig-like ; TM : domaine transmembranaire.

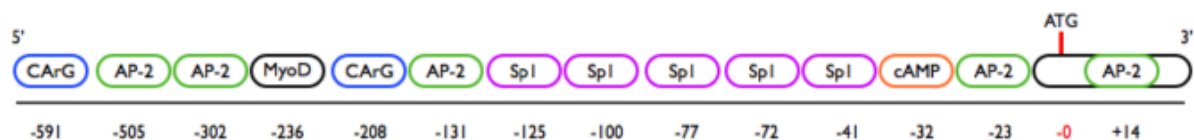
B/ Structure de la protéine CD146. V : régions variables ; C2 : régions constantes des domaines Ig-like.

Les flèches symbolisent les sites putatifs de N-glycoylation (Adapté de Sers et al., PNAS, 1993).

La région promotrice présente des motifs de reconnaissance à AP-2, Sp1, CArG, AMPc, CRE, MyoD. Le promoteur minimal de CD146 est formé par quatre sites Sp1, deux domaines AP-2 et un élément de réponse à l'AMPc (150). Des sites jouent un rôle important pour

l'expression de CD146. En effet, le site CRE inhibe la transcription du gène CD146 de 70% quand celui-ci est muté, les sites AP-2 qui sont situés à -131 et -302 par rapport à l'ATG initial inhibent l'expression de CD146 de 70% et 44% respectivement lorsqu'ils sont mutés. Il a aussi été montré que l'AP-2 (151) et les sites CREBs (152) modulent l'expression de CD146 dans les cellules de mélanome et qu'ils augmentent la tumorigénicité et le pouvoir métastatique. Il a été démontré que le site de fixation à AP-2 situé dans la région promotrice (situé à -23 paires de bases) constitue un inhibiteur de la transcription de CD146 tandis que les autres sites AP-2 (situés à -131, -302 et -505 paires de bases) sont des activateurs de la transcription (151) (Figure 20).

Figure 20 : Organisation de la région promotrice de CD146



Le promoteur de CD146 est constitué de quatre domaines AP-2, un domaine AMPc, cinq domaines Sp1, deux domaines CARG, un domaine MyoD (D'après Mintz-Weber, Journal of Biological Chemistry, 2000).

L'ARNm compte 3332 nucléotides (référence de la séquence : NM_006500.2) (www.ncbi.nlm.nih.gov). Il a été identifié sur des cellules de mélanome humain (153). Sa région codante se compose de 1940 paires de bases. Il y a une grande homologie de séquence pour cette protéine entre l'homme et la souris mais on peut noter des différences. En effet, la séquence protéique présente 76% d'identité entre ces deux espèces. Les régions codantes, 5'UTR et 3'UTR ont une homologie respective de 80.6%, 72.4% et 31%. Chez l'homme, il y a un allongement des régions 5' et 3' UTR ainsi que 6 paires de bases en moins dans l'exon 2.

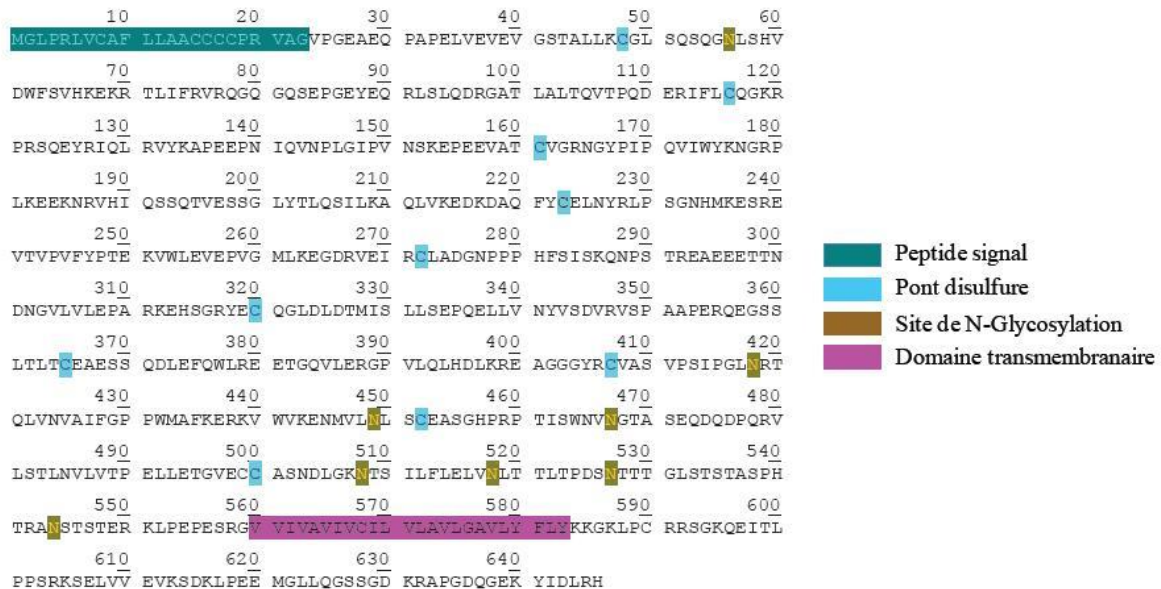
2) Description protéique

a. Généralités

CD146 est une glycoprotéine transmembranaire de 646 AA (acides aminés) (référence de la séquence : NP_006491.2) (www.ncbi.nlm.nih.gov) appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Cette protéine est constituée d'un peptide signal (AA 1 à 23), d'un domaine extracellulaire (AA 24 à 559), un domaine transmembranaire hydrophobe (AA 560 à 583) et d'un court domaine intra-cytoplasmique (AA 584 à 646). Le domaine extracellulaire est

constitué de cinq boucles immunoglobuline-like de type V-V-C2-C2-C2 stabilisées entre elles par un pont disulfure (149) (Figures 19 et 21).

Figure 21 : séquence protéique de CD146



(D'après www.uniprot.org)

La séquence protéique obtenue à partir de la région codante de CD146 a un poids moléculaire de 71698 Daltons. Cependant, CD146 a un poids moléculaire de 113000 Daltons. Cette différence est due aux sites de glycosylation présents sur la séquence de la protéine. En effet, CD146 est une protéine fortement N-glycosylée puisqu'elle présente huit sites potentiels de N-glycosylation (Asn-Xaa-Ser/Thr) en positions 56, 418, 449, 467, 508, 518, 527 et 544 ce qui représente environ 35% du poids moléculaire (154). La composition de ces arborisations glycosylées varie selon le type cellulaire (145,148) (Figures 19 et 21). La présence de sialylation a été mise en évidence grâce à un traitement de la protéine avec de la neuraminidase (0.04U/mL) (155).

b. Les différentes isoformes membranaires

CD146 membranaire existe sous deux isoformes : une isoforme longue et une isoforme courte. Ces deux isoformes n'ont pas été découvertes simultanément. La forme longue a été découverte initialement dans les mélanocytes en 1987 (142) alors que la forme courte a été découverte à partir d'ADN complémentaire de poulet en 1996 (156). Elles résultent d'un épissage alternatif de l'exon 15 ce qui entraîne un décalage du cadre de lecture (157). Ces 2

isoformes sont donc identiques au niveau du domaine extracellulaire mais différent par la longueur de leur région cytoplasmique (63 et 21 AA) (158). Au niveau intracellulaire, elles ont en commun un domaine de 16 AA contenant un site de phosphorylation par la PKC (protéine kinase C). L'isoforme longue possède un deuxième site de phosphorylation par la PKC et une séquence d'endocytose, alors que l'isoforme courte possède un motif de liaison aux domaines PDZ (147) (Figure 22). Le domaine intracytoplasmique est similaire à 95% pour l'isoforme courte et 93 % pour l'isoforme longue entre l'homme et la souris.

Figure 22 : Séquence courte et longue chez l'homme, la souris et le poulet

Short cytoplasmic form

	<u>transmembrane domain</u>	Protein Kinase C site	PDZ Domain interaction site
HEMCAM-s	SESKGIIIVAIIVCILVVAVLGSIIYFLHKKGKISCGRS	SGK	QDIARNTSI
mMCAM-s	P----VV---V---TL-L---AAL--FY---LP-----		EME-----
hMCAM-s	P--R-VV---V-----L---AVL---Y---LP-R-----		EME-----

Long cytoplasmic form

	<u>transmembrane domain</u>	Protein Kinase C site	Protein Kinase C site	endocytosis signal
HEMCAM-1	SESKGIIIVAIIVCILVVAVLGSIIYFLHKKGKISCGRS	SGK	QDITKPEAR	KDKNVVEVKSDKLSSEAGLLQGANGEKRS
mMCAM-1	P----VV---V---TL-L---AAL--FY---LP-----		E--L-PT--SEF-----	P--MA---S--D--A-G--G-----H
hMCAM-1	P--R-VV---V-----L---AVL---Y---LP-R-----		E--L-PS--NEL-----	P--M---S--D--A-G--G-----H
bMCAM-1		--AVL--FY---LP-----	E--L-PT--SEF-----	P--M---S--D--A-G--G-----H

Le premier trio de séquences correspond à l'alignement de séquence de l'isoforme courte de CD146 chez l'homme (hMCAM-s), la souris (mMCAM-s) et le poulet (HEMCAM-s).

Le second trio de séquences correspond à l'alignement de séquence de l'isoforme longue de CD146 chez l'homme (hMCAM-l), la souris (mMCAM-l) et le poulet (HEMCAM-l) (D'après Alais et al., J. Cell. Sci., 2001).

La protéine CD146 peut exister sous forme monomérique et dimérique dans les cellules normales et cancéreuses. Le ratio dimères sur monomères est plus élevé dans les cellules tumorales comparé aux cellules normales (159).

c. La forme soluble

Une forme soluble de CD146 de 100000 Daltons a été mise en évidence dans le surnageant de culture de cellules endothéliales (160). Elle est détectable et quantifiable dans le plasma et le sérum humain. Chez un sujet sain, sa concentration est de 260 ± 60 ng/ml (161). Sa concentration plasmatique et sérique varie dans différentes pathologies telles que l'insuffisance rénale chronique (161), le cancer (162), la sclérodermie (163) ou la pré-éclampsie (164).

Cette forme soluble provient de la protéolyse des deux isoformes courte et longue de CD146 par des métalloprotéases dont l'activité est stimulée par le TNF- α (165). L'utilisation d'un inhibiteur non-spécifique de métalloprotéases (GM6001) inhibe la sécrétion de CD146 soluble (166). Les métalloprotéases sont une grande famille de protéases dont l'activité catalytique est dépendante d'un ion métallique tel que les ions Zn^{2+} ou Cu^{2+} . Les métalloprotéases se divisent en cinq groupes : les métalloprotéases de la matrice (MMPs), les MMPs transmembranaires (MT-MMPs), les métalloprotéases avec un domaine de type désintégrine (ADAMs), les ADAMs avec un motif de type thrombospondine (ADAMTS) et les métalloprotéases ne rentrant pas dans les quatre groupes précédents (Figure 23). Les métalloprotéases sont régulées au niveau de leur expression, de leur activation par clivage de la proforme latente et de leur activité par quatre inhibiteurs naturels qui sont les TIMPs (Tissue Inhibitors of Matrix Metalloprotease). Certaines peuvent aussi être inhibées par l' α -2-macroglobuline.

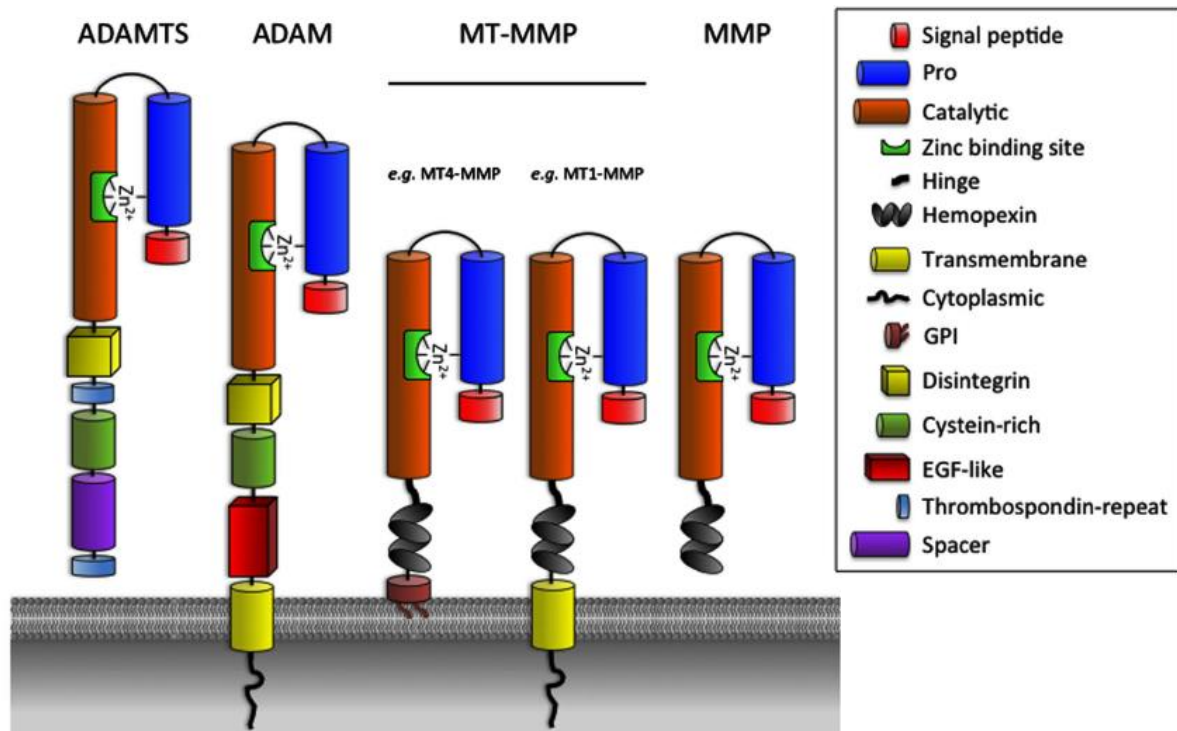
- **Les MMPs** : Il y en a 23 décrites à ce jour (167). Ce sont des enzymes sécrétées qui sont composées de quatre domaines : un peptide signal pour l'adressage subcellulaire, un pro-domaine dont l'ablation est nécessaire pour l'activité catalytique, un domaine protéolytique et un domaine hémopexine interagissant avec un hème. Il existe aussi des MMPs ne contenant que le domaine catalytique comme les MMPs 7 et 26 (168). Le clivage activateur est obtenu généralement par une Furine (ou une protéine semblable) dans l'appareil de golgi (169).

- **Les MT-MMPs** : Il en existe 6 (167). Leur structure est proche de celle des MMPs mais elles n'ont pas de domaine hémopexine. Certaines sont ancrées dans la membrane par un motif glycosyl-phosphatidylinositol, c'est le cas de MT4-MMP et MT6-MMP, les autres (MT1-MMP, MT2-MMP, MT3-MMP et MT5-MMP) ont un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique (170).

- **Les ADAMs** : Il y en a 25 connues (167). Elles sont constituées d'un peptide signal, d'un pro-domaine, d'un domaine protéolytique qui nécessite un motif consensus (HExxHxxGxxH, les histidines permettent l'interaction avec le Zn^{2+}) formant une poche catalytique, un domaine désintégrine (séquence consensus CRDAVNECDITEYC) se liant aux intégrines, un domaine riche en cystéine s'attachant aux protéoglycanes conduisant le substrat vers la poche catalytique (171), un domaine EGF-like qui peut interagir avec différentes protéines, un domaine transmembranaire et une queue cytoplasmique plus ou moins longue qui est capable de fixer différentes protéines. Certaines ADAMs n'ont pas d'activité catalytique, c'est le cas d'ADAM 11 (169,172).

- Les **ADAMTS** : Il y en a 19 répertoriées (167). Contrairement aux ADAMs, elles ne possèdent pas de domaine transmembranaire, elles sont solubles et disposent d'un ou plusieurs domaines thrombospondines (173).

Figure 23 : Schématisation des différents groupes de métalloprotéases



(D'après Noël et al, *Front. Pharmacol.*, 2012)

Enfin, une autre isoforme de CD146 soluble a été mise en évidence chez le poulet. Elle provient d'un épissage alternatif où l'intron 11 est retenu ce qui entraîne un décalage du cadre de lecture et l'apparition d'un codon stop avant le domaine transmembranaire (156).

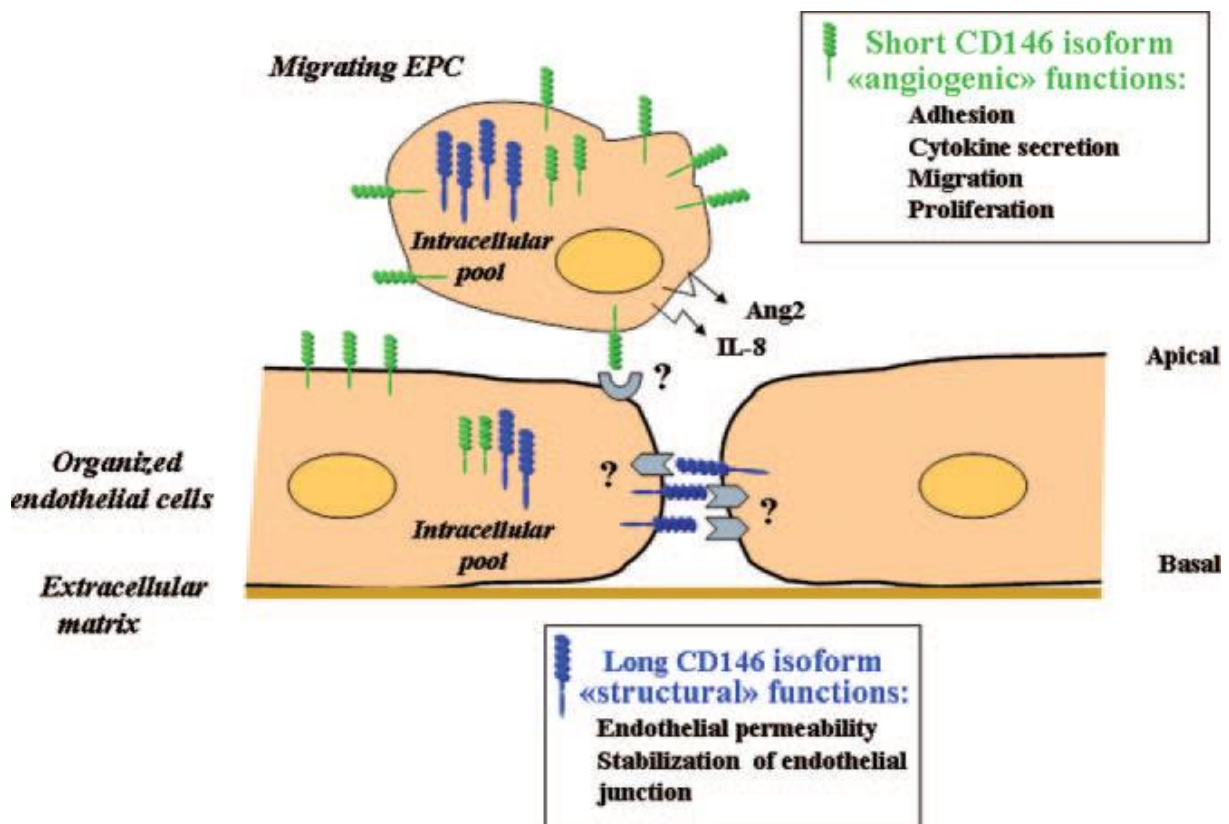
A l'heure actuelle, seul le récepteur du CD146 soluble généré par protéolyse des formes membranaires a été identifié. Notre équipe a montré que ce récepteur est l'angiostatine p80 (174) et qu'il est présent à la fois sur les cellules endothéliales et sur de nombreuses cellules tumorales (175).

III. Localisation

1) Localisation sur les cellules endothéliales

CD146 est exprimé de façon constitutive et ubiquitaire sur l'endothélium humain quel que soit la localisation anatomique des vaisseaux et leur calibre. Il est fortement présent au niveau des jonctions endothéliales mais il n'est pas exprimé au sein des jonctions adhérentes (176). Les isoformes longue et courte de CD146 ont une localisation différente. L'isoforme longue est localisée au niveau intracellulaire lorsque les cellules ne sont pas confluentes et au niveau jonctionnel lorsque les cellules sont confluentes. Cette localisation lui confère des fonctions structurales et une implication dans la transmigration des monocytes et dans la perméabilité cellulaire (165). L'isoforme courte est localisée préférentiellement au niveau de la membrane des cellules endothéliales progénitrices circulantes et possède des fonctions angiogéniques. Elle est localisée au niveau de la membrane apicale lorsque les cellules ne sont pas confluentes et au niveau du front de migration lorsqu'elles sont confluentes (103) (Figure 24).

Figure 24 : Localisation et fonctions des isoformes de CD146 dans les cellules endothéliales



(D'après Kebir et al., Circulation Research, 2010)

2) Localisation sur les cellules cancéreuses

Initialement décrit dans les cellules du mélanome (142), CD146 est présent au niveau des cellules tumorales primitives et des métastases (177). Son expression est un marqueur de mauvais pronostic puisqu'elle est corrélée avec le pouvoir métastatique des mélanomes (143). La molécule CD146 a été associée à un stade avancé d'autres cancers et en particulier les cancers de la prostate (178), du sein (179), du rein (180) et du poumon non à petites cellules (162).

3) Localisation sur les cellules immunitaires

Dans le sang périphérique de patients sains, il a été montré grâce à un co-marquage CD146+ CD45+ qu'environ 1% des cellules sanguines mononuclées expriment CD146. Une analyse des différents types de lymphocytes par cytométrie en flux a montré une expression de CD146 sur certaines populations de lymphocytes B et T. 1% des lymphocytes B expriment CD146 et cette expression est augmentée d'un facteur 5 suite à une stimulation par l'IL-4 et CD40. La génération de deux anticorps par immunisation de rat avec des cellules issues de la lignée lymphocytaire T HUT102 a permis de montrer que 2% des lymphocytes T CD3+, CD3+ CD4+ et CD3+ CD8+ expriment CD146 (181) (Figure 25). La quantité de lymphocytes T CD146+ est augmentée suite à une stimulation par l'IL-2 (181) et par la phytohémagglutinine (PHA) qui est un agent mitogène (182). *In vivo*, ces lymphocytes T CD146+ sont retrouvés dans le liquide synovial de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde (182). Plus récemment, CD146 présent sur les cellules CD4+ a été associé à une adhésion aux lymphocytes TH17 (183) et une co-expression de CD146 et de CCR6 a été démontrée sur une population de lymphocytes TH17 (184).

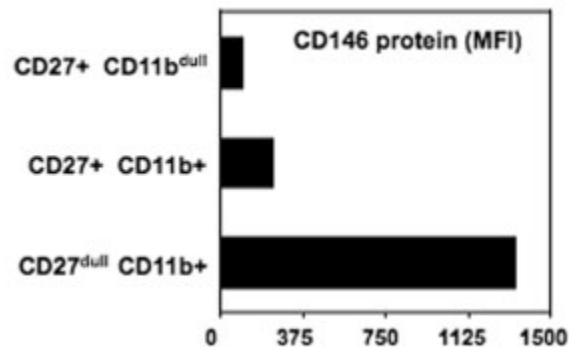
Figure 25 : Expression de CD146 sur les lymphocytes

Lymphocyte subset	Mean \pm SD, %
CD3 ⁺ T cells	2.09 \pm 0.84
CD3 ⁺ CD4 ⁺ T cells	2.08 \pm 0.73
CD3 ⁺ CD8 ⁺ T cells	2.50 \pm 2.47
CD19 ⁺ B cells	0.74 \pm 0.86
CD3 ⁻ NK cells	0.11 \pm 0.13

Analyse de l'expression de CD146 sur les lymphocytes B, T et les cellules NK en cytométrie en flux. (D'après Elshal et al, Blood, 2005)

Chez la souris, CD146 n'est pas détectable sur les lymphocytes T et B, les monocytes et les cellules dendritiques. En revanche 30% des neutrophiles et 60% des NK l'expriment. L'expression de CD146 est corrélée avec l'expression des marqueurs CD27 et CD11b qui reflètent l'état de maturité des NK. Une augmentation de l'expression de CD146 est retrouvée dans les cellules NK les plus matures (CD27⁻ CD11b⁺) (185) (Figure 26).

Figure 26 : Expression de CD146 sur les cellules NK de souris



Analyse de l'expression de CD146 sur des cellules NK issues de la rate de souris par cytométrie en flux. (D'après Despoix et al, J. Immunol., 2008)

Ces différentes études ont montré que la molécule CD146 est exprimée de façon préférentielle sur des sous-populations leucocytaires activées.

4) Localisation médullaire

Chez l'adulte, l'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse des os longs. La moelle osseuse est composée d'un réseau dense de capillaires discontinus ce qui permet un passage facile des cellules produites dans la moelle vers le sang. Elle est composée d'un réseau de sinus vasculaires et est principalement composée de cellules stromales (réticulaires, endothéliales, adipocytaires et ostéoblastiques) qui servent de soutien au processus d'hématopoïèse.

La molécule CD146 est exprimée au sein de cellules progénitrices mésenchymateuses de la moelle osseuse *in vivo* et *in vitro*. En effet, une étude a montré, en cytométrie en flux, que l'expression élevée de CD146 sur les cellules mésenchymateuses humaines était associée à la différenciation de ces cellules mésenchymateuses en cellules musculaires lisses (186). D'autres études montrent que les cellules mésenchymateuses de l'endomètre exprimant CD146 ont la capacité de se différencier en cellules adipocytaires, ostéogéniques ainsi qu'en progéniteurs neuronaux, en cellules gliales et en cellules stromales qui supportent l'hématopoïèse (187–189). De manière intéressante, plus les cellules mésenchymateuses expriment CD146 à leur surface,

plus leur capacité de différenciation ostéogénique est importante (188). Récemment, le potentiel thérapeutique de cette sous-population de cellules mésenchymateuses CD146+ a été mis en évidence. En effet, il a été observé *in vivo*, après la réalisation d'une fracture fémorale, un meilleur adressage des cellules mésenchymateuses CD146+ vers le site de lésion en comparaison aux cellules mésenchymateuses CD146- (190). De plus, dans un modèle d'arthrite chez la souris, il a été montré une diminution de la progression de la pathologie après injection intra-articulaire de cellules mésenchymateuses CD146+ associée à une diminution de la prolifération des lymphocytes TH17 (191). Ces études établissent un rôle potentiel des cellules mésenchymateuses CD146+ dans la régénération osseuse ainsi que dans la réparation du cartilage.

Une autre étude a permis d'isoler une population de cellules du stroma CD146+ possédant les caractéristiques des cellules murales. Leur localisation dans la moelle osseuse et leur phénotype les rangent dans une sous-population de cellules réticulaires adventitielles. Ce sont des cellules abondantes dans la moelle osseuse et elles sont capables de générer un tissu osseux et un environnement hématopoïétique après isolement et implantation dans une souris immunodéficiente (189). De plus, l'angiopoïétine-1 est régulée par les cellules stromales CD146+. Il a été montré qu'une diminution de l'expression de CD146 par des siRNA ou par une stimulation avec FGF-b (qui est un régulateur de CD146 et de l'angiopoïétine-1) réduit la capacité de ces cellules à participer au remodelage et à l'assemblage des structures pseudo-vasculaires *in vitro* et à former des microenvironnements hématopoïétiques *in vivo*. Etant donné la localisation spatiale des cellules réticulaires adventitielles et l'expression de Tie-2 (le récepteur de l'angiopoïétine-1), il a été suggéré que CD146 et l'angiopoïétine-1 participent à l'interaction entre les cellules endothéliales et les cellules stromales (192).

5) Localisation au niveau des cellules musculaires lisses et des péricytes

L'expression de CD146 au sein des cellules musculaires lisses (CML) a été découverte lors des études réalisées sur les cellules souches mésenchymateuse CD146+. En effet, il a été observé en cytométrie en flux que l'augmentation des cellules CD146+ était concomitante avec l'apparition de marqueurs des CML (calponine-1 et SM22 α) ce qui suggère un enrichissement de cellules CD146+ lors de la différenciation en CML. L'expression de CD146 au sein des CML a été confirmée histologiquement grâce à une co-localisation de CD146 et SM22 α au sein des disques intervertébraux (186). Il a également été montré que les cellules CD146+ présentent

une contractilité plus importante que les cellules CD146- grâce à une technique de contraction sur gel de collagène à partir d'anneaux fibreux des disques intervertébraux murins. Ce résultat a aussi été observé sur les cellules humaines d'anneaux fibreux (193).

CD146 est également exprimé sur les péricytes. En effet, la molécule CD146 est détectée sur les péricytes issus du tissu de l'hémangiome et au sein de la synovie des arthrites rhumatoïdes grâce à des marquages immuno-histochimiques (194). De plus, il a été montré que les cellules stromales de la moelle osseuse CD146+ expriment des marqueurs des cellules sous-endothéliales (tels que SMA α) et le récepteur du facteur de croissance dérivé des plaquettes β (PDGFR β). Ces cellules stromales CD146+ sont capables, en co-culture avec des cellules endothéliales, de former *in vitro* l'assemblage ainsi que le remodelage de structures pseudocapillaires (192). CD146 est également retrouvé au sein de cellules périvasculaires du myocarde (195). De plus, il a été montré que l'injection de cellules progénitrices périvasculaires multipotentes dérivées des cellules progénitrices embryonnaires humaines (les hESC-PVPCs) CD146+ permet un rétablissement de l'intégrité vasculaire rétinienne chez le rat diabétique. Cette étude montre le potentiel thérapeutique des cellules dans la stabilisation vasculaire (196). D'autre part, une étude montre une corrélation entre l'expression de CD146 sur les péricytes et le phénotype asymptomatique des plaques d'athérosclérose de la carotide (197).

6) Localisation au niveau des trophoblastes

CD146 est exprimé au niveau des trophoblastes intermédiaires et extra-villeux (198). Il est également exprimé par les cellules du complexe cumulo-ovocytaire et par les cellules de l'endomètre. Sur l'embryon préimplantatoire, CD146 est présent sur le trophoctoderme et le bouton embryonnaire (199).

CD146 étant impliqué dans l'implantation embryonnaire, notre équipe a montré que le CD146 soluble présent dans les surnageants d'embryon peut constituer un nouveau biomarqueur de la sélection des embryons lors d'une fécondation *in vitro*. Le milieu de culture embryonnaire de chaque embryon transféré a été recueilli pour la mesure de CD146 soluble par dosage ELISA. Des concentrations significativement plus élevées de CD146 soluble sont présentes chez les surnageants d'embryons qui ne se sont pas implantés par rapport à ceux qui ont été implantés avec succès (1310 +/- 1152 pg/mL contre 845 +/- 1173 pg/mL) (200).

7) Localisation dans le système nerveux central

La molécule CD146 est exprimée dans le système nerveux central et dans certaines parties du cerveau durant le développement embryonnaire et son expression diminue après la naissance. Chez le poulet et le rat, CD146 est exprimé dans le cerebellum, l'hippocampe, les cellules de Purkinje et les cellules sensorimotrices de la corde spinale (201). Chez le poulet, CD146 se fixe au NOF (Neurite outgrowth factor) ce qui provoque l'extension des neurites (146). De plus il a été montré que CD146 augmente le processus d'extension du tectum optique chez le poulet (201).

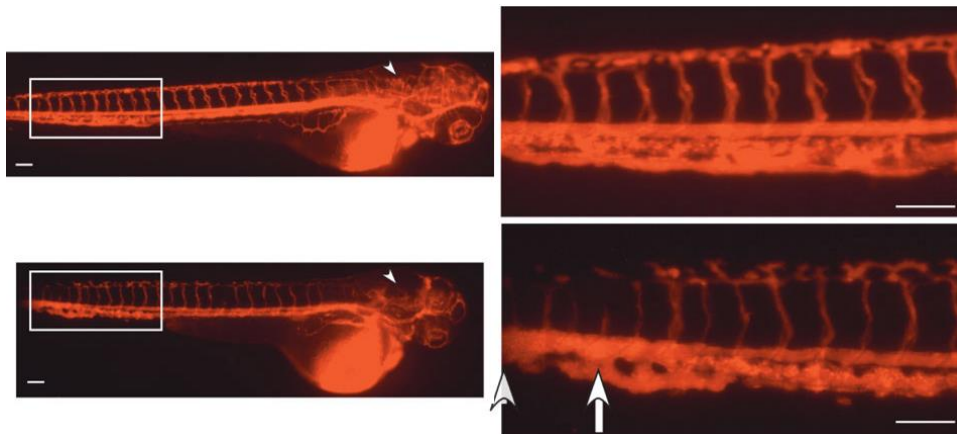
IV. Fonctions physiologiques de CD146/CD146 soluble

1) Rôle dans l'angiogenèse

Les cellules endothéliales qui possèdent la capacité angiogénique sont capables de proliférer, de migrer, d'adhérer et ont la capacité de former des pseudo-capillaires.

L'utilisation de siRNA dirigés contre CD146 sur des cellules endothéliales de type HUVEC a permis de mettre en évidence une diminution de la prolifération, de l'adhésion et de la migration cellulaire. Ceci montre le rôle clé de CD146 dans l'activité des cellules endothéliales et dans l'angiogenèse (202). Suite à ces expériences, un modèle d'inactivation de l'expression de CD146 par des oligonucléotides morpholinos antisens a été réalisé chez le poisson zèbre. Ceci a permis de montrer une diminution du nombre de vaisseaux intersomitiques qui s'accompagne d'une baisse du flux sanguin et d'une réduction de la lumière des vaisseaux (203) (Figure 27). Chez le poisson zèbre, une diminution de l'expression de CD146 s'accompagne d'une diminution de la signalisation angiogénique induite par le VEGF-A (204).

Figure 27 : Visualisation de la vascularisation par microangiographie.



Visualisation des vaisseaux sanguins intersomitiques chez le poisson zèbre par microangiographie. Une diminution des vaisseaux est observable après injection de morpholinos-nucléotidiques anti-CD146 (photos en bas) en comparaison à l'injection de morpholinos-nucléotidiques contrôles (photos en haut). (D'après Chan et al, Dev. Dyn, 2005).

Le rôle de CD146 dans l'angiogenèse a également été mis en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps tel que l'anticorps AA98. L'injection de cet anticorps dans un modèle de membrane chorioallantoïque de poulet entraîne une diminution d'environ 7 fois de la densité de vaisseaux. Chez la souris, des injections de cet anticorps ont permis de diminuer le nombre de vaisseaux de 70% dans des modèles de xénogreffes de cellules tumorales de leiomyosarcome, de cancer pancréatique et d'hépatocarcinome (205). L'anticorps AA98 inhibe l'activation de la voie NFκB induite après stimulation de cellules endothéliales par un milieu conditionné de cellules cancéreuses (cellules d'hépatocarcinome). En effet, cet anticorps va inhiber la phosphorylation de p38 MAPK, supprimer l'activation de NFκB et diminuer l'expression d'ICAM-1 et de MMP-9 (206).

D'autre part, CD146 est impliqué dans l'angiogenèse induite par la nétrine 1. Ceci a été montré chez les souris déficientes en CD146 ainsi que chez le poisson zèbre invalidé pour CD146 par des oligonucléotides morpholinos antisens (207).

Par ailleurs, une étude portant sur le développement vasculaire du rein a permis d'observer une expression de CD146 sur les cellules endothéliales embryonnaires rénales et la déplétion de ces cellules CD146 positives conduit à une désorganisation et une réduction de leur capacité à former un réseau de cellules endothéliales CD31+. Cette étude suggère ainsi un rôle de CD146 dans le développement vasculaire rénal (208).

Les isoformes courte et longue de CD146 ont des effets différents sur l'angiogenèse. En effet, l'utilisation de siRNA dirigés spécifiquement contre ces deux isoformes montre que l'absence de l'isoforme courte diminue la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules

endothéliales, tandis que sa surexpression conduit à l'augmentation de l'adhésion et de la prolifération de ces progéniteurs endothéliaux. Ces expériences ont également montré l'implication de l'isoforme longue dans la formation de pseudo-capillaires en matrigel *in vitro*. L'isoforme courte de CD146 est donc associée à des phénomènes pro-angiogéniques alors que l'isoforme longue est liée à la stabilisation des structures vasculaires nouvellement formées (103).

En utilisant une molécule recombinante CD146 soluble, il a été montré *in vitro* et *in vivo* que CD146 soluble présente des effets chimiotactiques sur les cellules endothéliales matures et sur les progéniteurs endothéliaux. De plus, CD146 soluble possède des propriétés angiogéniques en augmentant de façon importante les capacités de migration, de prolifération et de formation de pseudo-capillaires des cellules endothéliales matures ou progénitrices. Ceci a été confirmé *in vivo* par l'injection sous-cutanée, chez la souris, de matrigel contenant du CD146 soluble. En effet, le recrutement des cellules CD31+ et CD45+ ainsi que des CML est augmenté ce qui aboutit à la formation de structures de type capillaire. Ces effets impliquent la stimulation de la forme membranaire de CD146 et sont associés à une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse tels que le récepteur du VEGF, MMP-2, e-NOS et uPa. Des expériences réalisées *in vivo* dans un modèle d'ischémie de la patte chez le rat par ligature de l'artère fémorale montrent que des injections locales répétées de CD146 soluble s'accompagnent d'une augmentation de la densité capillaire et du taux de perfusion sanguine de la patte, confirmant l'effet angiogénique important de la molécule (104). Ces études ont permis de mettre en évidence que CD146 soluble possède des propriétés chimiotactiques et angiogéniques, ce qui la range dans la catégorie des facteurs de croissance.

2) Rôle dans la perméabilité cellulaire et la transmigration endothéliale

En raison de sa localisation jonctionnelle, de l'augmentation de son expression en fonction de la confluence et de l'interaction avec le cytosquelette d'actine, la molécule CD146 est impliquée dans la cohésion cellule-cellule et dans le contrôle de la perméabilité endothéliale.

Les deux isoformes membranaires de CD146 semblent posséder les mêmes propriétés d'adhérence. Néanmoins, l'isoforme longue est davantage impliquée dans l'adhésion ferme des lymphocytes T sur l'endothélium. En effet, elle induit la formation d'expansions cytoplasmiques des lymphocytes, permettant le roulement, l'adhérence et la transmigration de ces leucocytes à travers l'endothélium. Ces phénomènes s'accompagnent de l'augmentation de

microvillis à la membrane des lymphocytes T (209). Ceci suggère un rôle potentiel de CD146 dans la perméabilité et la transmigration endothéliale. Une autre étude a montré une augmentation de la perméabilité de l'endothélium suite à une incubation avec l'anticorps P1H12, un anticorps anti-CD146, sur une monocouche de cellules endothéliales HMVECs (pour Human MicroVascular Endothelial Cells) (210).

L'implication de CD146 soluble dans la transmigration des leucocytes à travers l'endothélium a également été montrée en utilisant la lignée monocyttaire THP1 et des monocytes primaires. Une augmentation de cette transmigration est observée suite à une stimulation avec du CD146 soluble (165). Le CD146 soluble se lie préférentiellement à un sous-type de monocytes, possédant des capacités de transmigration par une interaction hétérophilique et stimule leur migration trans-endothéliale (211).

V. Fonctions dans les pathologies cancéreuses

1) Expression de CD146 dans le mélanome

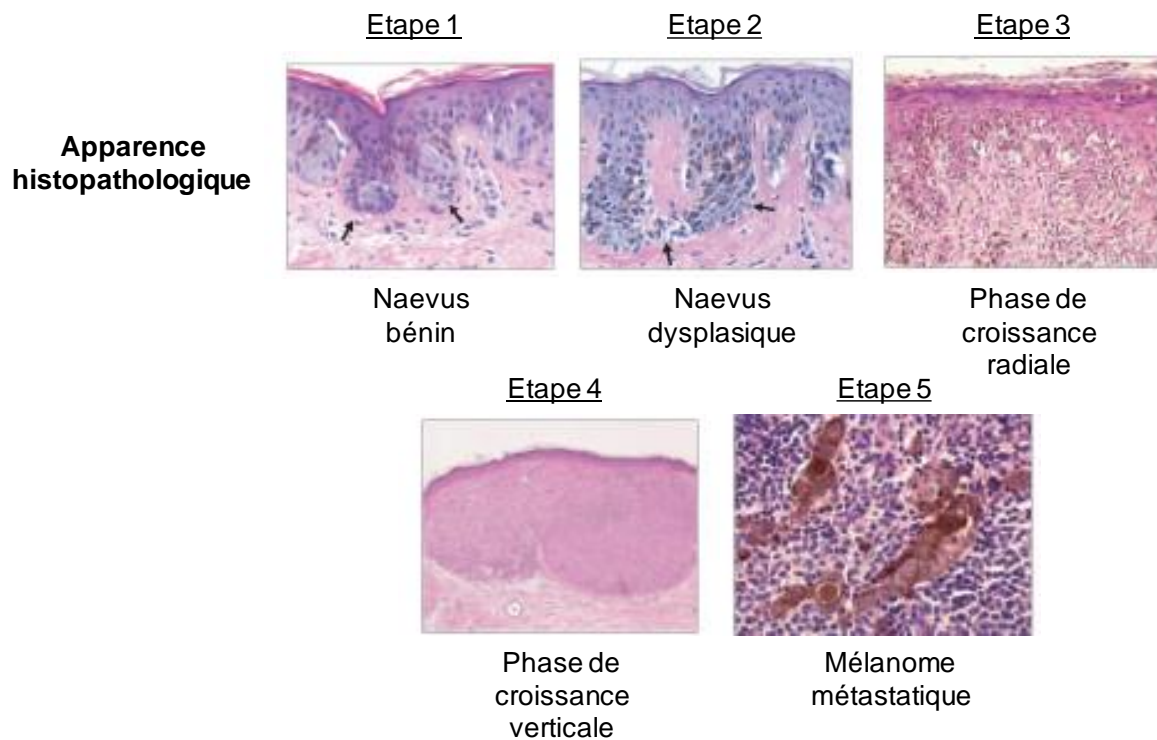
a. Le mélanome

Avec près de 11176 cas estimés en 2012, le mélanome représente entre 2 et 3 % de l'ensemble des cancers. Il touche un peu plus de femmes (53 %) que d'hommes (47 %) et l'âge moyen au diagnostic est de 56 ans. C'est le cancer pour lequel l'incidence augmente le plus (10 % par an depuis 50 ans). Il existe des risques génétiques prédisposant à cette maladie (5 à 10 % des cas) mais aussi des facteurs environnementaux tels que la surexposition aux ultraviolets naturels ou artificiels et des facteurs propres aux individus (nombre élevé de nævus, peau claire). Outre les mélanomes qui représentent 10 % des cancers de la peau mais qui sont responsables de 80 % des décès de cancer dermatologique, il en existe d'autres types. Les plus fréquents sont les carcinomes : ils représentent 90 % de l'ensemble des cancers cutanés. Ils surviennent généralement après l'âge de 50 ans, sur les zones découvertes du corps. Ils sont le plus souvent dus à une exposition excessive aux UVs. Contrairement au mélanome, le point de départ de ces cancers cutanés n'est pas les mélanocytes, mais les kératinocytes. On en distingue deux types : les carcinomes basocellulaires et épidermoïdes. Les carcinomes basocellulaires sont les plus fréquents. Ils évoluent lentement et n'entraînent pas de métastases. Cependant, ils

peuvent s'étendre localement et entraîner une destruction des tissus sous-cutanés. Les carcinomes épidermoïdes (ou carcinomes spinocellulaires) sont plus rares et peuvent entraîner des métastases (*d'après l'INCa*). Le carcinome verruqueux est une variété de carcinome épidermoïde totalement différencié. Il forme une lésion exophytique, verruqueuse, à croissance lente, qui peut rester longtemps superficielle. L'extension aux tissus osseux et musculaires voisins est possible, plus sous la forme de refoulement que d'infiltration, caractère bien limité en périphérie. Il ne donne normalement pas de métastase (*www.oncopathologie.com*).

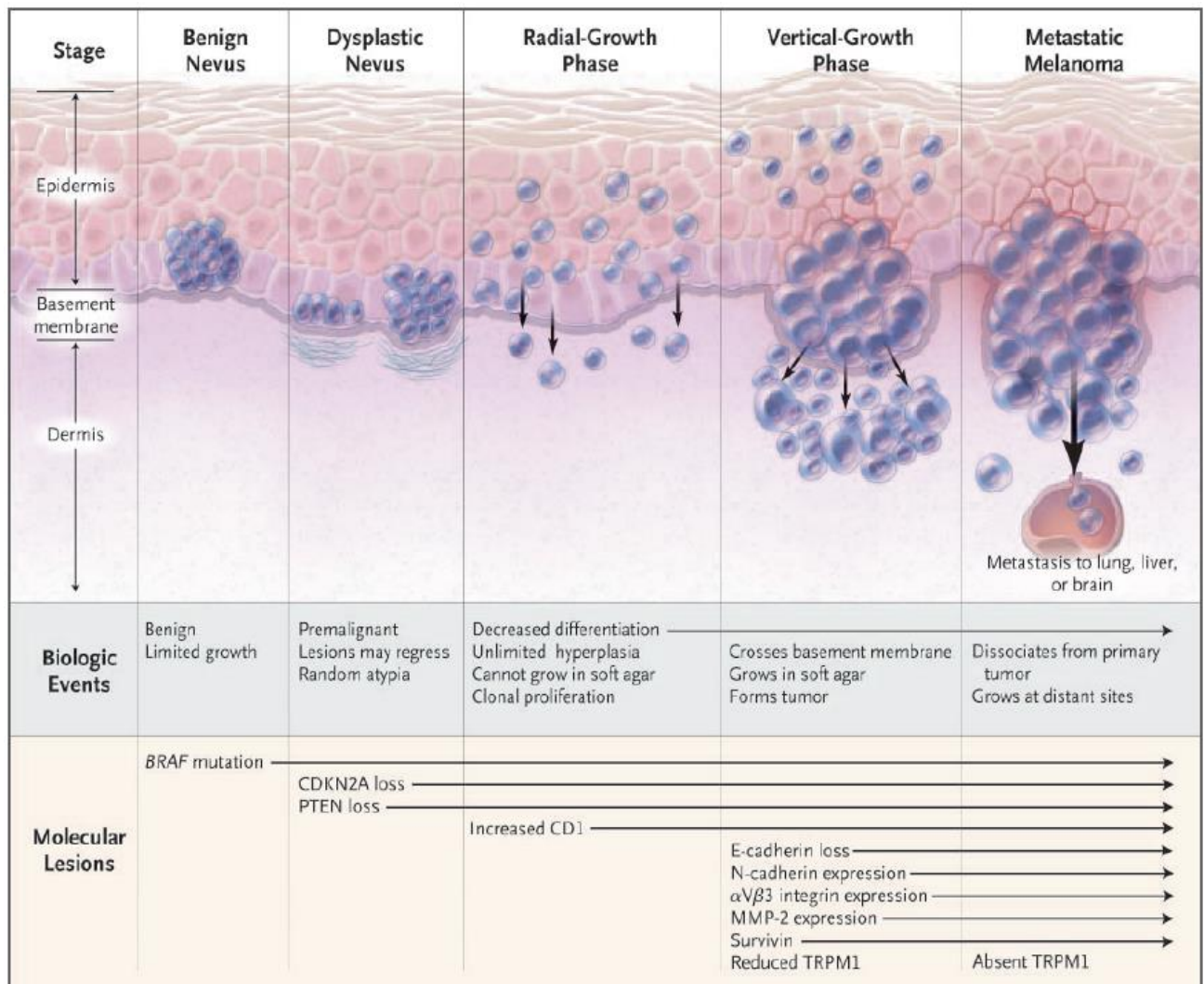
D'après le modèle du Pr Clark de 1969, le développement de la maladie se fait en cinq étapes (212) (Figures 28 et 29). Durant la première phase, il y a apparition d'un nævus qui correspond à une prolifération des mélanocytes qui sont, dans la majorité des cas, bénins. Puis à partir de ce nævus, les mélanocytes acquièrent un phénotype malin (cellules de mélanome) et prolifèrent de façon aberrante, il s'agit de la deuxième phase. La phase trois est une phase de croissance radiale pendant laquelle les cellules de mélanome envahissent l'épiderme par un développement radial. Durant la quatrième phase, les cellules acquièrent un phénotype migratoire et invasif leur permettant d'envahir le derme réticulaire et papillaire puis de former un nodule ayant la capacité de s'élargir jusqu'à la couche graisseuse, il s'agit de la phase de croissance verticale. L'étape finale correspond à la dissémination des cellules de mélanome via la circulation lymphatique et sanguine. Les cellules sont donc capables d'envahir d'autres organes et de former des nodules métastatiques, d'abord dans les ganglions lymphatiques sentinelles, les poumons, le foie et le cerveau puis finalement dans tous les organes. La survie est de 14 % sur 5 ans pour les patients avec un mélanome métastatique (213).

Figure 28 : Histopathologie des différentes étapes du modèle de Clark



Les mélanocytes normaux développent progressivement un phénotype malin par l'acquisition de diverses caractéristiques phénotypiques. Les caractéristiques histologiques particulières caractérisant chaque étape de la progression sont les manifestations visibles des changements génétiques sous-jacents. (D'après Miller et al, N. Engl. J. Med., 2006).

Figure 29 : Evénements et changements moléculaires dans la progression du mélanome



En haut sont représentées les cellules de mélanome qui évoluent au cours de la progression de la maladie. En-dessous, sont répertoriés les événements biologiques et les lésions moléculaires qui sont associés aux différents stades du modèle de Clark. (D'après Miller et al, N. Engl. J. Med., 2006).

La transformation d'un nævus bénin en nævus malin implique un grand nombre d'événements moléculaires. En effet, environ 50 % des mélanomes sont associés à une mutation dans le gène *BRAF* (214) et 15 % sont associés à une mutation somatique de *NRAS* (215). Ces deux gènes codent pour des protéines kinases qui sont impliquées dans les voies de signalisation MAPK et qui contrôlent la prolifération des cellules de mélanome. Ces mutations sont associées à la première phase d'apparition du mélanome mais leur mutation seule ne suffit pas à induire la maladie. Il existe également des mutations inactivant les gènes *PTEN* (Phosphatase and TENsin homologue) dans 30 à 50 % des cas de mélanomes non-familiaux (216) et *CDKN2A* dans 25 à 40 % des cas de mélanomes familiaux (217). Ces deux gènes codent pour des

suppresseurs de tumeur et sont impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, une mutation entraîne donc une prolifération aberrante des cellules de mélanome. Le gène *MITF* (Microphthalmia associated Transcription Factor) est également impliqué dans le développement du mélanome. Il s'exprime uniquement lors de la différenciation mélanocytaire au cours du développement et permet le maintien d'une population progénitrice chez l'adulte. Mais, dans le mélanome, il est surexprimé et agit comme un oncogène, il permet aux cellules de mélanome d'acquérir un phénotype agressif et prolifératif (213,218).

Les molécules d'adhérence jouent également un rôle dans le développement du mélanome. Elles sont importantes surtout lors de l'invasion verticale des cellules et de la dissémination métastatique. Dans ce contexte, la voie de signalisation WNT est essentielle. Les protéines WNT1 et WNT3a sont augmentées durant les premières phases du développement du mélanome, entraînant une prolifération ainsi qu'une augmentation de la différenciation des mélanocytes en cellules de mélanome. Puis, la baisse d'expression de ces deux molécules laisse place à l'expression de WNT5a qui entraîne une dérégulation de la β -caténine et donc une déstabilisation de la jonction à travers les cadhérines (219). Le passage de la phase radiale vers la phase verticale se caractérise par la perte d'expression de la E-cadhérine et une surexpression de la N-cadhérine, caractéristique des mélanomes invasifs. Il va y avoir une interaction entre la N-cadhérine tumorale et la N-cadhérine d'autres types cellulaires tels que l'endothélium ou le derme. L'intégrine $\alpha 5\beta 3$ est exprimée durant cette phase ce qui entraîne une augmentation de la motilité et de la survie des cellules tumorales. Comme pour de nombreux autres types de cancer, la première étape de la dissémination métastatique dans le mélanome passe par un détachement au niveau de la tumeur primaire de cellules de mélanome qui vont disséminer par la circulation sanguine et/ou lymphatique grâce à un phénomène d'intravasation. Ces cellules vont ensuite disséminer dans d'autres organes par extravasation pour y établir un foyer secondaire appelé nodule métastatique. Les processus de roulement et d'adhésion des cellules tumorales sont semblables à ceux utilisés par les leucocytes avec un rôle important de la N-cadhérine permettant d'établir des liaisons cellules cancéreuses-endothélium (213) (Figure 29).

On distingue quatre principaux types de mélanome de la peau (220) :

➤ Le mélanome superficiel extensif (60 à 70 % des cas), lié à des coups de soleil importants dans le passé. Il s'étend d'abord horizontalement à la surface de la peau puis en profondeur dans les couches de la peau. Il se présente sous la forme d'une tache irrégulière brune ou noire qui change lentement sur une période d'un à cinq ans, puis rapidement. Le

mélanome superficiel extensif apparaît le plus fréquemment sur le cou, la partie supérieure du tronc chez l'homme et la partie inférieure des jambes chez la femme.

➤ Le mélanome de Dubreuilh ou lentigo malin (212) (5 à 10 % des cas) se manifeste le plus souvent chez les personnes âgées de plus de 50 ans. Il est lié à des expositions répétées aux rayons ultraviolets. Son extension est d'abord horizontale, puis verticale. Il apparaît le plus souvent dans des zones exposées au soleil, surtout au niveau du visage, mais aussi sur le cou et les mains. Il se manifeste par l'apparition d'une tâche brune plus ou moins foncée qui augmente de taille très lentement.

➤ Le mélanome nodulaire (moins de 5% des cas) est le type de mélanome dont la croissance est la plus rapide. Il peut atteindre toutes les parties de la peau, y compris les régions non exposées au soleil. Contrairement aux autres mélanomes qui commencent à s'étendre horizontalement, le mélanome nodulaire s'étend rapidement en profondeur dans les couches de la peau. Il se manifeste habituellement sous la forme d'une surélévation de la peau de couleur foncée ou de la même couleur que la peau.

➤ Le mélanome acro-lentigineux (ou mélanome des extrémités) se découvre le plus souvent chez les personnes qui ont la peau foncée, sur la paume des mains, la plante des pieds ou sous les ongles. Il se développe d'abord horizontalement pendant plusieurs mois ou années, puis verticalement, en profondeur. Il apparaît habituellement sous la forme d'une lésion foncée plane, puis sous forme de nodules (*d'après l'INCa*).

b. Le traitement du mélanome

Le traitement de ces différents types de mélanome repose essentiellement sur la chirurgie qui est adaptée à la topographie et à la profondeur de la lésion mais il existe également d'autres traitements qui ont été approuvés par la FDA (*d'après l'INCa*) :

✓ La chimiothérapie classique : elle détruit les cellules cancéreuses en agissant sur leurs mécanismes de division. Les principaux médicaments de chimiothérapie utilisés dans le traitement du mélanome sont la dacarbazine et la fotémustine.

✓ L'immunothérapie par interféron α est rarement proposée mais elle peut être utilisée en traitement adjuvant pour les mélanomes de stade II dont l'épaisseur est supérieure à 1,5 millimètre et/ou en cas d'ulcération, et après une chirurgie pour certains mélanomes de stade III. Pour le moment, seule une augmentation de la durée de la survie sans récurrence du mélanome a été démontrée.

✓ De hautes doses d'IL-2 peuvent être données. En effet, l'IL-2 active la population cellulaire LAK (Lymphokine Activated Killer) qui contiennent les cellules NK, les lymphocytes et les lymphocytes NKT qui ont la capacité de tuer les cellules néoplasiques (221).

Ces thérapies n'étant pas ciblées, elles touchent également les cellules saines ce qui entraîne des effets secondaires indésirables importants. La recherche de nouveaux traitements ciblés est donc importante :

✓ L'immunothérapie spécifique par anticorps monoclonaux vise à stimuler les défenses immunitaires de l'organisme contre les cellules cancéreuses. Les principaux anticorps monoclonaux utilisés dans le traitement des mélanomes sont : le nivolumab et le pembrolizumab (anticorps anti-PD1) ; l'ipilimumab (anticorps anti CTLA4) (associé dans certains cas au nivolumab).

✓ Les thérapies ciblées bloquent la croissance ou la propagation des cellules cancéreuses en interférant avec les altérations moléculaires qu'elles présentent ou avec des mécanismes qui sont à l'origine de leur développement et de leur dissémination. Des molécules de thérapies ciblées peuvent également être utilisées pour traiter les mélanomes présentant une mutation BRAF V600E (222). Ces composés agissent en bloquant des protéines kinases, qui sont impliquées dans la croissance et le développement des cellules. Ils contribuent ainsi à limiter la division et le développement des cellules cancéreuses. Les molécules utilisées sont le vémurafenib, le dabrafénib, le tramétinib (en règle générale en association au dabrafénib) et le cobimétinib (en règle générale en association au vémurafenib). En cas de mutation c-kit, il peut y avoir une thérapie ciblée avec un inhibiteur de c-kit : l'imatinib.

c. CD146 dans le mélanome

CD146 a initialement été découvert dans des cellules de mélanome humain, en 1987 (142). Son expression est un marqueur de mauvais pronostic puisqu'elle est corrélée avec le pouvoir métastatique des mélanomes (143).

Il a été montré que l'induction de l'expression de CD146 par une transfection dans des cellules de mélanome qui n'expriment pas CD146 augmente leur adhésion sur une monocouche de cellules HUVECs, leur invasion et leur activité métalloprotéase *in vitro*. De plus, l'induction de CD146 augmente le nombre de métastases pulmonaires après une injection intraveineuse de cellules de mélanome chez la souris nude *in vivo* (223). L'ajout de cellules de mélanome exprimant CD146 dans un modèle *in vitro* de reconstitution d'épiderme humain en trois

dimensions permet de voir que ces cellules se séparent de l'épiderme puis se propagent dans le derme, alors que des cellules qui n'expriment pas CD146 perdent ce phénotype (224). Ceci a été confirmé grâce à l'utilisation de siRNA dirigés contre CD146. En effet, ces siRNA entraînent une diminution de la progression tumorale et du potentiel métastatique du mélanome (225). Ils entraînent également une diminution de l'adhésion entre les cellules et une diminution de la croissance tumorale chez des souris immunodéficientes (224).

Les mécanismes impliqués dans la progression du mélanome ne sont pas encore clairement définis. Une étude montre qu'une déplétion de lymphocytes B1 chez la souris entraîne une diminution de la croissance tumorale et des métastases dans un modèle de métastases expérimental suite à une injection de cellules B16. Cette diminution des métastases implique des interactions homophiliques entre les lymphocytes B1 et les cellules B16 via CD146 (226). De plus une mise en co-culture de ces lymphocytes B1 avec des cellules de mélanome augmente l'expression de CD146 à la membrane cellulaire des cellules cancéreuses. Une étude a été réalisée sur une cohorte de patients atteints de mélanome, avec deux groupes de patients, l'un comprenant des patients à un stade précoce et l'autre à un stade avancé. Une analyse de différents marqueurs cancéreux dans le sang de ces patients montre que seul CD146 est un marqueur de corrélation avec les stades avancés de la maladie (227). Une autre étude a confirmé ce résultat en démontrant que CD146 est un marqueur de mauvais pronostic de survie chez des patients atteints de mélanome. Il s'agit d'un meilleur marqueur qu'une analyse de biopsies des ganglions périphériques sentinelles (228).

Ces différentes études ont démontré que CD146 est un marqueur de mauvais pronostic pour les patients ayant un mélanome et qu'une utilisation en tant que marqueur de discrimination des différents stades de tumeur pourrait être bénéfique et pourrait permettre une adaptation plus précoce des traitements.

2) Implication de CD146 dans le processus tumoral

La molécule CD146 a ensuite été associée à un stade avancé de différents cancers et en particulier les cancers du pancréas (229), de la prostate (178), du sein (179), du rein (180) et du poumon non à petites cellules (162). Elle est associée à la croissance tumorale et à la dissémination des métastases (230). Elle joue également un rôle dans la progression et l'implantation tumorale (143).

Dans les cas du cancer de la prostate, on observe une expression de CD146 qui est corrélée à un mauvais pronostic. La surexpression de CD146 sur des lignées cancéreuses prostatiques augmente leur pouvoir invasif et métastatique (231). De même, dans les cancers ovariens, l'expression de CD146 est corrélée avec l'augmentation du pouvoir métastatique de la tumeur. Une inhibition de l'expression protéique de CD146 sur des lignées cellulaires dérivées de cancers ovariens entraîne une inhibition du pouvoir invasif, de la propagation tumorale et induit une apoptose des cellules cancéreuses. Ceci s'explique par le fait que l'absence de CD146 induit une diminution de l'activité des Rho GTPases (232) qui sont impliquées dans l'invasion, la prolifération et la dissémination métastatique des cellules cancéreuses.

Il a également été démontré que l'expression de CD146 est augmentée dans des ostéosarcomes par rapport à des ostéoblastes non-pathologiques (233). L'injection d'anticorps dirigés contre CD146 (ABX-MA1) dans un modèle de souris immunodéficientes diminue la quantité de métastases pulmonaires induites par une injection de cellules dérivées d'ostéosarcome humain (234).

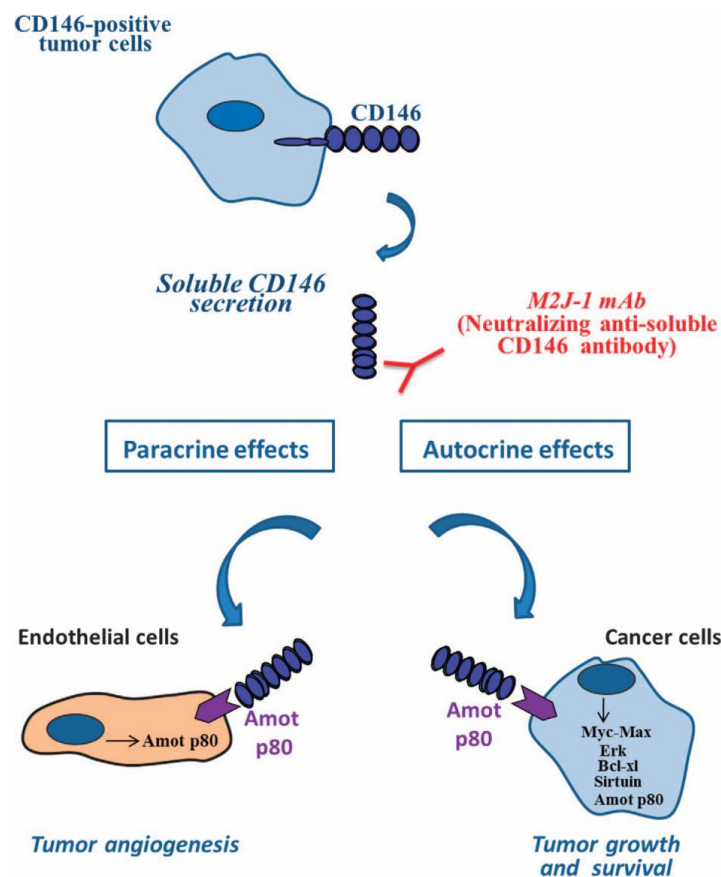
Dans le cancer du sein, une étude montre que CD146 agirait comme un suppresseur de tumeur (235), mais d'autres études contradictoires ont fait de CD146 un marqueur de mauvais pronostic (236). En effet, une augmentation de l'expression de CD146 dans une lignée cellulaire de cancer du sein induit l'augmentation de la motilité et de la tumorigénicité des cellules (237).

Par ailleurs, dans les tumeurs gastriques et mammaires, l'expression de CD146 est associée à une perte des marqueurs épithéliaux et l'acquisition de marqueurs mésenchymateux. CD146 pourrait constituer un marqueur de la transition du phénotype épithélial vers le phénotype mésenchymateux des cellules tumorales, un phénomène impliqué dans la formation de métastases. De plus, l'expression de CD44 augmente, et celle de CD24 diminue à la surface des cellules, suggérant que ces cellules acquièrent un phénotype caractéristique des cellules souches cancéreuses (238–240).

CD146 intervient également dans l'angiogenèse tumorale. En effet, *in vivo*, une inhibition de l'angiogenèse par un anticorps monoclonal anti-CD146 (clone AA98) a été obtenue dans un modèle de membrane chorioallantoïdienne de poulet ainsi que dans un modèle de xénogreffe tumorale chez la souris. L'administration de cet anticorps chez la souris a permis de réduire la densité de vaisseaux sanguins dans la tumeur conduisant à une baisse de la croissance tumorale (205,241). Dans un autre modèle de xénogreffe chez le poisson zèbre, le blocage de la traduction de la protéine par des oligonucléotides morpholinos antisens inhibe l'angiogenèse tumorale de tumeurs gastriques, pancréatiques et de mélanomes (204).

La forme soluble de CD146 augmente la prolifération des cellules cancéreuses et leur résistance à l'apoptose dans des expériences *in vitro*, et augmente la croissance et la vascularisation tumorale *in vivo* dans un modèle de xénogreffe de cellules cancéreuses chez la souris. Ses effets sont donc à la fois autocrine et paracrine, et empruntent la voie de signalisation de l'oncogène *c-myc* qui est impliquée dans la prolifération, l'apoptose, la sénescence et la migration des cellules cancéreuses (175) (Figure 30).

Figure 30 : Schéma des effets induits par CD146 soluble sur les cellules cancéreuses



*Les tumeurs CD146-positives sont capables de sécréter du CD146 soluble provenant du clivage des formes membranaires de CD146. Ce CD146 soluble génère à la fois des effets paracrines et autocrines par sa liaison à l'angiomotine (Amot p80). Les effets paracrines impliquent la prolifération des cellules endothéliales dans lesquelles Amot est surexprimé ce qui conduit à une angiogénèse tumorale. Les effets autocrines sont médiés par l'induction de *c-myc*, *max*, *Erk*, *Amot p80*, *Bcl-xl* et *sirtuin-1* dans les cellules cancéreuses, entraînant la croissance et la survie de la tumeur. Tous ces effets peuvent être antagonisés par l'anticorps anti-CD146 soluble M2J-1. (D'après Stalin et al., Oncogene, 2016)*

Il a récemment été montré que CD146 peut avoir un rôle dans la résistance des cellules tumorales aux traitements anticancéreux. En effet, malgré une réponse initiale favorable à la chimiothérapie, il y a une récurrence sous un an lors du cancer du poumon à petites cellules

(SCLC) et une résistance à de multiples médicaments. Grâce à un profil protéomique, les auteurs ont identifié CD146 comme étant fortement surexprimée dans les lignées cellulaires chimiorésistantes du SCLC et dans un modèle murin de xénotransplante de tumeurs chimiorésistantes dérivées de patient (PDX) par rapport à des tumeurs non chimiorésistantes. La déplétion de CD146 dans les cellules chimiorésistantes entraîne une diminution de la prolifération cellulaire et réduit la concentration inhibitrice médiane (IC50) de médicaments chimiothérapeutiques *in vitro*. Cette résistance à la chimiothérapie médiée par CD146 se fait via une activation de MRP1/ABCC1 (Mitochondrial 37S Ribosomal Protein 1/ATP Binding Cassette subfamily C member 1) et de la voie PI3/AKT. De plus, le profil métabolomique montre que CD146 module la production de lactate dans les cellules chimiorésistantes qui ont une faible phosphorylation oxydative. Ces résultats suggèrent que CD146 peut servir de nouvelle cible thérapeutique pour vaincre la chimiorésistance dans le SCLC (242). Une autre équipe a montré que CD146 confère une résistance au tamoxifène dans le cancer du sein. En effet, *in vitro*, CD146 est surexprimé au niveau ARN et protéique dans des cellules résistantes au tamoxifène (MCF-7-Tam-R) comparé à des cellules non résistantes (MCF-7). CD146 promeut la résistance des cellules cancéreuses au tamoxifène en surexprimant l'expression d'ER α et en activant la voie AKT suivi de l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse. De plus, dans une cohorte de 4142 patientes ayant un cancer du sein, l'expression de CD146 est inversement corrélée à la survie sans récurrence et sans métastase et cela particulièrement dans le sous-groupe ayant été traité uniquement avec du tamoxifène (243).

3) CD146 en thérapie

La molécule CD146 a donc un rôle important en cancérologie et pourrait constituer une cible en thérapie anticancéreuse. Dans ce but, plusieurs équipes ont tenté de générer des anticorps anti-CD146 pour inhiber la croissance tumorale et/ou la vascularisation.

Parmi ces anticorps, l'anticorps ABX-MA1 reconnaît à la fois la molécule CD146 tumorale et endothéliale. Cet anticorps inhibe la formation de sphéroïdes composés de cellules de mélanome mais il n'a pas d'effet, *in vitro*, sur la prolifération des cellules cancéreuses. Cependant les auteurs ont montré qu'*in vivo* il a un effet inhibiteur sur la croissance tumorale après une xénotransplante de cellules de mélanome dans des souris nude avec un effet qui porte essentiellement sur l'angiogenèse tumorale. De plus, il réduit les métastases grâce à son effet

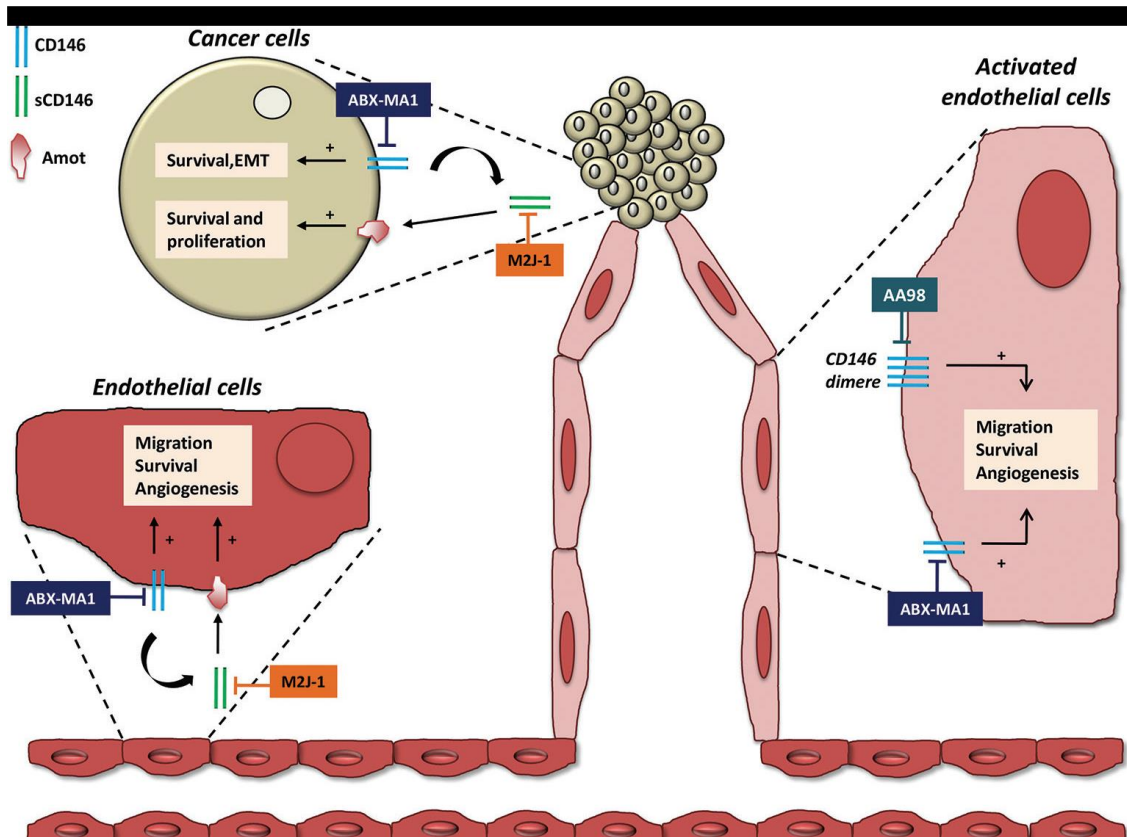
inhibiteur sur l'expression de MMP2 qui est fortement impliquée dans le processus de formation des métastases (244) (Figure 31).

Un autre anticorps a été généré, l'anticorps AA98. Il reconnaît uniquement la molécule CD146 des cellules endothéliales participant à la vascularisation tumorale. Il a un effet inhibiteur sur la prolifération et la migration des HUVECs lorsqu'elles sont cultivées en présence de surnageants de cellules cancéreuses. Cet anticorps a comme fonction d'inhiber les propriétés angiogéniques de CD146 *in vitro* et *in vivo* dans des modèles de xénogreffes de tumeurs humaines sur des souris immunodéprimées. Il a été démontré que cet anticorps AA98 possède un potentiel de diagnostic et d'agent thérapeutique en biologie vasculaire et cancéreuse (205). Il a ensuite été montré que l'anticorps AA98 inhibe la phosphorylation de la protéine p38/MAPK, supprime l'activation de NFκB et inhibe l'expression de MMP-9 et d'ICAM-1, suggérant que la suppression de NFκB est un point crucial des effets inhibiteurs de l'anticorps sur la migration des cellules endothéliales, l'angiogenèse et le développement des métastases tumorales (206) (Figure 30). Il a été décrit dans la littérature une augmentation de l'expression de CD146 lorsque les cellules sont traitées avec certains agents anticancéreux tels que le Vorinostat, un inhibiteur des histones déacétylases. Ainsi, le fait de traiter des tumeurs avec l'anticorps AA98 en complément du Vorinostat permet d'augmenter les effets cytotoxiques du Vorinostat sur les cellules cancéreuses avec une diminution de l'angiogenèse, de la croissance tumorale et des métastases (245).

Mais ces deux anticorps, ABX-MA1 et AA98, ne ciblent pas spécifiquement la molécule CD146 tumorale puisqu'ils semblent agir essentiellement sur la vascularisation tumorale.

Notre équipe a récemment généré un anticorps appelé M2J-1 qui reconnaît spécifiquement la forme soluble de CD146. Il diminue la prolifération des cellules cancéreuses tout en induisant leur apoptose *in vitro*. *In vivo*, des expériences de xénogreffes de cellules cancéreuses de mélanome et de pancréas chez la souris ont permis de montrer qu'un traitement avec cet anticorps diminue la croissance tumorale par un effet pro-apoptotique sur les cellules cancéreuses et une diminution de la vascularisation intra-tumorale. Une stratégie thérapeutique ciblant CD146 soluble pourrait donc être envisagée en thérapie anti-angiogénique anti-tumorale (175) (Figures 30 et 31).

Figure 31 : Les anticorps inhibiteurs associés aux différents isoformes durant la croissance tumorale et l'angiogèse

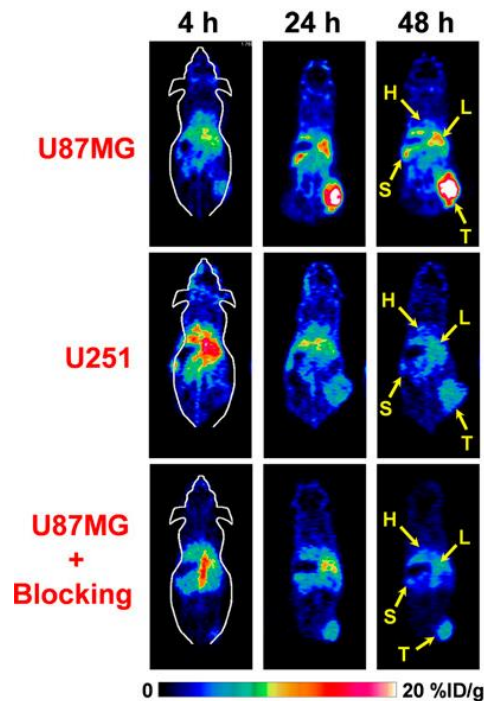


(D'après Stalin, Chapter Intech, 2016).

4) CD146 en imagerie

CD146 étant une cible moléculaire potentielle pour le diagnostic et la thérapie ciblée dans différents cancers, l'équipe de Dr Cai a récemment généré un anticorps monoclonal anti-CD146 appelé YY146 qu'elle a radiomarqué avec du ^{64}Cu -NOTA (246–248) et du ^{89}Zr -Df (249,250). Elle a ensuite utilisé ce radiotracteur en imagerie, quantitative et non invasive, TEP scan (Tomographie par Emission de Positons) afin de voir l'expression de CD146 dans le glioblastome (246,250), le cancer du poumon (247,248) et le carcinome hépatocellulaire (249). Ce radiotracteur permet d'imager des tumeurs ayant différents niveaux de CD146 et cela de façon spécifique (Figure 32). Il peut donc détecter des tumeurs précoces, permettre d'établir un pronostic et servir d'aide lors de la résection chirurgicale.

Figure 32 : Imagerie TEP avec du ^{64}Cu -NOTA-YY146 dans des souris xéno greffées avec des cellules de glioblastome



Images TEP des plans coronaires des tumeurs U87MG et U251. Il y a une augmentation de l'absorption du traceur dans les xéno greffes de tumeurs U87MG (en haut). En revanche, il y a une absorption tumorale plus faible chez les tumeurs U251 (milieu) ou lorsque des souris portant des tumeurs U87MG ont été pré-injectées avec une dose bloquante d'anticorps non marqué (en bas).

H= cœur ; L= foie ; S= rate ; T= tumeur (D'après Yang et al., PNAS, 2015)

VI. Fonctions dans les autres pathologies

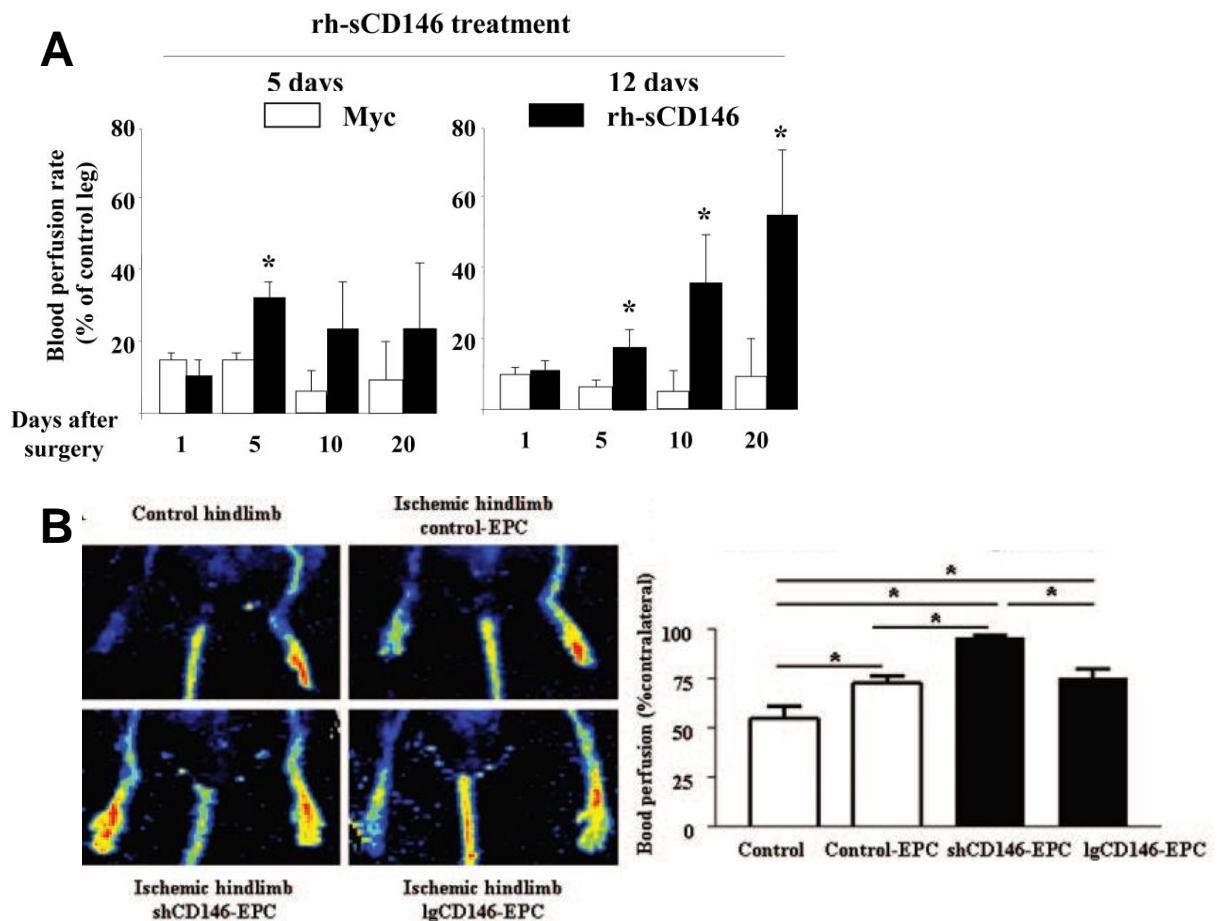
1) Pathologies ischémiques

La molécule CD146 soluble possède des propriétés angiogéniques et augmente la migration, la prolifération et la capacité à établir des structures vasculaires en matrigel. L'intérêt thérapeutique potentiel de CD146 soluble a été testé dans un modèle d'ischémie des membres inférieurs. Une injection locale de CD146 soluble réduit significativement l'auto-amputation, la nécrose tissulaire, l'inflammation, la fibrose et augmente le flux sanguin. L'ensemble de ces données permet d'établir que CD146 soluble possède des propriétés chémoattractantes et angiogéniques en induisant une néo-vascularisation fonctionnelle *in vivo* (Figure 33 A). Les

propriétés angiogéniques de CD146 soluble sont médiées par le CD146 membranaire. En effet, des expériences de siRNA dirigés contre CD146 ne permettent plus aux PECs d'être stimulées par CD146 soluble (104).

L'intérêt thérapeutique de CD146 soluble dans l'ischémie des membres inférieurs et le fait que ces effets soient dépendants de l'expression de CD146 membranaire ont amené notre équipe à étudier le rôle des isoformes membranaires de CD146 sur les propriétés angiogéniques des PECs. L'isoforme courte de CD146 est surexprimée dans les PECs en comparaison avec des cellules endothéliales matures et son expression est augmentée par des stimulants pro-angiogéniques (VEGF et SDF-1) qui sont connus pour favoriser la néo-vascularisation post-ischémique. Elle est impliquée dans l'adhésion des PECs à un endothélium activé et également dans la migration et dans la prolifération des PECs. L'isoforme longue est impliquée dans la stabilisation des jonctions au niveau de l'endothélium, ce qui suggère des fonctions dans la régénération des vaisseaux sanguins. De plus, une injection de PECs surexprimant l'isoforme courte de CD146 augmente l'incorporation des PECs dans le muscle ischémique et améliore la reperfusion sanguine dans un modèle murin d'ischémie des membres inférieurs. Ceci montre l'intérêt potentiel d'une stratégie de thérapie cellulaire avec des PECs surexprimant CD146 court pour le traitement des ischémies périphériques (103) (Figure 33 B).

Figure 33 : Effet de l'injection de CD146 soluble ou de cellules endothéliales progénitrices surexprimant l'isoforme courte ou longue de CD146 sur la reperfusion sanguine dans un modèle d'ischémie de la patte



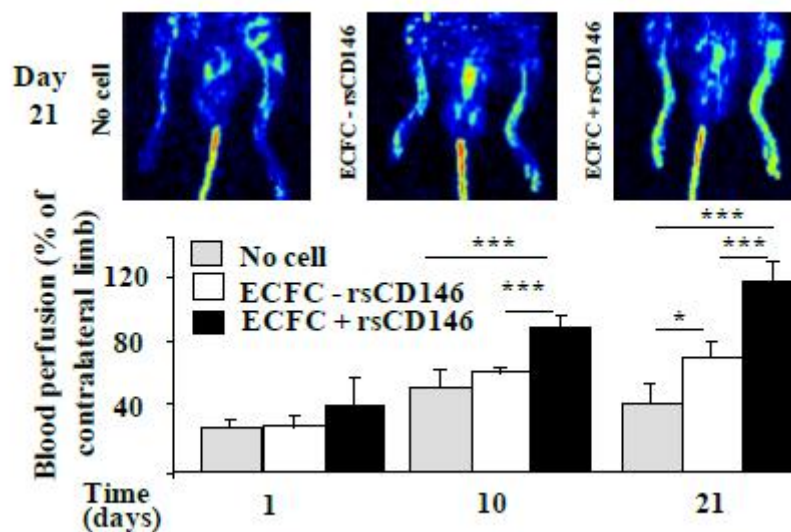
A/ Effet d'une injection locale de CD146 soluble dans un modèle d'ischémie du membre inférieur chez le rat (D'après Harhoury et al., Blood, 2010).

B/ Effet de l'injection de cellules progénitrices endothéliales transitoirement transfectées avec l'isoforme courte ou longue de CD146 dans un modèle d'ischémie du membre inférieur chez la souris NOD-SCID (D'après Kebir et al., Circulation Research, 2010).

Notre équipe a récemment étudié les effets d'un prétraitement des PECs avec du CD146 soluble. Ce prétraitement des PECs augmente leur capacité angiogénique et leur survie à la fois *in vitro* et *in vivo*, dans un modèle murin d'ischémie des membres inférieurs. Une stimulation avec du CD146 soluble provoque le clivage extracellulaire de la forme courte de CD146, entraînant une sécrétion de CD146 soluble. La partie intracellulaire de la forme courte de CD146 est ensuite clivée par l'action de la préséniline-1. Le fragment intracellulaire de l'isoforme courte est ensuite dirigé dans le noyau, où il module la transcription de gènes impliqués dans l'angiogenèse et l'apoptose cellulaire. Ces effets pro-angiogéniques et anti-apoptotiques sont dépendants des deux récepteurs au VEGF (VEGFR-1 et VEGFR-2) qui sont

rapidement phosphorylés par la stimulation avec CD146 soluble. Ces données montrent que CD146 soluble agit sur les PECs grâce à l'interaction avec un large réseau de protéines et l'intégration de leurs voies de signalisation. Le prétraitement des progéniteurs endothéliaux avec du CD146 soluble pourrait donc constituer une nouvelle stratégie utilisable en thérapie vasculaire régénérative (251) (Figure 34).

Figure 34 : Effet de l'injection de PECs prétraités avec du CD146 soluble sur la reperfusion sanguine dans un modèle d'ischémie de la patte



(D'après Stalin et al., Cardiovascular Research, 2016).

2) Pathologies obstétricales

Environ 20 % des femmes fertiles sont touchées par des pertes fœtales spontanées précoces (jusqu'à 12 semaines d'aménorrhée) et 2 % par des pertes fœtales tardives (de 12 à 22 semaines d'aménorrhée). Il s'agit d'un événement pouvant être multi-causal dont les mécanismes sont peu connus.

CD146 est fortement exprimé pendant la gestation et durant la fenêtre implantatoire. Le niveau d'expression de CD146 diminue ensuite de façon rapide pendant les étapes suivantes. L'utilisation d'un anticorps bloquant anti-CD146 (AA98) diminue l'adhésion des blastocystes sur une monocouche de cellules de l'épithélium utérin et diminue la croissance des cellules trophoblastiques *in vitro*. *In vivo*, cet anticorps empêche l'implantation de l'embryon chez la souris via l'inhibition de l'activité des collagénases MMP-2 et MMP-9, l'inhibition de la

prolifération des trophoblastes, la stimulation de l'apoptose et l'inhibition de l'angiogenèse. Une analyse histologique montre que les embryons sont présents dans la corne utérine mais ils sont petits et en mauvais état (252).

De plus, des taux élevés de CD146 soluble ont été mis en évidence chez des femmes présentant des antécédents de fausses couches par rapport à une population contrôle sans fausse couche rapportée (253).

Il a également été montré que CD146 est exprimé par les trophoblastes extravilleux qui permettent d'établir une circulation fœto-maternelle par l'invasion de la décidue et le remodelage des artères utérines, mais il n'est pas détecté sur les syncytiotrophoblastes et les cytotrophoblastes (198). L'expression de CD146 sur les trophoblastes au cours des pré-éclampsies est fortement diminuée voir absente, en rapport avec une baisse des capacités invasives de ces trophoblastes (164).

Dans la continuité de ces travaux, notre équipe a émis l'hypothèse que CD146 soluble pourrait constituer un nouveau facteur physiologique avec des propriétés angiogéniques impliquées dans la régulation du développement vasculaire placentaire en agissant sur les trophoblastes extra-villeux. En utilisant des explants de placenta, il a été montré que CD146 soluble inhibe la croissance des trophoblastes extra-villeux, la capacité de ces trophoblastes à migrer et à former des pseudo-capillaires sur matrigel sans affecter les propriétés prolifératives et apoptotiques des cellules. De plus, il a été observé une diminution progressive, lors des grossesses normales, des taux plasmatiques de CD146 soluble et d'auto-anticorps anti-CD146 au cours des 3 trimestres, phénomène non retrouvé dans la pré-éclampsie et dans les retards de croissance intra-utérins. Les effets prolongés d'une administration de CD146 soluble dans un modèle de rate gestante ont été étudiés. Une injection systémique répétée de CD146 soluble après un accouplement provoque une diminution significative de la fertilité et du nombre d'embryons par portée. Une étude histologique réalisée sur le placenta a montré une diminution de la migration des cellules à glycogène (analogues des trophoblastes extra-villeux chez le rat) chez les rates traitées avec du CD146 soluble (254). La molécule CD146 soluble pourrait donc représenter, chez la femme, un biomarqueur attractif du développement vasculaire placentaire ainsi qu'une cible thérapeutique dans les complications obstétricales dues à une angiogenèse pathologique.

Suite à ces travaux, notre équipe a dosé le CD146 soluble présent dans les surnageants d'embryon afin de voir s'il peut constituer un nouveau biomarqueur de la sélection des embryons lors d'une fécondation *in vitro*. Le milieu de culture embryonnaire de chaque embryon transféré a été recueilli pour la mesure de CD146 soluble par dosage ELISA. Des

concentrations significativement plus élevées de CD146 soluble sont présentes chez les surnageants d'embryons qui ne se sont pas implantés par rapport à ceux qui ont été implantés avec succès (1310 +/- 1152 pg/mL contre 845 +/- 1173 pg/mL) (200).

Ces expériences ont permis de montrer l'importance de CD146 dans l'implantation embryonnaire.

3) Pathologies inflammatoires

a. Les pathologies inflammatoires cutanées

CD146 a été identifié sur des cultures primaires de kératinocytes, mais son expression n'est pas observée sur des coupes d'épiderme sain. Son expression est augmentée dans diverses pathologies cutanées telles que le psoriasis où les kératinocytes suprabasaux expriment du CD146, dans les sarcomes de Kaposi, le lichen plan, sur l'épiderme recouvrant des néoplasmes cutanés ou dans les dermatites chroniques ou aiguës (255).

Notre équipe a montré des taux plus élevés de CD146 soluble chez des patients ayant une sclérodémie comparés à des personnes saines (867.1 ± 32.3 vs 497.7 ± 16.5 ng/mL). Il y a une association significative entre des taux bas de CD146 soluble et la gangrène digitale ou la fibrose pulmonaire, deux manifestations sévères de la maladie. De plus, il y a une sensibilité accrue des souris déficientes pour CD146 au développement de la fibrose dans un modèle murin d'injection de bléomycine cutanée. Cela montre une association entre le développement de la fibrose et l'absence de CD146. Cet effet est reversé par l'injection de la forme soluble, suggérant un effet positif de l'injection de CD146 soluble. L'ensemble de ces données met en évidence un effet bénéfique de CD146/CD146s impliquant la voie WNT sur la physiopathologie de la sclérodémie et ouvre une perspective sur son utilisation en thérapeutique (163).

b. Les pathologies inflammatoires rénales

Certaines fonctions endothéliales, telles que la perméabilité, sont altérées dans de nombreuses pathologies à composante inflammatoire comme les pathologies rénales inflammatoires.

L'analyse de biopsies de patients atteints de néphropathie montre une augmentation de l'expression de CD146 membranaire sur les cellules endothéliales et mésangiales, et une néo-expression sur les cellules tubulaires (256). Il existe une corrélation entre l'expression de CD146 et l'augmentation de la protéinurie, la prolifération endocapillaire et le syndrome inflammatoire. Le taux sérique de CD146 est augmenté dans l'insuffisance rénale chronique et il est corrélée à la sévérité de la maladie chez des patients souffrant de néphropathie diabétique de type 2 (257).

CD146 est donc un acteur crucial dans la pathologie inflammatoire rénale et une cible thérapeutique.

4) Athérosclérose

La présence de CD146 au niveau de l'endothélium et à la surface des leucocytes ainsi que son implication dans la perméabilité vasculaire font de cette molécule un acteur potentiel dans les étapes du développement de l'athérosclérose.

Des études menées chez l'homme ont montré le rôle potentiel de CD146 dans l'athérosclérose. En effet, une première étude a montré l'augmentation du taux sérique de CD146 soluble chez les patients diabétiques de type 1, suggérant ainsi la capacité de biomarqueur de CD146 soluble dans l'athérosclérose. Dans cette étude, l'augmentation du CD146 soluble précède l'IMT (Intima Media Thickness) qui est un marqueur prédictible de la présence de plaques d'athérosclérose (258). De plus, l'expression de CD146 augmente au sein de cellules ou de microvésicules circulantes dans les pathologies cardiovasculaires, renforçant ainsi le caractère de biomarqueur de CD146 dans l'athérosclérose (259,260).

CD146 a également été observé au sein de la plaque d'athérosclérose. En effet, CD146 est exprimé sur les cellules musculaires lisses et les cellules endothéliales, mais également sur les macrophages spumeux, ceci suggère un rôle de CD146 dans la progression de la plaque d'athérosclérose. Les auteurs montrent une corrélation entre l'augmentation du taux de CD146 soluble et l'expression de sa forme membranaire (261). D'autre part, il a été montré une corrélation entre le CD146 membranaire et la présence de MMP-9 au sein de la plaque d'athérosclérose, suggérant un lien entre CD146 et l'instabilité de la plaque d'athérosclérose (262).

Une autre étude montre l'augmentation de CD146 au sein des artères athérosclérotiques des membres inférieurs suite à une amputation ainsi qu'une endartériectomie fémorale comparé à des artères dilatées issues d'anévrisme de l'aorte abdominale et des artères ne présentant pas de plaques d'athérosclérose. CD146 a donc un rôle dans l'angiogenèse lors de la sténose consécutive à l'athérosclérose (263).

VII. Partenaires et voies de signalisation

1) Les partenaires de CD146

La première molécule interagissant avec la partie extracellulaire de CD146 à avoir été décrite est NOF (Neurite Outgrowth Factor). Une transfection stable d'ADN complémentaire codant pour CD146 induit une adhésion des cellules neuronales sur une matrice de NOF. Cependant, peu de données confirment cette interaction dans d'autres espèces que le poulet (146).

Plus récemment, la laminine 411 a été identifiée comme étant un ligand vasculaire de CD146 exprimé par les lymphocytes TH17. Cette interaction entre la laminine 411 et CD146 facilite l'adhésion et la transmigration tissulaire des lymphocytes TH17, ce qui entraîne une augmentation de l'inflammation (264). Une étude réalisée sur des cellules de mélanome humaines montre une co-expression de CD146 et des laminines 421 et 411. Cette étude suggère que cette interaction pourrait faciliter la migration tumorale (265).

Des travaux menés sur des cellules endothéliales et cancéreuses ont permis de découvrir de nouveaux ligands des isoformes de CD146. Une liaison directe entre CD146 et VEGFR-2 a ainsi été montrée grâce à des expériences de co-immunoprécipitation sur des cellules endothéliales. Cette interaction est indispensable à la transduction du signal induit par le VEGF (266). Récemment, notre équipe a montré que l'isoforme courte de CD146 est également associée à VEGFR-1 dans les radeaux lipidiques (251). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle murin déficient pour CD146 où l'absence de CD146 inhibe la formation de vaisseaux induite par le VEGF. Des expériences sur des modèles murins de xélogreffe de cellules cancéreuses ont montré que l'utilisation conjointe d'anticorps anti-VEGF (Bevacizumab) et anti-CD146 (AA98) a un effet synergique sur le développement tumoral (266).

Il a également été montré une interaction entre le CD146 endothélial et la nétrine-1. Les auteurs ont montré une diminution de l'angiogenèse induite par la nétrine-1 dans la souris

déficiente pour CD146 spécifiquement au niveau de l'endothélium et après utilisation d'un anticorps bloquant CD146 (AA98) (207).

D'autres travaux menés dans notre laboratoire ont permis de mettre en évidence grâce à des techniques de biacore et d'ELISA un autre ligand, la galectine-1. C'est une lectine de 14 kDa produite par les cellules endothéliales, épithéliales et interstitielles. La galectine-1 est un inducteur de l'apoptose des cellules endothéliales et se fixe à CD146 via les glycosylations extracellulaires (267). De plus, la galectine-1 active la voie de signalisation du VEGFR-2 via la neuropiline-1 (268), récepteur dont la phosphorylation est dépendante de CD146 (266). Récemment il a été montré une interaction entre CD146 et la galectine-3 qui est connue pour son rôle dans le développement et la progression du cancer, ainsi que dans le développement de métastases. La galectine-3 se lie aux N-glycosylations de CD146 et induit la dimérisation de CD146 suite à une activation de la voie AKT (269).

CD146 interagit également avec WNT5a afin de réguler la migration cellulaire. CD146 active la voie non canonique de WNT5a via JNK (c-Jun amino-terminale Kinase) et inhibe la voie canonique de WNT5a entraînant la dégradation de la β -caténine qui constitue les jonctions adhérentes (270). Récemment, notre équipe a montré que WNT5a induit la phosphorylation de JNK dans des fibroblastes embryonnaires de souris mais cette phosphorylation n'a pas lieu dans les fibroblastes embryonnaires de souris déficientes pour CD146, ce qui suggère qu'il y a une diminution de la voie non canonique de WNT dans ces dernières. Cette étude a également montré une activation de la voie canonique avec WNT3a dans les cellules déficientes pour CD146 spécifiquement (163).

Enfin, notre laboratoire a identifié l'angiomotine p80, grâce à une étude réalisée en spectrométrie de masse, comme étant un récepteur de CD146 soluble. L'angiomotine est une protéine impliquée dans la migration cellulaire, les jonctions entre les cellules et l'angiogenèse. L'interaction de l'angiomotine avec CD146 soluble a un effet pro-angiogénique (174). Elle est présente sur les cellules endothéliales et cancéreuses (175).

2) Les facteurs induisant CD146

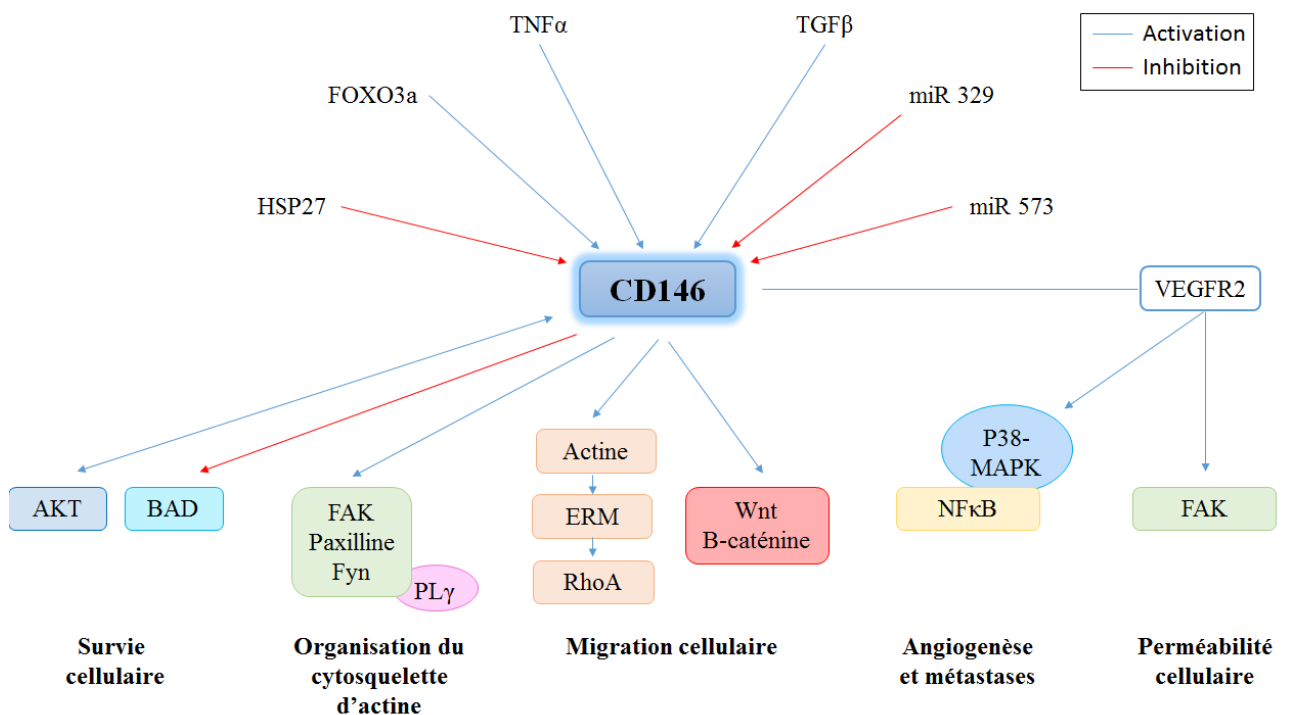
Il existe différents facteurs pouvant moduler l'expression de CD146 (Figure 35) :

- Une stimulation avec du TNF- α augmente la présence de CD146 à la surface des cellules endothéliales (165).
- Le TGF- β 1 augmente la quantité d'ARNm de CD146 dans des hépatocytes en culture préalablement traités au carbonate tétrachloride (CCl₄), qui est un inducteur d'hépatite

aigüe. Cette augmentation d'ARN messager de CD146 semble stimuler la capacité régénérative de ces hépatocytes (271).

- La molécule HSP27 (Heat Shock Protein 27), qui est une molécule chaperonne impliquée notamment dans la différenciation tumorale et la tumorigenèse, inhibe la migration et l'invasion des cellules de mélanome et agit ainsi sur le phénotype tumoral (272). Il a été montré qu'une surexpression de HSP27 dans des lignées de mélanome diminue l'expression de CD146 et augmente l'expression de la E-cadhérine (273).
- Une activation de la protéine AKT par le PD98059 et la Wortmannine, dans des lignées de mélanome, augmente l'expression de CD146 à la membrane cellulaire. Réciproquement, une surexpression de CD146 augmente l'état d'activation d'AKT qui inhibe la protéine BAD (Bcl-2-Associated Deat promoter) augmentant ainsi la survie cellulaire (274).
- Deux microARN, miR329 (275) et miR573 (276), ont également été décrits comme inhibant l'expression de CD146 au sein des cellules cancéreuses.
- Le facteur de transcription FOXO3a régule l'expression transcriptionnelle de CD146 suite à une stimulation par la sémaphorine 3a sur les cellules du cancer du sein (277).

Figure 35 : schéma récapitulatif des partenaires et des voies de signalisation médiées par CD146



3) Les voies de signalisation cellulaire induites par CD146

Différentes voies de signalisation cellulaire induites par l'activation de CD146 ont pu être mises en évidence grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiques ainsi que l'inhibition spécifique de CD146 (Figure 35).

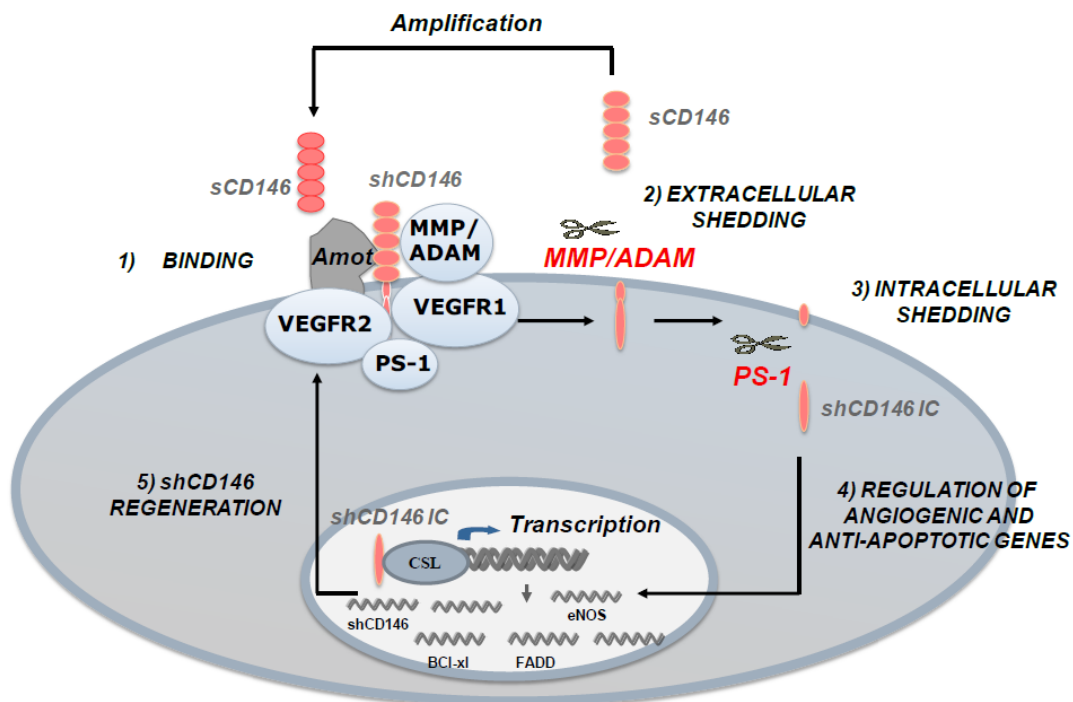
L'activation de CD146 fait intervenir la phosphorylation de p125^{FAK} et de la paxiline, et le recrutement de p59^{fyn}. En effet, l'engagement de CD146 à l'aide de l'anticorps S-endo1 augmente à la fois la libération de calcium intracellulaire et l'entrée de calcium extracellulaire. Cette modulation du flux calcique est médiée par le recrutement et l'activation de p59^{fyn} qui induit la phosphorylation de la PLC γ . L'entrée de calcium entraîne le recrutement de PYK2 et de p130^{cas}. De plus, p59^{fyn} va permettre l'activation de p125^{FAK} ce qui va induire une signalisation cellulaire impliquant la réorganisation du cytosquelette d'actine et permettre une transcription de facteurs qui sont impliqués dans la survie et la migration cellulaire (278,279).

Une autre étude confirme le rôle de CD146 dans l'induction de signaux couplés au cytosquelette d'actine et dans la migration cellulaire. Le domaine cytoplasmique de CD146 interagit avec des protéines liées à l'actine, de la famille ERM (« ezrine-radixine-moesine »). Cela permet le recrutement de ces protéines ERM au niveau des protusions des cellules de mélanome. Ce phénomène induit la formation et l'élongation des microvillis au niveau des protusions. CD146 recrute RhoGDI1 (Rho guanine nucleotide dissociation inhibitory factors 1) via des protéines ERM et séquestre ainsi RhoGDI1 de RhoA, ce qui conduit à une activation de RhoA et une augmentation de la motilité cellulaire (280). Une autre étude montre qu'après stimulation avec WNT5a des cellules du mélanome, CD146 est redistribué au sein d'une structure polarisée nommée W-RAMP (Wnt5a-mediated Receptor–Actin–Myosin Polarity). Ce complexe joue un rôle dans la rétraction membranaire et dans l'orientation de la migration cellulaire impliquant RhoA (281). De plus, le blocage de CD146 par l'utilisation d'ARN interférant a montré l'implication de CD146 dans la voie WNT/ β -caténine. En effet, il y a une diminution de la phosphorylation de la β -caténine médiée par la voie NF κ B/GSK-3 β lorsque que l'expression de CD146 est inhibée. Ceci suggère que CD146 réduit l'activité de la voie WNT/ β caténine par l'activation de la voie NF κ B.(282).

Récemment, notre équipe a étudié l'implication de la forme soluble de CD146 dans la signalisation médiée par CD146. La forme soluble augmente l'activation de VEGFR-1 et VEGFR-2 au sein des progéniteurs endothéliaux. Cette activation est dépendante de la liaison de la forme soluble à l'angiomotine (Amot) ainsi que de l'activation de la forme courte de CD146. Les formes courte et soluble CD146, les VEGFR-1 et -2, l'angiomotine et la

préséniline-1 sont regroupés au sein de radeaux lipidiques. Dans les cellules endothéliales, lorsque CD146 soluble se lie à l'angiomotine, il induit le clivage extracellulaire de l'isoforme courte de CD146 (shCD146) par des métalloprotéases qui est suivi par un clivage intracellulaire dépendant de la préséniline-1 (PS-1). Le fragment intracellulaire (shCD146 IC) migre ensuite vers le noyau et interagit avec CSL pour induire la transcription des gènes pro-angiogéniques comme *eNOS* et l'isoforme courte de CD146, conduisant à la régénération de la forme courte à la membrane par insertion de protéines néo-synthétisées, mais aussi à réguler les gènes de survie comme *FADD* et *Bcl-xL* (251) (Figure 36). Au sein des cellules cancéreuses, il a été montré que la forme soluble de CD146 active une protéine oncogène c-myc qui est impliquée dans la prolifération, l'apoptose, la sénescence et la migration des cellules cancéreuses. Cette activation est médiée par la phosphorylation d'ERK et est indépendante du VEGF (175).

Figure 36 : Mécanisme d'action de CD146 soluble sur les cellules endothéliales



(D'après Stalin et al., Cardiovascular Research, 2016)

Résultats

Partie 1: Identification des enzymes impliquées dans le clivage des deux isoformes membranaires de CD146 et de deux nouvelles isoformes de CD146 soluble générées par épissage alternatif

Introduction

La molécule CD146 existe sous deux isoformes membranaires : une isoforme longue et une isoforme courte. Elles résultent d'un épissage alternatif de l'exon 15 (157). Ces 2 isoformes diffèrent par la longueur de leur région cytoplasmique (63 et 21 acides aminés) et leurs fonctions. L'isoforme longue est localisée au niveau jonctionnel ce qui lui confère des fonctions structurales et une implication dans la transmigration des monocytes et dans la perméabilité cellulaire (165). L'isoforme courte est localisée préférentiellement au niveau de la membrane des cellules endothéliales et possède des fonctions angiogéniques (103).

La molécule CD146 existe également sous une forme soluble de 100 kDa qui a été mise en évidence dans le surnageant de culture de cellules endothéliales (160). Elle est détectable et quantifiable dans le sérum humain. Sa concentration sérique varie dans différentes pathologies. Cette forme soluble provient en majeure partie de la protéolyse du CD146 membranaire par des métalloprotéases dont l'activité est stimulée par le TNF- α (165). En utilisant une molécule recombinante CD146 soluble (rh-sCD146), il a été montré *in vitro* et *in vivo* que CD146 soluble présente des effets angiogéniques (104) en augmentant de façon importante les capacités de migration, de prolifération et de formation de pseudo-capillaires des cellules endothéliales. Des expériences réalisées *in vivo* dans un modèle d'ischémie de la patte chez le rat par ligature de l'artère fémorale montrent que des injections locales répétées de CD146 soluble s'accompagnent d'une augmentation de la densité capillaire et du taux de perfusion sanguine de la patte, confirmant l'effet angiogénique important de la molécule (104).

CD146 soluble apparait donc comme une molécule ayant des propriétés angiogéniques proches de celles du VEGF. Or, il a été décrit de nombreuses isoformes du VEGF, générées en particulier par épissage alternatif.

L'objectif de ce travail a donc été, dans un premier temps, d'étudier le mécanisme de clivage des isoformes courte et longue de CD146 dans les cellules endothéliales ; puis, dans un deuxième temps, de rechercher l'existence de formes solubles provenant d'un épissage alternatif et d'étudier leur potentiel angiogénique.

Article

Identification of two novel pro-angiogenic spliced variants of soluble CD146 with differential expression and regulation: involvement in systemic sclerosis

Marie NOLLET^{1*}, Alexandrine FOUCAULT-BERTAUD^{1*}, Richard BACHELIER¹, Anais MOYON^{1,2},
Indumathi SOMASUNDARAM³, Amel ESSAADI¹, Franck PEIRETTI⁴, Aurélie S. LEROYER¹,
Benjamin GUILLET^{1,2}, Brigitte GRANEL^{1,5}, Françoise DIGNAT-GEORGE¹, Nathalie BARDIN¹,
and Marcel BLOT-CHABAUD¹

1- INSERM UMR-S 1076, Aix-Marseille University, VRCM, Faculty of Pharmacy, Marseille, France.

2- CERIMED Aix-Marseille University, Faculty of Medicine, Marseille, France

3- Department of Stem Cell and Regenerative Medicine, Centre for Interdisciplinary Research, D.Y. Patil University, Kolhapur, Maharashtra, India.

4- INSERM UMR-S 1062, Aix-Marseille University, NORT, Faculty of Medicine, Marseille, France

5- Internal Medicine Department, Assistance publique-Hôpitaux de Marseille (AP-HM), CHU of Marseille, 13915 Marseille, France

**Both authors contributed equally to the work*

Short title: *Multiple sCD146 forms stimulate angiogenesis*

Total word count: 6595

Subject codes: *Angiogenesis, Vascular Biology, Vascular Disease, Biomarkers*

Correspondence : *D. Marcel Blot-Chabaud, PhD, UMR-S 1076 INSERM-Laboratoire d'Hématologie et d'Immunologie, UFR de Pharmacie, 27 Bd J. Moulin, 13385 Marseille Cedex 5*

Phone number: (+33) 4 91 83 56 85 Fax number: (+33) 4 91 83 56 02

E-mail address: marcel.blot-chabaud@laposte.net

Abstract

Rationale- CD146 is a glycoprotein with a major role in the vascular system. Two membrane isoforms and one soluble form have been described. The soluble CD146 (sCD146), which is in part the result of the shedding of the membrane isoforms, has been reported to promote angiogenesis. However, proteinases involved in this shedding are unknown and the possibility that spliced variants of sCD146 could also contribute to angiogenesis is still unexplored.

Objective- In this study, we 1/ identified the proteinases involved in the shedding of the two membrane isoforms of CD146, 2/ searched for spliced sCD146 variants and studied their role in angiogenesis, and 3/ evaluated the involvement of these new variants in systemic sclerosis, which is characterized by an impaired angiogenesis.

Methods and Results- Experiments showed that the short and long membrane isoforms of CD146 are shed through Tace and ADAM10, respectively. In addition, RNA seq experiments revealed the existence of two alternative sCD146 mRNA spliced variants, I5-13-sCD146 and I10-sCD146. The proteins generated from these mRNA splice variants promote angiogenesis *in vitro* and *in vivo*, in a mouse model of limb ischemia. Of interest, spliced variants of sCD146 are differentially expressed in organs and differentially regulated. Thus, I5-13-sCD146 is increased by WNT5a and TNF and is increased in the sera of patients with systemic sclerosis (SSc). In contrast, I10-sCD146 is decreased by VEGF, netrin and WNT3a, and is decreased in SSc.

Conclusions- Together, these findings establish that sCD146 exists as different soluble forms generated by the shedding of the membrane isoforms and by alternative splicing of the primary transcript. These different forms are able to support angiogenesis and are differentially expressed and regulated, in particular in SSc, attesting for their involvement in physiology and pathology.

Abbreviation

sCD146 Soluble CD146

SSc Systemic sclerosis

ECFC Endothelial Colony Forming Cells

HUVEC Human umbilical venous endothelial cells

Lg CD146 Long isoform of CD146

Sh CD146 Short isoform of CD146

ICD Intracellular domain

AMD Age-related macular degeneration

Rh-sCD146 recombinant human soluble CD146

Introduction

CD146 is a transmembrane glycoprotein expressed essentially on the vascular system. It displays numerous functions related to vascular permeability, inflammation and angiogenesis. CD146 is expressed as two different isoforms. In endothelial cells, the long isoform is a component of the endothelial junction primarily involved in the control of cell-cell cohesion, vascular permeability and tissue architecture¹. In contrast, the short isoform is rather expressed at the apical membrane and displays angiogenic functions¹. In addition to these two membrane isoforms, a soluble form (sCD146) has been described for the first time by our team². It is detectable in the human serum and its level is modulated in different pathologies, such as inflammatory bowel diseases³, pathological pregnancies⁴, chronic renal failure² and cancer⁵. Soluble CD146 can be generated by the shedding of CD146 membrane isoforms and has recently been shown to be involved in angiogenesis⁶. Indeed, it displays chemotactic effects on vascular cells and it is able to stimulate endothelial cell proliferation, migration and ability to generate vascular structures in matrigel. In addition, our team has shown that it was able to increase neo-vascularization and to restore blood flow in an animal model of hindlimb ischemia⁷. At present, the mechanism of generation of sCD146 is unknown. It has been shown that it could depend on a GM6001-

sensitive mechanism⁸ and that it is Ca²⁺-dependent⁹. The avian homolog of CD146, gicerin, has been largely studied by the group of Dunon. As for humans, two different isoforms of membrane CD146 (short and long) have been described. Of interest, a soluble form generated by alternate splicing with retention of intron 11 has been described. This isoform is only constituted by the extracellular part of the molecule and differs from the membrane forms at the C terminal part¹⁰. This result indicates that CD146 can exist as different isoforms not only for the membrane forms but also for the soluble ones. Thus, we sought to determine whether soluble CD146 proteins could also result from alternative splicing in human.

Deciphering the different molecules involved in angiogenesis, their mechanism of generation and action remains an important challenge and may provide new approaches for the treatment of ischemic diseases but also of angiogenesis-related pathologies, as AMD and cancer. Soluble CD146 constitutes a major molecule involved in physiological and pathological angiogenesis^{6,7}. We therefore investigated 1/ the mechanism of shedding of long and short CD146 isoforms that generates sCD146 in endothelial cells; 2/ the potential existence of spliced sCD146 isoforms; and 3/ their respective roles in angiogenesis.

Methods

Cells

Endothelial Colony Forming Cells (ECFC) were cultured in endothelial EGM-2 MV medium Clonetics, Walkersville, USA), as previously described¹¹.

HUVEC were obtained as previously described and were cultured in EGM2 medium.

For stimulation experiments, cells were maintained for 3 hours in basal medium and then stimulated.

Cell proliferation assay

Experiments were performed as previously described⁶. Results were expressed as arbitrary units.

Experiments were performed in triplicates.

Endothelial cell tube formation in spheroids

Formation of spheroid experiments was performed as previously described¹².

RNA isolation, reverse transcription and real time PCR

Total cellular RNA was isolated from cells, reverse transcribed into cDNA and the resulting cDNA was subjected to qPCR as previously described⁶. Forward and reverse specific primer sequences are given in supplementary table 1. The values given refer to the number of transcript copies.

Co-immunoprecipitation experiments

Experiments were performed as previously described¹³.

Western-blot analysis

Western-blot analysis was performed as previously described⁸. Membranes were probed with specific primary antibodies (7A4 diluted 1/3000, actine diluted 1/5000, Tace and ADAM10 diluted 1/1000, I10-sCD146 and I5-13-sCD146 diluted 1/250) followed by secondary antibodies coupled to peroxidase.

Blots were revealed with the ECL substrate (Pierce). Membranes probed with various antibodies were stripped between antibodies.

Yolk sac membrane assay

The yolk sac membrane (YSM) assay was performed using a modified protocol as previously described¹⁴.

Lipid raft preparation

Lipid rafts were isolated as previously described¹⁵ by sucrose density gradient centrifugation of cells treated with non-ionic detergents.

Immunofluorescence experiment

The localization of the different isoforms of CD146 and ADAM10/Tace was examined in cells seeded on coverslip. Cells were fixed 10 minutes with paraformaldehyde at room temperature, then permeabilized with saponin (0.2%) then incubated during 30 minutes at room temperature with the anti-CD146 antibodies (1/100) and anti-Tace (1/200) or anti-ADAM10 (1/100) antibodies. After 3 rinses in PBS, cells were incubated with a secondary antibody associated to a fluorescent probe. In some experiments, the nucleus was stained with DAPI.

In sections of muscles from ischemic mice, vascularisation was visualized with isolectin B4 (Lifetechnologies, reference I21411) (1/100). Cells and tissue sections were examined by fluorescence microscopy (Leica sp5, Leica, Nanterre, France).

Induction of hind limb ischemia in mice

Female mice were subjected to unilateral hind limb ischemia by complete resection of the entire left femoral artery. Laser-doppler tissue imaging showed that obstruction of the left common femoral artery decreased blood perfusion by about 50% at day 1. After surgery, animals were split in four treatment groups: one control group injected in ischemic adductor muscles twice a week with PBS for 28 days;

three experimental groups treated as the control groups with the three different recombinant human soluble CD146 (rh-sCD146, rh-I5-13-sCD146, rh-I10-sCD146) 2 µg.

Supplemental material is given in Online supplement.

RESULTS

Soluble CD146 is generated both by shedding of membrane CD146 and alternative splicing

Soluble CD146 secreted by ECFC was evaluated in control condition and after stimulation with TNF. Experiments were performed in the absence or presence of the pan-matrix metalloprotease inhibitor GM6001 in order to estimate the relative contribution of shed and spliced forms. Results showed that the GM6001-dependent part of sCD146 corresponds to around 75% of the total secretion. Therefore, 25% of the total secretion corresponds to a GM6001-resistant secretion (figure 1A).

We performed the same type of experiments in the presence of a furin convertase inhibitor (IF). We observed that both in control and TNF conditions, IF inhibited sCD146 secretion. Of interest in both conditions, the fraction of the secretion resistant to IF was similar (figure 1B).

Finally, we used different TIMP to inhibit sCD146 secretion (figure 1C). Results showed that TIMP-1 (1 µg/ml) was able to reduce sCD146 secretion in both conditions, TIMP-3 was able to reduce sCD146 secretion only when the cells were treated with TNF, and no effect of TIMP-2 (1 µg/ml) was observed.

Long CD146 isoform generates soluble CD146 through an ADAM10-dependent shedding

We analyzed the influence of long (lgCD146 siRNA) and short (shCD146 siRNA) CD146 siRNA on sCD146 secretion in control condition. We observed (figure 2A) that, whereas lgCD146 siRNA reduced sCD146 secretion by around 75%, there was no effect of shCD146 siRNA. This indicates that in control condition, only the long CD146 isoform is involved in sCD146 secretion.

In view of the inhibitory effects of TIMPs on sCD146 secretion in control condition (effect of TIMP-1), we tested the effect of siRNA targeting ADAM10, MT1-MMP and MMP-2. The effect of siRNA targeting Tace was also tested, as a control. Results (figure 2B) showed that only ADAM10 siRNA was able to inhibit sCD146 secretion and that the effect was similar to that of GM6001. Supplementary figure 1 shows the efficiency of siRNA targeting MT1-MMP, MMP2, ADAM10 and Tace on RNA (A) and protein (B) expression.

To confirm this result, we performed a co-immunoprecipitation experiment and showed that, in control condition, lgCD146 co-immunoprecipitated with ADAM10 whereas shCD146 and ADAM10 did not

(figure 2C). By immunofluorescence, we showed that IgCD146 colocalized with ADAM10, both at the junction of endothelial cells and in the perinuclear area, in confluent ECFC. They were also colocalized in the intracellular compartment in non-confluent cells (figure 2D). The colocalization of IgCD146 and ADAM10 at the cellular junction in confluent cells was confirmed in another endothelial cell type, HUVEC (see supplementary figure 2). As IgCD146 is mainly expressed at the junction of endothelial cells, we tested the effect of ADAM10 silencing and over-expression on the cellular permeability, as determined by dextran permeability (figure 2E and F). Results show that treatment of ECFC with ADAM10 siRNA or transfection of the cells with the ADAM10 plasmid respectively decreased and increased their permeability to dextran, whereas treatment with Tace siRNA or transfection with Tace plasmid did not modify it.

To confirm these results, we over-expressed IgCD146 isoform in CHO cells by transfecting the plasmid containing this form. A stable clone expressing a high amount of IgCD146 was selected (Supplementary figure 3A). This clone was transiently transfected with a plasmid encoding for ADAM10 and the effect was observed on sCD146 secretion. Results (Supplementary figure 3B) show that in the presence of ADAM10, sCD146 secretion was significantly increased. Finally, the effect of ADAM10 transfection was observed on the permeability of CHO stably transfected or not with IgCD146 (CHO-IgCD146 and CHO-C, respectively). Results showed that the permeability of CHO-IgCD146 was significantly increased in the presence of ADAM10 whereas there is no effect of ADAM10 on CHO-C, (Supplementary figure 3C).

Short CD146 isoform generates soluble CD146 through a Tace-dependent shedding

We analyzed the influence of long (IgCD146 siRNA) and short (shCD146 siRNA) CD146 siRNA on sCD146 secretion after 24h of treatment with TNF 20 ng/ml by comparison with the control condition. We confirmed (figure 3A) that, in control condition, only IgCD146 siRNA reduced sCD146 secretion and observed that, under TNF, both IgCD146 and shCD146 siRNA reduced sCD146 secretion. IgCD146 siRNA reduced sCD146 secretion by about 60% and shCD146 siRNA reduced it by about 25%. We thus used different siRNA to identify the proteinases involved in shCD146 shedding. In view of the effects of TIMPs on sCD146 secretion under TNF (inhibition by TIMP-1 and TIMP-3), we tested the effect of

siRNA targeting ADAM10, MT1-MMP and Tace. Results (figure 3B) showed that both ADAM10 siRNA and Tace siRNA were able to inhibit sCD146 secretion. Of interest, ADAM10 and Tace siRNA reduced sCD146 secretion by 60% and 25 %, respectively, as observed with IgCD146 and shCD146 siRNA. This result suggested that, as IgCD146 is shed by ADAM10, shCD146 is shed by Tace.

To confirm this hypothesis, we performed a co-immunoprecipitation experiment and showed that under TNF, shCD146 co-immunoprecipitated with Tace, and IgCD146 co-immunoprecipitated with ADAM10 (figure 3C). By immunofluorescence, we showed that shCD146 colocalized with Tace in ECFC cells under TNF. In confluent cells, shCD146 colocalized with Tace at the membrane and in the nucleus, whereas, in non confluent cells, they essentially co-localized around the nucleus and at the membrane ruffles of migrating cells. As shCD146 was recently described by our group to be present in lipid rafts of endothelial cells, and as Tace was also described in this cellular fraction¹⁶, we analyzed the lipid raft fractions of ECFC in control condition and under TNF. In these experiments, GM6001 10 μ M was added to the cells in order to avoid the shedding of the molecule (figure 3E). Results show that, in control condition, no shCD146 was observed in lipid rafts. In contrast, under TNF, both shCD146 and Tace were present in this cellular fraction.

To confirm these results, we over-expressed shCD146 isoform in CHO cells by transfecting the plasmid containing this form. A stable clone expressing a high amount of shCD146 was selected (Supplementary figure 3A). This clone was transiently transfected with a plasmid encoding for Tace and the effect was observed on sCD146 secretion. Results (Supplementary figure 3D) showed that in the presence of Tace, sCD146 secretion was significantly increased.

Additional forms of soluble CD146 are generated by alternative splicing

Since a fraction of the sCD146 secretion was GM6001-insensitive (See figure 1), we hypothesized that this fraction could be due to the generation of additional forms of sCD146 generated by alternative splicing. To test this hypothesis, we performed RNA seq on ECFC cells. Results showed the existence of at least two additional isoforms of sCD146.

One of these isoforms contained the intron 10 of the molecule (I10-sCD146 isoform). Another one contained both the introns 5 and 13 of the molecule (I5-13-sCD146 isoform). Figure 4A gives a schematic

representation of these two isoforms in comparison with the shed form and supplementary tables 3 and 4 give the sequences of these new isoforms. We verified the expression of I10-sCD146 and I5-13-sCD146 transcripts in ECFC and in other endothelial cells, HUVEC. Results show that both transcripts are present a (figure 4B) in ECFC and HUVEC and that they are expressed as protein as demonstrated by immunofluorescence on ECFC (figure 4C) and by western-blot in ECFC supernatants (figure 4D). We tested the effect of different pro-angiogenic molecules on the expression of the two variants. Of interest, they are differentially modulated. Indeed, I5-13-sCD146 was up-regulated at the mRNA level by TNF and WNT5a whereas it was not modified by the shed form of CD146, VEGF, TGF β , netrin and WNT3a. In contrast, I10-sCD146 was not up-regulated at the mRNA level by these different factors. The mRNA level of I10-sCD146 variant was even down-regulated by VEGF, netrin and WNT3a (figure 4E).

I5-13-sCD146 and I10-sCD146 isoforms of sCD146 display pro-angiogenic effects *in vitro* and *in vivo*

Since ECFC constitute a useful model for *ex vivo* angiogenesis studies, we evaluated the effect of the two spliced sCD146 isoforms (I10 and I5-13) on ECFC proliferation. Experiments were performed in the presence of GM6001 in order to prevent membrane CD146 shedding. Results showed that both siRNA targeting I10-sCD146 and I5-13-sCD146 inhibited the proliferation of ECFC (figure 5A). The efficiency of both siRNA was verified (Supplementary figure 1C). Plasmids encoding for both isoforms were also transfected into ECFC to examine their effect on proliferation. Results (figure 5B) show that both plasmids significantly increased the proliferation. The angiogenic potential of these two sCD146 isoforms was also estimated after generation of the recombinant proteins. Recombinant I10-sCD146 and I5-13-sCD146 proteins (rh-I10-sCD146 and rh-I5-13-sCD146, respectively) were produced and characterized (Supplementary figure 4). Their effect was tested on the proliferation of ECFC and compared to that of the recombinant shed sCD146 form (rh-sCD146) (figure 5C). Results show that rh-I10-sCD146, rh-I5-13-sCD146 and rh-sCD146 increased ECFC proliferation. They also increased vascularisation in a yolk sac membrane assay (figure 5D and supplementary figures 5 and 6). We also performed experiments of capillary-like formation in 3D (spheroid experiments) with the three recombinant proteins. Results show

that the three recombinant proteins increased the ability to generate pseudo-capillaries, as measured by the number of sprouts, branch points and cumulative sprout length.

Pro-angiogenic properties of the different forms of sCD146 led us to investigate their angiogenic effect in a mouse model of hind limb ischemia. Ischemic mice were locally treated twice a week with 2µg of rh-sCD146, rh-I10-sCD146 and rh-I5-13-sCD146 for 28 days and blood flow was estimated by laser-Doppler. Results show that the three forms were able to increase blood flow as compared to animals treated with PBS (figure 6A and B). Labelling of muscle with isolectin B4 showed that vascularisation was increased in animals treated with rh-I10-sCD146, rh-I5-13-sCD146 and rh-sCD146, as compared to control animals treated with PBS (figure 6C). Finally, angiography pictures showed also an increase in the number of vessels in the legs treated with rh-I10-sCD146, rh-I5-13-sCD146 and rh-sCD146, as compared to legs treated with PBS (figure 6D).

I5-13-sCD146 and I10-sCD146 are differentially expressed and modulated in systemic sclerosis

We analyzed the mRNA levels of the newly identified sCD146 variants using human tissue array. Results are given in figure 7A. Whereas many organs did not express I5-13-sCD146 or I10-sCD146, lung, lymph node, or rectum, highly expressed the two isoforms of sCD146. Of interest, peripheral blood lymphocytes expressed high levels of I5-13-sCD146 but did not express I10-sCD146.

Since I5-13-sCD146 and I10-sCD146 are highly expressed in lung and differentially modulated by TNF and WNT5a/3a, we decided to focus on the expression of these isoforms in pathological conditions and in particular in systemic sclerosis (SSc) which is an autoimmune disorder characterized by dysregulated angiogenesis and pulmonary fibrosis among the most serious complications. We thus analyzed the expression of I5-13-sCD146 and I10-sCD146 in the sera of patients with SSc, as compared to control patients (Figure 7b). Results show that I5-13-sCD146 is significantly increased in patients with SSc whereas I10-sCD146 is decreased.

Discussion

In this study, we demonstrate that multiple isoforms of sCD146 are found in the soluble compartment and determined their mechanisms of generation. We identified for the first time the proteases involved in the shedding of both membrane CD146 isoforms and reported the existence of two supplementary isoforms generated by alternative splicing and encoding for new sCD146 proteins. These isoforms are secreted by endothelial cells and also display angiogenic properties. The fact that different sCD146 isoforms exist with the same physiological function highlights the importance of the molecule, as reported for VEGF, and suggests that they could be differentially regulated in physiology and/or pathology.

Concerning the shed form of CD146, we have demonstrated that it can be generated by two different ADAMs as a function of the membrane CD146 isoform. Indeed, the long form is shed by ADAM10 whereas the short form is shed by Tace. This indicates that the two shed forms of CD146 might probably differ by a couple of amino acids since ADAM10 and Tace do not cleave the same sequences of amino acids and that these shedding might be differentially regulated. Although it is not currently possible to know the exact difference in amino acids between the two forms, it will be interesting to further study this difference to check whether it is linked to different functional effects. Concerning the regulation, we have recently shown that the short isoform of CD146 displayed a complete proteolytic processing with the shedding of the extracellular part followed by the shedding of the intracellular part through presenilin-1, generating an intracellular domain (shCD146-ICD). In contrast, the long isoform displayed only an extracellular shedding¹³. We showed that the short CD146 isoform could thus display direct transcriptional effects through shCD146-ICD translocation into the nucleus. In the present study, we show that the ADAM involved in shCD146 shedding is Tace. Of interest Tace and presenilin-1 are often associated to generate sequential shedding of proteins. Thus, notch is also processed through these two molecules, leading to the generation of NICD with transcriptional effects¹⁷. Further studies will be necessary to characterize factors involved in the specific shedding of one or the other form of CD146.

In addition to the shed form of CD146, our study shows that endothelial cells are able to secrete at least two other forms of sCD146. These two isoforms are generated by alternative splicing and differ from the shed form at the C- terminal part for I10-sCD146 and at both the N- and C- terminal parts for I5-13-sCD146. These isoforms are also able to stimulate angiogenesis both *in vitro* and *in vivo*. Different angiogenic factors have been shown to exist as different isoforms. Thus, the major angiogenic molecule VEGF displays many different isoforms¹⁸. These isoforms display different receptors, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 and neuropilin that can be expressed in distinct cells and affect angiogenesis or lymphangiogenesis¹⁹. Of interest, different isoforms can also bind the same receptor and induce different signal transduction and trafficking that will elicit diverse cellular outcome²⁰. Recently, both pro-angiogenic and anti-angiogenic isoforms of VEGF have been described. This is of major interest since in tumors both types of molecules are expressed. However, they are both inhibited by anti-VEGF molecules as bevacizumab, reducing the effect of the therapy²¹. In our study, only pro-angiogenic molecules have been found. It is probable that many other isoforms exist in addition to these two new forms and an exhaustive work to find them out will be necessary. Another interesting question to be issued will be the complementary effects of these different isoforms on angiogenesis. Indeed, we will have to examine whether these different forms display additive or synergistic effects on angiogenesis. Along this line we can hypothesize that they could affect different steps of the angiogenic process. It will therefore be of interest to identify their receptors. Concerning the shed form of sCD146, we have shown that it binds the p80 isoform of angiomin to generate its effects⁶. Whether another isoform of angiomin, as angiomin p130 or angiomin-like 1 or 2, or another protein is involved will be the goal of future researches. For VEGFs, at least four different receptors have been identified, VEGFR1-2-3 and neuropilin-1. These receptors are involved in angiogenesis but also in lymphangiogenesis. Whether one or several of the sCD146 forms is involved in lymphangiogenesis will have to be tested. Finally, we can also hypothesize that these isoforms could be involved in other physiological processes. Along this line, we have shown that the shed form of sCD146 is also involved in inflammation. Indeed, it is able to bind monocytes to increase their transendothelial migration. These new isoforms of sCD146 could thus also display roles in inflammation, or in immunity, as described for the VEGF164²².

Of interest, we have shown that the regulation of the two new splice variants of sCD146 is different since I5-13-sCD146 is up-regulated at the mRNA level by WNT5a and TNF whereas I10-sCD146 is not. In addition, I5-13-sCD146 is expressed in lymphocytes whereas I10 is not. This is in favor of different roles and regulatory pathways for each isoform. The effect of WNT5a on I5-13-sCD146 and its high expression in lung and lymphocytes prompted us to analyze its expression in the sera of patients with systemic sclerosis (SSc). Indeed, dysregulated angiogenesis plays a major role in the development of this pathology and abnormalities in many factors regulating angiogenesis have been reported²³. Thus, VEGF, PDGF, FGF-2 and PlGF are increased in patients with SSc whereas the pro-angiogenic HGF is decreased. In addition, it was reported that Th17 lymphocytes express CD146 and that their number was increased in human autoimmune diseases²⁴. Finally, in a recent study, we have reported for the first time that CD146/sCD146 is involved in the fibrotic process during SSc, in particular in the pulmonary fibrosis²⁵. We showed that CD146/CD146s and WNT signalling pathways were inter-related and led to the pro-fibrotic state. In the present study, we extend these results by showing that I5-13-sCD146 splice variant is increased by WNT5a and TNF, and that the protein is significantly enhanced in SSc patients whereas I10-sCD146 is decreased by WNT3A and VEGF, and is decreased in SSc. The observed regulation of the two isoforms in the sera of patients is in agreement with the described increase of TNF, Wnt3a and VEGF in SSc patients. This result is important since it confirms the involvement of CD146/sCD146 in SSc and shows that different pro-angiogenic forms of sCD146 may be involved in the development of the pathology, paving the way for therapy.

Finally, this study opens new perspectives for the study of CD146/sCD146. Indeed, it will now be of interest to exhaustively investigate all the spliced isoforms of sCD146, as it has been performed for VEGF, in order to examine their functions and identify their receptor and signalling pathways. Further studies will also have to be performed to examine whether cells that do not express the membrane forms of CD146 could express these isoforms. Indeed, expression of CD146 by the different cells present in the organism is generally based on the expression of the membrane forms. One can wonder whether some cells could express one or several of these spliced isoforms of sCD146 without expressing the membrane form of CD146. Thus, in our study, we have shown that lymphocytes express

a high level of mRNA encoding for the I5-13-sCD146 isoform. Up to now, only Th17 lymphocytes have been shown to express CD146. However, in a physiological context, Th17 cells represent only a very small proportion of lymphocytes. We can thus postulate that other types of lymphocytes, to be identified, could express I5-13-sCD146.

Taken together, our results identified the two proteinases involved in the shedding of the two membrane isoforms of CD146 and identified two new pro-angiogenic isoforms of sCD146 generated by alternative splicing (Supplementary figure 6). One of these isoforms, I5-13-sCD146, appears to be specifically increased in systemic sclerosis. Further studies will now be necessary to further analyze its role in human vascular and inflammatory disorders in order to propose it as a novel target for diagnostic and/or therapeutic purposes.

Acknowledgements

The authors thank Biocytex company for providing rh-sCD146 and Elisa kits.

Sources of funding

This work was supported by research funding from INSERM, Aix-Marseille University and ANR.

Disclosures

The authors declare no competing financial interests.

REFERENCES

1. Kebir A, Harhour K, Guillet B, Liu JW, Foucault-Bertaud A, Lamy E, Kaspi E, Elganfoud N, Vely F, Sabatier F, Sampol J, Pisano P, Kruithof EKO, Bardin N, Dignat-George F, Blot-Chabaud M. CD146 short isoform increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. *Circ Res*. 2010;107:66–75.
2. Bardin N, Moal V, Anfosso F, Daniel L, Brunet P, Sampol J, Dignat George F. Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. *Thromb Haemost*. 2003;90:915–920.
3. Bardin N, Reumaux D, Geboes K, Colombel JF, Blot-Chabaud M, Sampol J, Duthilleul P, Dignat-George F. Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2006;12:16–21.
4. Pasquier E, Bardin N, De Saint Martin L, Le Martelot MT, Bohec C, Roche S, Mottier D, Dignat-George F. The first assessment of soluble CD146 in women with unexplained pregnancy loss. A new insight? *Thromb Haemost*. 2005;94:1280–1284.
5. Stalin J, Nollet M, Garigue P, Fernandez S, Vivancos L, Essaadi A, Muller A, Bachelier R, Foucault-Bertaud A, Fugazza L, Leroyer AS, Bardin N, Guillet B, Dignat-George F, Blot-Chabaud M. Targeting soluble CD146 with a neutralizing antibody inhibits vascularization, growth and survival of CD146-positive tumors. *Oncogene*. 2016;35:5489–5500.
6. Stalin J, Harhour K, Hubert L, Subrini C, Lafitte D, Lissitzky J-C, Elganfoud N, Robert S, Foucault-Bertaud A, Kaspi E, Sabatier F, Aurrand-Lions M, Bardin N, Holmgren L, Dignat-George F, Blot-Chabaud M. Soluble melanoma cell adhesion molecule (sMCAM/sCD146) promotes angiogenic effects on endothelial progenitor cells through angiomin. *J Biol Chem*. 2013;288:8991–9000.
7. Harhour K, Kebir A, Guillet B, Foucault-Bertaud A, Voytenko S, Piercecchi-Marti M-D, Berenguer C, Lamy E, Vely F, Pisano P, Ouafik L, Sabatier F, Sampol J, Bardin N, Dignat-George F, Blot-Chabaud M. Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia. *Blood*. 2010;115:3843–3851.
8. Bardin N, Blot-Chabaud M, Despoix N, Kebir A, Harhour K, Arsanto J-P, Espinosa L, Perrin P, Robert S, Vely F, Sabatier F, Le Bivic A, Kaplanski G, Sampol J, Dignat-George F. CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009;29:746–753.
9. Boneberg E-M, Illges H, Legler DF, Fürstenberger G. Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependent process. *Microvasc Res*. 2009;78:325–331.
10. Vainio O, Dunon D, Aïssi F, Dangy JP, McNagny KM, Imhof BA. HEMCAM, an adhesion molecule expressed by c-kit+ hemopoietic progenitors. *J Cell Biol*. 1996;135:1655–1668.
11. Delorme B, Basire A, Gentile C, Sabatier F, Monsonis F, Desouches C, Blot-Chabaud M, Uzan G, Sampol J, Dignat-George F. Presence of endothelial progenitor cells, distinct from mature endothelial cells, within human CD146+ blood cells. *Thromb Haemost*. 2005;94:1270–1279.

12. Korff T, Kimmina S, Martiny-Baron G, Augustin HG. Blood vessel maturation in a 3-dimensional spheroidal coculture model: direct contact with smooth muscle cells regulates endothelial cell quiescence and abrogates VEGF responsiveness. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol.* 2001;15:447–457.
13. Stalin J, Harhoury K, Hubert L, Garrigue P, Nollet M, Essaadi A, Muller A, Foucault-Bertaud A, Bachelier R, Sabatier F, Pisano P, Peiretti F, Leroyer AS, Guillet B, Bardin N, Dignat-George F, Blot-Chabaud M. Soluble CD146 boosts therapeutic effect of endothelial progenitors through proteolytic processing of short CD146 isoform. *Cardiovasc Res.* 2016;111:240–251.
14. Beckers M, Gladis-Villanueva M, Hamann W, Schmutzler W, Zwadlo-Klarwasser G. The use of the chorio-allantoic membrane of the chick embryo as test for anti-inflammatory activity. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* 1997;46:29–30.
15. Tellier E, Canault M, Rebsomen L, Bonardo B, Juhan-Vague I, Nalbone G, Peiretti F. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res.* 2006;312:3969–3980.
16. Tellier E, Canault M, Poggi M, Bonardo B, Nicolay A, Alessi M-C, Nalbone G, Peiretti F. HDLs activate ADAM17-dependent shedding. *J Cell Physiol.* 2008;214:687–693.
17. Gudey SK, Sundar R, Mu Y, Wallenius A, Zang G, Bergh A, Heldin C-H, Landström M. TRAF6 stimulates the tumor-promoting effects of TGF β type I receptor through polyubiquitination and activation of presenilin 1. *Sci Signal.* 2014;7:ra2.
18. Guyot M, Pagès G. VEGF Splicing and the Role of VEGF Splice Variants: From Physiological-Pathological Conditions to Specific Pre-mRNA Splicing. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2015;1332:3–23.
19. Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev.* 2002;82:673–700.
20. Fearnley GW, Smith GA, Abdul-Zani I, Yuldasheva N, Mughal NA, Homer-Vanniasinkam S, Kearney MT, Zachary IC, Tomlinson DC, Harrison MA, Wheatcroft SB, Ponnambalam S. VEGF-A isoforms program differential VEGFR2 signal transduction, trafficking and proteolysis. *Biol Open.* 2016;5:571–583.
21. Biselli-Chicote PM, Oliveira ARCP, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. VEGF gene alternative splicing: pro- and anti-angiogenic isoforms in cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2012;138:363–370.
22. Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Amano S, Ogura Y, Hida T, Oguchi Y, Ambati J, Miller JW, Gragoudas ES, Ng Y-S, D'Amore PA, Shima DT, Adamis AP. VEGF164-mediated inflammation is required for pathological, but not physiological, ischemia-induced retinal neovascularization. *J Exp Med.* 2003;198:483–489.
23. Hummers LK, Hall A, Wigley FM, Simons M. Abnormalities in the regulators of angiogenesis in patients with scleroderma. *J Rheumatol.* 2009;36:576–582.
24. Dagur PK, McCoy JP. Endothelial-binding, Proinflammatory T Cells Identified by MCAM (CD146) Expression: Characterization and Role in Human Autoimmune Diseases. *Autoimmun Rev.* 2015;

25. Kaspi E, Heim X, Granel B, Guillet B, Stalin J, Nollet M, Bertaud-Foucault A, Robaglia-Schlupp A, Roll P, Cau P, Leroyer A, Bachelier R, Benyamine A, Dignat-George F, Blot-Chabaud M, Bardin N. Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in systemic sclerosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2017.

FIGURES

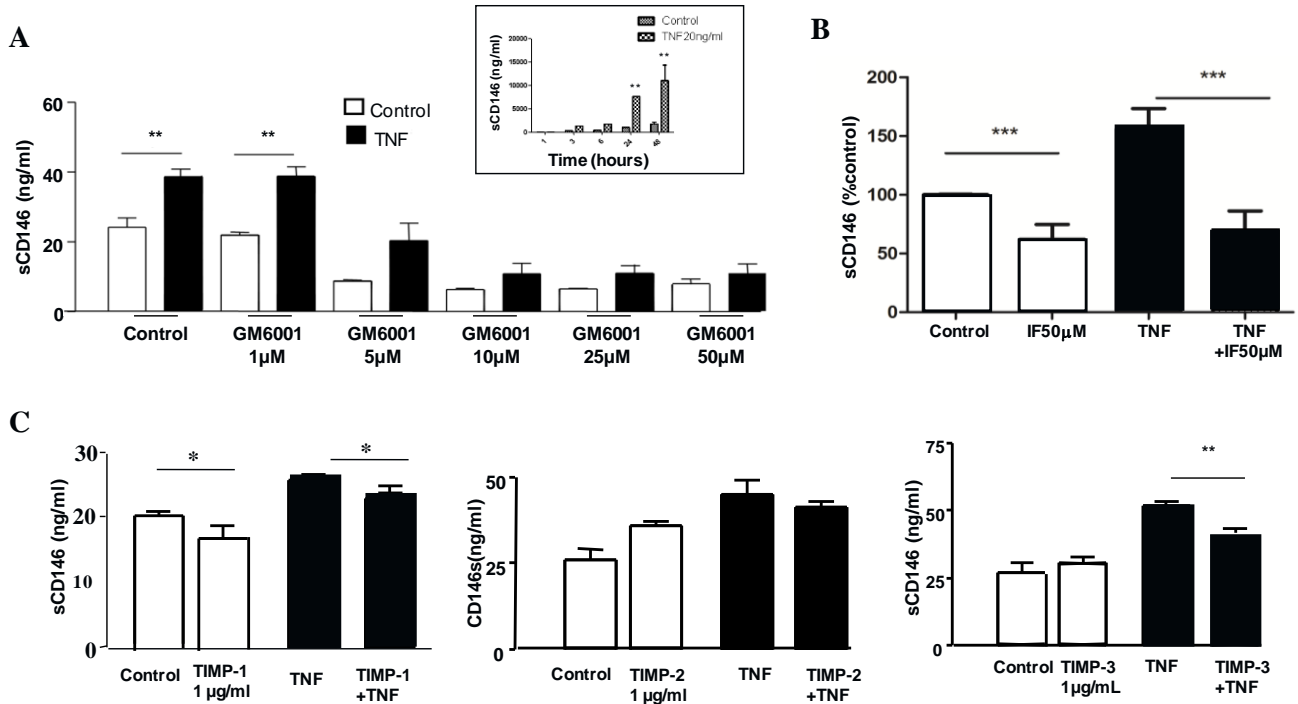


Figure 1: Effect of proteinase inhibitors on sCD146 secretion in ECFC

A: The effect of the pan-inhibitor GM6001 was tested on soluble CD146 (sCD146) secretion in ECFC cells. Experiments were performed in control conditions and after treatment with 20 ng/ml TNF for 24h. Insert shows that TNF treatment significantly increases sCD146 from 24 h of treatment. A dose-dependence of GM6001 effect was performed between 1 and 50 μ M. Results are the mean values \pm SEM of 5 experiments.

B: The effect of furin convertase inhibitor (IF) was tested at 50 μ M on sCD146 secretion in control condition and after treatment with TNF 20 ng/ml for 24 h. Results are the mean values \pm SEM of 3 experiments.

C: Effect of TIMP-1, -2 and -3 (1 μ g/ml) was tested on sCD146 secretion in control condition and after treatment with 20 ng/ml TNF. Results are the mean values \pm SEM of 3 experiments.

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$, experimental vs Control

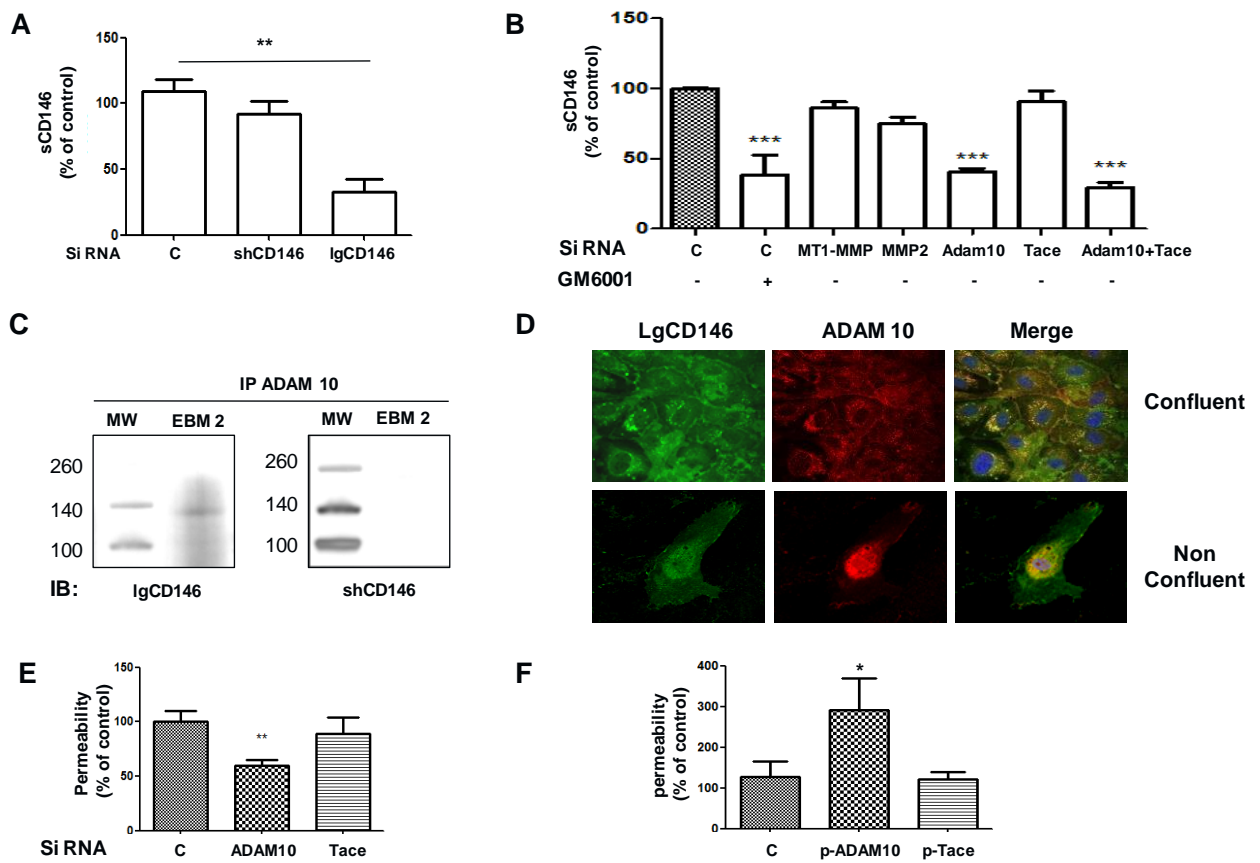


Figure 2: ADAM10 is involved in the shedding of the long isoform of CD146 in ECFC

A: ECFC were transfected with siRNA targeting the short (shCD146) or the long (IgCD146) isoforms of CD146 and with a control siRNA (C). Soluble CD146 (sCD146) secretion was determined. Results are the mean values +/- SEM of 4 different experiments.

B: ECFC were transfected with siRNA targeting MT1-MMP, MMP2, ADAM10 or Tace and with a control siRNA (C). Soluble CD146 (sCD146) secretion was determined. In one condition, cells were treated with GM6001 10 μ M. Results are the mean values +/- SEM of 5 different experiments.

C: ADAM10 was immunoprecipitated in ECFC cultured in basal condition (EBM2). The long (IgCD146) and short (shCD146) isoforms of CD146 were then detected by western blot using specific antibodies. Results are representative of 3 different experiments.

D: The long isoform of CD146 (IgCD146) and ADAM10 were visualized by immunofluorescence in confluent and non confluent ECFC. Merge pictures are also shown. Results are representative of 3 different experiments.

E: ECFC were transfected with siRNA targeting ADAM10 or Tace and with a control siRNA (C). The permeability of the ECFC monolayer grown on semi-permeable filters was determined using dextran-FITC. Results are the mean values +/- SEM of 3 experiments.

F: ECFC were transfected with plasmid vectors encoding ADAM10 (p-ADAM10) or Tace (p-Tace) and with a control plasmid vector (C). The permeability of the ECFC monolayer grown on semi-permeable filters was determined using dextran-FITC. Results are the mean values +/- SEM of 3 experiments.

*: P<0.05, **: P<0.01, ***: P<0.001, experimental vs Control.

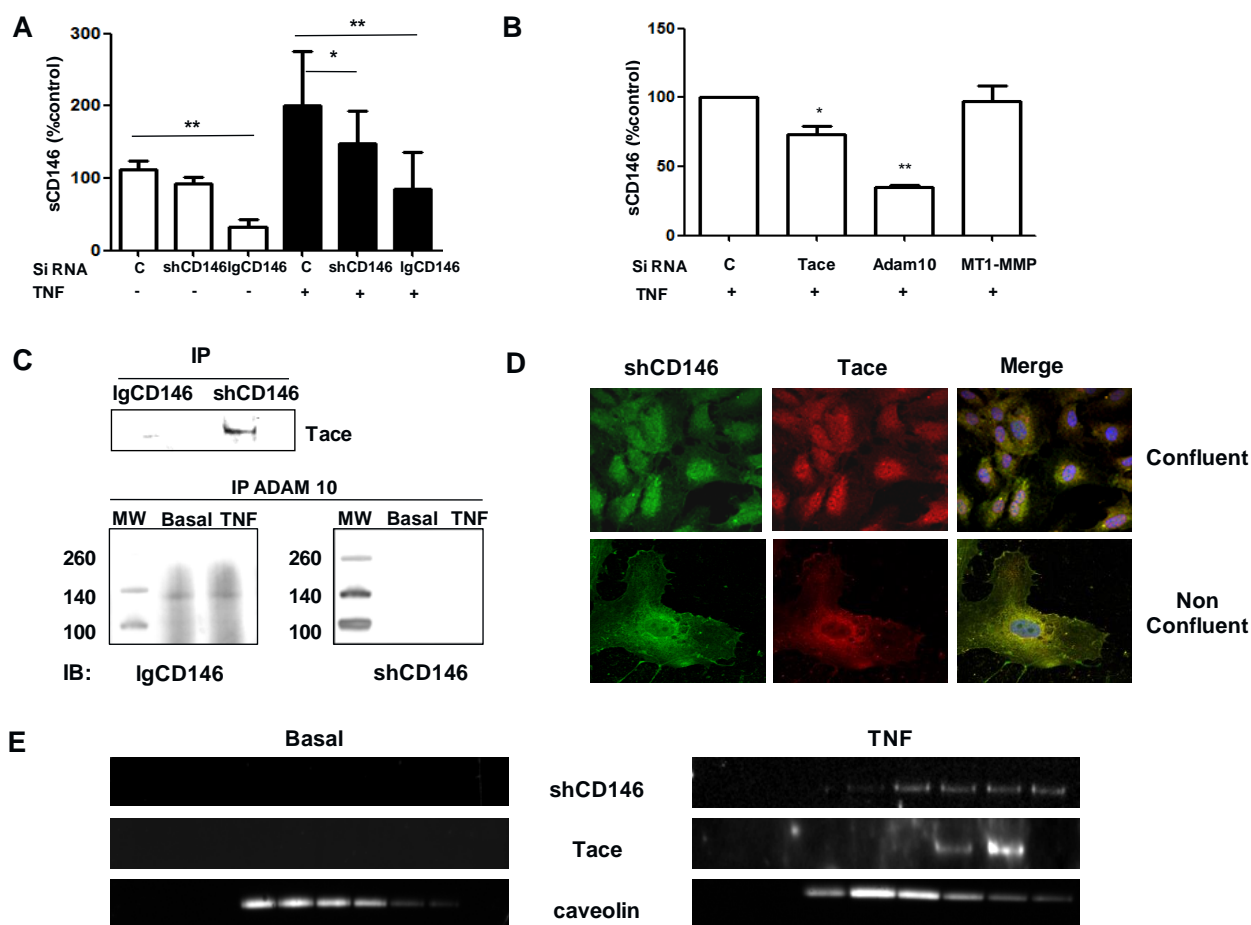


Figure 3: Tace is involved in the shedding of the short isoform of CD146 in ECFC

A: ECFC were transfected with siRNA targeting the short (shCD146) or the long (lgCD146) isoforms of CD146 and with a control siRNA (C) and soluble CD146 (sCD146) secretion was determined in basal condition and in cells treated for 24h with TNF 20 ng/ml. Results are the mean values +/- SEM of 5 different experiments.

B: ECFC treated for 24h with 20 ng/ml TNF were transfected with siRNA targeting Tace, ADAM10, MT1-MMP and with a control siRNA (C) and soluble CD146 (sCD146) secretion was determined. Results are the mean values +/- SEM of 3 different experiments.

C: The long (lgCD146) and short (shCD146) isoforms of CD146 were immunoprecipitated in ECFC cultured for 24h with 20 ng/ml TNF. Tace was then detected by western blot.

In another series of experiments, ADAM10 was immunoprecipitated in ECFC cultured in basal condition (Basal) or after a treatment of 24h with 20 ng/ml TNF (TNF). The long (lgCD146) and short (shCD146) isoforms of CD146 were then detected by western blot using specific antibodies Results are representative of 3 different experiments in each series.

D: The short isoform of CD146 (ShCD146) and Tace were visualized by immunofluorescence in confluent and non confluent ECFC. Merge pictures are also shown. Results are representative of 3 different experiments.

E: ECFC were cultured in basal condition (Basal) or for 24h with 20 ng/ml TNF (TNF) and lipid raft fractions were prepared as described in the Material and Methods section. Then, the first eight fractions were revealed with specific antibodies against the short isoform of CD146 (shCD146), Tace and caveolin. Results are the mean values +/- SEM of 3 experiments.

*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, experimental vs Control.

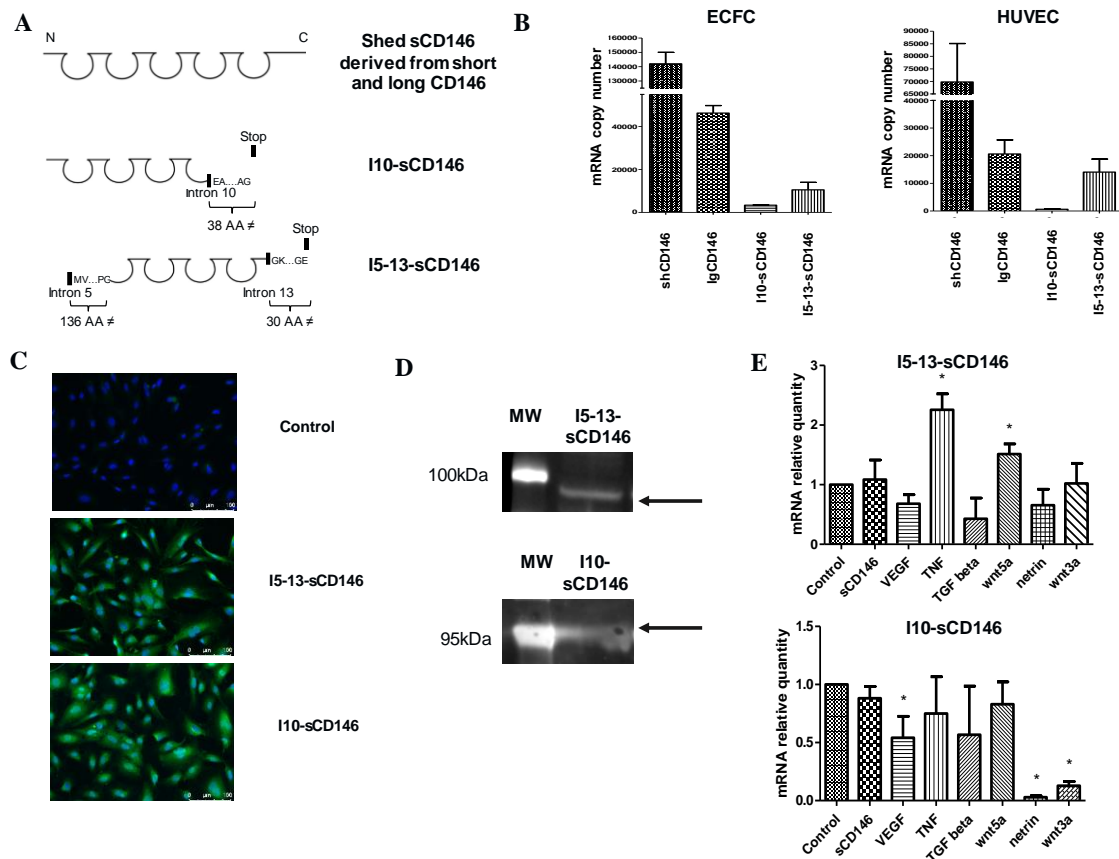


Figure 4: Characterization of I10-sCD146 and I5-13-sCD146 isoforms

A: Schematic representation of the I10-sCD146 and I5-13-sCD146 isoforms as compared to the shed form. The differences in amino acids are indicated.

B: The mRNA expression of I10-sCD146 and I5-13-sCD146 isoforms was analyzed in ECFC and HUVEC and compared to mRNA expression of the short and long isoforms of CD146. Results are the mean values +/- SEM of 3 experiments.

C: The expression of I10-sCD146 and I5-13-sCD146 isoforms was analyzed by immunofluorescence in ECFC. Nuclei were labelled with Dapi. The picture is representative of 3 different experiments.

D: The protein expression of I10-sCD146 and I5-13-sCD146 isoforms was visualized by western-blot in ECFC supernatants. The picture is representative of 3 different experiments.

E: The mRNA expression of I10-sCD146 and I5-13-sCD146 isoforms was analyzed by qPCR in ECFC after treatment of the cells for 24h with the recombinant shed soluble CD146 50 ng/ml, VEGF 20 ng/ml, TNF 20 ng/ml, TGF beta 5 ng/ml, and netrin 50 ng/ml. Cells were also treated for 15 min with WNT5a 200 ng/ml and 1h with WNT3a 50 ng/ml. Results are the mean values +/- SEM of 3 experiments.

*: P<0.05, experimental vs Control.

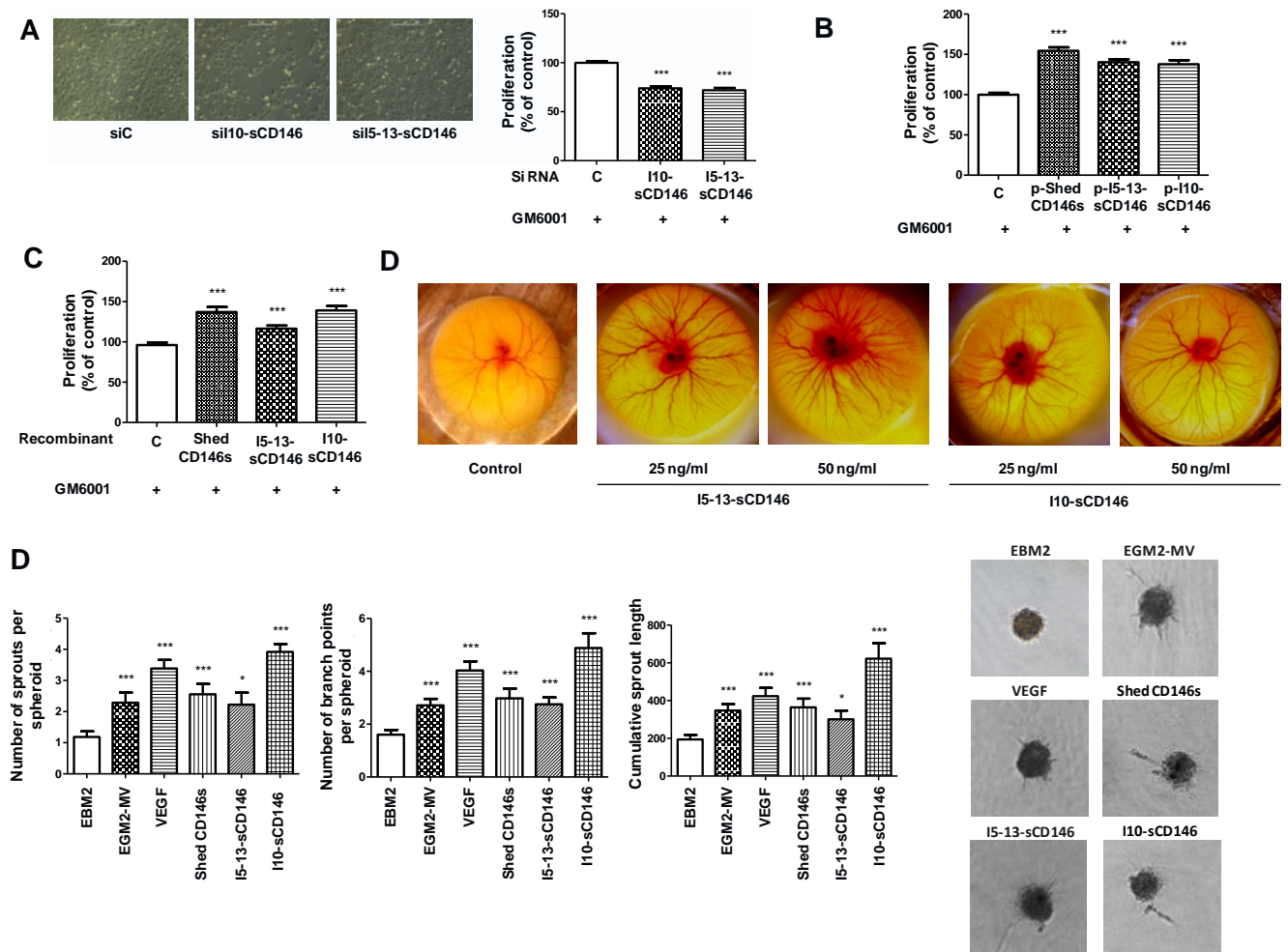


Figure 5: Effect of I5-13-sCD146 and I10-sCD146 on angiogenesis

A: Effect of siRNA targeting I10-sCD146 and I5-13-sCD146 on proliferation of ECFC. Experiments were performed in the presence of GM6001 10 μ M. Results are mean values of 4 different experiments and representative pictures of the cells in one experiment are given.

B: Effect of over-expression of I10-sCD146 (p-I10-sCD146), I5-13-sCD146 (p-I5-13-sCD146) and shed sCD146 (p-shed sCD146) realized by plasmid transfection on proliferation of ECFC. Experiments were performed in the presence of GM6001 10 μ M.

C: Effect of recombinant proteins I10-sCD146, I5-13-sCD146 and shed sCD146 50 ng/ml on the proliferation of ECFC. Experiments were performed in the presence of GM6001 10 μ M. Results are mean values of 4 different experiments.

D: Yolk sac membrane assays were performed in the presence of 25 ng/ml or 50 ng/ml I5-13-sCD146 and I10-sCD146 for 48h and compared to control. Representative pictures of 4 different experiments are given.

E: Effect of recombinant proteins I10-sCD146, I5-13-sCD146 and shed sCD146 50 ng/ml on the number of sprouts, branched points and cumulative sprout length in spheroid experiments realized with ECFC.

Results were compared to VEGF 20 ng/ml and complete EGM2-MV medium. Average of the experiments and representative pictures are given. Results are mean values of 4 different experiments.

*: $P < 0.05$, ***: $P < 0.001$, experimental vs Control.

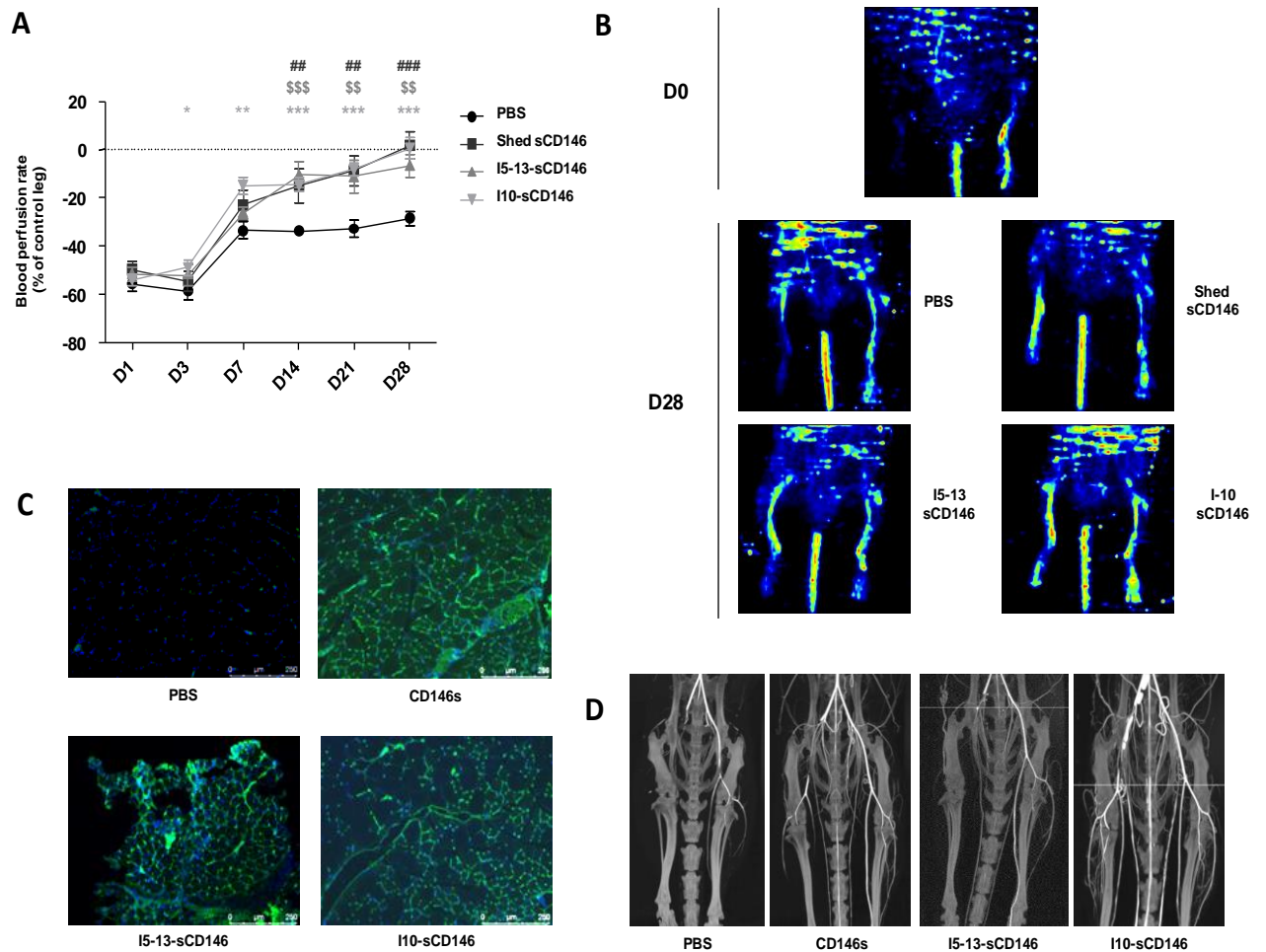


Figure 6: Effect of local injection of recombinant I5-13-sCD146 and I10-sCD146 in a mouse ischemic hind limb model

A: Ischemic mice were subjected to local injection of either PBS or 2 μ g of rh-sCD146/ rh-I10-sCD146/ rh-I5-13-sCD146 twice a week for 28 days. Blood perfusion rate was monitored by laser-Doppler as a function of time in all animals. Results are mean values of 6 different animals in each group and expressed as % of the control leg. *: $P < 0.05$, I10-sCD146 vs. PBS; \$: $P < 0.05$, I5-13-sCD146 vs. PBS; #: $P < 0.05$, shed sCD146 vs. PBS.

B: Representative pictures of laser-Doppler experiments are given at day 0 (D0) and at day 28 (D28) after treatment with shed sCD146, I5-13-sCD146 and I10-sCD146, in comparison with PBS.

C: Blood vessels examination in hind limb muscle sections from control (PBS) and shed sCD146/ I10-sCD146/ rh-I5-13-sCD146 treated animals 28 days after surgery. Vessels are labelled with isolectin B4. Pictures are representative of different 3 different experiments in 6 animals.

D: Angiographic pictures of control (PBS) and shed sCD146/ I10-sCD146/ I5-13-sCD146 treated animals at D28. Pictures are representative of the 6 animals in each group.

SUPPLEMENTAL MATERIAL

Detailed Methods

Histological Analysis

The YSM was surgically removed and fixed in 10% buffered formaldehyde for 10 hours, dehydrated in graded alcohol, cleared in xylene and embedded in paraffin. 5µm thick sections were cut in a plane parallel to the surface of the YSM and stained by hematoxylin-eosin which was observed under a light photomicroscope.

Plasmid transfection experiments and clone selection

Plasmids encoding for the different proteins were introduced in CHO cells using Fugen kit as described by the manufacturer (Promega). Stable clones were then selected with Geneticin and FACS and western blot or RT-PCR analysis was performed to identify the clone with the highest expression.

siRNA experiments

SiRNA designed to silence the different isoforms of sCD146 were generated. A control siRNA was also used in each experiment. siRNAs were introduced in endothelial cells using the Silencemag magnetofection kit as described by the manufacturer (OZ Biosciences). Silencing resulted in about 80-95% of protein expression as a function of the experiments (see supplementary figure 1).

Sequences of the different siRNAs are given in supplementary table 2.

Quantitative flow cytometry

The level of membrane expression of the different isoforms of CD146 was determined by labeling cells with the antibody or the isotype matched control antibody coupled to fluorescent dye (10 µg/ml) for 1h at 4°C. After washing, samples were analyzed by flow cytometry (Gallios™ Flow Cytometer, Beckman Coulter, Villepinte). The results were then analyzed using Kaluza software (Kaluza® Analysis Software, Beckman Coulter).

Tissue array

TissueScan Human Normal Tissue qPCR Arrays (OriGeneTechnologies, Rockville MD) were used to screen for I5-13-sCD146 and I10-sCD146 expression in 48 different tissues and following manufacturer's instructions.

ELISA

For detecting the two spliced isoforms of sCD146 (I5-13-sCD146 and I10-sCD146), a sandwich immunoassay was used (Biocytex). The protocol was modified for the second antibody (detection antibody) that was replaced by the anti-I5-13-sCD146 or anti-I10-sCD146 antibodies coupled to HRP.

Laser Doppler blood flow analysis

The ratio of the ischemic versus normal hind limb blood flow was measured using a laser doppler blood flow analyzer. At different time points post-surgery (days 1, 3, 7, 14, 21 and 28), animals were subjected to 3 consecutive laser scanings over the regions of interest (leg and feet). Blood flow was expressed as the ischemic versus normal hind limb ratio.

Angiographic CT imaging studies

The animals were deeply anesthetised with mix of Ketamine Xylazine (100mg/kg and 10mg/kg respectively) and perfused intracardially with 2ml of lipiodole. CT 3D images were obtained with a microPET/microCT rodent model scanner (nanoPET/CT®, Mediso) with caractéristique below : 70 kVp energy, exposure time of 300 ms and 720 projections.

Subjects

Sera from 24 SSc patients admitted to internal medicine departments in Marseille (France) were analyzed. All patients fulfilled the 2013 ACR/EULAR Classification Criteria for Scleroderma and were then sub classified according to LeRoy et al criteria. As controls, we studied the sera of 24 age and sex

matched blood donors. All samples came from a declared Biobank (DC 2012-1704) with respect of ethical directives and were stored to -80°C prior to use.

Ethics committee approval

The animal experiments conformed to the directive 2010/63/EU of the European Parliament and were approved by the Institution's Animal care and Use Committee (Aix-Marseille University). The procedures described above were conducted under an institutional approved animal use protocol (Marseille Ethical Committee) and under the supervision of an authorized researcher (B. Guillet; n°13328).

The experiments on human samples were performed retrospectively on plasmas from patients with systemic sclerosis. They were performed in accordance with the Helsinki declaration of 1975, revised in 1983, approved by relevant institutional review board and informed consent of the patients was obtained. B. Granel and N. Bardin analyzed the data and all authors had an access to primary clinical data

Peptides, plasmids, antibodies, and inhibitors

The recombinant human soluble form of CD146 corresponding to the shed sCD146 (rh-sCD146) was obtained from Biocytex. The rh-I5-13-sCD146 and rh-I10-sCD146 arise from the purification on the column of protein tagged with HA peptide (Trial Kit 3320A, MBL).

The plasmid encoding for Tace was from Dr F. Peiretti, UMR-S1062, Marseille, France.

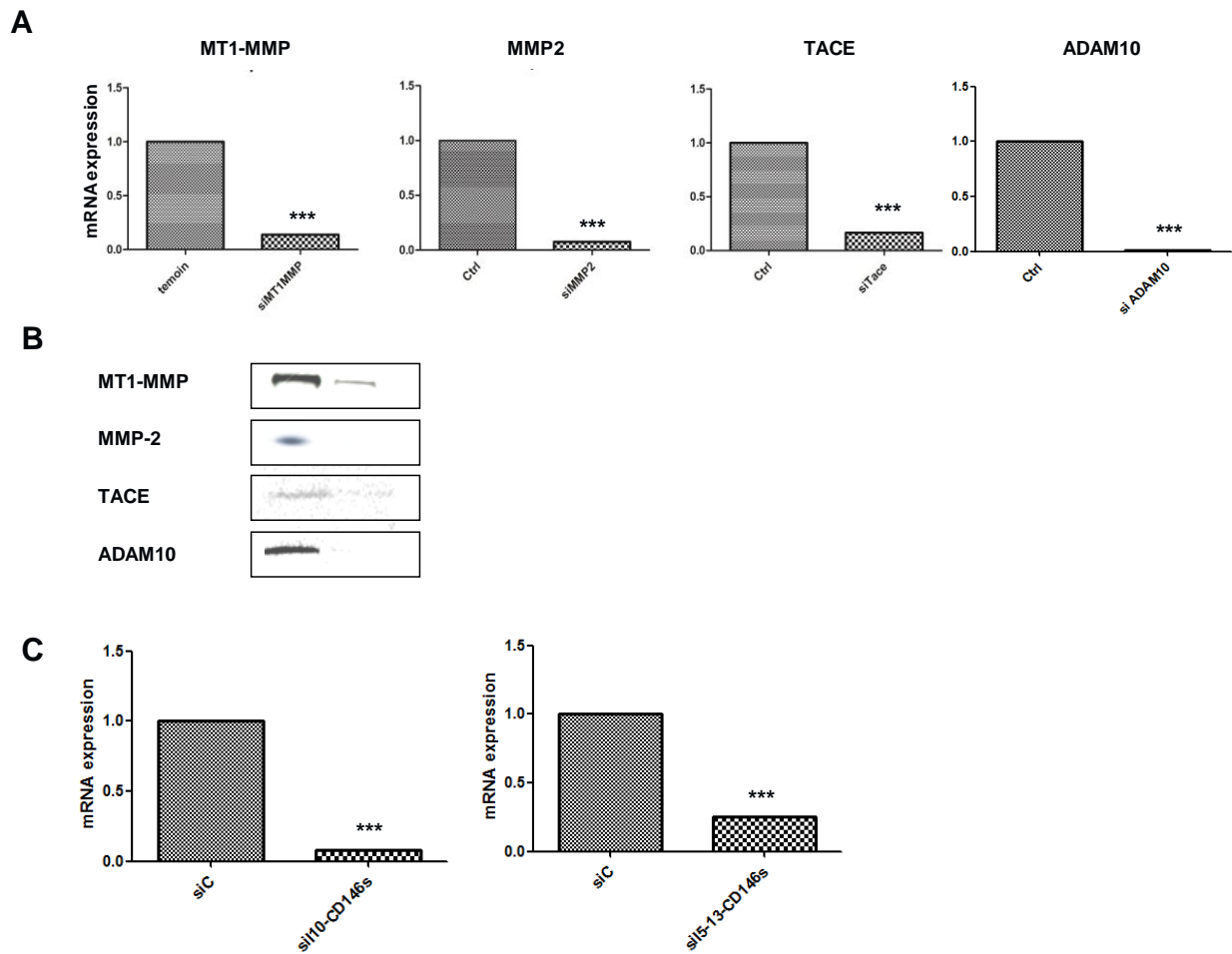
The plasmid encoding for ADAM10 was a kind gift from Dr B. Charreau, UMR-S1064, Nantes, France. Polyclonal antibodies against I5-13-sCD146 and I10-sCD146 were generated by Covalab company by injecting peptides corresponding to the specific parts of the two proteins. Antibodies against ADAM-17 (ab2051), ADAM-10 (EPR5622), CD146 (clone 7A4) and actine were respectively purchase from Abcam, Millipore, Biocytex and Cell signaling.

GM6001 was from Selleck chemicals.

Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm SEM of the indicated number of experiments. Statistical analysis was performed with the Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Significant differences were determined using non parametric Mann Whitney test. A P-value < 0.05 was considered as significant.

SUPPLEMENTAL FIGURES

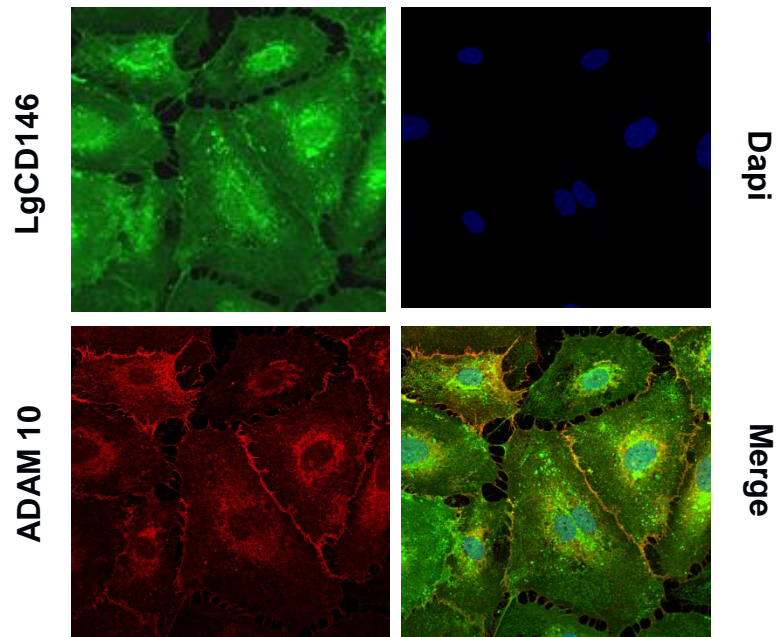


Supplementary figure 1: Efficiency of siRNA

A: The efficiency of siRNA targeting MT1-MMP, MMP2, TACE and Adam10 was tested at the mRNA level by qPCR after transfection in ECFC. Results are mean values \pm SEM of 3 independent experiments.

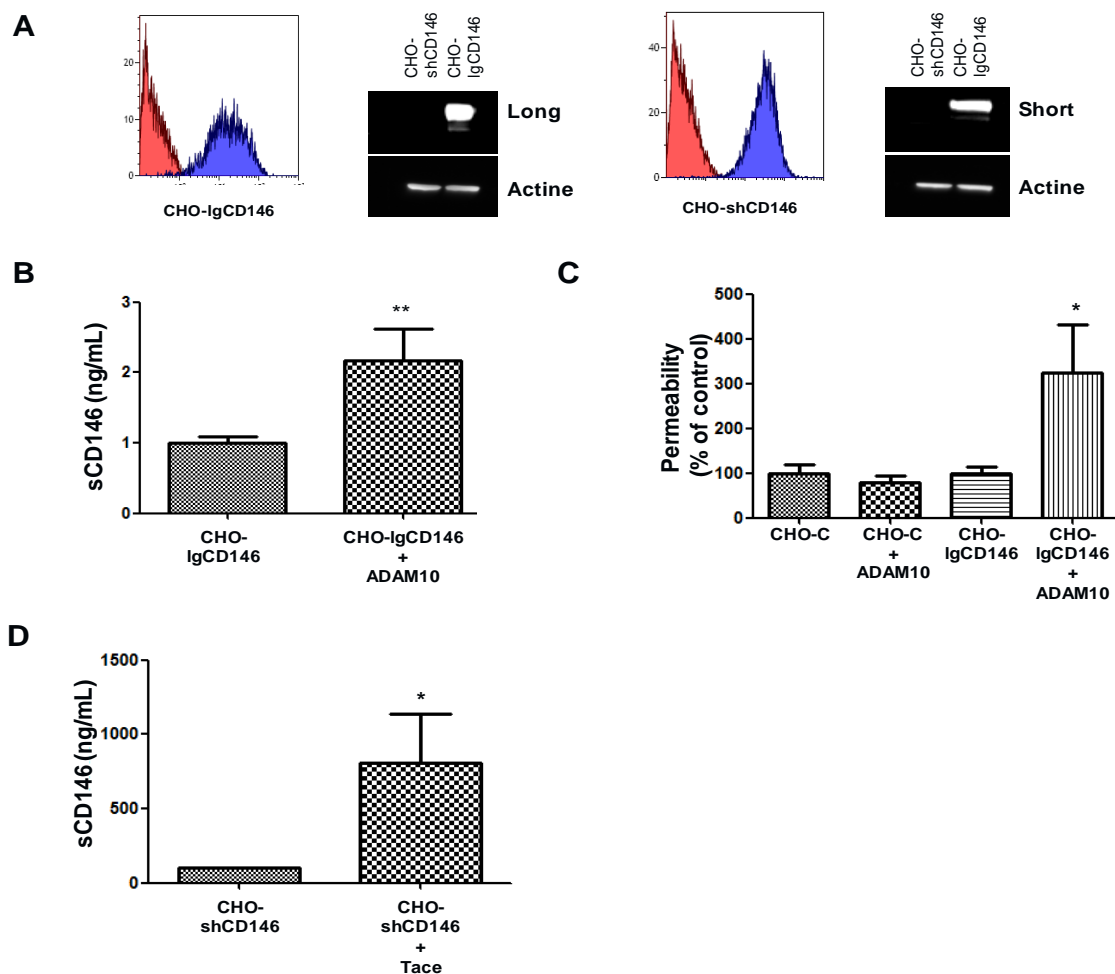
B: The efficiency of siRNA targeting MT1-MMP, MMP2, TACE and Adam10 was tested at the protein level by western-blot after transfection in ECFC. Results are mean values \pm SEM of 3 different experiments.

C: The efficiency of siRNA targeting I10-sCd146 and I5-13-sCD146 was tested at the mRNA level by qPCR after transfection in ECFC. Results are mean values \pm SEM of 3 independent experiments.



Supplementary figure 2: Co-localization of the long isoform of CD146 and Adam10 in HUVEC

Expression of the long isoform of CD146 (LgCD146) and Adam10 was visualized by immunofluorescence in HUVEC. Nuclei were labelled with dapi and merge picture is given. The figure is representative of at least 3 experiments.



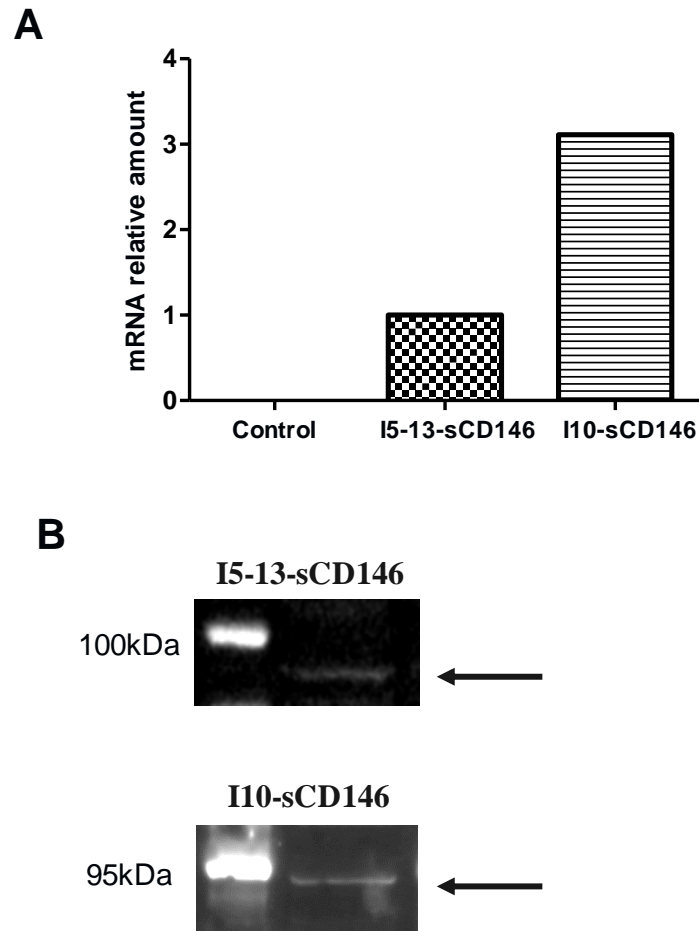
Supplementary figure 3: Effect of Adam10 and Tace in CHO cells stably transfected with short (sh) and long (lg) isoforms of CD146.

A: CHO were stably transfected with the long isoform (CHO-IgCD146) or the short isoform (CHO-shCD146) of CD146. Expression of both isoforms was verified by FACS and western-blot with specific antibodies. Results are representative of 3 different experiments for each.

B: Soluble CD146 (sCD146) was determined in the supernatants of CHO-IgCD146 transiently transfected (+Adam10) or not with Adam10. Results are the mean values +/- SEM of 5 experiments.

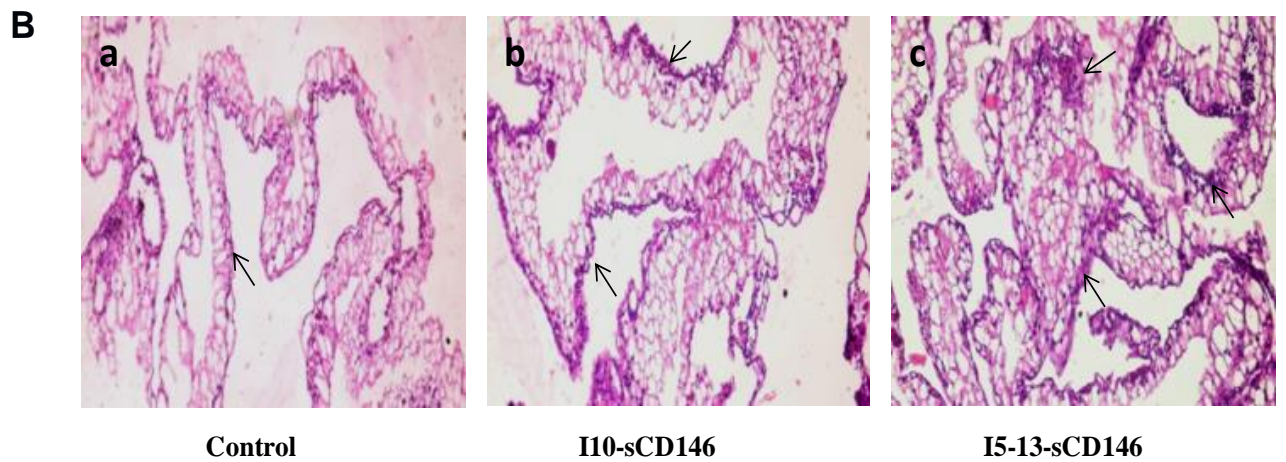
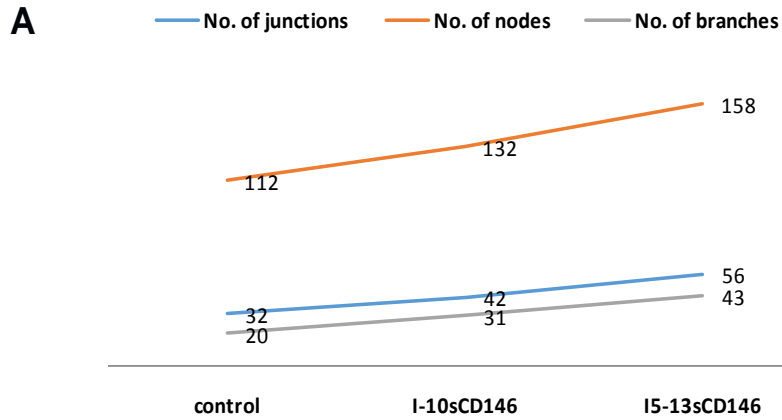
C: Permeability was determined with dextran-FITC on CHO and CHO-IgCD146 transiently transfected (+Adam 10) or not with Adam10. Results are the mean values +/- SEM of 3 experiments.

D: Soluble CD146 (sCD146) was determined in the supernatants of CHO-shCD146 transiently transfected (+Tace) or not with Tace. Results are the mean values +/- SEM of 4 experiments.



Supplementary figure 4: Characterization of recombinant I10-sCD146 and I5-13-sCD146

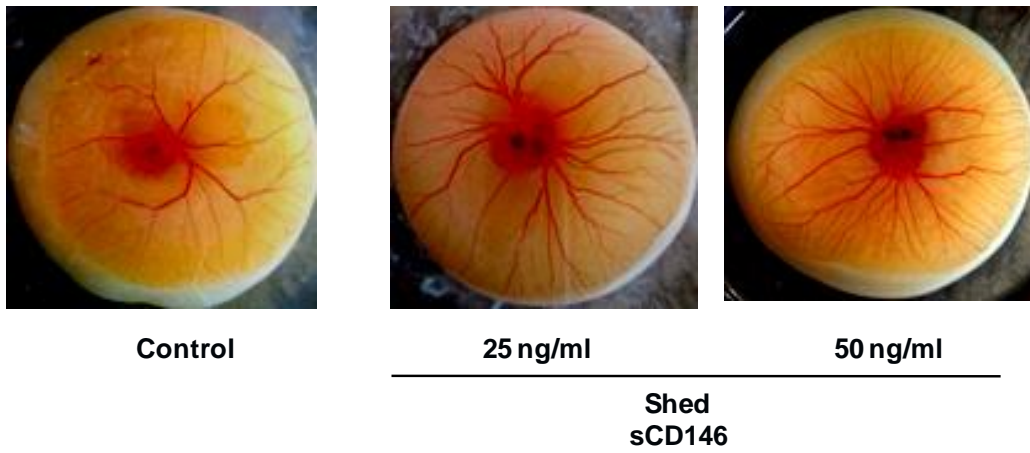
Recombinant I10-sCD146 and I5-13-sCD146 proteins were generated in CHO cells after stable transfection of the plasmids. The mRNA expression of the molecules was examined by qPCR (**A**) and proteins were characterized by western-blot using specific polyclonal antibodies generated against the molecules (**B**). Pictures are representative of 3 different experiments.



Supplementary figure 5: Yolk sac membrane assay quantification and histology

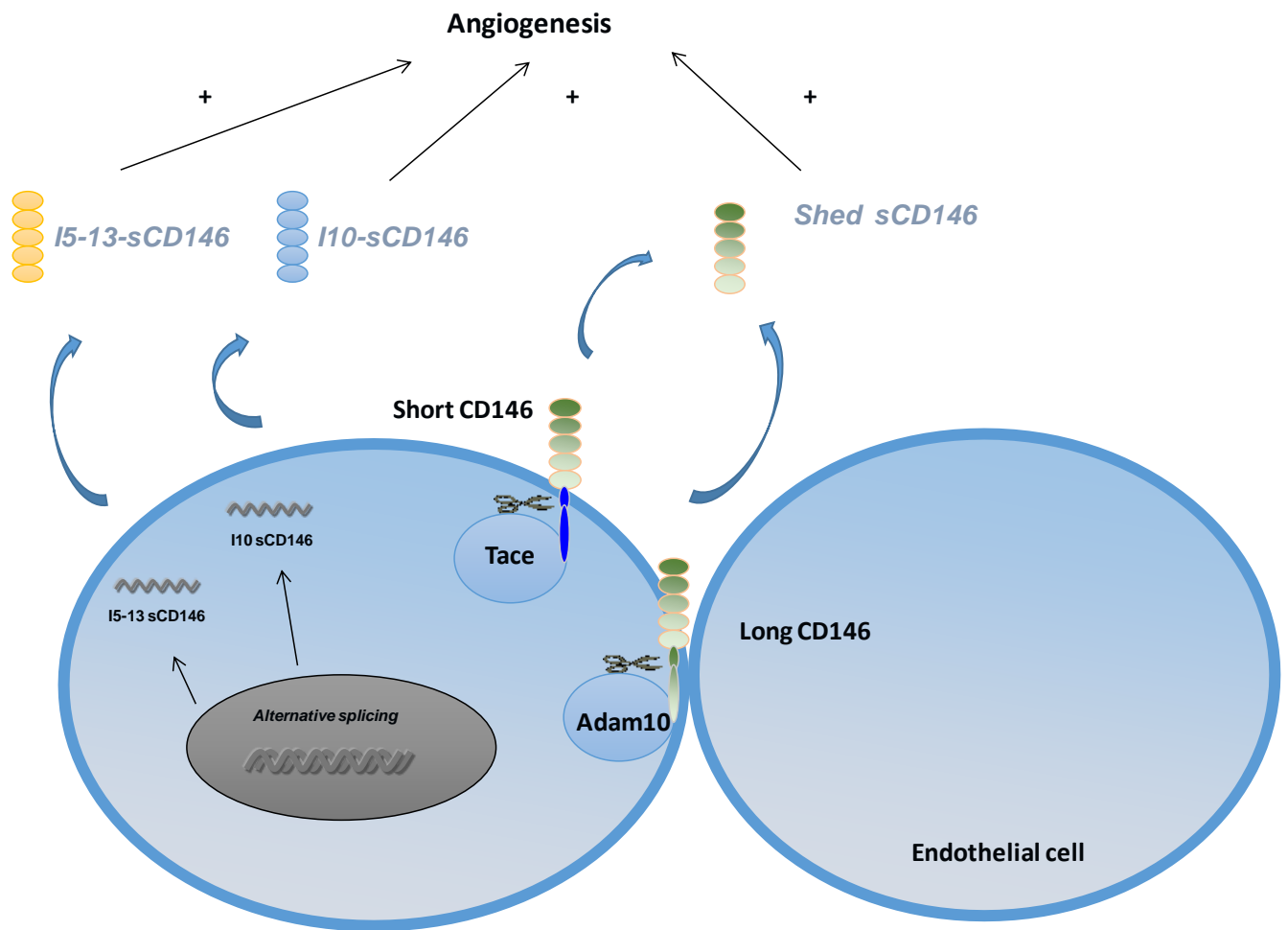
A: Quantification of the YSM assay performed with I5-13-sCD146 and I10-sCD146 is given. The number of junctions, nodes and branches is given.

B: Histological analysis of the YSM assay performed with I5-13-sCD146 and I10-sCD146 is shown. Arrows indicate with areas with angiogenesis.



Supplementary figure 6: Yolk sac membrane assay with shed sCD146

Experiments were performed in the presence of 25 ng/ml or 50 ng/ml recombinant shed sCD146 for 48h and compared to control. Representative pictures of 4 different experiments are given.



Supplementary figure 7: Summary of the mechanism of generation of soluble CD146 in endothelial cells

A shed form of sCD146 is generated through the shedding of membrane long and short CD146 isoforms by Adam 10 and Tace, respectively. Two novel isoforms, I5-13-sCD146 and I10-sCD146, are also produced by alternative splicing. All these forms are pro-angiogenic.

SUPPLEMENTAL TABLES

GAPDH F: GGTGGTCTCCTGACTTCAACA, R: GTTGCTGTAGCCAATTCGTTGT

CD146sh F: CCACTGGCCTCAGCACTTCC, R: CTA CTCACCTTTCTGGACAG

CD146lg F: TGGTTTGTACACCTTGCAGAGTATTC, R: TGGGCAGCCGGTAGTTG

MT1MMP F: TAGCGCTTCCTTCGAACATT, R: GCAGAAGTTTTACGGCTTGC

MMP2 F: TGATCTTGACCAGAATACCATCGA, R: GGCTTGCGAGGAAGAAGTT

Tace F : GCATTCTCAAGTCTCCACAAG, R: CTGGGAGAGCCAACTAAGC

ADAM10 F: CAGAGTGCACACCAGGAGAA, R: CCCAGGTTTCAGTTTGCATT

I10-sCD146 F:GGCAGAGGAAGAGACAACCA, R: TTGGGGTGACCTGGTCTCTA

I5-13-sCD146 F: GGACATCTAGACGGTGCTC, R: ACAAATGCAAGCTGGAAACC.

Supplementary table 1: Forward and reverse primers

siTACE sens: 5'CAGGAUUUAAAGGUUAUGGAA, antisens: 5'UUCCAUAACCUUUAAAUCCUG

siADAM10 sens: 5'GAAUGGUAGAACAAGGUGAtt, antisens: 5'UCACCUUGUUCUACCAUCCA

siMT1MMP sens: 5'GCGAUGAAGUCUUCACUUAAdTdT; antisens: 5'UAAGUGAAGACUUCAUCGC

sihCD146 sens: 5'CAGGAGAUGGAGAGAAAUACAUCGA, antisens:
5'UCGAUGUAUUUCUCUCCAUCUCCUG

silgCD146 sens: 5'CCCGUCUCGUAAGACCGAACUUGUA, antisens:
5'UACAAGUUCGGUCUUACGAGACGGG

sil10-sCD146 sens: CCCUCCCUCUGGGUAGAGACCAGGU, antisens:
ACCUGGUCUCUACCCAGAGGGAGGG

siI5-13-sCD146 sens: UGGACAUCUAGACGGCUGCUCGUUU, antisens:
AAACGAGCAGCCGUCUAGAUGUCCA.

Supplementary table 2: Sense and antisens siRNA

I5-13-sCD146

ATGGTATACATTGTTAGACAATTTCTTTTATACAATGTTTCTGGGTCAGTCTATTTAGAT
CAACTGATCGTTTTTGCTTACTGCCAAGTTTTCCATACTACGCATAGCAGGTAGTCGAGTT
CACCATTCCCCATTTAGTGGACATCTAGACGGCTGCTCGTTTTTATCATTGCAGCATTCT
TTGCACACATCCTTGGATATGAGCAGACATGAAAATGTTTTTCTAGGGTTGACACTGAGC
AGTAAAAGTGCTGGGTTGAAGGGTTTTCCAGCTTGCATTTGTACCTGGCCTTCTACAGGGG
ACAGGGGGCTATTTAGATGGTCCCCTGCCAACCCAGTGGACAACCCTAGGGTGGGGCTG
GAGGTGGGGCTGAGGCTGAGTCTTCCCTCCCCTTCCCTCCCTGCCAGGGGTCCACATTAG
TCGTCCCAGACTGTGGAGTCGAGTGGTTTTGTACACCTTGCAGAGTATTCTGAAGGCACAG
CTGGTTAAAGAAGACAAAGATGCCAGTTTTACTGTGAGCTCAACTACCGGCTGCCAGT
GGGAACCACATGAAGGAGTCCAGGGAAGTCACCGTCCCTGTTTTCTACCCGACAGAAAAA
GTGTGGCTGGAAGTGGAGCCCGTGGGAATGCTGAAGGAAGGGGACCGCGTGGAAATCAGG
TGTTTGGCTGATGGCAACCCTCCACCACACTTCAGCATCAGCAAGCAGAACCCAGCACC
AGGGAGGCAGAGGAAGAGACAACCAACGACAACGGGGTCCCTGGTGTGGAGCCTGCCCGG
AAGGAACACAGTGGGCGCTATGAATGTCAGGGCCTGGACTTGGACACCATGATATCGCTG
CTGAGTGAACCACAGGAACTACTGGTGAACATATGTGTCTGACGTCCGAGTGAAGTCCCGCA
GCCCCTGAGAGACAGGAAGGCAGCAGCCTCACCTGACCTGTGAGGCAGAGAGTAGCCAG
GACCTCGAGTTCCAGTGGCTGAGAGAAGAGACAGGCCAGGTGCTGGAAAGGGGGCCTGTG
CTTCAGTTGCATGACCTGAAACGGGAGGCAGGAGGCGGCTATCGCTGCGTGGCGTCTGTG
CCCAGCATAACCCGGCCTGAACCGCACACAGCTGGTCAACGTGGCCATTTTTGGCCCCCT
TGGATGGCATTCAAGGAGAGGAAGGTGTGGGTGAAAGAGAATATGGTGTGAATCTGTCT
TGTGAAGCGTCAGGGCACCCCGGCCACCATCTCCTGGAACGTCAACGGCACGGCAAGT
GAACAAGACCAAGATCCACAGCGAGTCTGAGCACCTGAATGTCTCTCGTGACCCCGGAG
CTGTTGGAGACAGGTGTTGAATGCACGGCCTCCAACGACCTGGGCAAAAACACCAGCATC
CTCTTCCCTGGAGCTGGTCAATTTAACCACCCTCACACCAGACTCCAACACAACCACTGGC
CTCAGCACTTCCACTGCCAGTCTCATAACCAGAGCCAACAGCACCTCCACAGGTAAGCCA
GGCCTGGCAAGAGAACAGGGCTGTGCCAGGGCATCCTTTCTGCCCTGTCCCTCCCAGAG
AGCCCTGTCCAGAAAGGTGAGTAG

Supplementary table 3: mRNA sequence of I5-13-sCD146 isoform

I10-sCD146

ATGGGGCTTCCCAGGCTGGTCTGCGCCTTCTTGCTCGCCGCTGCTGCTGCTGTCTCCTCGC
GTCGCGGGTGTGCCCCGAGAGGCTGAGCAGCCTGCGCCTGAGCTGGTGGAGGTGGAAGTG
GGCAGCACAGCCCTTCTGAAGTGC GGCCCTCTCCCAGTCCCAAGGCAACCTCAGCCATGTC
GACTGGTTTTCTGTCCACAAGGAGAAGCGGACGCTCATCTTCCGTGTGCGCCAGGGCCAG
GGCCAGAGCGAACCTGGGGAGTACGAGCAGCGGCTCAGCCTCCAGGACAGAGGGGCTACT
CTGGCCCTGACTCAAGTCAACCCCCAAGACGAGCGCATCTTCTTGTGCCAGGGCAAGCGC
CCTCGGTCCCAGGAGTACCGCATCCAGCTCCGCGTCTACAAAGCTCCGGAGGAGCCAAAC
ATCCAGGTCAACCCCTGGGCATCCCTGTGAACAGTAAGGAGCCTGAGGAGGTGCTACC
TGTGTAGGGAGGAACGGGTACCCCATTCCTCAAGTCATCTGGTACAAGAATGGCCGGCCT
CTGAAGGAGGAGAAGAACCGGGTCCACATTCAGTCGTCCCAGACTGTGGAGTCGAGTGGT
TTGTACACCTTG CAGAGTATTCTGAAGGCACAGCTGGTTAAAGAAGACAAAGATGCCCAG
TTTTACTGTGAGCTCAACTACCGGCTGCCAGTGGGAACCATGAAGGAGTCCAGGGAA
GTCACCGTCCCTGTTTTCTACCCGACAGAAAAAGTGTGGCTGGAAGTGGAGCCCGTGGGA
ATGCTGAAGGAAGGGGACCGCGTGGAAATCAGGTGTTTGGCTGATGGCAACCCTCCACCA
CACTTCAGCATCAGCAAGCAGAACCCAGCACCAGGGAGGCAGAGGAAGAGACAACCAAC
GACAACGGGGTCTTGGTGCTGGAGCCTGCCCGGAAGGAACACAGTGGGCGCTATGAATGT
CAGGGCCTGGACTTGGACACCATGATATCGCTGCTGAGTGAACCACAGGAACTACTGGTG
AACTATGTGTCTGACGTCCGAGTGAGTCCCGCAGCCCTGAGAGACAGGAAGGCAGCAGC
CTCACCCCTGACCTGTGAGGCAGAGAGTAGCCAGGACCTCGAGTTCAGTGGCTGAGAGAA
GAGACAGGCCAGGTGCTGGAAAGGGGGCCTGTGCTTCAGTTGCATGACCTGAAACGGGAG
GCAGGAGGCGGCTATCGCTGCGTGGCGTCTGTGCCAGCATAACCCGGCCTGAACCGCACA
CAGCTGGTCAACGTGGCCATTTTTGGTGAGGCCCTCCCTCTGGGTAGAGACCAGGTCACC
CCAAGTGGGGTGGTTTTTAAGCTCTTTGACAAAAAGCCACCTGCTGCCCTGGGGAGCTCT
GGTGC GGAGGGGGAGGCAGGCTAG

Supplementary table 4: mRNA sequence of I10-sCD146 isoform

Discussion

Cette étude a permis de mettre en évidence le mécanisme de clivage des deux isoformes membranaires de CD146. Nous avons ainsi démontré que la molécule CD146 soluble clivée pouvait être générée par le clivage des formes longue et courte par deux ADAMs différentes. En effet, la forme longue de CD146 est clivée par ADAM 10 alors que la forme courte est clivée par Tace (ADAM 17).

Cette étude nous a également permis de déceler, grâce à une expérience de RNA seq, l'existence, dans les cellules endothéliales, de deux autres isoformes de CD146 soluble provenant d'un épissage alternatif. Ces deux formes présentent un décalage du cadre de lecture dû à la conservation de certains introns ce qui va entraîner l'apparition d'un codon stop avant le domaine transmembranaire. La première isoforme a conservé l'intron 10 lors de l'épissage ce qui entraîne une différence dans sa partie C-terminale au niveau de 38 AA par rapport à la forme soluble clivée et l'apparition d'un codon stop au niveau du cinquième domaine extracellulaire (C2). La deuxième isoforme a conservé les introns 5 et 13. Le codon d'initiation est au niveau de l'intron 5 et la séquence est différente au niveau de 136 AA en N-terminal et de 30 AA en C-terminal. Nous avons montré que, comme la forme soluble clivée, ces deux isoformes sont impliquées dans l'angiogenèse. En effet, elles augmentent significativement la prolifération et la formation de pseudo-capillaires des cellules endothéliales. Des expériences réalisées *in vivo* dans un modèle d'ischémie de la patte chez la souris par ligature de l'artère fémorale montrent que des injections locales répétées de ces formes épissées de CD146 soluble s'accompagnent d'une augmentation du taux de perfusion sanguine de la patte. Des expériences sur la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet confirment cet effet pro-angiogénique. Il apparaît que l'ensemble des formes solubles de CD146 ont des effets similaires sur l'angiogenèse. Il va donc maintenant être intéressant d'étudier si ces formes ont des effets additifs. Si tel est le cas, il est probable qu'elles puissent avoir des récepteurs différents. Alors que l'on sait que la forme clivée se fixe sur l'angiomotine, les récepteurs des deux formes épissées sont encore inconnus. Il faudra alors les identifier grâce à des techniques d'immunoprécipitation et de spectrométrie en masse comme cela a été fait pour l'angiomotine (174).

Les deux formes épissées I5-13-sCD146 et I10-sCD146 sont fortement exprimées dans le poumon et sont modulées de façon différente par le TNF- α , le VEGF, WNT5a et WNT3a.

De plus, notre équipe a récemment montré que CD146/CD146 soluble est impliqué dans le processus fibrotique dans la sclérodermie systémique. Ceci nous a conduit à étudier l'expression de ces deux isoformes dans cette pathologie qui est une maladie auto-immune caractérisée par une angiogenèse dérégulée et une fibrose pulmonaire dans les complications les plus sévères. L'isoforme I5-13-sCD146 augmente suite à une stimulation par WNT5a et TNF- α et est significativement augmentée dans le sérum de patients sclérodermiques alors que l'isoforme I10-sCD146 diminue suite à une stimulation par WNT3a et VEGF et est diminuée dans le sérum de patients sclérodermiques. Ces résultats confirment l'implication de CD146/CD146 soluble dans la sclérodermie systémique et montre que les différentes formes pro-angiogénique de CD146 soluble pourraient être impliquées dans le développement de la pathologie, ouvrant ainsi la voie à une option thérapeutique.

Enfin, étant donné que les cellules cancéreuses exprimant CD146 sécrètent la forme soluble clivée (175), il sera intéressant d'étudier le mécanisme de clivage de CD146 soluble dans les cellules cancéreuses afin de voir si les mêmes ADAMs sont impliquées. Il sera également relevant de déterminer si ces 2 formes épissées de CD146 soluble sont exprimées dans les cellules cancéreuses et s'il y a des modulations dans l'expression de ces formes entre les cellules normales et cancéreuses. On pourra également envisager de les doser par ELISA dans le sérum de patients avec différents cancers afin de déterminer si elles peuvent être spécifiques d'un type de cancer. Enfin, il pourra être intéressant de réaliser de nouveaux RNA seq sur différents types de cellules afin de déterminer s'il existe d'autres isoformes et si elles sont spécifiques de certains tissus.

Partie 2: Génération d'un nouvel anticorps anti-CD146 capable de cibler spécifiquement la forme tumorale de la molécule

Introduction

La molécule CD146 a initialement été découverte dans des cellules de mélanome humain, en 1987 (142). Son expression est un marqueur de mauvais pronostic puisqu'elle est corrélée avec le pouvoir métastatique des mélanomes (143). La molécule CD146 a été associée à un stade avancé dans d'autres cancers et en particulier les cancers de la prostate (178), du sein (179), du rein (180) et du poumon non à petites cellules (162).

CD146 est associée à la croissance tumorale et à la dissémination des métastases (230). Elle joue un rôle dans la progression et l'implantation tumorale (143). Elle intervient également dans l'angiogenèse tumorale. En effet, *in vivo*, une inhibition de l'angiogenèse par un anticorps monoclonal anti-CD146 (clone AA98) a été obtenue dans un modèle de membrane chorioallantoïdienne de poulet ainsi que dans un modèle de xénogreffe tumorale dans un modèle murin. L'administration de cet anticorps chez la souris a permis de réduire la densité de vaisseaux sanguins dans la tumeur conduisant à une baisse de la croissance tumorale (205,241). Dans un autre modèle de xénogreffe chez le poisson zèbre, le blocage de la traduction de la protéine par des oligonucléotides morpholinos inhibe l'angiogenèse tumorale de tumeurs gastriques, pancréatiques et de mélanome (204).

La molécule CD146 a donc un rôle important en cancérologie et pourrait constituer une cible en thérapie anti-cancéreuse. Dans ce but, plusieurs équipes ont tenté de générer des anticorps anti-CD146 pour inhiber la croissance tumorale et/ou la vascularisation. Parmi ces anticorps, l'anticorps ABX-MA1 reconnaît à la fois la molécule CD146 tumorale et celle endothéliale. Cet anticorps n'a pas d'effet, *in vitro*, sur la prolifération des cellules cancéreuses. Cependant les auteurs ont montré qu'*in vivo* cet anticorps a un effet inhibiteur sur la croissance tumorale après une xénogreffe de cellules de mélanome dans des souris nude avec

probablement un effet qui porte essentiellement sur l'angiogenèse tumorale (244). Un autre anticorps, l'anticorps AA98, reconnaissant uniquement la molécule CD146 des cellules endothéliales participant à la vascularisation tumorale, a été généré. Cet anticorps a un effet inhibiteur sur la prolifération et la migration des HUVECs lorsqu'elles sont cultivées en présence de surnageants de cellules cancéreuses (205). Mais ces deux anticorps ne ciblent pas spécifiquement la molécule CD146 tumorale puisqu'ils semblent agir essentiellement sur la vascularisation tumorale.

L'objectif de ce travail a donc été de générer un anticorps anti-CD146 spécifique de la forme tumorale (TsCD146). Cet anticorps a ensuite été caractérisé puis nous avons étudié son intérêt diagnostique et thérapeutique.

Article

A novel anti-CD146 antibody specifically targets cancer cells by internalizing the molecule

Marie Nollet¹, Jimmy Stalin¹, Anaïs Moyon^{1,2}, Waël Traboulsi¹, Amel Essaadi¹, Stéphane Robert¹, Nausicaa Malissen³, Richard Bachelier¹, Laurent Daniel⁴, Alexandrine Foucault-Bertaud¹, Caroline Gaudy-Marqueste³, Romaric Lacroix¹, Aurélie S. Leroyer¹, Benjamin Guillet^{1,2}, Nathalie Bardin¹, Françoise Dignat-George¹, and Marcel Blot-Chabaud¹.

1- INSERM UMR-S 1076, Aix-Marseille University, UFR Pharmacy, Marseille, France.

2- CERIMED (European Center of Research in Medical Imaging), Aix-Marseille University, Marseille, France.

3-Department of dermatology, Timone hospital, Assistance publique des Hôpitaux de Marseille, Inserm UMR-S 911, Aix-Marseille University, Marseille, France.

4-Service d'anatomie pathologique, Aix-Marseille University, Timone hospital, Marseille, France.

Running title: Anti-tumor CD146 antibody

Correspondence : D. Marcel Blot-Chabaud, PhD, UMR-S 1076 INSERM, UFR Pharmacy, Aix-Marseille University, 27 Bd J. Moulin, 13005 Marseille.

Phone number: (+33) 4 91 83 56 85

Fax number: (+33) 4 91 83 56 02

E-mail address: marcel.blot-chabaud@laposte.net

ABSTRACT

CD146 is an adhesion molecule belonging to the immunoglobulin superfamily which is present on many tumors (melanoma, kidney, pancreas, breast, ...). In addition, it has been shown to be expressed on other cell types, as vascular endothelial and smooth muscle cells. Generating an antibody able to specifically recognize CD146 in cancer cells (designated as tumor CD146), but not in normal cells, would thus be of major interest for diagnostic purposes but also for targeting tumor CD146 without affecting the vascular system.

We thus generated antibodies against the extracellular part of the molecule produced in cancer cells and selected an antibody able to specifically recognize tumor CD146. This antibody, referred to as TsCD146 mAb, was able to detect CD146-positive tumors in human biopsies and *in vivo*, by PET imaging, in an animal model of xenografted tumor cells. In addition, TsCD146 mAb antibody was able to specifically detect CD146-positive cancer microparticles in the plasma of patients by FACS analysis. TsCD146 mAb displayed also therapeutic effects since it was able to reduce the growth of human CD146-positive cancer cells xenografted in nude mice. This effect was due, at least in part, to a decrease in the proliferation of CD146-positive cancer cells after TsCD146-mediated internalization of the membrane CD146.

Thus, TsCD146 mAb constitute a novel antibody specifically targeting the tumor form of CD146 that could be of major interest for diagnostic and therapeutic strategies against CD146-positive tumors in a context of personalized medicine.

Key words: antibody, CD146, cancer, PET, therapy, diagnosis

INTRODUCTION

CD146 (or MCAM, Mel-CAM, MUC18, Gicerin, S-endo1) is a transmembrane glycoprotein of about 110 kDa [1]. This adhesion molecule belongs to the immunoglobulin superfamily, displays five extracellular domains of the V-V-C2-C2-C2 type, a transmembrane domain and a short intracytoplasmic domain [2]. Two different isoforms of the membrane CD146 have been identified that differ by their cytoplasmic tail. The CD146 molecule was initially discovered in human melanoma cells [3] and was then described in many other tumors such as pancreas [4], kidney [5], prostate [6] or breast [7] cancer. In these cells, CD146 expression constitutes a marker of bad diagnosis since it is involved in tumor growth and dissemination [8]. In particular, its expression was shown to induce epithelio-mesenchymal transition [9]. However, CD146 is also expressed on the different cells constituting the vessels where it displays important physiological functions. Thus, our laboratory identified the molecule in the endothelium [10] and other reports described its expression on smooth muscle cells and pericytes [11,12]. In endothelial cells, CD146 is essentially present at the junction and is involved in vascular permeability and leucocytes transmigration during inflammation [10,13].

In view of the deleterious role of CD146 in tumor development and dissemination, it would be of major interest to specifically target the tumor form of CD146 (designated as tumor CD146) without affecting CD146 present in normal cells, in particular vascular cells (designated as physiological CD146). Many studies evidenced structural and functional differences between molecules expressed on both cancer and normal cells. Thus, different levels of glycosylation or different conformational states have been reported [14]. In view of these data, our working hypothesis was that tumor CD146 could display structural features that differ from that of physiological CD146. We have thus generated antibodies able to recognize the extracellular part of CD146 and screened them on their ability to recognize CD146 expressed in cancer cells but not CD146 expressed in vascular cells. Of interest, one antibody, that we referred to as TsCD146 mAb (for Tumor specific anti-CD146 monoclonal antibody) displayed these properties. This antibody was thus further characterized in order to evaluate its potential interest for diagnostic and/or therapeutic applications.

RESULTS

Generation of a newly developed monoclonal anti-CD146 antibody specifically targeting tumor CD146.

The recombinant extracellular part of CD146 was produced in mouse myeloma cells and used as immunogen to generate rat monoclonal antibodies. Hybridomas were screened for clones producing antibodies that i/ bind to the membrane CD146 expressed on cancer cells, and ii/ do not bind to the membrane CD146 expressed on the surface of endothelial and smooth muscle cells. The hybridoma clone TsCD146 mAb (IgG1 subtype) was selected on these criteria and was further characterized.

Characterization of TsCD146 mAb

Since it has been shown that many tumors express CD146, we examined the expression of the molecule in five cancer lines with reference to two types of micro- and macrovascular endothelial cells, and smooth muscle cells. CD146 expression was evaluated in these different cells at the mRNA level by RT-PCR with primers directed against the extracellular portion of CD146 and at the protein level by Elisa assay on cell lysates. UACC-1273 and C8161, two metastatic melanoma cell lines; Panc-1, a pancreatic cancer line; SW620 and Lovo, two colonic cancer lines were used. In these different cancer cell lines, only Lovo do not express CD146. For endothelial cells, HUVECs which are macroendothelial primary cells and the HMEC-1 line which is a microendothelial cell line were used. Finally, the HUA-SMC smooth muscle cells were also used. In all the cells, except Lovo, we observed CD146 expression at the mRNA (Figure 1A) and protein (Figure 1B) levels. TsCD146 mAb was characterized in comparison to the commercially available S-Endo1 antibody on its ability to bind cancer cells, endothelial cells and smooth muscle cells. To this end, both flow cytometry and immunofluorescence experiments were performed (Figure 1C). Results show that the TsCD146 mAb was able to bind UACC-1273, Panc-1, C8161, SW620 cancer cells and not Lovo cells which do not express CD146. In contrast, it was not able to bind HUVEC, HMEC-1 and HUA-SMC cells. As a control, the S-Endo1 antibody was able to bind all cells, except Lovo cells. In addition, immunoprecipitation experiments were performed on the different cell lines with the TsCD146 mAb and CD146 was revealed by western-blot. Results

(Figure S1) show that TsCD146 mAb immunoprecipitates CD146 only in UACC and Panc-1 cell lines, but not in HUVEC and HMEC-1 cells, and that the molecule is evidenced around 110 kDa.

Use of TsCD146 mAb for immunodetection of cancer cells in biopsies of human tissues

In order to demonstrate that TsCD146 mAb was able to detect CD146-positive tumor cells without labeling vascular cells, we carried out immunofluorescence experiments on human biopsies of melanoma (Figure 2A) in comparison with biopsies of normal skin (Figure 2B). Experiments were also performed on biopsies from verrucous carcinoma of skin (Figure 2C), renal carcinoma (Figure 2D) and colonic adenocarcinoma (Figure 2E). Sections of tissues were also labeled with an antibody directed against the vascular endothelium (anti-CD31 antibody). Binding of TsCD146 mAb was evidenced on tumor cells but not on endothelial cells which were labeled with CD31 mAb. No binding was observed with TsCD146 mAb on normal skin. In contrast, S-Endo1 antibody was able to bind both tumor and endothelial cells in renal carcinoma, as demonstrated by its colocalization with CD31 antibody in vessels (Figure S2).

Use of radiolabeled TsCD146 Fab'2 for immunodetection of melanoma cells by PET imaging

We investigated whether TsCD146 mAb was able to detect human melanoma cells *in vivo* using a xenograft model. To this end, we used Fab'2 fragment from TsCD146 mAb coupled to ⁶⁸Ga (see Material and Methods). Nude mice were injected with C8161 cells and 36 days after, ⁶⁸Ga Fab'2-TsCD146 was injected in animals. Results obtained by PET imaging (Figure 3A) showed that the tumor was visualized by the radiolabeled Fab'2. Of interest, only the external part of the tumor was labeled, without labeling in the central part. To further analyze this result, we performed immunofluorescence and histological experiments on these tumors after the sacrifice of the animal. Results confirmed the results obtained *in vivo*. Indeed, only the external part of the tumor was labeled with the TsCD146 mAb (Figure 3B) and the internal part corresponded to necrotic tissues (Figure 3C).

Use of TsCD146 mAb for immunodetection of cancer cell microparticles in the plasma of patients with melanoma

As cancer cells are able to generate microparticles which are secreted in the blood flow of patients and as microparticles carry many proteins from the mother cells, we investigated whether microparticles (MP) generated by melanoma cell lines or patients with melanoma were detected by the TsCD146 mAb. In a first series of experiments, MP were isolated from the culture medium of UACC melanoma cells and from the culture medium of HUVEC, and binding of TsCD146 mAb was analyzed together with the binding of the MP-specific annexinV. Figure 4A shows that there was no binding on HUVEC MP whereas TsCD146 mAb binding was observed on UACC MP. In view of these results, we performed a second series of experiments with plasmas from control patients and patients with melanoma (Figure 4B). Results show that annexin V/Ts CD146- positive cancer MP were detected in the plasma of patients with melanoma whereas there was no annexin V/TsCD146- positive MP detected in the plasma of control patients. In addition, the number of annexin V/TsCD146-positive MP was correlated with the initial *versus* metastatic stages of the tumor.

TsCD146 mAb decreases proliferation and membrane expression of CD146 in cancer cells by internalizing the molecule

We tested the effect of TsCD146 mAb on cancer cell proliferation as compared to proliferation of endothelial cells. After a 72-hour treatment with the antibody at 5 μ g/ml, we observed a decrease in proliferation of UACC-1273, C8161 and Panc-1 cells whereas there was no effect on HUVEC and HMEC-1 cells (Figure 5A).

Since an anti-proliferative effect of TsCD146 mAb was observed on cancer cells and since CD146 is involved in cell proliferation, we investigated whether this effect could be due to a decrease in the expression of CD146. In a first series of experiments, we analyzed the total expression of CD146 by Elisa on whole cell lysates. Results (Figure 5B) showed that total CD146 was reduced in cancer cells but not in endothelial cells after 72h of treatment with TsCD146 mAb. In a second series of experiments, we then investigated whether this could be due to a decrease in the membrane expression of CD146. The membrane CD146 expression was thus evaluated by flow cytometry in cancer cells after 72 hours

of treatment with the TsCD146 mAb or the control IgG. A significant decrease in membrane expression of CD146 was observed in the different cancer cell lines whereas there was no effect in endothelial cells (Figure 5C).

In view of these results, we performed experiments to determine whether this down-regulation of membrane CD146 was due to membrane CD146 internalization and degradation. To this end, we used a probe that was fluorescent in acidic subcellular compartments as endosomes or lysosomes. Results (Figure 6A) show that after treatment of C81-61 cells with the TsCD146 mAb, CD146 was directed towards intracellular acidic compartments of the cells at 37°C but not at 4°C, this last condition preventing the internalization of proteins from the membrane to the intracellular compartments. In addition, time-course experiments showed that the phenomenon started rapidly since it could be observed as soon as three hours after the beginning of treatment with the TsCD146 mAb. Similar results were obtained with Panc-1 and UACC cells (Figure S3). This result was confirmed by confocal microscopy experiments. Indeed, we showed that, after 72h of treatment with TsCD146 mAb, CD146 was colocalized with rab11 in intracellular compartments in C81-61 cells (Figure 6B).

TsCD146 mAb decreases tumor growth in animal models of xenograft

The effect of TsCD146 mAb was tested on tumor growth in C8161 melanoma cells orthotopically xenografted in NOD/SCID mice. When tumors reached about 20 mm³, TsCD146 mAb or an isotype control IgG (rat IgG1 mAb) were injected, twice a week, for 46 days. Tumor growth was monitored by determination of relative tumor volume by caliper. Caliper measurement revealed a significant decrease of tumor size in the group of mice injected with the TsCD146 mAb as compared to the rat IgG control group after 32 days of treatment (Figure 7A). Tumor weight was also determined at day 46 on isolated tumors after the sacrifice of animals and revealed that tumor weight was significantly reduced in the TsCD146 mAb treated group as compared to the rat IgG control group (Figure 7B). Finally, tumors were photographed at day 46 after the sacrifice of the animals and confirmed the inhibitory effect of TsCD146 mAb (Figure 7C).

These results were confirmed in another model of CD146-positive tumors subcutaneously xenografted in nude mice, the Panc-1 cells. Using the same experiments, we showed that tumor volume

measured with caliper was significantly reduced in the TsCD146 mAb treated tumor group as compared to the control group from day 43 after the beginning of the treatment (Figure S4).

DISCUSSION

Early detection and treatment of cancer is a major issue of public health. In order to efficiently fight the disease, personalized diagnosis and therapy are developed. This is based on the knowledge of the different proteins which are modified or involved in the development of the pathology. Among them, CD146 has been described to be neo-expressed in numerous tumors and to be associated with a bad prognosis. Indeed, CD146-positive tumors are characterized by a high proliferation rate and a high capacity to disseminate. This is due, in particular, to the role of CD146 in epithelio-mesenchymal transition [12]. Many tumors neo-express CD146, in particular melanoma, prostatic, breast, lung, pancreatic, kidney, gastric and hepatic cancers [3–5,7,15–19]. However, CD146 is not only expressed in these cancer cells, but it is also physiologically expressed by different types of cells, essentially by endothelial and smooth muscle cells constituting the vessels [8], and by some activated T cells [20]. In endothelial cells, CD146 is of major importance since it is essentially expressed at the junction of the cells and is involved in vascular permeability, inflammation and angiogenesis [10,13,21]. In smooth muscle cells, CD146 is involved in the interaction with endothelium [1]. Finally, in Th17 cells, CD146 displays a major role in lymphocyte extravasation to the central nervous system [22]. Thus, both normal and cancer cells express the CD146 molecule. Likewise, microparticles contained in the bloodstream and generated from both endothelial [23] and CD146-positive cancer cells [24] exhibit CD146 at their surface. Up to now, it was impossible to specifically target CD146 expressed in cancer cells or their derivatives as circulating cancer cells or microparticles, leading to major problems for diagnosis and/or targeted therapy. Specifically targeting the tumor form of CD146 with an antibody could thus allow detecting and targeting tumor cells without affecting vascular integrity and functions. Only two neutralizing monoclonal antibodies targeting the membrane form of CD146 have been generated until now. ABX-MA1 decreases tumor growth and vascularization but targets both the tumor and the endothelial membrane CD146 and thus displays negative effects on the host vascularization [25]. More recently, AA98 mAb has been generated that specifically targets the membrane CD146 expressed by tumor vessels [26]. However, this antibody does not interact with cancer cells. Finally, our team recently

developed the M2J-1 mAb which specifically target the soluble form of CD146 but not the tumor CD146 [27]. Thus, currently, there is no antibody specifically targeting cancer cells.

Of interest, it has been frequently described that normal and tumor forms of protein can differ because of different sequences, post-translational modifications or three-dimensional conformations. Thus, many post-translational modifications of proteins occur in cancer cells such as glycosylation, acetylation, ubiquitination or sumoylation [28] that may explain different binding characteristics of antibodies. Likewise, different three-dimensional conformations can result from differences in oligomerisation. Thus, many differences could lead to different structural features of CD146 in cancer and normal cells. This prompted us to generate an antibody able to target tumor CD146 but not physiological CD146. Up to now, no structural difference between the two forms of CD146 has been described. It has only been reported that CD146 could exist as both monomeric and dimeric forms with differences between normal and cancer cells [29]. Thus, CD146 could be essentially expressed as a dimer in cancer cells and as a monomer in endothelial cells. Further studies will be necessary to test this hypothesis and a detailed characterization of the target of the TsCD146 mAb will be required to explain the specificity of the TsCD146 antibody.

Concerning the interest of TsCD146 mAb for diagnosis, we have shown that it is able to detect CD146 in human biopsies of different tumors expressing CD146 and *in vivo* in xenografted tumors by PET imaging. Concerning this last technique, it could be useful for the specific detection of CD146-positive tumors before targeted therapy. Today, tumor cells are detected by imaging with common markers as ¹⁸F-FDG which do not permit to distinguish between tumors [30]. There is a need for new biomarkers able to discriminate between tumors that would pave the way for a personalized medicine. TsCD146 mAb could thus constitute one of these biomarkers. Of interest, we have shown that it is also able to detect microparticles from CD146-positive tumors in the plasma of patients with melanoma and that the number of CD146-positive microparticles was significantly increased in metastatic patients versus patients with initial tumors. Along this line, it will be of interest to test in future studies whether TsCD146 mAb is also able to detect circulating cancer cells that are released by tumors and constitute biomarkers of tumor dissemination. In that way, this new antibody could thus constitute a new tool to detect CD146-positive tumors in liquid biopsies by a minimally invasive technique.

In addition to the diagnostic interest, our study shows that TsCD146 mAb could be of interest for therapeutic purposes. Indeed, our results demonstrate that treatment with the antibody induces a decrease in the expression of the tumor CD146 molecule at the membrane. This is due in part to an internalization of the molecule after treatment with the antibody, as demonstrated by the use of a pH-dependent fluorescent dye and the colocalization with rab11, which is involved in vesicle transport between membrane and intracellular compartments [31]. This mechanism has been described for other antibodies, as trastuzumab. This antibody is currently used for the treatment of breast cancer and internalizes the HER2 receptor, a marker of bad prognosis as CD146 [32]. Thus, the tumor CD146 molecule could be removed from the plasma membrane and then be directed from the endosomal to the lysosomal compartments where it could be degraded. Further experiments will be necessary to further characterize this phenomenon. This reduction in CD146 membrane expression leads, at least in part, to a decrease in cell proliferation, as already reported [33], and could explain the observed therapeutic effect of the molecule. Indeed, in xenografted models of cancer cells, our experiments show that TsCD146 mAb administration leads to a significant decrease in tumor growth. In view of its mechanism of action, TsCD146 mAb could thus be of therapeutic interest, administrated either alone or coupled to toxins or radioactive atoms, in order to fight cancer cells after internalization. This second strategy has been shown to give convincing results recently [34].

In conclusion, our study shows that it is possible to specifically target the tumor CD146 molecule. We have, for the first time, successfully generated a monoclonal antibody, referred to as TsCD146 mAb, that specifically binds and internalizes tumor membrane CD146. This antibody could be of interest for diagnosis since it is able to recognize CD146-positive tumors on biopsies and *in vivo* by PET imaging. It can also detect microparticles in the plasma of patients with CD146-positive tumors. In addition, because of its mechanism of action, this antibody could also be of interest for therapy since it is able to reduce the growth of CD146-positive tumors xenografted in nude mice. It will now be of major interest to precisely define its specific epitope on cancer cells and to further study its mechanism of action before considering its use in human personalized medicine.

MATERIALS AND METHODS

Cell culture

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) were grown in Endothelial Cell Growth Media (EGM-2 Bulletkit™) (Lonza, Amboise, France). The HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cell Line) cell line was grown in Endothelial Basal Medium (EBM) (PAA, Velizy-Villacoublay, France) supplemented with fetal calf serum (FCS 10%), penicillin and streptomycin, 1%), L-glutamine (1%), epidermal growth factor (10ng/mL) and hydrocortisone (50µg/mL). HUA-SMC (Smooth Muscle Cells) were grown in Dulbecco's Modified Eagles medium (DMEM) added with 10% SVF.

Tumor cell lines PANC-1 (pancreatic cancer) and LOVO (colonic cancer) were cultured in DMEM (Life Technologies, Saint Aubin, France) supplemented with FCS (10%), PS (%), L-glutamine (1%) and sodium pyruvate (1%). The tumor cell lines UACC-1273 (melanoma), C8161 (melanoma) and SW620 (colonic cancer) were cultured in RPMI 1640 Glutamax™ (life technologies) supplemented with FCS (10%) and PS (1%). The cells were grown in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

Generation of antibodies against CD146

Antibodies against CD146 were generated by the platform of monoclonal antibodies (Mi-mAbs; Marseille-Luminy, France) by injection in rat of a recombinant protein, generated in mouse myeloma, corresponding to the extracellular part of CD146. After obtaining the hybridoma, anti-CD146 antibodies were purified by affinity chromatography on a HiTrap protein G column (GE Healthcare).

qPCR

Experiments were performed as previously described [27]. Primers were: GAPDH: R: 5'-GGTGGTCTCCTGACTTCAACA; F: 5'-GTTGCTGTAGCCAATTCGTTGT; CD146: R: 5'-GGCTAATGCCTCAGATCGATG; F: 5'-AATATGGTGTTGAATCTGTCTTG

Flow Cytometry

Cells were processed as previously described [27] and data analyzed by flow cytometer (Gallios™ Flow Cytometer, Beckman Coulter, Villepinte). The results were then analyzed using Kaluza software (Kaluza® Analysis Software, Beckman Coulter).

UACC derived microparticles were first generated by serial centrifugations (3 centrifugations at 70,000 g for 1h30) of UACC supernatant medium. MP were then labeled with 10µl of AnnexinV-FITC (Tau Technologies, Netherlands) and 10µl of various concentration of PE-TsCD146 mAb during 30 minutes at room temperature, without light. 500µl of AnnexinV binding buffer were finally added and tube was analysed on flow cytometer. Titration curve was therefore established, by determination of the maximum percentage of double positive AnnexinV / TsCD146 microparticles among AnnexinV-positive MP (data unshown). The TsCD146 antibody suspension on vesicles was also adjusted equivalently with IgG isotypic control to confirm staining specificity.

The same staining was realized on plasmatic MP derived from healthy patients or patients with melanoma. Briefly, PFP were prepared from EDTA blood collection tubes using a first centrifugation on ficoll sucrose gradient 30 min at 800 g. Then the part above PBMC ring was collected. Then 30µl of PFP were thawed and stained with AnnexinV FITC and TsCD146 PE Ab or IgG isotypic control during 30 minutes at room temperature, without light. After addition of 500µl of AnnexinV binding buffer + hirudine (Cryopep, Montpellier, France), 30µl of MP count beads (Biocytex, Marseille, France) were added to evaluate the tumoral MP concentration.

MP analyses were realized on Gallios Flow Cytometer using the Megamix+ FSC strategy previously published by our team [35]. Cancer MP were defined as AnnexinV /TsCD146-positive events.

Confocal microscopy

Experiments were performed as previously described [27] with primary anti-CD146 antibodies S-endo1 (Biocytex) and TsCD146 mAb (dilution 1/200) and secondary anti-mouse and anti-rat (dilution 1/200) antibodies coupled to Alexa 488 diluted in PBS-saponin (0.2%) - FCS (10%) for 30 minutes. The lamellae were then mounted with DAPI (Prolong® gold antifade reagent with DAPI, Invitrogen) mounting liquid and observed with the confocal microscope (Leica SP5, Leica, Nanterre, France).

For experiments on biopsies, organs were fixed in 4% formalin and cut using a cryostat. The slides were then pretreated in a pH 6 citrate buffer at 96 ° C for 30 minutes. They were then preincubated for 30 minutes in PBS-BSA 0.5% -Triton 10X 0.1%. Immunofluorescence experiments were then carried out on these sections with primary antibodies S-endo1 and TsCD146 mAb (dilution 1/100) overnight in a humidity chamber and anti-mouse and anti-rat secondary antibodies (dilution 1/200) coupled to Alexa diluted in PBS-BSA 0.5% - Triton 10X 0.1% for 1 hour. The lamellae were then mounted with mounting fluid (Prolong, Invitrogen) and observed with the confocal microscope (Leica SP5).

For experiments with rab11, cells were first treated for 72 hours with TsCD146 mAb. Then cells were fixed with PFA 4% and incubated for 5 minutes in PBS-Triton 10X 0.2% followed by 30 minutes' incubation with PBS-BSA 0.5%. They were then incubated with rab11 antibody (Abcam, Ab3612) for 1 hour and secondary antibodies (anti-rat alexa 647 for TsCD146 mAb and anti-rabbit alexa 488 for rab 11) for 1 hour. Colocalization of both proteins was visualized with confocal microscope.

CD146 Elisa

Experiments were performed as previously described [27].

Immunoprecipitation and western-blot experiments

Experiments were performed as previously described [27].

Proliferation experiments

Experiments were performed as previously described [27].

Internalization experiments with protonex red 600 SE

Cells were seeded in 96-well plates, 10,000 cells per well, in complete cell culture medium containing 2.5-30 µg/ml Ts CD146 mAb conjugated to Protonex red 600 SE (AAT Bioquest, CA). Protonex is a pH-sensitive dye that is non-fluorescent at basic pH (extracellular: culture medium) and fluorescent at acidic pH (intracellular: endosomes, lysosomes). Serially-diluted antibodies were added and plates were incubated at 37°C for 3, 6 and 9 hours. Experiments were also performed at 4°C as a control in order to block the internalization processes. Mean fluorescent intensities (MFI) of intracellular Protonex were measured per well using Glomax (Promega).

Analysis of tumor growth on tumor xenografted animals

Xenografts of human tumor cell lines were produced by injecting tumor cells (5×10^6 cells resuspended in PBS) subcutaneously into the back of NOD/SCID mice. When tumors reached 20 mm³, peri-tumoral administration of purified TsCD146 mAb or rat control IgG were realized at a dose of 10 µg, twice a week, for 46 days. Tumor size was measured twice a week with caliper and tumor volume was determined according to the equation: (length*width*thickness)*0.5236. Tumor weight was also evaluated at the end of the experiment after the sacrifice of the animal.

NODAGA conjugation and radiolabeling

TsCD146 Fab'2 were generated and purified with Amicon Ultra-0.5 3kDa Centrifugal Filter 500µL (Millipore Corporation) and added 10 equivalents of p-NCS-benzyl-NODAGA in 0.2M bicarbonate buffered. The mixture was left at 37°C for 3h. The conjugate was then transferred to an Amicon Ultra-0.5 3kDa Centrifugal Filter Devices 500µL, concentrated in distilled water (0.5mg/mL) and stored at -80°C.

Radiochemistry

Gallium was obtained in $^{68}\text{GaCl}_3$ form using a commercial TiO_2 -based $^{68}\text{Ge}/^{68}\text{Ga}$ generator (Obninsk). $^{68}\text{GaCl}_3$ (200.69 ± 40.97 MBq/0.5 mL) was eluted from a $^{68}\text{Ge}-^{68}\text{Ga}$ generator using 0.1 N HCl, after which 4M ammonium acetate buffer (pH 7.4) was added. This solution was then added to NODAGA-TsCD146 Fab'2 (15µg); final pH of the mixture was 6.0. The reaction mixture was stirred at room temperature for 15 min with manual shaking.

MicroPET imaging

Mice xenografted with C8161 cells (n=6) were injected IV at day 36 post implementation with 5-10 MBq of ^{68}Ga -NODAGA-TsCD146 Fab'2 under 2% isoflurane anesthesia. PET images were acquired 1h30 and 3H00 after ^{68}Ga -NODAGA-TsCD146 Fab'2 IV injection with a MedisoNanoPET/CT under 2% isoflurane anesthesia.

Ethics committee approval.

The animal experiments conformed to the directive 2010/63/EU of the European Parliament and were approved by the Institution's Animal care and Use Committee (Aix-Marseille University). The procedures described above were conducted under an institutional approved animal use protocol

(Marseille Ethical Committee) and under the supervision of an authorized researcher (B. Guillet; n°13328).

The experiments on human were performed retrospectively on plasmas from patients with melanoma. They were performed in accordance with the Helsinki declaration of 1975, revised in 1983 and informed consent of the patients was obtained.

Statistical analysis and expression of results

The data were expressed as mean values \pm SEM of the indicated number of experiments. Statistical analysis was performed with the Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). The variance between the different groups to be compared was estimated before statistical analysis. When comparing more than two groups, a non-parametric one-way ANOVA followed by a Dunn's multiple comparison test was used. Significant differences between two groups were determined using the unpaired student's t test or Mann-Whitney test. A value of $P \leq 0.05$ was considered to be significant.

The sample size was chosen for each type of experiment using an a priori power analysis. No exclusion criteria were taken into account; all the values obtained during the experiments were used for both *in vitro* and *in vivo* studies. In animal studies, the groups' sizes were chosen using an a priori power analysis, the investigator was blinded to the group allocation and mice were distributed at random in the different groups.

Supplementary Information accompanies the paper on the website (<http://www.nature.com/onc>).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Biocytex company (Marseille, France) for CD146 Elisa kits and S-Endo-1/COM7A4 antibodies. This study was financed by grants from Inserm, Aix-Marseille University and SATT Sud-Est.

REFERENCES

1. Shih IM. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol.* 1999; 189: 4–11. doi: 10.1002/(SICI)1096-9896(199909)189:1<4::AID-PATH332>3.0.CO;2-P.
2. Sers C, Kirsch K, Rothbacher U, Riethmüller G, Johnson JP. Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993; 90: 8514–8.
3. Lehmann JM, Riethmüller G, Johnson JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86: 9891–5.
4. Maitra A, Hansel DE, Argani P, Ashfaq R, Rahman A, Naji A, Deng S, Geradts J, Hawthorne L, House MG, Yeo CJ. Global expression analysis of well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms using oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2003; 9: 5988–95.
5. Ueno K, Hirata H, Majid S, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R. IGFBP-4 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway and induces M-CAM expression in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2011; 129: 2360–9. doi: 10.1002/ijc.25899.
6. Wu G-J, Fu P, Chiang C-F, Huss WJ, Greenberg NM, Wu M-WH. Increased expression of MUC18 correlates with the metastatic progression of mouse prostate adenocarcinoma in the TRAMP model. *J Urol.* 2005; 173: 1778–83. doi: 10.1097/01.ju.0000154643.30048.2c.
7. Zeng G-F, Cai S-X, Wu G-J. Up-regulation of METCAM/MUC18 promotes motility, invasion, and tumorigenesis of human breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2011; 11: 113. doi: 10.1186/1471-2407-11-113.
8. Wang Z, Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett.* 2013; 330: 150–62. doi: 10.1016/j.canlet.2012.11.049.
9. Imbert A-M, Garulli C, Choquet E, Koubi M, Aurrand-Lions M, Chabannon C. CD146 expression in human breast cancer cell lines induces phenotypic and functional changes observed in Epithelial to Mesenchymal Transition. *PLoS One.* 2012; 7: e43752. doi: 10.1371/journal.pone.0043752.
10. Bardin N, Anfosso F, Massé JM, Cramer E, Sabatier F, Le Bivic A, Sampol J, Dignat-George F. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood.* 2001; 98: 3677–84.
11. Espagnolle N, Guilloton F, Deschaseaux F, Gadelorge M, Sensébé L, Bourin P. CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *J Cell Mol Med.* 2014; 18: 104–14. doi: 10.1111/jcmm.12168.
12. Maier CL, Shepherd BR, Yi T, Pober JS. Explant outgrowth, propagation and characterization of human pericytes. *Microcirc N Y N 1994.* 2010; 17: 367–80. doi: 10.1111/j.1549-8719.2010.00038.x.

13. Bardin N, Blot-Chabaud M, Despoix N, Kebir A, Harhoury K, Arsanto J-P, Espinosa L, Perrin P, Robert S, Vely F, Sabatier F, Le Bivic A, Kaplanski G, et al. CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29: 746–53. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.183251.
14. Boja ES, Rodriguez H. Proteogenomic convergence for understanding cancer pathways and networks. *Clin Proteomics.* 2014; 11: 22. doi: 10.1186/1559-0275-11-22.
15. Wu GJ, Varma VA, Wu MW, Wang SW, Qu P, Yang H, Petros JA, Lim SD, Amin MB. Expression of a human cell adhesion molecule, MUC18, in prostate cancer cell lines and tissues. *The Prostate.* 2001; 48: 305–15.
16. Jiang G, Zhang L, Zhu Q, Bai D, Zhang C, Wang X. CD146 promotes metastasis and predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res CR.* 2016; 35: 38. doi: 10.1186/s13046-016-0313-3.
17. Zabouo G, Imbert A-M, Jacquemier J, Finetti P, Moreau T, Esterni B, Birnbaum D, Bertucci F, Chabannon C. CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res BCR.* 2009; 11: R1. doi: 10.1186/bcr2215.
18. Liu W-F, Ji S-R, Sun J-J, Zhang Y, Liu Z-Y, Liang A-B, Zeng H-Z. CD146 expression correlates with epithelial-mesenchymal transition markers and a poor prognosis in gastric cancer. *Int J Mol Sci.* 2012; 13: 6399–406. doi: 10.3390/ijms13056399.
19. Ilie M, Long E, Hofman V, Selva E, Bonnetaud C, Boyer J, Vénissac N, Sanfiorenzo C, Ferrua B, Marquette C-H, Mouroux J, Hofman P. Clinical value of circulating endothelial cells and of soluble CD146 levels in patients undergoing surgery for non-small cell lung cancer. *Br J Cancer.* 2014; 110: 1236–43. doi: 10.1038/bjc.2014.11.
20. Pickl WF, Majdic O, Fischer GF, Petzelbauer P, Faé I, Waclavicek M, Stöckl J, Scheinecker C, Vidicki T, Aschauer H, Johnson JP, Knapp W. MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1997; 158: 2107–15.
21. Kebir A, Harhoury K, Guillet B, Liu JW, Foucault-Bertaud A, Lamy E, Kaspi E, Elganfoud N, Vely F, Sabatier F, Sampol J, Pisano P, Kruithof EKO, et al. CD146 short isoform increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. *Circ Res.* 2010; 107: 66–75. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.109.213827.
22. Duan H, Xing S, Luo Y, Feng L, Gramaglia I, Zhang Y, Lu D, Zeng Q, Fan K, Feng J, Yang D, Qin Z, Couraud P-O, et al. Targeting endothelial CD146 attenuates neuroinflammation by limiting lymphocyte extravasation to the CNS. *Sci Rep.* 2013; 3: 1687. doi: 10.1038/srep01687.
23. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011; 31: 27–33. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.218123.
24. de Souza PS, Faccion RS, Bernardo PS, Maia RC. Membrane microparticles: shedding new light into cancer cell communication. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016; 142: 1395–406. doi: 10.1007/s00432-015-2029-8.

25. Mills L, Tellez C, Huang S, Baker C, McCarty M, Green L, Gudas JM, Feng X, Bar-Eli M. Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res.* 2002; 62: 5106–14.
26. Lin Y, Wu X, Shen Y, Bu P, Yang D, Yan X. A novel antibody AA98 V(H)/L directed against CD146 efficiently inhibits angiogenesis. *Anticancer Res.* 2007; 27: 4219–24.
27. Stalin J, Nollet M, Garigue P, Fernandez S, Vivancos L, Essaadi A, Muller A, Bachelier R, Foucault-Bertaud A, Fugazza L, Leroyer AS, Bardin N, Guillet B, et al. Targeting soluble CD146 with a neutralizing antibody inhibits vascularization, growth and survival of CD146-positive tumors. *Oncogene.* 2016; 35: 5489–500. doi: 10.1038/onc.2016.83.
28. Eisenberg-Lerner A, Ciechanover A, Merbl Y. Post-translational modification profiling - A novel tool for mapping the protein modification landscape in cancer. *Exp Biol Med* Maywood NJ. 2016; 241: 1475–82. doi: 10.1177/1535370216651732.
29. Bu P, Zhuang J, Feng J, Yang D, Shen X, Yan X. Visualization of CD146 dimerization and its regulation in living cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 2007; 1773: 513–20. doi: 10.1016/j.bbamcr.2007.01.009.
30. Singnurkar A, Poon R, Metser U. Comparison of 18F-FDG-PET/CT and 18F-FDG-PET/MR imaging in oncology: a systematic review. *Ann Nucl Med.* 2017; 31: 366–78. doi: 10.1007/s12149-017-1164-5.
31. Welz T, Wellbourne-Wood J, Kerkhoff E. Orchestration of cell surface proteins by Rab11. *Trends Cell Biol.* 2014; 24: 407–15. doi: 10.1016/j.tcb.2014.02.004.
32. zum Büschenfelde CM, Hermann C, Schmidt B, Peschel C, Bernhard H. Antihuman epidermal growth factor receptor 2 (HER2) monoclonal antibody trastuzumab enhances cytolytic activity of class I-restricted HER2-specific T lymphocytes against HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res.* 2002; 62: 2244–7.
33. Kang Y, Wang F, Feng J, Yang D, Yang X, Yan X. Knockdown of CD146 reduces the migration and proliferation of human endothelial cells. *Cell Res.* 2006; 16: 313–8. doi: 10.1038/sj.cr.7310039.
34. Govindan SV, Goldenberg DM. New antibody conjugates in cancer therapy. *ScientificWorldJournal.* 2010; 10: 2070–89. doi: 10.1100/tsw.2010.191.
35. Robert S, Lacroix R, Poncelet P, Harhoury K, Bouriche T, Judicone C, Wischhusen J, Arnaud L, Dignat-George F. High-sensitivity flow cytometry provides access to standardized measurement of small-size microparticles--brief report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2012; 32: 1054–8. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.244616.

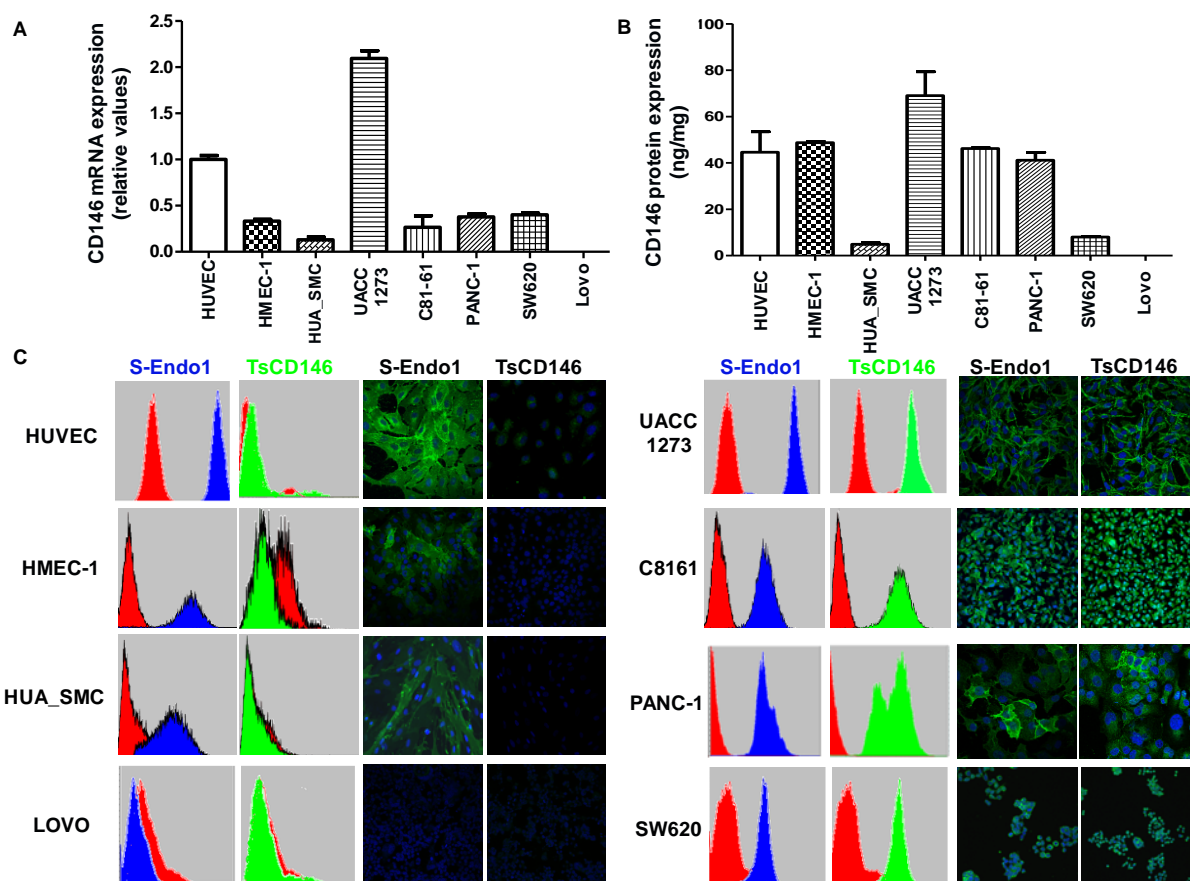


Figure 1: Specific detection of CD146 in cancer cells with TsCD146 antibody

A- The CD146 mRNA expression was analyzed in the different cell lines by RT-PCR. The results are expressed as relative values compared to HUVEC. Results are the average of 3 different experiments.

B- The protein expression of CD146 was analyzed in the different cell lines with an ELISA assay. Results are expressed as relative values compared to Huvec. Results are the average of 3 different experiments.

C- CD146 was detected in the different cell lines with the TsCD146 mAb and the control S-Endo1 antibody by flow cytometry and immunofluorescence. Control mouse and rat IgG were used and antibodies were coupled to a secondary FITC antibody. Pictures are representative of 3 different experiments.

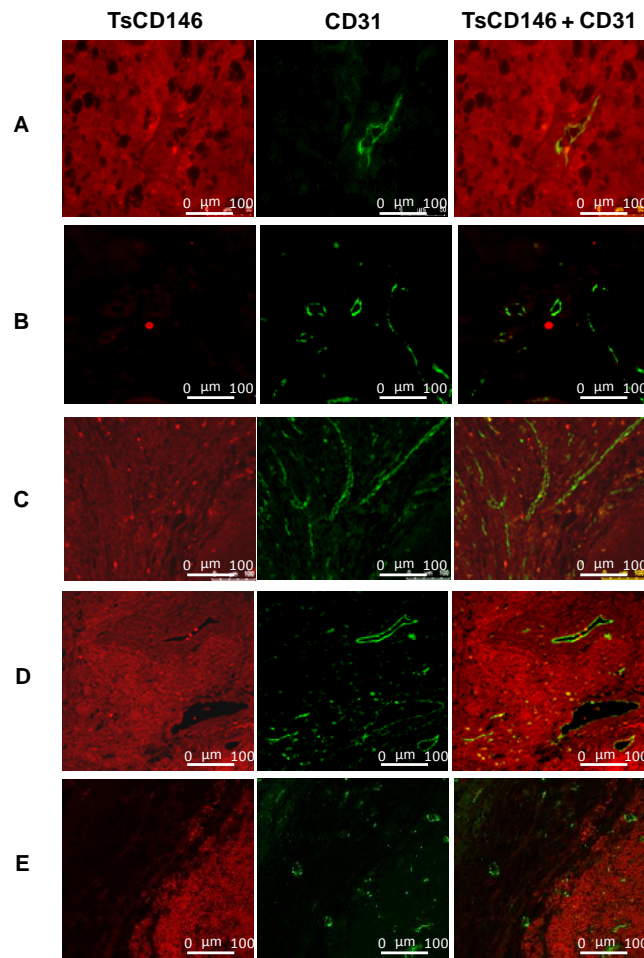


Figure 2: Immunodetection of CD146 in cancer cells with TsCD146 mAb in human biopsies

Human melanoma (A), normal skin (B), verrucous carcinoma of skin (C), renal carcinoma (D) and colonic adenocarcinoma (E) biopsies were labeled with the TsCD146 mAb coupled to an Alexa 546 anti-rat antibody and analyzed by immunofluorescence. CD31 mAb coupled to an alexa 488 anti-rabbit antibody was also used and merge pictures are given. This experiment is representative of 3 experiments for each type of cancer (Magnification 40X).

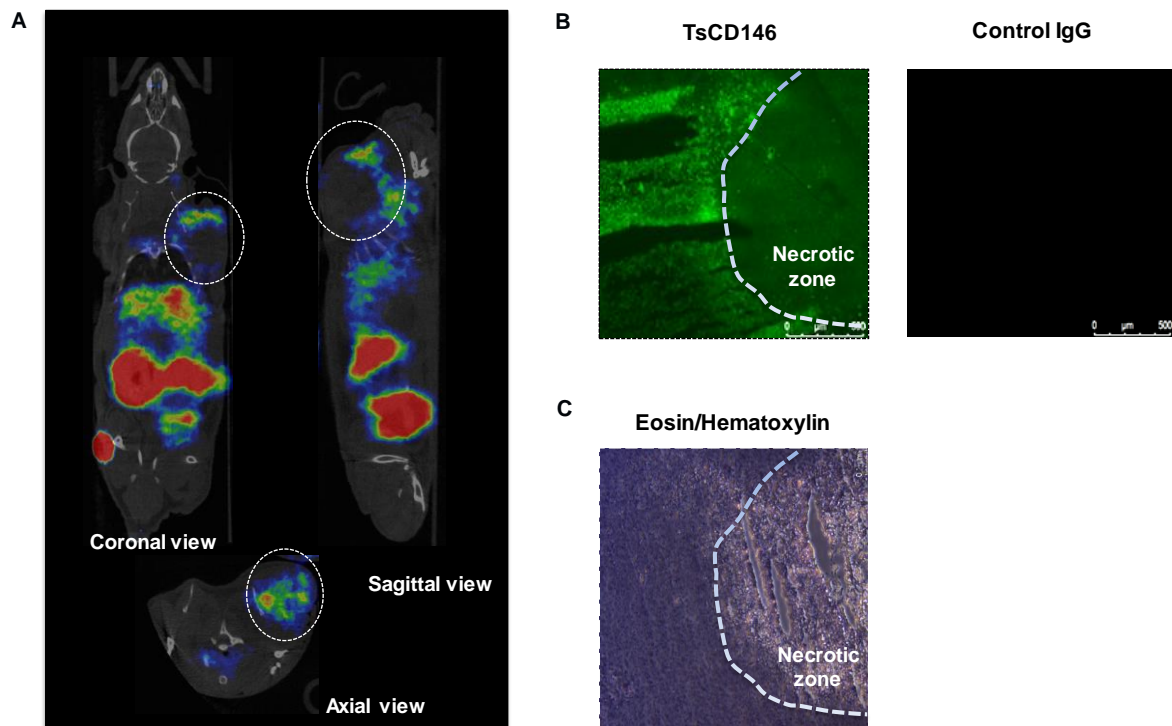


Figure 3: Immunodetection of CD146 with radiolabeled TsCD146 mAb in cancer cells xenografted in nude mice

A- Fab'2-TsCD146 was radiolabeled with ^{68}Ga after NODAGA conjugation and injected in nude mice xenografted with C8161 melanoma cells. PET analysis showed that the tumor was detected with the radiolabeled antibody. Coronal, sagittal and axial views are given. Tumors are visualized within dotted circles. Representative pictures of PET are given. Experiments were performed with 6 different animals.

B- After sacrifice of the animals, tumors were labeled with TsCD146 mAb coupled to a FITC second antibody. A control rat IgG was also used as a control. The dotted line corresponds to the necrotic zone visualized in C. A representative picture from 6 different experiments is given. Magnification x5.

C- After sacrifice of the animals, tumors were analyzed by histochemistry after treatment with eosin/hematoxylin. The dotted line corresponds to the necrotic zone. A representative picture from 6 different animals is given.

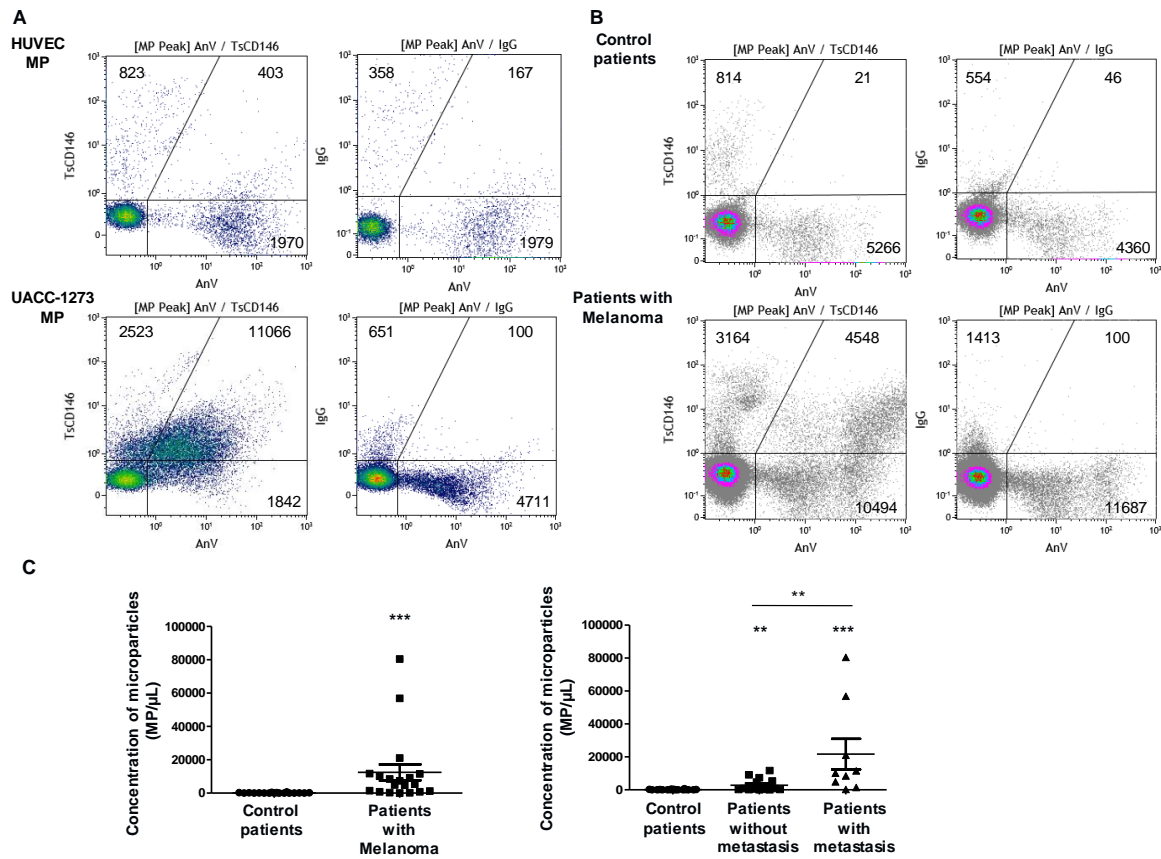


Figure 4: Immunodetection of CD146 in microparticles from cancer cells and plasmas of patients with melanoma with TsCD146 mAb.

A- Annexin V-positive microparticles from HUVEC and UACC-1273 cells were analyzed by flow cytometry with TsCD146 mAb-PE and IgG1-PE control antibody. Pictures are representative of at least 4 different experiments.

B- Annexin V-positive microparticles from plasmas of control patients or patient with melanoma were analyzed by flow cytometry with TsCD146 mAb-PE. Experiments were also performed with control IgG1-PE.

C- Annexin V-positive / TsCD146-positive microparticles from plasmas of control patients and patients with melanoma at different stages were quantified. Control patients were compared to melanoma patients and patients with melanoma at initial or metastatic stages. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ experimental versus control.

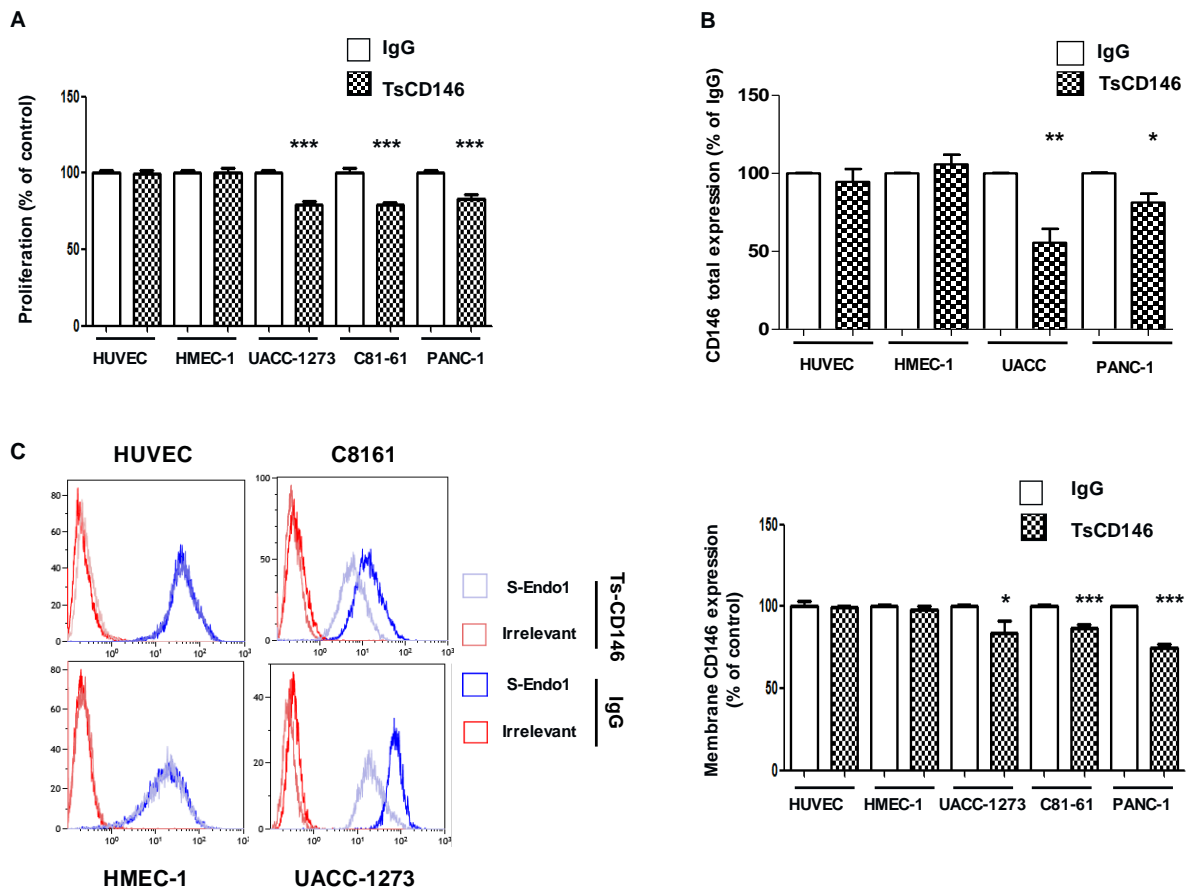


Figure 5: Effect of TsCD146 mAb antibody on cell proliferation and CD146 expression

A- Analysis of the proliferation of HUVEC, HMEC-1, UACC-1273, C81-61 and Panc-1 cells after 72h in the presence of IgG or TsCD146 mAb (5µg / ml). The results are expressed as mean values +/- standard deviation of 3 experiments.

B- Total CD146 expression was determined by Elisa on lysates of UACC, Panc-1, HUVEC and HMEC-1 cells after 72h of treatment with control IgG or TsCD146 mAb. Mean values of three different experiments are given.

C- Membrane expression of CD146 was determined by flow cytometry experiments with S-endo1 antibody in the different cell lines after treatment with TsCD146 mAb (5µg / ml) or IgG (5µg / ml) for 72 hours. Representative FACS profiles are given. The results are expressed as mean values +/- standard deviation of 3 experiments.

* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001, experimental versus control

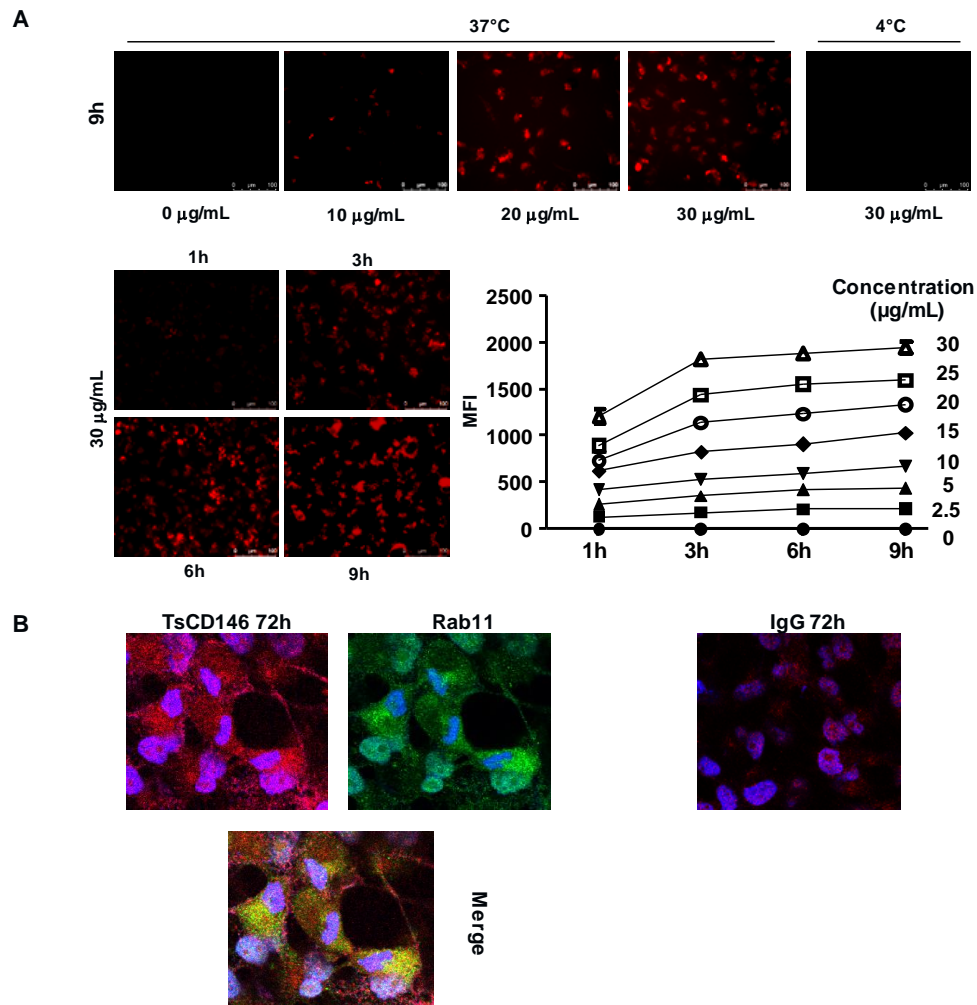


Figure 6: Effect of TsCD146 mAb antibody on CD146 internalization

A- Visualization and quantification of TsCD146 mAb internalization in C81-61 cells. C81-61 were seeded and incubated for 1 to 9 hours at 37°C with 2.5-30 µg/ml TsCD146 mAb conjugated to Protonex red 600 SE. Mean Fluorescence Intensity (MFI) of the signal was measured and visualized with a fluorescence microscope. As a control, experiments were also performed at 4°C for 9 hours with 30 µg/ml of the complex. The results are representative of 4 different experiments.

B- Colocalization of CD146 and rab11 in C81-61 cells. After treatment of C81-61 cells with TsCD146 mAb for 72h, cells were fixed and TsCD146 mAb was visualized together with rab11 by confocal microscopy. Merge picture is given. C81-61 cells treated for 72h with control IgG are also shown. Nuclei are visualized in blue with dapi. Pictures are representative of 3 different experiments.

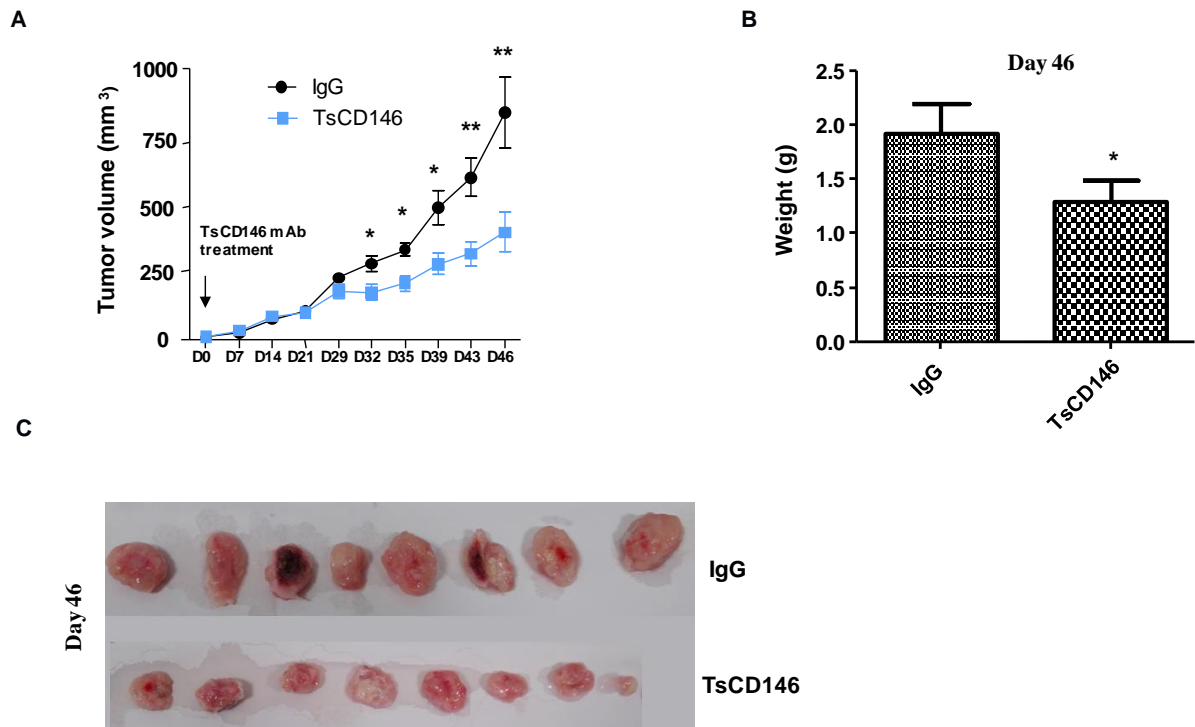


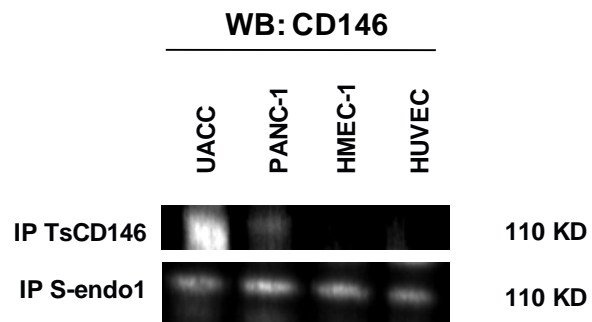
Figure 7: Effect of TsCD146 mAb on growth of C81-61 cells in an animal model of xenograft

A- 8 NOD/SCID mice xenografted with C8161 cells were treated for 46 days with control IgG or the TsCD146 mAb. Tumor volume was determined twice a week with caliper.

B- Tumor weight was determined in IgG and TsCD146 mAb treated animals after the sacrifice of the animals

D- Tumors from IgG and TsCD146 mAb treated animals were photographed after sacrifice of the animals.

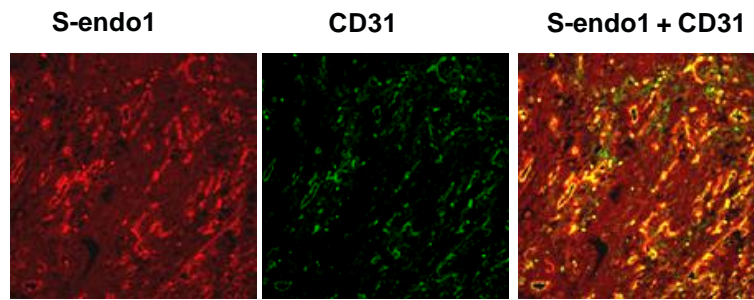
Supplementary Information



Supplementary figure 1: Immunoprecipitation of CD146 in endothelial and cancer cells with TsCD146 mAb

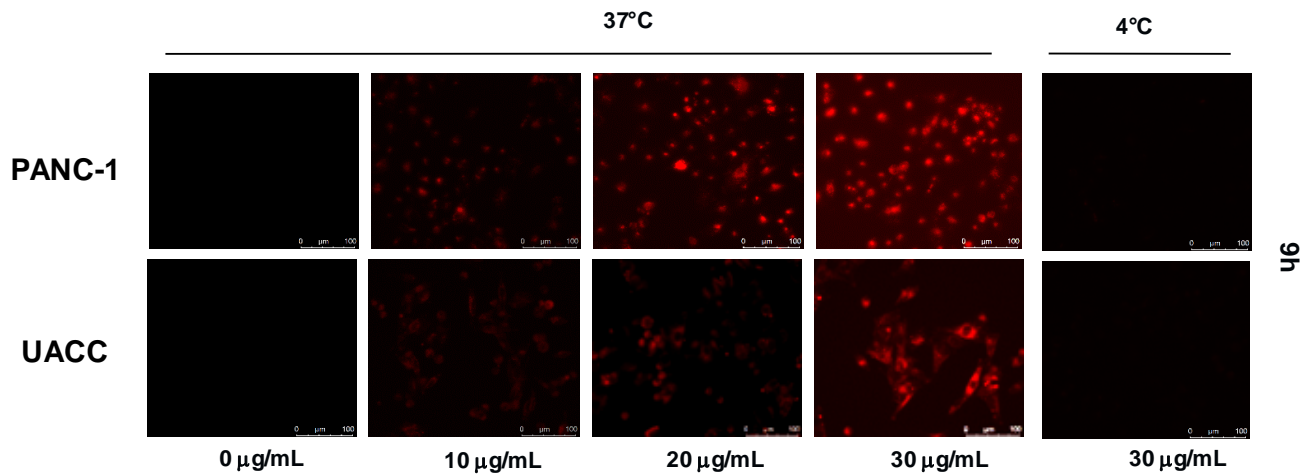
CD146 was immunoprecipitated in lysates of UACC, Panc-1, HUVEC and HMEC-1 with TsCD146 or S-Endo1 mAbs and revealed by western-blot with COM7A4 antibody.

The molecular weight of the protein is given. The picture is representative of three different experiments.



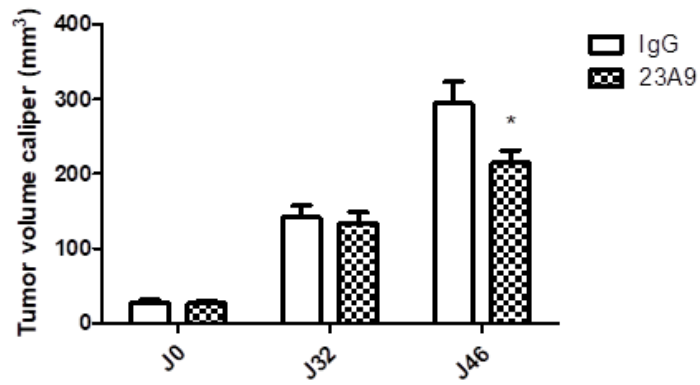
Supplementary figure 2: Immunodetection of CD146 in cancer cells with S-endo1 mAb in human biopsies

Human renal carcinoma biopsies were labeled with the S-endo1 mAb coupled to an Alexa 546 anti-mouse antibody and analyzed by immunofluorescence. CD31 mAb coupled to an alexa 488 anti-rabbit antibody was also used and merge pictures are given. This experiment is representative of 3 experiments (Magnification 40X).



Supplementary figure 3: Internalization of TsCD146 mAb in Panc-1 cells

Visualization of TsCD146 mAb internalization in PANC-1 and UACC cells. Cells were seeded and incubated for 1 to 9 hours at 37°C with 10-30 µg/ml TsCD146 mAb conjugated to Protonex red 600 SE. Fluorescence intensity of the signal was visualized with a fluorescence microscope. As a control, experiments were also performed at 4°C for 9 hours with 30 µg/ml of the complex. The results are representative of 4 different experiments.



Supplementary figure 4: Effect of TsCD146 mAb on growth of Panc-1 cells in an animal model of xenograft

8 NOD/SCID mice xenografted with Panc-1 cells were treated for 46 days with control IgG or the TsCD146 mAb. Tumor volume was determined with caliper.

*: $p < 0.05$, experimental versus control.

Discussion

Nous avons réussi à générer un anticorps anti-CD146 contre la partie extracellulaire de CD146 produite dans des cellules de myélome de souris (collaboration avec le CIML) capable de détecter la forme CD146 membranaire cancéreuse sans reconnaissance de la forme CD146 « physiologique ». Ceci constitue, à notre connaissance, le premier anticorps avec cette propriété.

Cet anticorps, TsCD146, présente un intérêt diagnostique puisqu'il marque spécifiquement CD146 tumoral sur des biopsies. Il permet également de détecter les microparticules cancéreuses dans le plasma de patients ayant un mélanome. De plus, nous montrons que le nombre de microparticules TsCD146 positives augmente significativement avec le stade de la maladie. Enfin, cet anticorps est utilisable en imagerie TEP-CT et permet de diagnostiquer des tumeurs CD146 positives. Il pourrait aussi être utilisé en radiothérapie.

Il apparaît également que cet anticorps présente un intérêt thérapeutique puisqu'il baisse la prolifération des cellules cancéreuses en diminuant l'expression membranaire de CD146. L'anticorps, une fois fixé à la molécule CD146, va entraîner son internalisation. Ce mécanisme a été décrit pour d'autres anticorps comme le Trastuzumab qui, une fois fixé à la protéine HER2, entraîne son internalisation puis sa dégradation (283). En conséquence, TsCD146 baisse significativement la croissance tumorale dès 32 jours de traitement comparé à un IgG contrôle. Cette diminution est de 40% lors du sacrifice à 48 jours.

Nos résultats et les données de la littérature ouvrent donc de nouvelles perspectives. Ainsi, il serait intéressant de poursuivre cette étude en étudiant le mécanisme de la spécificité de l'anticorps. Des différences entre les protéines normales et cancéreuses sont fréquemment décrites. Ces protéines peuvent avoir des séquences différentes, il peut y avoir des modifications post-traductionnelles telles que la glycosylation, l'acétylation, l'ubiquitination ou la sumoylation, il peut également y avoir une conformation tridimensionnelle différente (284). Ces différences peuvent expliquer une différence de liaison de l'anticorps. Les différences de conformation tridimensionnelle peuvent résulter d'une oligomérisation différente. A ce jour, aucune différence structurale n'a été décrite entre CD146 normal et tumoral. En revanche, il a été rapporté que CD146 pourrait exister sous forme monomérique et dimérique et que CD146 existerait essentiellement sous forme dimérique dans les cellules cancéreuses alors qu'il est essentiellement monomérique dans les cellules endothéliales (159). Des expériences sont

nécessaires afin de tester cette hypothèse et de caractériser la cible de TsCD146 afin d'expliquer sa spécificité. Une autre hypothèse pourrait être l'existence de partenaires différents qui rendent ou non l'épitope accessible.

De plus, CD146 étant présent sur les cellules tumorales circulantes (285), il sera intéressant de déterminer si l'on peut marquer ces cellules tumorales circulantes directement dans le sang avec l'anticorps. Cela pourrait présenter un intérêt diagnostique supplémentaire. Ceci est particulièrement intéressant dans le mélanome où il n'y a pas de marquage des cellules tumorales circulantes par EPCAM qui est le marqueur couramment utilisé dans les autres cancers.

Par la suite, il pourrait être intéressant de coupler cet anticorps à des toxines afin de détruire encore plus efficacement les cellules cancéreuses. En effet, l'anticorps internalisant CD146, on peut imaginer que la toxine pénétrera aussi dans la cellule pour y produire ses effets. L'effet de l'anticorps couplé à la toxine pourra alors être testé sur des souris xéno greffées avec différentes tumeurs afin de voir si la diminution de la croissance tumorale est supérieure à celle observée lors d'un traitement avec l'anticorps seul.

Enfin, il sera aussi intéressant de tester l'effet de cet anticorps dans la dissémination métastatique. En effet, on sait que CD146 est impliqué, via son rôle dans l'EMT en particulier (238), dans le processus de métastase. On peut donc imaginer que le fait de baisser son expression membranaire permette de réduire les métastases.

Conclusion et perspectives

La première partie de mon travail a permis de montrer que, dans les cellules endothéliales, la molécule CD146 soluble peut être générée par le clivage des formes longue et courte, respectivement par ADAM 10 et Tace (ADAM 17), et d'autre part qu'il existe deux autres isoformes de CD146 soluble provenant d'un épissage alternatif, I10-sCD146 et I5-13-sCD146. Ces différentes formes de CD146 soluble stimulent toutes l'angiogénèse.

Ces travaux ouvrent le champ à l'étude de nouvelles isoformes de CD146 comme c'est le cas pour le VEGF. En effet, l'épissage alternatif du VEGF induit de multiples variants qui se différencient par différents récepteurs, permettant d'induire des voies de signalisation différentes et d'obtenir des effets tissu-spécifiques. Ces différentes isoformes de VEGF stimulent l'angiogénèse. Toutefois, il existe aussi des isoformes ayant un rôle anti-angiogénique. Ces formes inhibitrices diminuent la prolifération induite par le VEGF et la migration des cellules endothéliales (49). Etant donné l'existence parmi les isoformes du VEGF de formes pro- et anti-angiogéniques, il apparaît maintenant difficile de pouvoir bloquer l'angiogénèse avec un anticorps anti-VEGF. En effet, de par sa cible, le Bevacizumab reconnaît les différentes isoformes de VEGF et bloque donc à la fois les isoformes pro- et anti-angiogéniques. Il faudrait donc pouvoir générer des anticorps capables de bloquer les formes pro-angiogéniques sans toucher les formes anti-angiogéniques. Dans ce cadre-là, il sera intéressant de regarder s'il existe, de la même façon, des isoformes pro- et anti-angiogéniques de CD146 et si tel est le cas de les cibler avec des anticorps reconnaissant spécifiquement chaque isoforme. Il va donc être primordial de poursuivre notre étude en caractérisant ces différentes formes. Il faudra ensuite définir les effets de ces formes sur les différentes étapes de l'angiogénèse, déterminer si elles ont des effets synergiques et enfin rechercher leurs récepteurs. L'angiomotine p80 a été caractérisée comme étant le récepteur de la forme soluble provenant du clivage des formes membranaires. Ce récepteur a été découvert par notre équipe grâce à des expériences de protéomique. Il sera donc intéressant de regarder si l'angiomotine est également le récepteur des formes provenant des épissages alternatifs, I10-sCD146 et I5-13-sCD146. S'il apparaît qu'il existe des récepteurs différents, il faudra alors les rechercher, étudier leur tissu-spécificité et déterminer l'affinité de chacune des formes pour les différents récepteurs. Un autre aspect sera de rechercher s'il existe d'autres isoformes qui pourraient être spécifiques des cellules cancéreuses et si ces isoformes peuvent constituer une signature d'un type de cancer.

Nos résultats montrent aussi que les trois formes solubles de CD146 jouent un rôle dans l'angiogénèse. Il sera donc intéressant de déterminer si elles sont régulées dans différentes

pathologies angiogéniques et notamment dans les rétinopathies angiogéniques (les rétinopathies liées au diabète de type 2, la dégénérescence maculaire liée à l'âge, ...).

Dans la deuxième partie de mon travail, nous avons généré pour la première fois un anticorps anti-CD146 capable de détecter spécifiquement la forme CD146 membranaire cancéreuse. Cet anticorps pourrait avoir un intérêt dans le cadre d'une médecine personnalisée. En effet, nous avons montré que cet anticorps présente un intérêt diagnostique puisqu'il reconnaît spécifiquement CD146 tumoral sur des biopsies, les microparticules cancéreuses, et qu'il est utilisable en imagerie TEP-CT. Il pourra aussi présenter un intérêt thérapeutique puisqu'il diminue significativement la croissance tumorale chez l'animal par un mécanisme impliquant une internalisation de la molécule. Dès lors, il pourra être intéressant de le coupler à des toxines comme cela a été fait pour d'autres anticorps qui possèdent aussi cette propriété. Ainsi, il a été montré que le Trastuzumab, qui cible la molécule HER2 dans le cancer du sein, présente un effet très supérieur lorsque l'anticorps est couplé à la toxine emtansine (DM1) (286). La conjugaison du DM1 au Trastuzumab confère ainsi à l'agent cytotoxique une sélectivité pour les cellules tumorales surexprimant HER2. Lorsque le Trastuzumab-DM1 se lie à la protéine HER2, il est internalisé puis dégradé dans le lysosome, ce qui conduit à la libération de catabolites cytotoxiques contenant du DM1 (essentiellement le complexe lysine-MCC (4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carbonyl)-DM1) directement à l'intérieur des cellules cancéreuses, provoquant leur destruction. L'anticorps anti-CD146 que nous avons développé agissant lui aussi par une internalisation de la molécule, il devrait être possible de le coupler aux toxines afin de détruire spécifiquement les cellules cancéreuses. Si tel est le cas, cet anticorps pourrait alors être développé afin de proposer un traitement personnalisé chez des patients présentant un des nombreux cancers exprimant fortement CD146. L'anticorps peut être couplé à différentes toxines et notamment à de la calichéamycine, de la emtansine (DM1/DM4) et de la dolastatine 10 (MMAE/MMAF). Ce couplage peut se faire de deux façons. La première méthode, dite classique, se fait par couplage sur une cystéine ou une lysine. La deuxième méthode consiste à fixer la toxine sur un site spécifique à l'aide d'agents de liaison particuliers.

En raison du mécanisme d'action de CD146, les tumeurs surexprimant la molécule constituent des cancers très agressifs avec une capacité de dissémination métastatique importante et une faculté à échapper aux traitements, en particulier aux traitements anti-angiogéniques et à la chimiothérapie. En effet, il a été montré que CD146 est surexprimé dans

certaines cellules cancéreuses résistantes aux traitements actuels (chimiothérapie, Tamoxifène, Sunitinib, ...). Ceci suggère que CD146 pourrait être utilisé en tant que marqueur prédictif de résistance aux thérapies actuelles et qu'en cas d'échec de ces traitements des anticorps anti-CD146, tels que l'anticorps TsCD146, pourraient être utilisés en seconde ligne. L'anticorps TsCD146 ciblant spécifiquement le CD146 tumoral, il pourrait également être couplé à de la chimiothérapie afin de permettre de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses sans détériorer les cellules avoisinantes. On peut également penser que l'anticorps TsCD146 soit associé à d'autres anticorps thérapeutiques. Ainsi, il pourrait être associé au Bevacizumab, qui est un anticorps anti-VEGF, afin de cibler à la fois les cellules tumorales et les vaisseaux alimentant la tumeur.

Enfin, cet anticorps pourrait présenter un intérêt majeur pour détecter les CTCs (cellules tumorales circulantes) directement dans le sang de patients atteints de cancer. En effet, cette détection non-invasive pourrait avoir un intérêt diagnostique en permettant de dépister précocement un cancer primitif ou une métastase. Elle a également un intérêt pronostic puisqu'elle permet de déterminer la réponse à un traitement ce qui permet d'apprécier l'efficacité d'un traitement, de dépister rapidement une résistance à un traitement et ainsi modifier la prise en charge thérapeutique ou de détecter une récurrence (287). Ceci serait tout particulièrement intéressant dans le mélanome où il n'y a pas d'expression d'Epcam, le marqueur couramment utilisé pour marquer les CTCs. Cette stratégie, utilisant CD146 pour enrichir les CTCs, a d'ailleurs été proposée il y a quelques années pour le cancer du sein (288).

Références bibliographiques

1. Martinez-Lemus LA. The dynamic structure of arterioles. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2012 Jan;110(1):5–11.
2. Garlanda C, Dejana E. Heterogeneity of endothelial cells. Specific markers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Jul;17(7):1193–202.
3. Stenmark KR, Yeager ME, El Kasmi KC, Nozik-Grayck E, Gerasimovskaya EV, Li M, et al. The adventitia: essential regulator of vascular wall structure and function. *Annu Rev Physiol*. 2013;75:23–47.
4. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med*. 2009 Mar;13(3):454–71.
5. George F, Brisson C, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, et al. Rapid isolation of human endothelial cells from whole blood using S-Endo1 monoclonal antibody coupled to immunomagnetic beads: demonstration of endothelial injury after angioplasty. *Thromb Haemost*. 1992 Jan 23;67(1):147–53.
6. Murphy C, Kanaganayagam GS, Jiang B, Chowienczyk PJ, Zbinden R, Saha M, et al. Vascular dysfunction and reduced circulating endothelial progenitor cells in young healthy UK South Asian men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007 Apr;27(4):936–42.
7. George F, Poncelet P, Laurent JC, Massot O, Arnoux D, Lequeux N, et al. Cytofluorometric detection of human endothelial cells in whole blood using S-Endo 1 monoclonal antibody. *J Immunol Methods*. 1991 May 17;139(1):65–75.
8. Blann AD, Woywodt A, Bertolini F, Bull TM, Buyon JP, Clancy RM, et al. Circulating endothelial cells. Biomarker of vascular disease. *Thromb Haemost*. 2005 Feb;93(2):228–35.
9. Makin AJ, Blann AD, Chung NAY, Silverman SH, Lip GYH. Assessment of endothelial damage in atherosclerotic vascular disease by quantification of circulating endothelial cells. Relationship with von Willebrand factor and tissue factor. *Eur Heart J*. 2004 Mar;25(5):371–6.
10. Nadar SK, Lip GYH, Lee KW, Blann AD. Circulating endothelial cells in acute ischaemic stroke. *Thromb Haemost*. 2005 Oct;94(4):707–12.
11. Rajagopalan S, Somers EC, Brook RD, Kehrer C, Pfenninger D, Lewis E, et al. Endothelial cell apoptosis in systemic lupus erythematosus: a common pathway for abnormal vascular function and thrombosis propensity. *Blood*. 2004 May 15;103(10):3677–83.
12. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997 Feb 14;275(5302):964–7.

13. Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, et al. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood*. 1998 Jul 15;92(2):362–7.
14. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000 Feb 1;95(3):952–8.
15. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004 Nov 1;104(9):2752–60.
16. Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, et al. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 2007 Mar 1;109(5):1801–9.
17. Dimmeler S, Aicher A, Vasa M, Mildner-Rihm C, Adler K, Tiemann M, et al. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) increase endothelial progenitor cells via the PI 3-kinase/Akt pathway. *J Clin Invest*. 2001 Aug;108(3):391–7.
18. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, et al. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999 Apr;5(4):434–8.
19. Kalka C, Masuda H, Takahashi T, Kalka-Moll WM, Silver M, Kearney M, et al. Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Mar 28;97(7):3422–7.
20. Gehling UM, Ergün S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood*. 2000 May 15;95(10):3106–12.
21. Ingram DA, Mead LE, Moore DB, Woodard W, Fenoglio A, Yoder MC. Vessel wall-derived endothelial cells rapidly proliferate because they contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood*. 2005 Apr 1;105(7):2783–6.
22. Yoon C-H, Hur J, Park K-W, Kim J-H, Lee C-S, Oh I-Y, et al. Synergistic neovascularization by mixed transplantation of early endothelial progenitor cells and late outgrowth endothelial cells: the role of angiogenic cytokines and matrix metalloproteinases. *Circulation*. 2005 Sep 13;112(11):1618–27.
23. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet J-M, Tedgui A. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res*. 2009 Jan;335(1):143–51.
24. Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, Récalde A, Blanc-Brude O, Mees B, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation*. 2009 Jun 2;119(21):2808–17.

25. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*. 1999 Jul;104(1):93–102.
26. Thomas GM, Panicot-Dubois L, Lacroix R, Dignat-George F, Lombardo D, Dubois C. Cancer cell-derived microparticles bearing P-selectin glycoprotein ligand 1 accelerate thrombus formation in vivo. *J Exp Med*. 2009 Aug 31;206(9):1913–27.
27. Chahed S, Leroyer AS, Benzerroug M, Gaucher D, Georgescu A, Picaud S, et al. Increased vitreous shedding of microparticles in proliferative diabetic retinopathy stimulates endothelial proliferation. *Diabetes*. 2010 Mar;59(3):694–701.
28. Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, et al. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Feb 20;49(7):772–7.
29. Peterson DB, Sander T, Kaul S, Wakim BT, Halligan B, Twigger S, et al. Comparative proteomic analysis of PAI-1 and TNF-alpha-derived endothelial microparticles. *Proteomics*. 2008 Jun;8(12):2430–46.
30. Deregibus MC, Cantaluppi V, Calogero R, Lo Iacono M, Tetta C, Biancone L, et al. Endothelial progenitor cell derived microvesicles activate an angiogenic program in endothelial cells by a horizontal transfer of mRNA. *Blood*. 2007 Oct 1;110(7):2440–8.
31. Zampetaki A, Kiechl S, Drozdov I, Willeit P, Mayr U, Prokopi M, et al. Plasma microRNA profiling reveals loss of endothelial miR-126 and other microRNAs in type 2 diabetes. *Circ Res*. 2010 Sep 17;107(6):810–7.
32. Ullal AJ, Pisetsky DS, Reich CF. Use of SYTO 13, a fluorescent dye binding nucleic acids, for the detection of microparticles in in vitro systems. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. 2010 Mar;77(3):294–301.
33. Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, et al. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation*. 2000 Feb 29;101(8):841–3.
34. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med*. 2000 Apr;6(4):389–95.
35. Ortéga N, Sordello S, Plouët J. [Tumoral vascularization: physiopathology and therapeutic prospects]. *Bull Cancer (Paris)*. 1997 Apr;84(4):391–5.
36. Jiang A, Zhang M, Liu Z. Angioblasts in adult and its role in ocular disorders due to neovascularization. *Yan Ke Xue Bao*. 2005 Sep;21(3):158–62, 178.
37. Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):932–6.
38. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996 Aug 9;86(3):353–64.

39. Yan H, Zhang C, Wang Z, Tu T, Duan H, Luo Y, et al. CD146 is required for VEGF-C-induced lymphatic sprouting during lymphangiogenesis. *Sci Rep*. 2017 Aug 7;7(1):7442.
40. Eliceiri BP, Paul R, Schwartzberg PL, Hood JD, Leng J, Cheresh DA. Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell*. 1999 Dec;4(6):915–24.
41. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003 Jun;9(6):685–93.
42. Pepper MS. Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997 Apr;17(4):605–19.
43. Milkiewicz M, Ispanovic E, Doyle JL, Haas TL. Regulators of angiogenesis and strategies for their therapeutic manipulation. *Int J Biochem Cell Biol*. 2006 Mar;38(3):333–57.
44. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 2001 Feb 16;49(3):507–21.
45. Liekens S, De Clercq E, Neyts J. Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem Pharmacol*. 2001 Feb 1;61(3):253–70.
46. Papetti M, Herman IM. Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002 May;282(5):C947–970.
47. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med*. 2005 Dec;9(4):777–94.
48. Jussila L, Alitalo K. Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiol Rev*. 2002 Jul;82(3):673–700.
49. Woolard J, Wang W-Y, Bevan HS, Qiu Y, Morbidelli L, Pritchard-Jones RO, et al. VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*. 2004 Nov 1;64(21):7822–35.
50. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005 Dec 15;438(7070):967–74.
51. Mandriota SJ, Pepper MS. Regulation of angiopoietin-2 mRNA levels in bovine microvascular endothelial cells by cytokines and hypoxia. *Circ Res*. 1998 Oct 19;83(8):852–9.
52. Andrae J, Gallini R, Betsholtz C. Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine. *Genes Dev*. 2008 May 15;22(10):1276–312.
53. Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med*. 2004 May;255(5):538–61.
54. Cao Y. Endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic implications. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001 Apr;33(4):357–69.
55. O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y, Chen C, Rosenthal RA, Moses M, et al. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*. 1994 Oct 21;79(2):315–28.

56. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57–70.
57. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646–74.
58. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986 Dec 25;315(26):1650–9.
59. Bialik S, Zalckvar E, Ber Y, Rubinstein AD, Kimchi A. Systems biology analysis of programmed cell death. *Trends Biochem Sci*. 2010 Oct;35(10):556–64.
60. Nishida K, Yamaguchi O, Otsu K. Crosstalk between autophagy and apoptosis in heart disease. *Circ Res*. 2008 Aug 15;103(4):343–51.
61. Martin SJ, Green DR. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell*. 1995 Aug 11;82(3):349–52.
62. White EJ, Martin V, Liu J-L, Klein SR, Piya S, Gomez-Manzano C, et al. Autophagy regulation in cancer development and therapy. *Am J Cancer Res*. 2011;1(3):362–72.
63. Wu W, Liu P, Li J. Necroptosis: an emerging form of programmed cell death. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2012 Jun;82(3):249–58.
64. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature*. 2001 May 17;411(6835):375–9.
65. Bissell MJ, Radisky D. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer*. 2001 Oct;1(1):46–54.
66. Radisky D, Hagios C, Bissell MJ. Tumors are unique organs defined by abnormal signaling and context. *Semin Cancer Biol*. 2001 Apr;11(2):87–95.
67. Park CC, Bissell MJ, Barcellos-Hoff MH. The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today*. 2000 Aug;6(8):324–9.
68. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*. 2004 Nov 18;432(7015):332–7.
69. Folkman J, Kalluri R. Cancer without disease. *Nature*. 2004 Feb 26;427(6977):787.
70. Cukierman E. Tumour development due to stroma permissiveness. *J Biosci*. 2005 Dec;30(5):551–2.
71. Beacham DA, Cukierman E. Stromagenesis: the changing face of fibroblastic microenvironments during tumor progression. *Semin Cancer Biol*. 2005 Oct;15(5):329–41.
72. Hochedlinger K, Blelloch R, Brennan C, Yamada Y, Kim M, Chin L, et al. Reprogramming of a melanoma genome by nuclear transplantation. *Genes Dev*. 2004 Aug 1;18(15):1875–85.
73. Cunha GR, Matrisian LM. It's not my fault, blame it on my microenvironment. *Differ Res Biol Divers*. 2002 Dec;70(9–10):469–72.

74. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med*. 1971 Nov 18;285(21):1182–6.
75. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):401–10.
76. Tozer GM, Kanthou C, Baguley BC. Disrupting tumour blood vessels. *Nat Rev Cancer*. 2005 Jun;5(6):423–35.
77. Jain RK. Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. *Science*. 2005 Jan 7;307(5706):58–62.
78. Cao Y. Antiangiogenic cancer therapy. *Semin Cancer Biol*. 2004 Apr;14(2):139–45.
79. Browder T, Butterfield CE, Kräling BM, Shi B, Marshall B, O'Reilly MS, et al. Antiangiogenic scheduling of chemotherapy improves efficacy against experimental drug-resistant cancer. *Cancer Res*. 2000 Apr 1;60(7):1878–86.
80. Kerbel RS, Kamen BA. The anti-angiogenic basis of metronomic chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jun;4(6):423–36.
81. Hatzipantelis KP, Natsis K, Albani M. Effect of acute limb ischaemia on neuromuscular function in rats. *Eur J Surg Acta Chir*. 2001 Nov;167(11):831–8.
82. Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg*. 1994 Apr;19(4):623–31.
83. Belkin M, Brown RD, Wright JG, LaMorte WW, Hobson RW. A new quantitative spectrophotometric assay of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Am J Surg*. 1988 Aug;156(2):83–6.
84. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg Lond Engl*. 2002 Dec;10(6):620–30.
85. Wang L, Chopp M, Teng H, Bolz M, Francisco M-A, Francisco MÃ, et al. Tumor necrosis factor α primes cerebral endothelial cells for erythropoietin-induced angiogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab Off J Int Soc Cereb Blood Flow Metab*. 2011 Feb;31(2):640–7.
86. Menger MD, Rucker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary “no-reflow.” *Shock Augusta Ga*. 1997 Jul;8(1):2–7.
87. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, et al. Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*. 1994 Feb;93(2):662–70.
88. Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, et al. Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation*. 1994 Nov;90(5 Pt 2):II228-234.

89. Carmeliet P, Moons L, Luttun A, Vincenti V, Compernelle V, De Mol M, et al. Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat Med*. 2001 May;7(5):575–83.
90. Autiero M, Waltenberger J, Communi D, Kranz A, Moons L, Lambrechts D, et al. Role of PlGF in the intra- and intermolecular cross talk between the VEGF receptors Flt1 and Flk1. *Nat Med*. 2003 Jul;9(7):936–43.
91. Silvestre J-S, Tamarat R, Ebrahimian TG, Le-Roux A, Clergue M, Emmanuel F, et al. Vascular endothelial growth factor-B promotes in vivo angiogenesis. *Circ Res*. 2003 Jul 25;93(2):114–23.
92. Olofsson B, Pajusola K, Kaipainen A, von Euler G, Joukov V, Saksela O, et al. Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Mar 19;93(6):2576–81.
93. Fischer C, Mazzone M, Jonckx B, Carmeliet P. FLT1 and its ligands VEGFB and PlGF: drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat Rev Cancer*. 2008 Dec;8(12):942–56.
94. Masaki I, Yonemitsu Y, Yamashita A, Sata S, Tani M, Komori K, et al. Angiogenic gene therapy for experimental critical limb ischemia: acceleration of limb loss by overexpression of vascular endothelial growth factor 165 but not of fibroblast growth factor-2. *Circ Res*. 2002 May 17;90(9):966–73.
95. Murakami M, Nguyen LT, Hatanaka K, Schachterle W, Chen P-Y, Zhuang ZW, et al. FGF-dependent regulation of VEGF receptor 2 expression in mice. *J Clin Invest*. 2011 Jul;121(7):2668–78.
96. Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Tani M, Nakano T, Egashira K, et al. Nonendothelial mesenchymal cell-derived MCP-1 is required for FGF-2-mediated therapeutic neovascularization: critical role of the inflammatory/arteriogenic pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Nov;26(11):2483–9.
97. Lindahl P, Johansson BR, Leveen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997 Jul 11;277(5323):242–5.
98. Chavakis E, Aicher A, Heeschen C, Sasaki K, Kaiser R, El Makhfi N, et al. Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *J Exp Med*. 2005 Jan 3;201(1):63–72.
99. Urbich C, Heeschen C, Aicher A, Sasaki K, Bruhl T, Farhadi MR, et al. Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nat Med*. 2005 Feb;11(2):206–13.
100. Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Maeda K, Tsuzuki M, Kim W, et al. Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in matrix metalloproteinase 2-deficient mice. *Circ Res*. 2007 Mar 30;100(6):904–13.
101. Huang P-H, Chen Y-H, Wang C-H, Chen J-S, Tsai H-Y, Lin F-Y, et al. Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Aug;29(8):1179–84.

102. Mazziere R, Masiero L, Zanetta L, Monea S, Onisto M, Garbisa S, et al. Control of type IV collagenase activity by components of the urokinase-plasmin system: a regulatory mechanism with cell-bound reactants. *EMBO J*. 1997 May 1;16(9):2319–32.
103. Kebir A, Harhoury K, Guillet B, Liu JW, Foucault-Bertaud A, Lamy E, et al. CD146 short isoform increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells in vitro and in vivo. *Circ Res*. 2010 Jul 9;107(1):66–75.
104. Harhoury K, Kebir A, Guillet B, Foucault-Bertaud A, Voytenko S, Piercecchi-Marti M-D, et al. Soluble CD146 displays angiogenic properties and promotes neovascularization in experimental hind-limb ischemia. *Blood*. 2010 May 6;115(18):3843–51.
105. Awad O, Dedkov EI, Jiao C, Bloomer S, Tomanek RJ, Schattman GC. Differential healing activities of CD34+ and CD14+ endothelial cell progenitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006 Apr;26(4):758–64.
106. Majka M, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak J, Ehrenman K, Pietrkowski Z, Kowalska MA, et al. Numerous growth factors, cytokines, and chemokines are secreted by human CD34(+) cells, myeloblasts, erythroblasts, and megakaryoblasts and regulate normal hematopoiesis in an autocrine/paracrine manner. *Blood*. 2001 May 15;97(10):3075–85.
107. Di Santo S, Yang Z, Wyler von Ballmoos M, Voelzmann J, Diehm N, Baumgartner I, et al. Novel cell-free strategy for therapeutic angiogenesis: in vitro generated conditioned medium can replace progenitor cell transplantation. *PLoS One*. 2009 May 21;4(5):e5643.
108. Bonheur JA, Albadawi H, Patton GM, Watkins MT. A noninvasive murine model of hind limb ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 2004 Jan;116(1):55–63.
109. Greenberg JI, Suliman A, Barillas S, Angle N. Chapter 7. Mouse models of ischemic angiogenesis and ischemia-reperfusion injury. *Methods Enzymol*. 2008;444:159–74.
110. Gifford SM, Propper BW, Eliason JL. The ischemic threshold of the extremity. *Perspect Vasc Surg Endovasc Ther*. 2011 Jun;23(2):81–7.
111. Chalothorn D, Zhang H, Clayton JA, Thomas SA, Faber JE. Catecholamines augment collateral vessel growth and angiogenesis in hindlimb ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005 Aug;289(2):H947-959.
112. Shireman PK, Quinones MP. Differential necrosis despite similar perfusion in mouse strains after ischemia. *J Surg Res*. 2005 Dec;129(2):242–50.
113. Silvestre JS, Mallat Z, Duriez M, Tamarat R, Bureau MF, Scherman D, et al. Antiangiogenic effect of interleukin-10 in ischemia-induced angiogenesis in mice hindlimb. *Circ Res*. 2000 Sep 15;87(6):448–52.
114. Couffinhal T, Silver M, Zheng LP, Kearney M, Witzchenbichler B, Isner JM. Mouse model of angiogenesis. *Am J Pathol*. 1998 Jun;152(6):1667–79.
115. Heil M, Schaper W. Influence of mechanical, cellular, and molecular factors on collateral artery growth (arteriogenesis). *Circ Res*. 2004 Sep 3;95(5):449–58.

116. Herring M, Gardner A, Glover J. A single-staged technique for seeding vascular grafts with autogenous endothelium. *Surgery*. 1978 Oct;84(4):498–504.
117. Murohara T, Ikeda H, Duan J, Shintani S, Sasaki K i, Eguchi H, et al. Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *J Clin Invest*. 2000 Jun;105(11):1527–36.
118. Hur J, Yoon C-H, Kim H-S, Choi J-H, Kang H-J, Hwang K-K, et al. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovasculogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004 Feb;24(2):288–93.
119. Davis BH, Schroeder T, Yarmolenko PS, Guilak F, Dewhirst MW, Taylor DA. An in vitro system to evaluate the effects of ischemia on survival of cells used for cell therapy. *Ann Biomed Eng*. 2007 Aug;35(8):1414–24.
120. Ziegelhoeffer T, Fernandez B, Kostin S, Heil M, Voswinckel R, Helisch A, et al. Bone marrow-derived cells do not incorporate into the adult growing vasculature. *Circ Res*. 2004 Feb 6;94(2):230–8.
121. Frueh J, Maimari N, Homma T, Bovens SM, Pedrighi RM, Towhidi L, et al. Systems biology of the functional and dysfunctional endothelium. *Cardiovasc Res*. 2013 Jul 15;99(2):334–41.
122. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005 Apr 21;352(16):1685–95.
123. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. 2013 Oct;13(10):709–21.
124. Seneviratne A, Hulsmans M, Holvoet P, Monaco C. Biomechanical factors and macrophages in plaque stability. *Cardiovasc Res*. 2013 Jul 15;99(2):284–93.
125. Silvestre-Roig C, de Winther MP, Weber C, Daemen MJ, Lutgens E, Soehnlein O. Atherosclerotic plaque destabilization: mechanisms, models, and therapeutic strategies. *Circ Res*. 2014 Jan 3;114(1):214–26.
126. Sluimer JC, Daemen MJ. Novel concepts in atherogenesis: angiogenesis and hypoxia in atherosclerosis. *J Pathol*. 2009 May;218(1):7–29.
127. Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med*. 2009 May 7;360(19):1989–2003.
128. Bhambhani M. American Rheumatism Association (ARA) criteria for the classification of rheumatoid arthritis (RA). *J Assoc Physicians India*. 1996 Feb;44(2):89.
129. LeRoy EC, Black C, Fleischmajer R, Jablonska S, Krieg T, Medsger TA, et al. Scleroderma (systemic sclerosis): classification, subsets and pathogenesis. *J Rheumatol*. 1988 Feb;15(2):202–5.
130. Boin F, Rosen A. Autoimmunity in systemic sclerosis: current concepts. *Curr Rheumatol Rep*. 2007 May;9(2):165–72.

131. Humbert M, Morrell NW, Archer SL, Stenmark KR, MacLean MR, Lang IM, et al. Cellular and molecular pathobiology of pulmonary arterial hypertension. *J Am Coll Cardiol*. 2004 Jun 16;43(12 Suppl S):13S–24S.
132. Schachna L, Wigley FM. Targeting mediators of vascular injury in scleroderma. *Curr Opin Rheumatol*. 2002 Nov;14(6):686–93.
133. Del Papa N, Colombo G, Fracchiolla N, Moronetti LM, Ingegnoli F, Maglione W, et al. Circulating endothelial cells as a marker of ongoing vascular disease in systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2004 Apr;50(4):1296–304.
134. Avouac J, Juin F, Wipff J, Couraud PO, Chiochia G, Kahan A, et al. Circulating endothelial progenitor cells in systemic sclerosis: association with disease severity. *Ann Rheum Dis*. 2008 Oct;67(10):1455–60.
135. Bompais H, Chagraoui J, Canon X, Crisan M, Liu XH, Anjo A, et al. Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*. 2004 Apr 1;103(7):2577–84.
136. Mayes MD. Endothelin and endothelin receptor antagonists in systemic rheumatic disease. *Arthritis Rheum*. 2003 May;48(5):1190–9.
137. Kahaleh MB. Endothelin, an endothelial-dependent vasoconstrictor in scleroderma. Enhanced production and profibrotic action. *Arthritis Rheum*. 1991 Aug;34(8):978–83.
138. Matucci Cerinic M, Kahaleh MB. Beauty and the beast. The nitric oxide paradox in systemic sclerosis. *Rheumatol Oxf Engl*. 2002 Aug;41(8):843–7.
139. Hebbbar M, Peyrat JP, Hornez L, Hatron PY, Hachulla E, Devulder B. Increased concentrations of the circulating angiogenesis inhibitor endostatin in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*. 2000 Apr;43(4):889–93.
140. Allanore Y, Borderie D, Lemaréchal H, Ekindjian OG, Kahan A. Nifedipine decreases sVCAM-1 concentrations and oxidative stress in systemic sclerosis but does not affect the concentrations of vascular endothelial growth factor or its soluble receptor 1. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(4):R309–14.
141. Herrick AL. Pathogenesis of Raynaud’s phenomenon. *Rheumatol Oxf Engl*. 2005 May;44(5):587–96.
142. Lehmann JM, Holzmann B, Breitbart EW, Schmiegelow P, Riethmüller G, Johnson JP. Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000. *Cancer Res*. 1987 Feb 1;47(3):841–5.
143. Johnson JP, Bar-Eli M, Jansen B, Markhof E. Melanoma progression-associated glycoprotein MUC18/MCAM mediates homotypic cell adhesion through interaction with a heterophilic ligand. *Int J Cancer*. 1997 Nov 27;73(5):769–74.

144. Bardin N, George F, Mutin M, Brisson C, Horschowski N, Francés V, et al. S-Endo 1, a pan-endothelial monoclonal antibody recognizing a novel human endothelial antigen. *Tissue Antigens*. 1996 Nov;48(5):531–9.
145. Bardin N, Francès V, Lesaule G, Horschowski N, George F, Sampol J. Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996 Jan 5;218(1):210–6.
146. Taira E, Takaha N, Taniura H, Kim CH, Miki N. Molecular cloning and functional expression of gicerin, a novel cell adhesion molecule that binds to neurite outgrowth factor. *Neuron*. 1994 Apr;12(4):861–72.
147. Alais S, Allioli N, Pujades C, Duband JL, Vainio O, Imhof BA, et al. HEMCAM/CD146 downregulates cell surface expression of beta1 integrins. *J Cell Sci*. 2001 May;114(Pt 10):1847–59.
148. Shih IM. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol*. 1999 Sep;189(1):4–11.
149. Sers C, Kirsch K, Rothbacher U, Riethmüller G, Johnson JP. Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Sep 15;90(18):8514–8.
150. Mintz-Weber CS, Johnson JP. Identification of the elements regulating the expression of the cell adhesion molecule MCAM/MUC18. Loss of AP-2 is not required for MCAM expression in melanoma cell lines. *J Biol Chem*. 2000 Nov 3;275(44):34672–80.
151. Jean D, Gershenwald JE, Huang S, Luca M, Hudson MJ, Tainsky MA, et al. Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *J Biol Chem*. 1998 Jun 26;273(26):16501–8.
152. Xie S, Price JE, Luca M, Jean D, Ronai Z, Bar-Eli M. Dominant-negative CREB inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma cells. *Oncogene*. 1997 Oct 23;15(17):2069–75.
153. Lehmann JM, Riethmüller G, Johnson JP. MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Dec;86(24):9891–5.
154. Lei X, Guan C-W, Song Y, Wang H. The multifaceted role of CD146/MCAM in the promotion of melanoma progression. *Cancer Cell Int*. 2015;15(1):3.
155. Schön M, Kähne T, Gollnick H, Schön MP. Expression of gp130 in tumors and inflammatory disorders of the skin: formal proof of its identity as CD146 (MUC18, Mel-CAM). *J Invest Dermatol*. 2005 Aug;125(2):353–63.
156. Vainio O, Dunon D, Aïssi F, Dangy JP, McNagny KM, Imhof BA. HEMCAM, an adhesion molecule expressed by c-kit+ hemopoietic progenitors. *J Cell Biol*. 1996 Dec;135(6 Pt 1):1655–68.
157. Guezguez B, Vigneron P, Alais S, Jaffredo T, Gavard J, Mège R-M, et al. A dileucine motif targets MCAM-I cell adhesion molecule to the basolateral membrane in MDCK cells. *FEBS Lett*. 2006 Jun 26;580(15):3649–56.

158. Taira E, Nagino T, Taniura H, Takaha N, Kim CH, Kuo CH, et al. Expression and functional analysis of a novel isoform of gicerin, an immunoglobulin superfamily cell adhesion molecule. *J Biol Chem*. 1995 Dec 1;270(48):28681–7.
159. Bu P, Zhuang J, Feng J, Yang D, Shen X, Yan X. Visualization of CD146 dimerization and its regulation in living cells. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res*. 2007 Apr;1773(4):513–20.
160. Bardin N, Francès V, Combes V, Sampol J, Dignat-George F. CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells. *FEBS Lett*. 1998 Jan 2;421(1):12–4.
161. Bardin N, Moal V, Anfosso F, Daniel L, Brunet P, Sampol J, et al. Soluble CD146, a novel endothelial marker, is increased in physiopathological settings linked to endothelial junctional alteration. *Thromb Haemost*. 2003 Nov;90(5):915–20.
162. Ilie M, Long E, Hofman V, Selva E, Bonnetaud C, Boyer J, et al. Clinical value of circulating endothelial cells and of soluble CD146 levels in patients undergoing surgery for non-small cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2014 Mar 4;110(5):1236–43.
163. Kaspi E, Heim X, Granel B, Guillet B, Stalin J, Nollet M, et al. Identification of CD146 as a novel molecular actor involved in systemic sclerosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2017 Jun 9;
164. Liu Q, Yan X, Li Y, Zhang Y, Zhao X, Shen Y. Pre-eclampsia is associated with the failure of melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146) expression by intermediate trophoblast. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 2004 Feb;84(2):221–8.
165. Bardin N, Blot-Chabaud M, Despoix N, Kebir A, Harhoury K, Arsanto J-P, et al. CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 May;29(5):746–53.
166. Boneberg E-M, Illges H, Legler DF, Fürstenberger G. Soluble CD146 is generated by ectodomain shedding of membrane CD146 in a calcium-induced, matrix metalloprotease-dependent process. *Microvasc Res*. 2009 Dec;78(3):325–31.
167. Shiomi T, Lemaître V, D’Armiento J, Okada Y. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Pathol Int*. 2010 Jul;60(7):477–96.
168. Parks WC, Wilson CL, López-Boado YS. Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2004 Aug;4(8):617–29.
169. Novak U. ADAM proteins in the brain. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas*. 2004 Apr;11(3):227–35.
170. Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Dec;6(12):931–44.
171. Blobel CP. Metalloprotease-disintegrins: links to cell adhesion and cleavage of TNF alpha and Notch. *Cell*. 1997 Aug 22;90(4):589–92.

172. Primakoff P, Myles DG. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. *Trends Genet TIG*. 2000 Feb;16(2):83–7.
173. Porter S, Clark IM, Kevorkian L, Edwards DR. The ADAMTS metalloproteinases. *Biochem J*. 2005 Feb 15;386(Pt 1):15–27.
174. Stalin J, Harhoury K, Hubert L, Subrini C, Lafitte D, Lissitzky J-C, et al. Soluble melanoma cell adhesion molecule (sMCAM/sCD146) promotes angiogenic effects on endothelial progenitor cells through angiomin. *J Biol Chem*. 2013 Mar 29;288(13):8991–9000.
175. Stalin J, Nollet M, Garigue P, Fernandez S, Vivancos L, Essaadi A, et al. Targeting soluble CD146 with a neutralizing antibody inhibits vascularization, growth and survival of CD146-positive tumors. *Oncogene*. 2016 Oct 20;35(42):5489–500.
176. Bardin N, Anfosso F, Massé JM, Cramer E, Sabatier F, Le Bivic A, et al. Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion. *Blood*. 2001 Dec 15;98(13):3677–84.
177. Sers C, Riethmüller G, Johnson JP. MUC18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread. *Cancer Res*. 1994 Nov 1;54(21):5689–94.
178. Wu GJ, Varma VA, Wu MW, Wang SW, Qu P, Yang H, et al. Expression of a human cell adhesion molecule, MUC18, in prostate cancer cell lines and tissues. *The Prostate*. 2001 Sep 15;48(4):305–15.
179. Zeng G-F, Cai S-X, Wu G-J. Up-regulation of METCAM/MUC18 promotes motility, invasion, and tumorigenesis of human breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2011 Mar 30;11:113.
180. Ueno K, Hirata H, Majid S, Tabatabai ZL, Hinoda Y, Dahiya R. IGFBP-4 activates the Wnt/beta-catenin signaling pathway and induces M-CAM expression in human renal cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2011 Nov 15;129(10):2360–9.
181. Elshal MF, Khan SS, Takahashi Y, Solomon MA, McCoy JP. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2923–4.
182. Pickl WF, Majdic O, Fischer GF, Petzelbauer P, Faé I, Waclavicek M, et al. MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 Mar 1;158(5):2107–15.
183. Hadjinicolaou AV, Wu L, Fang B, Watson PA, Hall FC, Busch R. Relationship of CD146 expression to activation of circulating T cells: exploratory studies in healthy donors and patients with connective tissue diseases. *Clin Exp Immunol*. 2013 Oct;174(1):73–88.
184. Kamiyama T, Watanabe H, Iijima M, Miyazaki A, Iwamoto S. Coexpression of CCR6 and CD146 (MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells. *J Dermatol*. 2012 Oct;39(10):838–42.
185. Despoix N, Walzer T, Jouve N, Blot-Chabaud M, Bardin N, Paul P, et al. Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation. *Eur J Immunol*. 2008 Oct;38(10):2855–64.

186. Espagnolle N, Guilloton F, Deschaseaux F, Gadelorge M, Sensébé L, Bourin P. CD146 expression on mesenchymal stem cells is associated with their vascular smooth muscle commitment. *J Cell Mol Med*. 2014 Jan;18(1):104–14.
187. Fayazi M, Salehnia M, Ziaei S. Differentiation of human CD146-positive endometrial stem cells to adipogenic-, osteogenic-, neural progenitor-, and glial-like cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2015 Apr;51(4):408–14.
188. Ulrich C, Abruzzese T, Maerz JK, Ruh M, Amend B, Benz K, et al. Human Placenta-Derived CD146-Positive Mesenchymal Stromal Cells Display a Distinct Osteogenic Differentiation Potential. *Stem Cells Dev*. 2015 Jul 1;24(13):1558–69.
189. Sorrentino A, Ferracin M, Castelli G, Biffoni M, Tomaselli G, Baiocchi M, et al. Isolation and characterization of CD146+ multipotent mesenchymal stromal cells. *Exp Hematol*. 2008 Aug;36(8):1035–46.
190. Harkness L, Zaher W, Ditzel N, Isa A, Kassem M. CD146/MCAM defines functionality of human bone marrow stromal stem cell populations. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Jan 11;7:4.
191. Wu C-C, Liu F-L, Sytwu H-K, Tsai C-Y, Chang D-M. CD146+ mesenchymal stem cells display greater therapeutic potential than CD146- cells for treating collagen-induced arthritis in mice. *Stem Cell Res Ther*. 2016 Feb 3;7:23.
192. Sacchetti B, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007 Oct 19;131(2):324–36.
193. Nakai T, Sakai D, Nakamura Y, Nukaga T, Grad S, Li Z, et al. CD146 defines commitment of cultured annulus fibrosus cells to express a contractile phenotype. *J Orthop Res Off Publ Orthop Res Soc*. 2016 Aug;34(8):1361–72.
194. Middleton J, Americh L, Gayon R, Julien D, Mansat M, Mansat P, et al. A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J Pathol*. 2005 Jul;206(3):260–8.
195. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*. 2008 Sep 11;3(3):301–13.
196. Kim JM, Hong K-S, Song WK, Bae D, Hwang I-K, Kim JS, et al. Perivascular Progenitor Cells Derived From Human Embryonic Stem Cells Exhibit Functional Characteristics of Pericytes and Improve the Retinal Vasculature in a Rodent Model of Diabetic Retinopathy. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(9):1268–76.
197. Davaine J-M, Quillard T, Brion R, Lapérine O, Guyomarch B, Merlini T, et al. Osteoprotegerin, pericytes and bone-like vascular calcification are associated with carotid plaque stability. *PloS One*. 2014;9(9):e107642.

198. Shih IM, Kurman RJ. Expression of melanoma cell adhesion molecule in intermediate trophoblast. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 1996 Sep;75(3):377–88.
199. Wang H, Du X, Xu Y, Wang Z. Identification of CD146 Expression in Human and Mouse Preimplantation Embryo. *J Reprod Contracept*. 2008 Mar;19(1):17–26.
200. Bouvier S, Paulmyer-Lacroix O, Molinari N, Bertaud A, Paci M, Leroyer A, et al. Soluble CD146, an innovative and non-invasive biomarker of embryo selection for in vitro fertilization. *PLoS One*. 2017;12(3):e0173724.
201. Taira E, Kohama K, Tsukamoto Y, Okumura S, Miki N. Characterization of Gicerin/MUC18/CD146 in the rat nervous system. *J Cell Physiol*. 2004 Mar;198(3):377–87.
202. Kang Y, Wang F, Feng J, Yang D, Yang X, Yan X. Knockdown of CD146 reduces the migration and proliferation of human endothelial cells. *Cell Res*. 2006 Mar;16(3):313–8.
203. Chan B, Sinha S, Cho D, Ramchandran R, Sukhatme VP. Critical roles of CD146 in zebrafish vascular development. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 2005 Jan;232(1):232–44.
204. So J-H, Hong S-K, Kim H-T, Jung S-H, Lee M-S, Choi J-H, et al. Gicerin/Cd146 is involved in zebrafish cardiovascular development and tumor angiogenesis. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech*. 2010 Nov;15(11):1099–110.
205. Yan X, Lin Y, Yang D, Shen Y, Yuan M, Zhang Z, et al. A novel anti-CD146 monoclonal antibody, AA98, inhibits angiogenesis and tumor growth. *Blood*. 2003 Jul 1;102(1):184–91.
206. Bu P, Gao L, Zhuang J, Feng J, Yang D, Yan X. Anti-CD146 monoclonal antibody AA98 inhibits angiogenesis via suppression of nuclear factor-kappaB activation. *Mol Cancer Ther*. 2006 Nov;5(11):2872–8.
207. Tu T, Zhang C, Yan H, Luo Y, Kong R, Wen P, et al. CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development. *Cell Res*. 2015 Mar;25(3):275–87.
208. Halt KJ, Pärssinen HE, Junttila SM, Saarela U, Sims-Lucas S, Koivunen P, et al. CD146(+) cells are essential for kidney vasculature development. *Kidney Int*. 2016 Aug;90(2):311–24.
209. Guezguez B, Vigneron P, Lamerant N, Kieda C, Jaffredo T, Dunon D. Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Nov 15;179(10):6673–85.
210. Solovey AN, Gui L, Chang L, Enestein J, Browne PV, Hebbel RP. Identification and functional assessment of endothelial P1H12. *J Lab Clin Med*. 2001 Nov;138(5):322–31.
211. Garibaldi S, Barisione C, Ghigliotti G, Spallarossa P, Barsotti A, Fabbi P, et al. Soluble form of the endothelial adhesion molecule CD146 binds preferentially CD16+ monocytes. *Mol Biol Rep*. 2012 Jun;39(6):6745–52.
212. Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*. 1969 Mar;29(3):705–27.

213. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *N Engl J Med*. 2006 Jul 6;355(1):51–65.
214. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002 Jun 27;417(6892):949–54.
215. Hocker T, Tsao H. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum Mutat*. 2007 Jun;28(6):578–88.
216. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene*. 2003 May 19;22(20):3113–22.
217. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet Lond Engl*. 2005 Feb 19;365(9460):687–701.
218. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*. 2005 Jul 7;436(7047):117–22.
219. O’Connell MP, Weeraratna AT. Hear the Wnt Ror: how melanoma cells adjust to changes in Wnt. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009 Dec;22(6):724–39.
220. Champeau F, Verola O. [Malignant melanoma]. *Ann Chir Plast Esthet*. 1998 Aug;43(4):411–20.
221. Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP, Fisher RI, Weiss G, Margolin K, et al. High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1999 Jul;17(7):2105–16.
222. Ascierto PA, Simeone E, Giannarelli D, Grimaldi AM, Romano A, Mozzillo N. Sequencing of BRAF inhibitors and ipilimumab in patients with metastatic melanoma: a possible algorithm for clinical use. *J Transl Med*. 2012 May 28;10:107.
223. Xie S, Luca M, Huang S, Gutman M, Reich R, Johnson JP, et al. Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res*. 1997 Jun 1;57(11):2295–303.
224. Satyamoorthy K, Muyrers J, Meier F, Patel D, Herlyn M. Mel-CAM-specific genetic suppressor elements inhibit melanoma growth and invasion through loss of gap junctional communication. *Oncogene*. 2001 Aug 2;20(34):4676–84.
225. Todorovic V, Sersa G, Cemazar M. Gene electrotransfer of siRNAs against CD146 inhibits migration and invasion of human malignant melanoma cells SK-MEL28. *Cancer Gene Ther*. 2013 Mar;20(3):208–10.
226. Staquicini FI, Tandle A, Libutti SK, Sun J, Zigler M, Bar-Eli M, et al. A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans. *Cancer Res*. 2008 Oct 15;68(20):8419–28.

227. Rapanotti MC, Bianchi L, Ricosi I, Campione E, Pierantozzi A, Orlandi A, et al. Melanoma-associated markers expression in blood: MUC-18 is associated with advanced stages in melanoma patients. *Br J Dermatol*. 2009 Feb;160(2):338–44.
228. Pearl RA, Pacifico MD, Richman PI, Wilson GD, Grover R. Stratification of patients by melanoma cell adhesion molecule (MCAM) expression on the basis of risk: implications for sentinel lymph node biopsy. *J Plast Reconstr Aesthetic Surg JPRAS*. 2008;61(3):265–71.
229. Maitra A, Hansel DE, Argani P, Ashfaq R, Rahman A, Naji A, et al. Global expression analysis of well-differentiated pancreatic endocrine neoplasms using oligonucleotide microarrays. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003 Dec 1;9(16 Pt 1):5988–95.
230. Hedrick L, Cho KR, Vogelstein B. Cell adhesion molecules as tumour suppressors. *Trends Cell Biol*. 1993 Feb;3(2):36–9.
231. Wu G-J, Peng Q, Fu P, Wang S-W, Chiang C-F, Dillehay DL, et al. Ectopical expression of human MUC18 increases metastasis of human prostate cancer cells. *Gene*. 2004 Mar 3;327(2):201–13.
232. Wu Z, Wu Z, Li J, Yang X, Wang Y, Yu Y, et al. MCAM is a novel metastasis marker and regulates spreading, apoptosis and invasion of ovarian cancer cells. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med*. 2012 Oct;33(5):1619–28.
233. Schiano C, Grimaldi V, Casamassimi A, Infante T, Esposito A, Giovane A, et al. Different expression of CD146 in human normal and osteosarcoma cell lines. *Med Oncol Northwood Lond Engl*. 2012 Dec;29(4):2998–3002.
234. McGary EC, Heimberger A, Mills L, Weber K, Thomas GW, Shtivelband M, et al. A fully human antimelanoma cellular adhesion molecule/MUC18 antibody inhibits spontaneous pulmonary metastasis of osteosarcoma cells in vivo. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2003 Dec 15;9(17):6560–6.
235. Shih LM, Hsu MY, Palazzo JP, Herlyn M. The cell-cell adhesion receptor Mel-CAM acts as a tumor suppressor in breast carcinoma. *Am J Pathol*. 1997 Sep;151(3):745–51.
236. Zabouo G, Imbert A-M, Jacquemier J, Finetti P, Moreau T, Esterni B, et al. CD146 expression is associated with a poor prognosis in human breast tumors and with enhanced motility in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res BCR*. 2009;11(1):R1.
237. Zeng G, Cai S, Liu Y, Wu G-J. METCAM/MUC18 augments migration, invasion, and tumorigenicity of human breast cancer SK-BR-3 cells. *Gene*. 2012 Jan 15;492(1):229–38.
238. Imbert A-M, Garulli C, Choquet E, Koubi M, Aurrand-Lions M, Chabannon C. CD146 expression in human breast cancer cell lines induces phenotypic and functional changes observed in Epithelial to Mesenchymal Transition. *PLoS One*. 2012;7(8):e43752.
239. Liu W-F, Ji S-R, Sun J-J, Zhang Y, Liu Z-Y, Liang A-B, et al. CD146 expression correlates with epithelial-mesenchymal transition markers and a poor prognosis in gastric cancer. *Int J Mol Sci*. 2012;13(5):6399–406.

240. Zeng Q, Li W, Lu D, Wu Z, Duan H, Luo Y, et al. CD146, an epithelial-mesenchymal transition inducer, is associated with triple-negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Jan 24;109(4):1127–32.
241. Lin Y, Wu X, Shen Y, Bu P, Yang D, Yan X. A novel antibody AA98 V(H)/L directed against CD146 efficiently inhibits angiogenesis. *Anticancer Res*. 2007 Dec;27(6B):4219–24.
242. Tripathi SC, Fahrman JF, Celiktas M, Aguilar M, Marini KD, Jolly MK, et al. MCAM Mediates Chemoresistance in Small-Cell Lung Cancer via the PI3K/AKT/SOX2 Signaling Pathway. *Cancer Res*. 2017 Jun 23;
243. Liang Y-K, Zeng D, Xiao Y-S, Wu Y, Ouyang Y-X, Chen M, et al. MCAM/CD146 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells through induction of epithelial-mesenchymal transition, decreased ER α expression and AKT activation. *Cancer Lett*. 2017 Feb 1;386:65–76.
244. Mills L, Tellez C, Huang S, Baker C, McCarty M, Green L, et al. Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res*. 2002 Sep 1;62(17):5106–14.
245. Ma X, Liu J, Wu J, Yan X, Wu P, Liu Y, et al. Synergistic killing effect between vorinostat and target of CD146 in malignant cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2010 Nov 1;16(21):5165–76.
246. Yang Y, Hernandez R, Rao J, Yin L, Qu Y, Wu J, et al. Targeting CD146 with a ⁶⁴Cu-labeled antibody enables in vivo immunoPET imaging of high-grade gliomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Nov 9;
247. Sun H, England CG, Hernandez R, Graves SA, Majewski RL, Kamkaew A, et al. ImmunoPET for assessing the differential uptake of a CD146-specific monoclonal antibody in lung cancer. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2016 Nov;43(12):2169–79.
248. England CG, Jiang D, Hernandez R, Sun H, Valdovinos HF, Ehlerding EB, et al. ImmunoPET imaging of CD146 in murine models of intrapulmonary metastasis of non-small cell lung cancer. *Mol Pharm*. 2017 Aug 21;
249. Hernandez R, Sun H, England CG, Valdovinos HF, Ehlerding EB, Barnhart TE, et al. CD146-targeted immunoPET and NIRF Imaging of Hepatocellular Carcinoma with a Dual-Labeled Monoclonal Antibody. *Theranostics*. 2016;6(11):1918–33.
250. Hernandez R, Sun H, England CG, Valdovinos HF, Barnhart TE, Yang Y, et al. ImmunoPET Imaging of CD146 Expression in Malignant Brain Tumors. *Mol Pharm*. 2016 Jul 5;13(7):2563–70.
251. Stalin J, Harhour K, Hubert L, Garrigue P, Nollet M, Essaadi A, et al. Soluble CD146 boosts therapeutic effect of endothelial progenitors through proteolytic processing of short CD146 isoform. *Cardiovasc Res*. 2016 Aug 1;111(3):240–51.
252. Liu Q, Zhang B, Zhao X, Zhang Y, Liu Y, Yan X. Blockade of adhesion molecule CD146 causes pregnancy failure in mice. *J Cell Physiol*. 2008 Jun;215(3):621–6.

253. Pasquier E, Bardin N, De Saint Martin L, Le Martelot MT, Bohec C, Roche S, et al. The first assessment of soluble CD146 in women with unexplained pregnancy loss. A new insight? *Thromb Haemost.* 2005 Dec;94(6):1280–4.
254. Kaspi E, Guillet B, Piercecchi-Marti M-D, Alfaidy N, Bretelle F, Bertaud-Foucault A, et al. Identification of soluble CD146 as a regulator of trophoblast migration: potential role in placental vascular development. *Angiogenesis.* 2013 Apr;16(2):329–42.
255. Weninger W, Rendl M, Mildner M, Mayer C, Ban J, Geusau A, et al. Keratinocytes express the CD146 (Muc18/S-endo) antigen in tissue culture and during inflammatory skin diseases. *J Invest Dermatol.* 2000 Aug;115(2):219–24.
256. Daniel L, Bardin N, Moal V, Dignat-George F, Berland Y, Figarella-Branger D. Tubular CD146 expression in nephropathies is related to chronic renal failure. *Nephron Exp Nephrol.* 2005;99(4):e105-111.
257. Wang F, Xing T, Wang N, Liu L. Clinical significance of plasma CD146 and P-selectin in patients with type 2 diabetic nephropathy. *Cytokine.* 2012 Jan;57(1):127–9.
258. Ciftci Dogansen S, Helvaci A, Adas M, Deniz Onal S. The relationship between early atherosclerosis and endothelial dysfunction in type 1 diabetic patients as evidenced by measurement of carotid intima-media thickness and soluble CD146 levels: a cross sectional study. *Cardiovasc Diabetol.* 2013 Oct 18;12:153.
259. Shim Y, Nam MH, Hyuk SW, Yoon SY, Song JM. Concurrent hypermulticolor monitoring of CD31, CD34, CD45 and CD146 endothelial progenitor cell markers for acute myocardial infarction. *Anal Chim Acta.* 2015 Jan 1;853:501–7.
260. Chiva-Blanch G, Crespo J, Suades R, Arderiu G, Padro T, Vilahur G, et al. CD142+/CD61+, CD146+ and CD45+ microparticles predict cardiovascular events in high risk patients following a Mediterranean diet supplemented with nuts. *Thromb Haemost.* 2016 Jul 4;116(1):103–14.
261. Kohama K, Tsukamoto Y, Furuya M, Okamura K, Tanaka H, Miki N, et al. Molecular cloning and analysis of the mouse gicerin gene. *Neurochem Int.* 2005 May;46(6):465–70.
262. Qian Y-N, Luo Y-T, Duan H-X, Feng L-Q, Bi Q, Wang Y-J, et al. Adhesion molecule CD146 and its soluble form correlate well with carotid atherosclerosis and plaque instability. *CNS Neurosci Ther.* 2014 May;20(5):438–45.
263. Shayesteh-Kheslat R, Kauffels A, Rubie C, Frick VO, Wagner M, Kollmar O, et al. Proangiogenic potency of MUC18 in arteriosclerotic disease. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2015 Jun;56(3):409–15.
264. Flanagan K, Fitzgerald K, Baker J, Regnstrom K, Gardai S, Bard F, et al. Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS. *PloS One.* 2012;7(7):e40443.
265. Ishikawa T, Wondimu Z, Oikawa Y, Gentilcore G, Kiessling R, Egyhazi Brage S, et al. Laminins 411 and 421 differentially promote tumor cell migration via $\alpha 6\beta 1$ integrin and MCAM (CD146). *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2014 Sep;38:69–83.

266. Jiang T, Zhuang J, Duan H, Luo Y, Zeng Q, Fan K, et al. CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis. *Blood*. 2012 Sep 13;120(11):2330–9.
267. Jouve N, Despoix N, Espeli M, Gauthier L, Cypowyj S, Fallague K, et al. The involvement of CD146 and its novel ligand Galectin-1 in apoptotic regulation of endothelial cells. *J Biol Chem*. 2013 Jan 25;288(4):2571–9.
268. Hsieh SH, Ying NW, Wu MH, Chiang WF, Hsu CL, Wong TY, et al. Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene*. 2008 Jun 12;27(26):3746–53.
269. Colomb F, Wang W, Simpson D, Zafar M, Beynon R, Rhodes JM, et al. Galectin-3 interacts with the cell-surface glycoprotein CD146 (MCAM, MUC18) and induces secretion of metastasis-promoting cytokines from vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2017 May 19;292(20):8381–9.
270. Ye Z, Zhang C, Tu T, Sun M, Liu D, Lu D, et al. Wnt5a uses CD146 as a receptor to regulate cell motility and convergent extension. *Nat Commun*. 2013;4:2803.
271. Tsuchiya S, Tsukamoto Y, Taira E, LaMarre J. Involvement of transforming growth factor-beta in the expression of gicerin, a cell adhesion molecule, in the regeneration of hepatocytes. *Int J Mol Med*. 2007 Mar;19(3):381–6.
272. Aldrian S, Trautinger F, Fröhlich I, Berger W, Micksche M, Kindas-Mügge I. Overexpression of Hsp27 affects the metastatic phenotype of human melanoma cells in vitro. *Cell Stress Chaperones*. 2002 Apr;7(2):177–85.
273. Aldrian S, Kindas-Mügge I, Trautinger F, Fröhlich I, Gsur A, Herbacek I, et al. Overexpression of Hsp27 in a human melanoma cell line: regulation of E-cadherin, MUC18/MCAM, and plasminogen activator (PA) system. *Cell Stress Chaperones*. 2003;8(3):249–57.
274. Li G, Kalabis J, Xu X, Meier F, Oka M, Bogenrieder T, et al. Reciprocal regulation of MelCAM and AKT in human melanoma. *Oncogene*. 2003 Oct 9;22(44):6891–9.
275. Wang P, Luo Y, Duan H, Xing S, Zhang J, Lu D, et al. MicroRNA 329 suppresses angiogenesis by targeting CD146. *Mol Cell Biol*. 2013 Sep;33(18):3689–99.
276. Wang H-F, Chen H, Ma M-W, Wang J-A, Tang T-T, Ni L-S, et al. miR-573 regulates melanoma progression by targeting the melanoma cell adhesion molecule. *Oncol Rep*. 2013 Jul;30(1):520–6.
277. Mishra R, Thorat D, Soundararajan G, Pradhan SJ, Chakraborty G, Lohite K, et al. Semaphorin 3A upregulates FOXO 3a-dependent MelCAM expression leading to attenuation of breast tumor growth and angiogenesis. *Oncogene*. 2015 Mar 19;34(12):1584–95.
278. Anfosso F, Bardin N, Francès V, Vivier E, Camoin-Jau L, Sampol J, et al. Activation of human endothelial cells via S-endo-1 antigen (CD146) stimulates the tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125(FAK). *J Biol Chem*. 1998 Oct 9;273(41):26852–6.
279. Anfosso F, Bardin N, Vivier E, Sabatier F, Sampol J, Dignat-George F. Outside-in signaling pathway linked to CD146 engagement in human endothelial cells. *J Biol Chem*. 2001 Jan 12;276(2):1564–9.

280. Luo Y, Zheng C, Zhang J, Lu D, Zhuang J, Xing S, et al. Recognition of CD146 as an ERM-binding protein offers novel mechanisms for melanoma cell migration. *Oncogene*. 2012 Jan 19;31(3):306–21.
281. Witze ES, Litman ES, Argast GM, Moon RT, Ahn NG. Wnt5a control of cell polarity and directional movement by polarized redistribution of adhesion receptors. *Science*. 2008 Apr 18;320(5874):365–9.
282. Liu D, Du L, Chen D, Ye Z, Duan H, Tu T, et al. Reduced CD146 expression promotes tumorigenesis and cancer stemness in colorectal cancer through activating Wnt/ β -catenin signaling. *Oncotarget*. 2016 Jun 28;7(26):40704–18.
283. zum Büschenfelde CM, Hermann C, Schmidt B, Peschel C, Bernhard H. Antihuman epidermal growth factor receptor 2 (HER2) monoclonal antibody trastuzumab enhances cytolytic activity of class I-restricted HER2-specific T lymphocytes against HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res*. 2002 Apr 15;62(8):2244–7.
284. Eisenberg-Lerner A, Ciechanover A, Merbl Y. Post-translational modification profiling - A novel tool for mapping the protein modification landscape in cancer. *Exp Biol Med Maywood NJ*. 2016 Aug;241(14):1475–82.
285. Rapanotti MC, Campione E, Spallone G, Orlandi A, Bernardini S, Bianchi L. Minimal residual disease in melanoma: circulating melanoma cells and predictive role of MCAM/MUC18/MelCAM/CD146. *Cell Death Discov*. 2017;3:17005.
286. Menderes G, Bonazzoli E, Bellone S, Altwerger G, Black JD, Dugan K, et al. Superior in vitro and in vivo activity of trastuzumab-emtansine (T-DM1) in comparison to trastuzumab, pertuzumab and their combination in epithelial ovarian carcinoma with high HER2/neu expression. *Gynecol Oncol*. 2017 Jul 10;
287. Hofman V, Long É, Ilie M, Selva E, Hofman P. Les cellules tumorales circulantes : méthodes de détection et intérêt en oncologie. *Rev Francoph Lab*. 2013 Jan 1;2013(448):63–70.
288. Mostert B, Kraan J, Bolt-de Vries J, van der Spoel P, Sieuwerts AM, Schutte M, et al. Detection of circulating tumor cells in breast cancer may improve through enrichment with anti-CD146. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 May;127(1):33–41.