



**HAL**  
open science

# Etude du remodelage tumoral associé aux effets du peptide vasoactif urotensine II sur la néoangiogenèse et la croissance des glioblastomes

Vadim Le Joncour

► **To cite this version:**

Vadim Le Joncour. Etude du remodelage tumoral associé aux effets du peptide vasoactif urotensine II sur la néoangiogenèse et la croissance des glioblastomes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de Rouen, France, 2015. Français. NNT: . tel-02388480

**HAL Id: tel-02388480**

**<https://normandie-univ.hal.science/tel-02388480>**

Submitted on 1 Dec 2019

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

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

# Thèse

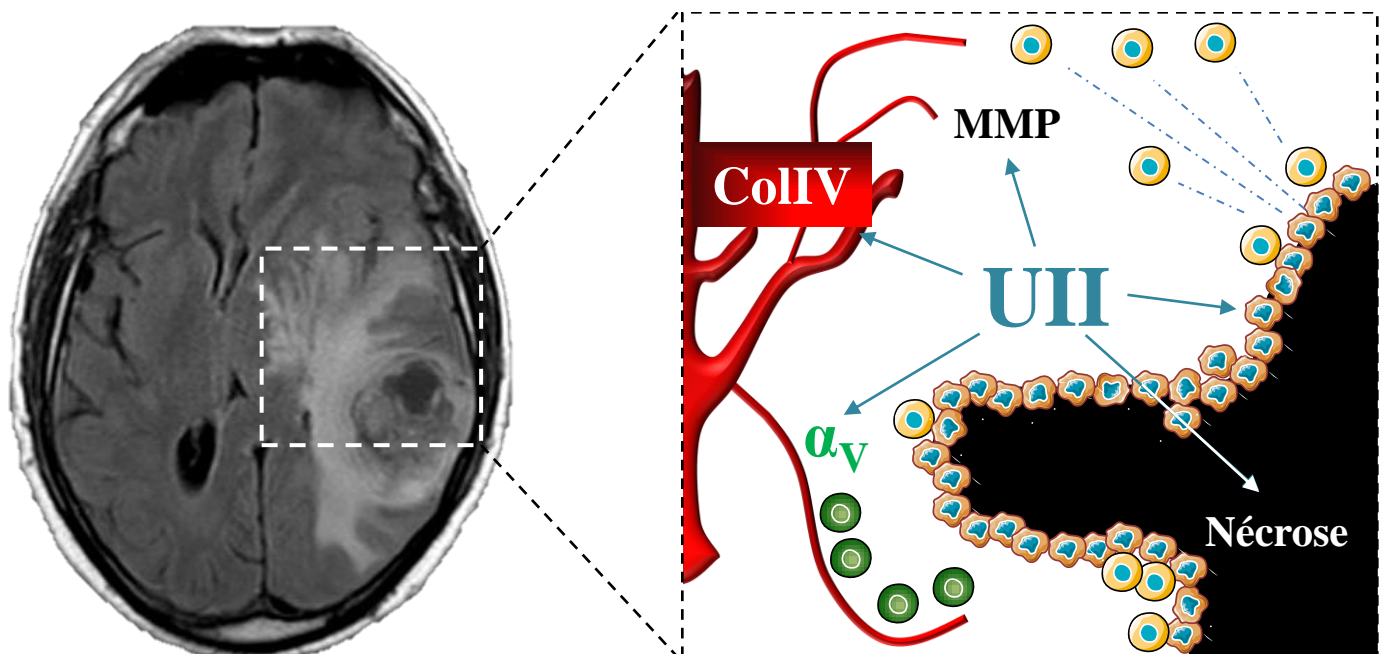
Présentée à l'Université de Rouen  
En vue de l'obtention du Doctorat *ès* Sciences  
Discipline : Biologie Cellulaire  
Spécialité : Neurosciences

## **Etude du remodelage tumoral associé aux effets du peptide vasoactif urotensine II sur la néoangiogenèse et la croissance des glioblastomes**

**Vadim Le Joncour**

**Soutenue le 22 janvier 2015 devant le jury composé de :**

<b>Mr L'Houcine Ouafik</b>	PU, Praticien Hospitalier, Marseille	Rapporteur
<b>Mr Fabrice Soncin</b>	Directeur de Recherche Inserm, Lille	Rapporteur
<b>Mme Clara Nahmias</b>	Directrice de Recherche CNRS, Paris	Examinatrice
<b>Mme Isabelle Milazzo</b>	Professeure des Universités, Rouen	Examinatrice
<b>Mme Hélène Castel</b>	Chargée de Recherche Inserm, Rouen	Directrice
<b>Mr Pierrick Gandolfo</b>	Professeur des Universités, Rouen	Directeur



*A Marion,  
A ma mère et ma sœur,  
En la mémoire de mon père.*

*Le Professeur L'Houcine Ouafik, Praticien Hospitalier aux Hôpitaux de Marseille, a volontiers accepté de siéger dans ce jury en qualité de rapporteur. Il s'agit d'un véritable honneur pour moi que les travaux de cette thèse soient jugés par un éminent spécialiste des peptides vasoactifs impliqués dans la tumorigenèse. Je l'en remercie très sincèrement et lui témoigne mon profond respect.*

*Le Docteur Fabrice Soncin, Directeur de Recherche Inserm à l'Université de Lille, a également accepté d'être le rapporteur de ce travail. Je tiens à lui exprimer ma gratitude et je suis particulièrement honoré qu'il participe à l'évaluation de cette thèse en tant que spécialiste de l'angiogenèse tumorale.*

*Le Docteur Clara Nahmias, Directrice de Recherche Inserm à l'Université de Paris-Descartes, a bien voulu être examinatrice de mes travaux, en tant qu'experte du système angiotensinergique et des mécanismes cellulaires du développement des cancers. Je tiens à lui signifier ma sincère reconnaissance.*

*Le Professeur Isabelle Segalas-Milazzo, Professeure à l'Université de Rouen, me fait également l'honneur d'être examinatrice dans ce jury. Je la remercie sincèrement de me faire l'honneur, de partager son expertise de la modélisation des interactions ligand-récepteur du système urotensinergique pour l'évaluation de ce manuscrit de thèse.*

*Je remercie le Docteur Youssef Anouar, Directeur de Recherche à l'Inserm et Directeur du Laboratoire Inserm U982 de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine, qui m'a accueilli au sein de son unité toutes ces années. Il m'a fourni tous les moyens nécessaires à l'accomplissement de ce travail et je l'en remercie.*

*Ce paragraphe est dédié au Professeur Pierrick Gandolfo, mon Mentor depuis le Master. Grâce à lui, j'ai pu bénéficier d'un modèle de rigueur et de qualité scientifique qui m'ont permis d'évoluer au cours de ces six dernières années. J'ai également, grâce à son aide, acquis un bagage solide dans le domaine de l'enseignement Universitaire. Au-delà de la simple valise que j'emporte pour la suite de ma carrière professionnelle, il m'a donné la passion de la transmission du savoir. A titre personnel, j'ai beaucoup aimé nos échanges sur la littérature, ses conseils sur le cadrage de mes photographies et sa bonne humeur sans faille qui ont fait que cette thèse fût « un plan qui se déroule sans accroc ».*

*Le Docteur Hélène Castel, Chargée de Recherche Inserm et coordinatrice de l'équipe « Astrocytes et Niche vasculaire », trouvera dans ces quelques lignes mes très sincères remerciements. D'abord, pour m'avoir fait profiter de son inestimable connaissance scientifique sur l'ensemble des projets auxquels j'ai participé au cours de ma thèse. Toujours, de bénéficier de sa rigueur technique d'électrophysiologiste méticuleuse. Sans nul doute, de ne jamais être freiné dans mes ambitions scientifiques et de me faire profiter de nombreux congrès enrichissants pour partager nos découvertes. Enfin, je la remercie tout particulièrement d'avoir toujours été présente et surtout, d'avoir cru en moi au départ.*

*Le travail décrit dans ce manuscrit n'aurait certainement pas été le même sans l'ensemble des Docteurs, doctorants, collègues et amis que j'ai croisé depuis mon arrivée au laboratoire, un matin de novembre 2007.*

*Ici, ma reconnaissance au Docteur Hubert Vaudry pour son accueil chaleureux dans la précédente unité Inserm 413, lors de mes débuts en tant que simple stagiaire volontaire de Licence. De m'avoir permis de participer aux coulisses de l'organisation d'un grand congrès international (ICN 2010, Rouen). Je remercie également les Docteurs David Vaudry et Béatrice Botia qui m'ont encadré au cours de ce premier stage. J'en garde un excellent souvenir.*

*Là, le témoignage de mon respect pour le Docteur Marie-Christine Tonon. Elle a toujours répondu présente lors de mes questionnements, notamment dans le domaine de l'immunohistochimie et de la culture de Neurosphères. J'ai également toujours pu compter sur sa bienveillance lorsque les journées de manip se prolongeaient jusque dans la soirée, et à ce jour, je peux dire que les « Loups de Mont Saint Aignan » n'auront pas eu ma peau.*

*Au Docteur Laurence Desrues, mes remerciements chaleureux. Son titre de Divinité de la Biologie Moléculaire m'a permis de bénéficier de conseils avisés. Son diplôme de Meilleur Collègue de Bureau a également contribué à rendre meilleure cette expérience de thèse. Mes prochains collègues souffriront de la comparaison à n'en pas douter.*

*Ces quelques mots sont en l'honneur du Docteur Fabrice Morin, qui a partagé avec moi ses connaissances dans le domaine de l'hypoxie et de l'autophagie. J'ai également profité de son savoir dans le domaine de l'enseignement, notamment pour les travaux pratiques de Physiologie Animale. Merci également pour le partage de son expertise de la photographie entomologique de l'infiniment petit, de l'exploration urbaine (URBEX pour ceux qui pratiquent), et de l'infiniment grand de la photographie des astres.*

*Au Docteur Martine Dubois, le témoignage de ma gratitude, et mes félicitations pour l'obtention de son poste d'Ingénieure à l'Inserm. J'ai beaucoup aimé nos échanges lors de nos projets communs, et j'ai pu bénéficier de son ultra-compétence dans le domaine des Sciences du Comportement et des Biostatistiques.*

*Je dédie ce passage aux forces vives de l'équipe, présentes et passées : les Docteurs Céline Lecointre, Marie Jarry, Mohamad Amki, Pierre-Olivier Guichet, Thomas Clavier, Orso Subrini, Damien Lanfray, Mickaël Diallo et Thomas Lefevbre. Les doctorants actuels, Jane-Eileen Joubert et Pierre-Mickaël Coly, ou en devenir (?! Gaëlle Lambert. Les techniciens Nicolas Perzo et anciennement David Bergerat. Vous avez, chacun d'entre vous, contribué à votre manière à la concrétisation de cette thèse. Je tiens à remercier particulièrement les « Bad Boyz », POG pour son savoir sur le gliome et sa maestria technique de l'immunohistochimie, ses conseils pour ma vie personnelle et son « Imposition de l'Anonymat », Momo pour son ultracompetence scientifique dans les marquages de l'endothélium chez la souris et sa bonne humeur, Perzowski pour son travail en biologie moléculaire et sa bonne humeur constante. Céline Lecointre, qui m'a formée aux techniques de migration cellulaire et encadrée à mes débuts au sein de l'équipe « Astrocytes et Niche*

*Vaculaire* ». Pour nos nombreuses discussions scientifiques et pour les plats divins qu'elle nous a concoctés. Notre amitié m'est très chère. Jane, j'ai pu assister à tes premiers pas (scientifiques) et constaté comme tu as pu grandir (métaphoriquement) depuis. En dehors, tu es une voisine d'en face du tonnerre, et une amie qui compte. Je te souhaite le meilleur pour la fin de ta thèse. Junior (désolé... !), tu fais honneur à Fabrice. Tu es un doctorant remarquable et tu as le bon goût d'avoir une belle âme. Tu feras un excellent chercheur et pour le reste, tu es déjà quelqu'un d'exceptionnel. Gaëlle, tu as été (et tu seras sans nul doute) une stagiaire irréprochable. Tu as tout le potentiel d'une future doctorante, je te souhaite de marquer l'essai et le meilleur pour la suite.

Au laboratoire, j'ai côtoyé trois autres groupes de recherche et j'ai pu bénéficier de leur compétence scientifique autant que du soutien moral de la ligue doctorante. Je tiens à gratifier de mes remerciements le Docteur Olivier Wurtz, d'abord pour ses enseignements au cours de ma formation Universitaire, puis pour ses compétences dans le domaine de l'immunologie et des cellules microgliales. Le Docteur Julien Chuquet, qui a clarifié certaines zones d'ombres et questionnements concernant mon avenir post-doctoral, le Docteur Christophe Dubessy pour ses connaissances scientifiques dans le domaine de l'UII et des souris Nude, le Docteur Anthony Falluel, pour le travail collaboratif auquel j'ai participé et le Pr Maité Montero pour sa bienveillance en toutes circonstances. Les Docteurs Delphine Burel et Lydie Jeandel pour l'organisation parfaite des UE de Licence que j'ai dispensés et leur gentillesse. Mesdames Catherine Beau pour son aide indéfectible dans mes tracas administratifs et son sourire à toute épreuve et Marie-Thérèse Schouft pour ses compétences dans la maintenance des cultures cellulaires. Je salue la troupe des doctorants/post doctorants, Abdallah, Taïmé, Houssni, Alexis, Hadrien, Marion (ma collègue du club des Nude-istes), Auriane, Roger, Maria et Aurélien. En particulier, Rhita pour sa bonne humeur et son humour si particulier mais dont je suis bon public, Hélène L pour ces soirées plus ou moins déguisées, Hélène B pour son sourire et sa joie de vivre, Marine, fraîchement débarquée mais instantanément adoptée, et pour cause !, Benjamin P (félicitations pour ton financement de thèse !), Antoine et Benjamin Q, Julie pour ces soirées dantesques dans la coloc' du Pérou, et son amitié qui m'est chère. Je lève également mon verre aux thésards soiffards, Dono et Céline, Coco, Nicolas Blue, Marloune, la famille Calbrix-Tassery (bienvenue au monde petite Charlie ! Je dédie aussi ce manuscrit à ta venue). Mes chers amis, j'espère que vous savez à quel point vous comptez pour moi.

Matthieu, je t'ai vu t'épanouir et affronter tes démons. Nos discussions scientifiques autour d'un café furent toujours enrichissantes, et je suis fier de cette complicité développée en dehors du labo. Tu feras un excellent chercheur, si tu en doutais encore. Je te passe le flambeau désormais, et même si nos horizons seront différents je sais que notre amitié perdurera.

A mes amis que j'ai négligé ces dernières années, mes remerciements pour leur compréhension. Du plus ancien, Olivier « Raaaaa » qui a foulé les mêmes bancs de maternelle et qui n'a jamais quitté mon esprit, aux plus fous, Daphné, Lydie et Yohan, Chokko et Dess, Ziza et Michel, et bien sûr Major Duck et sa future femme Elodie. Destroyer Dance, mec. Célia, architecte de formation, mais amie géniale de vocation. Ma fratrie,

*Fanny, Laure (Kawik, ça existe, j'en veux pour preuve que ce mot figure dans une thèse !) et Germain, ainsi que Chaton et François. Alexis, alias Gérard, et Romain, alias Gérard. Vous me manquez mes frères, mais je suis heureux de voir qu'on a tous les trois trouvé notre voie. Je compte sur toi pour l'éducation de mes rejetons, Gérard, et j'espère qu'ils viendront te voir s'ils ont des soucis en bio-informatique, Gérard. Vous êtes pourbes les gars. Notre amitié durera toujours.*

*A ma famille qui m'a soutenu toutes ces années. Ma tendre mère qui a fait en sorte que je ne manque jamais de rien et que je puisse me lancer dans ces longues études. D'avoir compris à quel point cela m'importait, et fait passer sa vie au second plan. Merci pour ce doux sacrifice. Ma petite sœur, qui partage certains gènes d'un grain de folie pas encore totalement caractérisé. Qui fait partie des rares personnes à me comprendre, littéralement. Je t'ai vu grandir et je suis fier de la personne que tu es devenue. Notre complicité m'est essentielle. Merci également de ton soutien indéfectible. Nous sommes les trois p'tits cochons ! Je vous aime toutes les deux tellement fort et espère vous rendre fières. Je salue Claude, pour sa bienveillance et son aide tout au long de ma vie, Tania, Vova, Alex et Marina qui forment ma famille d'horizons lointains.*

*A ma douce Marion, le hasard nous a rapproché et fait décidément bien les choses. Quelques violons et contrebasses, un DJ, un objectif 55-250. J'en ris en y repensant. Tu as fait preuve de beaucoup de courage ces derniers mois, et j'ai mis ta patience à rude épreuve. J'ai toujours pu compter sur ton soutien. Nous franchissons cette étape de notre vie ensemble et cela remplit mon cœur de joie. J'ai hâte de voir ce que la vie nous réserve. Je t'aime.*

*Enfin, je dédie ce manuscrit aussi à mon père. C'est en grande partie grâce à lui que j'en suis là. Il m'a appris la bonté, l'intégrité, l'amour du travail, les verbes irréguliers en anglais, mais surtout la curiosité, et a fait germer en moi cette passion pour les Sciences du Vivant. Des fouilles paléontologiques en amateur du dimanche à la recherche d'ammonites ou d'oursins fossilisés, à l'identification des facteurs impliqués dans le développement des cancers, il s'est passé de nombreuses années. Beaucoup trop sans lui, mais j'ai tenu le cap. Merci pour l'éducation que tu m'as donnée. J'espère que tu es fier de moi. Tu nous manques.*





*Les travaux présentés dans cette thèse ont été réalisés dans le Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N), Inserm U982.*

*Durant la préparation de mon doctorat, j'ai bénéficié d'une allocation financée par la Région Haute Normandie, que je tiens à remercier.*

*Ce travail est également le fruit de contributions des organismes suivants :*

*\*L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Inserm*

*\*L'Université de Rouen*

*\*L'Institut de Recherche et d'Innovation Biomédicale (IRIB)*

*\*La Plateforme de Recherche en Imagerie Cellulaire de Haute-Normandie*

*\*L'Ecole Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement*

*\*Le Cancéropôle Nord-Ouest*

*\*Le Gefluc de Rouen*

*\*Le Projet Peptide Research Network of Excellence, PeReNE*

## Sommaire

<b>Sommaire</b> .....	<b>1</b>
<b>Curriculum vitae</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>11</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>13</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>15</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>21</b>
<b>Summary</b> .....	<b>25</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>29</b>
<b>Préambule</b> .....	<b>31</b>
<b>Chapitre I : la tumorigenèse des gliomes</b> .....	<b>33</b>
<b>1. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la tumorigenèse gliale</b> .....	<b>33</b>
1.1. Angiogenèse normale et néo-vascularisation intraglomale .....	33
1.1.1. Mécanistique de l'angiogenèse physiologique.....	34
1.1.2. L'angiogenèse chez l'adulte : physiologie et pathologie .....	41
1.1.3. Angiogenèse tumorale .....	44
1.2. Invasion tumorale .....	47
1.2.1. Séquences de l'invasion tumorale : le détachement des cellules tumorales.....	48
1.2.2. Séquences de l'invasion tumorale : l'adhésion à la MEC .....	49
1.2.3. Séquences de l'invasion tumorale : la dégradation de la MEC.....	50
1.2.4. Séquences de l'invasion tumorale : la motilité et contractilité cellulaire .....	51
1.3. Hypoxie et nécrose intratumorales .....	52
1.3.1. Description du système HIF.....	53
1.3.2. Séquence de l'apparition de la nécrose dans les tumeurs cérébrales gliales .....	56
1.3.3. Conséquences de l'hypoxie dans la tumorigenèse gliale .....	57
<b>2. Données cliniques sur les tumeurs cérébrales d'origine gliale</b> .....	<b>58</b>
2.1. Classification anatomo-cytopathologique des tumeurs cérébrales gliales .....	59
2.1.1. Les astrocytomes.....	60
2.1.2. Les tumeurs d'origine oligodendrogliale .....	62
2.1.3. Les tumeurs mixtes oligo-astrocytaires.....	62
2.1.4. Autres types de tumeurs cérébrales gliales .....	64
2.2. Epidémiologie et facteurs de risques .....	64
2.2.1. Données épidémiologiques .....	65
2.2.2. Facteurs de risques .....	66
2.3. Génétique des gliomes .....	68
2.3.1. Mutations somatiques des astrocytomes bénins et faiblement malins .....	68
2.3.2. Mutations somatiques des astrocytomes anaplasiques .....	69
2.3.3. Mutations somatiques des GBM primaires et secondaires.....	71
2.3.4. Apport de la génétique des GBM dans la classification de Verhaak .....	71
2.4. Traitement des gliomes.....	74
2.4.1. Protocole de Stupp .....	74
2.4.2. Innovations récentes dans le traitement des GBM .....	77
2.4.3. Thérapies « biologiques » .....	82
2.4.4. Nouvelles cibles thérapeutiques, perspectives pour le traitement des GBM.....	84
<b>Chapitre II : le système urotensinergique</b> .....	<b>86</b>
<b>1. Le système urotensinergique, de l'Aplysie à l'Homme</b> .....	<b>86</b>
1.1. Structure des peptides urotensinergiques.....	86

1.2. Gènes codant les peptides urotensinergiques.....	88
1.3. Localisation de l'UII et de l'URP .....	90
1.3.1. Localisation périphérique .....	90
1.3.2. Localisation centrale .....	92
<b>2. Le récepteur de l'urotensine II .....</b>	<b>93</b>
2.1. Découverte et structure .....	93
2.2. Localisation de l'UT .....	96
2.2.1. Localisation périphérique .....	96
2.2.2. Localisation centrale .....	98
2.3. Pharmacologie de l'UT.....	99
2.3.1. Relations structure/activité.....	99
2.3.2. Découverte du palosuran .....	103
<b>3. Rôles physiologiques et physiopathologiques du système urotensinergique.....</b>	<b>104</b>
3.1. Activités biologiques <i>in vitro</i> et <i>ex vivo</i> .....	104
3.1.1. Effets vasoactifs .....	104
3.1.2. Effets sur la prolifération, la survie, l'hypertrophie et la migration cellulaires.....	106
3.1.3. Effets sur la néoangiogenèse.....	110
3.1.4. Effets sur les cellules du système immunitaire .....	114
3.2. Effets biologiques <i>in vivo</i> .....	114
3.2.1. Sur le système vasculaire .....	114
3.2.2. Sur le système rénal .....	116
3.2.3. Sur le système endocrinien .....	118
3.2.4. Sur le comportement animal .....	119
3.2.5. Dans le développement tumoral.....	121
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>125</b>
<b>1. Réactifs et consommables .....</b>	<b>125</b>
<b>2. Cultures cellulaires .....</b>	<b>126</b>
2.1. Cellules de GBM humain .....	126
2.2. Cellules endothéliales humaines.....	126
<b>3. Croissance cellulaire .....</b>	<b>127</b>
<b>4. Migration cellulaire.....</b>	<b>128</b>
<b>5. Tubulogenèse <i>in vitro</i> .....</b>	<b>128</b>
<b>6. Chimioattraction <i>in vivo</i> .....</b>	<b>129</b>
<b>7. Xénogreffes hétérotopiques de GBM humain .....</b>	<b>131</b>
<b>8. Analyses histologiques .....</b>	<b>132</b>
<b>9. Analyse des données.....</b>	<b>134</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>137</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>191</b>
<b>1. Etude du rôle du système urotensinergique dans la néoangiogenèse <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> .....</b>	<b>194</b>
<b>2. Impact de la modulation <i>in vivo</i> du système urotensinergique sur les mécanismes tumorigéniques des GBM.....</b>	<b>198</b>
<b>4. L'accélération de la tumorigenèse par l'hUII s'accompagne d'une augmentation de la malignité.....</b>	<b>210</b>
<b>Conclusion et Perspectives.....</b>	<b>221</b>
<b>1. Caractérisation histologique du rôle du système urotensinergique dans les GBM de patients .....</b>	<b>223</b>
<b>2. Rôle des macrophages recrutés par l'UII dans la tumorigenèse gliale .....</b>	<b>224</b>

<b>3. La signalisation des systèmes vasoactifs coopératifs.....</b>	<b>225</b>
<b>4. <i>Back to basics</i>, la vasoactivité des ligands de l'UT et l'impact sur la tumorigenèse.....</b>	<b>226</b>
<b>Références bibliographiques .....</b>	<b>231</b>
<b>Publications annexes .....</b>	<b>291</b>



## Curriculum vitae

### Formation Universitaire

- 2010 Master 2 Recherche**, parcours Neurosciences Moléculaires, Cellulaires et Comportementales (Université de Rouen), mention assez bien.
- 2009 Master 1 Recherche**, parcours Neurosciences Moléculaires, Cellulaires et Comportementales (Université de Rouen), mention assez bien.
- 2008 Licence**, parcours Biologie Cellulaire et Physiologie (Université de Rouen), mention assez bien.
- 2006 DEUG B** Biologie Cellulaire et Physiologie (Université de Rouen).
- 2004 Baccalauréat STL** (Lycée Val De Seine, Grand Quevilly), mention assez bien.

### Expérience dans le domaine de la recherche

#### 1. Collaborations scientifiques

- 2014 Medway School of Pharmacy (Université du Kent)** : Collaboration scientifique entre les Drs A. Edwards, V. Gubala et M. Freddi et H. Castel (Inserm U982). Evaluation de l'efficacité biologique (*in vitro*) et thérapeutique (*in vivo*) de différents construits de nanoparticules synthétiques, chargées en urantide, pour cibler les GBM.
- 2013 EA4108 (Laboratoire d'Informatique, du Traitement de l'Information et des Systèmes, LITIS)** : Collaboration scientifique entre le Pr P. Véra (Centre Henri Becquerel), le Dr P. Bohn (EA 4108) et le Dr H. Castel (Inserm U982). Etude en imagerie *in vivo* (MicroSPECT) de sondes radionucléaires spécifiques de l'apoptose cellulaire, de l'hypoxie tissulaire et de l'endothélium vasculaire, et de la fixation de ligands urotensinergiques radiomarqués, dans un modèle de xénogreffes de glioblastomes humains chez des souris immunodéprimées.
- 2012 Laboratoire d'Anatomocytopathologie (CHU de Rouen)** : Collaboration scientifique entre le Pr A. Laquerrière (CHU de Rouen) et le Dr H. Castel (Inserm U982). Formation aux techniques d'immunomarquages sur coupes de glioblastomes de patients en provenance de la tumorotheque du CHU de Rouen, et analyse d'images.

#### 2. Stages en laboratoire

- 2010 Inserm U982, Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N)** : Stage de Master 2 sur l'étude du rôle du système urotensinergique dans le développement des tumeurs cérébrales gliales (6 mois, directeur de stage Pr P. Gandolfo).
- 2009 Inserm U982 Laboratoire de Différenciation et Communication Neuronale et Neuroendocrine (DC2N)** : Stage de Master 1 sur l'étude de l'implication du neuropeptide urotensine II dans la migration et l'invasion des cellules tumorales astrocytaires (6 mois, directeur de stage Pr P. Gandolfo).

**2008 Inserm U413 (Neuroendocrinologie Cellulaire et Moléculaire) :** Stage volontaire portant sur la recherche des effets neuro-protecteurs du PACAP sur les cellules granulaires du cervelet après alcoolisation (7 mois, directeur de stage Dr D. Vaudry).

### 3. Publications scientifiques

#### Publications dans des périodiques à comité de lecture

1. Botia B, Jolivel V, Burel D, **Le Joncour V**, Roy V, Naassila M, Bénard M, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D (2011) Neuroprotective effects of PACAP against ethanol-induced toxicity in the developing rat cerebellum. *Neurotox Res.* **3**:423-34.
2. Joyard Y, **Le Joncour V**, Castel H, Diouf CB, Bischoff L, Papamicaël C, Levacher V, Vera P, Bohn P (2013) Synthesis and biological evaluation of a novel (99m)Tc labeled 2-nitroimidazole derivative as a potential agent for imaging tumor hypoxia. *Bioorg Med Chem Lett.* **13**:3704-8.
3. Chevalier A, Dubois M, **Le Joncour V**, Dautrey S, Lecointre C, Romieu A, Renard PY, Castel H, Sabot C (2013) Synthesis, biological evaluation, and in vivo imaging of the first camptothecin-fluorescein conjugate. *Bioconjug Chem.* **7**:1119-33.
4. Jarry M, Lecointre C, Malleval C, Desrues L, Schouft MT, **Lejoncour V**, Liger F, Lyvinec G, Joseph B, Loaëc N, Meijer L, Honnorat J, Gandolfo P, Castel H (2014) Impact of meriolins, a new class of cyclin-dependent kinase inhibitors, on malignant glioma proliferation and neo-angiogenesis. *Neuro Oncol.* **11**:1484-98.
5. Dubois M, **Le Joncour V**, Tonon MC, Anouar Y, Proust F, Morin F, Gandolfo P, Joly F, Hilber P, Castel H (2014) Evaluation of the impact of the cancer therapy everolimus on the central nervous system in mice. *PLoS One.* **12**:e113533.
6. Lecointre C, Desrues L, Joubert JE, Perzo N, Guichet PO, **Le Joncour V**, Brulé C, Chabbert M, Leduc R, Prézeau L, Laquerrière A, Proust F, Gandolfo P, Morin F, Castel H (2014) Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: Prototypic chemotaxic mechanism in glioma. *Oncogene, in press.*

#### Publication en préparation pour soumission dans des périodiques à comité de lecture

1. **Le Joncour V**, Lecointre C, Guichet PO, Desrues L, Modzelevski R, Bohn P, Couraud PO, Honnorat J, Tonon MC, Morin F, Castel H, Gandolfo P. Urotensin II induced acquisition of neoangiogenic and necrotic features in glioblastomas. Therapeutic potentials of UT receptor specific ligands.

#### Actes de congrès

1. Lecointre C, Morin F, Jarry M, **Le Joncour V**, Desrues L, Schouft MT, Lefebvre T, Vaudry H, Tonon MC, Langlois O, Proust F, Gandolfo P, Castel H (2009) Role of the urotensin II and UT partners in glioma cell migration. *Glia* **57**:168.
2. Botia B, Jolivel V, Burel D, **Le Joncour V**, Roy V, Naassila M, Bénard M, Fournier A, Vaudry H, Vaudry D (2010) Neuroprotective effects of PACAP against alcohol toxicity in the developing rat cerebellum. *J Mol Neurosci* **42**:304.
3. Lecointre C, **Le Joncour V**, Jarry M, Schouft MT, Desrues L, Morin F, Langlois O, Proust F, Compère V, Gandolfo P, Castel H (2011) The vasoactive peptide urotensin II induces chemotaxic migration or cell-cell adhesion during gliomagenesis. *Glia* **59**:42-3.

4. Dubois M, **Le Joncour V**, Lapinte N, Roy V, Tonon MC, Gandolfo P, Joly F, Hilber P, Castel H (2011) Comparison of the impact of the targeted therapy everolimus (Afinitor®) and the chemotherapy 5-FU on cognitive functions and cerebral plasticity in an animal model. *Eur J Cancer* **47**:143.
5. Lecointre C, **Le Joncour V**, Jarry M, Desrues L, Schouft MT, Morin F, Langlois O, Proust F, Compère V, Gandolfo P and Castel H (2012) The neuropeptide urotensin II as a new chemokine in glioma development activating biased migration/adhesion signaling pathways. *Regul Pept* **177**:25-6
6. **Le Joncour V**, Lecointre C, Jarry M, Joubert JE, Schouft MT, Morin F, Castel H and Gandolfo P (2012) Urotensin II receptor endogenous ligands as new candidates involved in high grade glioma tumor growth and neo-angiogenesis. *Regul Pept* **177**:26

#### Communications orales

1. **Le Joncour V**, Lecointre C, Jarry M, Joubert JE, Schouft MT, Morin F, Castel H and Gandolfo P (2012) Urotensin II receptor endogenous ligands as new candidates involved in high grade glioma tumor growth and neo-angiogenesis. 19<sup>th</sup> International Symposium on Regulatory Peptides, Copenhagen, 21-23 août 2012.
2. **Le Joncour V**, Lecointre C, Joubert JE, Schouft MT, Morin F, Modzelewski R, Véra P, Bohn P, Castel H and Gandolfo P (2012) Urotensin II receptor as a new pro-angiogenic candidate involved in high grade glioma growth. 16<sup>th</sup> Annual LARC-Neuroscience Network Conference, Portsmouth, 9 novembre 2012.
3. **Le Joncour V**, Lecointre C, Joubert JE, Morin F, Modzelewski R, Véra P, Bohn P, Castel H and Gandolfo P (2013) Urotensin II receptor endogenous ligands as new candidates involved in high grade glioma tumor growth and neo-angiogenesis. Rencontres Scientifiques de l'IRIB, Rouen, 21 juin 2013. **Prix de la meilleure présentation orale.**
4. **Le Joncour V**, Coly PM, Freddi M, Lecointre C, Joubert JE, Modzelewski R, Véra P, Bohn P, Wurtz O, Edwards A, Gubala V, Morin F, Gandolfo P and Castel H (2014) Role of the urotensinergetic system during glioblastoma development: potential involvement of autophagy. 3<sup>rd</sup> PeReNE steering committee, Portsmouth, 15 avril 2014)

#### Communications affichées

Je suis cosignataire de 28 communications affichées dont 16 en premier auteur et 6 dans le cadre de colloques internationaux.

#### **4. Formation technique**

- \* Xénogreffes hétéro- et orthotopiques chez des souris immunodéprimées *Nude*
- \* Implantations sous-cutanées d'éponges de Matrigel (Chimio-attraction *in vivo*)
- \* Imagerie et biodistribution de sondes radiomarquées, *in vivo* (MicroSPECT)
- \* Analyse immunohistochimique de coupes de glioblastomes humains inclus en paraffine
- \* Cultures cellulaires (astrocytes, lignées et explants tumoraux)
- \* Etude de la migration cellulaire et de la tubulogénèse
- \* Mesure des messagers intracellulaires
- \* Mesure de la production des *reactive oxygen species* (ROS)
- \* Immunocytochimie et immunohistochimie
- \* PCR quantitative en temps réel (qPCR)
- \* Microscopies conventionnelle et confocale, vidéo-microscopie
- \* Injection intrapéritonéales, intraveineuses, intratumorales et intracérébroventriculaires



## **5. Formation scientifique et de l'École Doctorale Normande de Biologie Intégrative, Santé et Environnement (EdNBISE)**

- \* Sauveteur Secouriste du Travail et de manipulation des extincteurs (2010)
- \* Graphpad Prism et ImageJ (Formations Inserm, Septembre 2010)
- \* Mener sa thèse comme un projet (Formation de l'EdNBISE, Janvier 2011)
- \* Anglais scientifique (Formation de l'EdNBISE, Février à Juin 2011)
- \* Comprendre la propriété intellectuelle et ses enjeux (Formation de l'EdNBISE, Décembre 2011)
- \* Expérimentation Animale de niveau 1 (Formation Inserm, du 13 au 28 février 2012)

Au cours de mon doctorat, j'ai participé aux activités de l'EdNBISE:

- \* Réunions du conseil de l'EdNBISE en tant que représentant élu des doctorants pour l'année 2012-2013
- \* 14, 15 et 16<sup>èmes</sup> Journées de l'EdNBISE (respectivement au Havre, à Rouen et à Caen), et membre du comité organisateur de la 15<sup>ème</sup> Journée. En tant que participant, j'ai particulièrement apprécié les thématiques abordées au cours de ces journées, les échanges inter-disciplinaires avec les autres membres de l'EdNBISE et les ateliers/tables rondes consacrés à l'insertion professionnelle post-doctorale, et de pouvoir présenter mon travail sous la forme de communications affichées  
En tant qu'organisateur, cette expérience a été formatrice à de multiples niveaux : contacts et invitation de professionnels de la recherche scientifique des secteurs industriel et académique, afin d'animer les conférences plénières et les ateliers d'insertion professionnelle ; démarches auprès des organismes régionaux, universitaires et privés pour obtenir des financements externes ; gestion d'un budget ; prise de parole devant un public dans la cadre de l'animation des débats et en assurant la fonction de *chair person*
- \* J'ai participé à la journée du GRR 2012 qui a été l'occasion de découvrir le panel des expertises scientifiques et techniques développées au sein de ce réseau, qui a donné lieu à une collaboration scientifique avec l'équipe QUANTIF (laboratoire LITIS)
- \* L'EdNBISE a subventionné à hauteur de 800 € mon déplacement au congrès International des Peptides Régulateurs (Copenhague, août 2012) qui a été l'objet d'une communication orale donnant lieu à la publication d'un acte de congrès dans le journal scientifique *Regulatory Peptides*

L'ensemble de ces actions m'a permis de développer des collaborations scientifiques indispensables à l'avancement des travaux de doctorat, d'améliorer mon aisance verbale scientifique (française et en anglaise) et de créer un réseau professionnel, utiles dans la recherche d'un emploi post-doctoral.

## **6. Activité d'enseignement et administratives**

- \* Titulaire de 2008 à 2010 d'un contrat de vacataire à l'Université de Rouen pour des missions de tutorat : accompagnement aux révisions d'examens des étudiants de L1 à L3 (30 h) et surveillance des contrôles continus et correction des copies (60 h)

- \* Animation lors des visites annuelles du laboratoire Inserm U982 par les lycéens de l'agglomération rouennaise, les étudiants de Licence (UE Initiation aux Sciences du Cerveau) et de Master (UE Neurosciences Approfondies) (2009-2012)
- \* Membre du *staff* de l'*International Congress of Neuroendocrinology* (ICN, 2010-Rouen)
- \* Membre du comité d'organisation de la 15<sup>ème</sup> journée de l'EdNBISE (<http://www.wix.com/jednbise2012/2012>)
- \* Représentant élu des doctorants rouennais au sein du conseil de l'EdNBISE (2012-2013)
- \* Vice-président de l'Association des Doctorants et Docteurs en Biologie de Normandie (ADN, <http://www.adn-normandie.fr/>) de 2012 à 2013
- \* Président de l'Association des Doctorants et Docteurs en Biologie de Normandie (ADN) de 2013 à aujourd'hui (<http://www.adn-normandie.fr/>, <https://www.facebook.com/adnrrouencaen?fref=ts>).
- \* Titulaire d'un demi-poste d'attaché temporaire à l'enseignement et la recherche (ATER) à l'Université de Rouen : dispense de travaux dirigés et travaux pratiques auprès des étudiants de L1 à M1 (121 h), dans les UE d' « Histologie », « Grandes Fonctions Physiologiques », « Immunologie », « Neurosciences » et « Biostatistiques » (octobre 2013 à août 2014)

## 7. Activités d'encadrement scientifique

- \* Mme Gaëlle Lambert (2014, 3 mois), étudiante stagiaire du M1 Recherche, parcours Neurosciences Biomédicales (Université de Rouen). Formation aux techniques de culture, croissance et migration cellulaires, de tubulogenèse, d'immunocytochimie et de manipulation de souris immunodéprimées.
- \* Mr Benjamin Poret (2013, 2 mois), étudiant stagiaire du M1 Recherche parcours Neurosciences Moléculaires, Cellulaires et Comportementales (Université de Rouen). Formation aux techniques de cultures cellulaires, d'immunohistochimie, et de mesure du volume tumoral chez des souris immunodéprimées.
- \* Mme Amanda Corla (2012, 3 mois), étudiante stagiaire en Licence de Biologie (Université de Portsmouth). Formation aux techniques de cultures cellulaires, d'injections sous-cutanées d'éponges de Matrigel, de coupes de tissu au cryostat, d'immunohistochimie et de xélogreffes hétéro- et orthotopiques dans des souris immunodéprimées.
- \* Mme Anne Legall (2012, 4 mois), étudiante stagiaire du M1 Recherche, parcours Neurosciences Moléculaires, Cellulaires et Comportementales (Université de Rouen). Formation aux techniques de cultures cellulaires, de découpes de tissu au cryostat, d'immunohistochimie et de xélogreffes hétérotopiques dans des souris immunodéprimées.



## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : Schématisation des niches vasculaires cérébrales et tumorales.....	34
<b>Figure 2</b> : Sélection et activation d'une cellule endothéliale <i>tip</i> . .....	36
<b>Figure 3</b> : Elongation du bourgeon et guidance des cellules <i>tip</i> . .....	38
<b>Figure 4</b> : Maturation de la portion néo-formée par l'induction de la quiescence des cellules endothéliales <i>phalanx</i> . .....	40
<b>Figure 5</b> : Nombre annuel de publications, référencées dans PubMed Research, en utilisant les mots-clefs « <i>angiogenesis &amp; tumor</i> ». .....	44
<b>Figure 6</b> : Les sept mécanismes de néoangiogenèse impliqués dans la tumorigenèse.....	46
<b>Figure 7</b> : Microphotographies illustrant les pseudopalissades hypoxiques dans un GBM de patient. ....	53
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique de la structure moléculaire de base des isoformes HIF- $\alpha$ et de la voie de signalisation régulant l'activité de HIF-1 $\alpha$ .....	55
<b>Figure 9</b> : Caractéristiques anatomo-cytopathologiques des quatre grades de tumeurs gliales selon la classification de l'OMS.....	63
<b>Figure 10</b> : Distribution des tumeurs cérébrales primaires selon leur type histologique, rapportée par le CBTRUS .....	65
<b>Figure 11</b> : Principales altérations génétiques et protéiques accompagnant la transformation maligne .....	70
<b>Figure 12</b> : Protocole de Stupp.....	75
<b>Figure 13</b> : Anticorps utilisés en thérapeutique.....	78
<b>Figure 14</b> : Représentation schématique des principales chimiothérapies ciblées utilisées dans le traitement des gliomes.....	80
<b>Figure 15</b> : Comparaison de la séquence peptidique et de la structure tridimensionnelle de l'hUII et de l'URP. ....	88
<b>Figure 16</b> : Schéma de l'évolution des gènes codant la somatostatine, l'UII ou l'URP. ....	89
<b>Figure 17</b> : Représentation schématique de la structure de l'UT humain. ....	95
<b>Figure 18</b> : Implication de l'UII dans le remodelage vasculaire. ....	113
<b>Figure 19</b> : Protocoles d'études <i>in vivo</i> de chimioattraction et de tumorigenèse.....	130

<b>Figure 20</b> : Effets cellulaires et voies de signalisation évoquées par les agonistes naturels et les ligands biaisés du récepteur UT humain.....	196
<b>Figure 21</b> : Expression et localisation du récepteur UT et de l'UII dans des cellules U87-MG en culture.....	199
<b>Figure 22</b> : Impact de l'augmentation (x10) des doses d'urantide administrées sur la croissance de cellules U87-MG xénotreffées dans des souris <i>Nude</i> .....	201
<b>Figure 23</b> : Macrographies représentatives de la néoangiogenèse péri tumorale de xénotreffes hétérotopiques de U87-MG traitées par l'hUII ou l'urantide.....	203
<b>Figure 24</b> : Impact d'un traitement combiné sur les systèmes urotensinergiques et angiotensinergiques sur le ralentissement du développement de xénotreffes de cellules U87-MG et la survie des animaux.....	209
<b>Figure 25</b> : Micrographies illustratives des zones hypoxiques révélées par le pimonidazole.....	211
<b>Figure 26</b> : Photographies illustratives de la nécrose intratumorale de xénotreffes de volume supérieur à 1000 mm <sup>3</sup> .....	213
<b>Figure 27</b> : Suivi de la tumorigenèse et de l'apparition progressive de la nécrose intratumorale dans des xénotreffes hétérotopiques de cellules U87-MG.....	215
<b>Figure 28</b> : Proposition de schéma final des connaissances acquises au cours de cette étude, concernant l'implication du système urotensinergique dans la tumorigenèse des gliomes malins.....	222

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1</b> : Molécules de l'adhésion cellulaire et matricielle intervenant dans l'invasion gliomale. ....	51
<b>Tableau 2</b> : Classification des lésions néoplasiques d'origine histologique gliale par l'OMS. ....	59
<b>Tableau 3</b> : Inventaire des thérapies ciblées actuellement développées pour le traitement des gliomes. ....	81
<b>Tableau 4</b> : Comparaison des séquences de l'UII et de l'URP au cours de l'évolution. ....	87
<b>Tableau 5</b> : Localisation périphérique de l'UII et de l'URP chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris. ....	90
<b>Tableau 6</b> : Localisation centrale de l'UII et de l'URP chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris. ....	92
<b>Tableau 7</b> : Pourcentages d'homologie des séquences protéiques de l'UT entre différentes espèces de tétrapodes. ....	94
<b>Tableau 8</b> : Localisation périphérique de l'UT chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris. ....	97
<b>Tableau 9</b> : Localisation centrale de l'UT chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris. ....	99
<b>Tableau 10</b> : Principaux composés agonistes et antagonistes du récepteur UT. ....	101
<b>Tableau 11</b> : Voies de transduction associées à l'activation du récepteur UT et impliquées dans les effets promotogènes, hypertrophiques et chimioattractants de l'UII. ....	108
<b>Tableau 12</b> : Voies de transduction associées à l'activation du récepteur UT et impliquées dans les mécanismes de formation et/ou remodelage des vaisseaux sanguins : effets sur les cellules endothéliales, musculaires lisses, macrophages et fibroblastes. ....	111
<b>Tableau 13</b> : Localisation de l'UII et de l'UT dans différents types de néoplasmes humains. ....	121

<b>Tableau 14</b> : Milieux de culture utilisés pour les lignées U87-MG et HCMEC-D3 et les cellules HUV-EC-C.....	127
<b>Tableau 15</b> : Liste des composés additionnés au Matrigel, et testés <i>in vivo</i> pour leurs propriétés chimioattractantes.....	129
<b>Tableau 16</b> : Liste des composés utilisés dans les études de tumorigenèse de xénogreffes hétérotopiques. ....	132
<b>Tableau 17</b> : Liste des bains et temps d'incubation pour la coloration, la déshydratation et la fixation de tranches micrométriques de tissu tumoral.....	133
<b>Tableau 18</b> : Liste des différents anticorps primaires utilisés dans les analyses cyto- et histologiques.....	133

## Liste des abréviations

(b)FGF :	<i>(basic) fibroblast growth factor</i>
10q :	bras long du chromosome 10
11p :	bras court du chromosome 11
19q :	bras long du chromosome 19
5-HT :	sérotonine
<sup>99m</sup> Tc :	technétium 99m
aa :	acide aminé
ACAT-1 :	acétyl-CoA C-acétyltransférase de type 1
ACEI :	<i>angiotensin-converting enzyme inhibitor</i>
ADAM :	<i>a disintegrin and metalloproteinase</i>
ADM :	adrénomédulline
ADN :	acide désoxyribonucléique
Adr :	adrénaline
AGT :	angiotensinogène
Akt :	protéine kinase B
Alk1 :	<i>activin receptor-like kinase 1</i>
Ang II :	angiotensine II
Ang1/2 :	angiopoïétine de type 1/2
APC :	<i>adenomatous polyposis coli</i>
aPKC $\zeta$ :	<i>atypical protein kinase C <math>\zeta</math></i>
ARB :	bloqueurs du récepteur de l'angiotensine II
ARF :	<i>alternate reading frame</i>
AT1 :	récepteur de l'angiotensine II de type 1
ATM :	<i>ataxia-telangiectasia-mutated</i>
bFGF :	<i>basic fibroblast growth factor</i>
BHE :	barrière hémato-encéphalique
bHLH :	<i>basic helix-loop-helix</i>
BK :	bradykinine
BMP9 :	<i>bone morphogenetic protein 9</i>
BRIP <sub>1</sub> :	<i>breast cancer A1-interacting protein 1</i>
BTEC :	<i>brain tumor epidemiology consortium</i>
CaMK :	calmoduline kinase
CBTRUS :	<i>Central Brain Tumor Registry of the united States</i>
CCK :	cholécystokinine
CD34 :	<i>hematopoietic progenitor cell antigen</i>
CD44 :	<i>homing cell adhesion molecule</i>
cdc42 :	<i>cell division control protein 42 homolog</i>
CDK4 :	<i>cyclin-dependent kinase 4</i>
CDNK2A :	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
CHO :	<i>chinese hamster ovary</i>
CHO-UT :	lignée <i>chinese hamster ovary</i> transfectée avec la forme humaine du récepteur UT
CML :	cellule musculaire lisse
ColIV :	collagène de type IV
COUP-TFII :	<i>chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 2</i>
CSF :	<i>colony-stimulating factor</i>
CSF1R :	<i>colony stimulating factor 1 receptor</i>



CUL2 :	culline-2
CXCR4 :	récepteur du SDF-1
DAG :	<i>donkey anti-goat IgG antibodies</i>
DAPI :	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DCC :	<i>deleted in colorectal cancer</i>
DI :	domaine inhibiteur
DLL4 :	<i>delta-like ligand 4</i>
DMEM :	<i>Dulbecco's modified essential medium</i>
DMLA :	dégénérescence maculaire liée à l'âge
EDTA :	acide éthylène diamine tétraacétique
EGF :	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR :	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGFR <sub>vIII</sub> :	variant III de l'EGFR
EG-VEGF :	<i>endocrine gland-derived vascular endothelial growth factor</i>
EPAS1 :	<i>endothelial Per Arnt Sim domain-containing protein 1</i>
EPO :	érythropoïétine
ERK1/2 :	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
ET-1 :	endothéline-1
ETS-1 :	protéine C-ets-1
FAK :	<i>focal adhesion kinase</i>
FDA :	<i>food and drug administration</i>
FIH-1 :	<i>factor inhibiting HIF-1<math>\alpha</math></i>
FITC :	isothiocyanate de fluorescéine
FOCI :	imagerie confocale par fibre optique
FoxO3 :	<i>forkhead box O3</i>
GBM :	glioblastome multiforme
GFAP :	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP :	<i>green fluorescent protein</i>
GPCR :	récepteur à sept domaines transmembranaires couplé aux protéines G
GRP :	<i>gastrin-releasing peptide</i>
GSK-3 $\beta$ :	<i>glycogen synthase kinase 3<math>\beta</math></i>
HB-EGF :	<i>heparin-binding EGF-like growth factor</i>
HCMC-D3 :	<i>human cerebral microvessel endothelial cell-D3</i>
HDAC :	histone désacétylase
HEPES :	acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
HGF :	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF-1/2 $\alpha/\beta$ :	<i>hypoxia-inducible factor-1/2 <math>\alpha/\beta</math></i>
HRE :	<i>hypoxia response element</i>
hUII :	urotensine II humaine
HUV-EC-C :	<i>human umbilical vein-endothelial cell-C</i>
ICAM-1 :	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
IDH1 :	isocitrate déhydrogénase 1
IGF-1 :	<i>insulin-like growth factor-1</i>
IL-1 $\beta$ , -2 -6, -8, -12 :	interleukines 1 $\beta$ , 2, 6, 8 et 12
INF- $\alpha/\gamma$ :	interféron- $\alpha/\gamma$
IP <sub>3</sub> :	inositol triphosphate
IRM :	imagerie par résonance magnétique
Jag-1 :	Jagged-1
JNK :	c-Jun N-terminal kinase
KLF2 :	<i>Kruppel-like factor 2</i>

L1-CAM :	<i>L1-cell adhesion molecule</i>
LCR :	liquide céphalo-rachidien
LFA-1 :	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LOH :	<i>loss of heterozygosity</i>
LPS :	lipopolysaccharide
LRP6 :	<i>low density lipoprotein receptor-related protein 6</i>
MAPK :	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MCP-1 :	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MDM2 :	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MEC :	matrice extracellulaire
MEK :	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
MET :	<i>hepatocyte growth factor receptor</i>
MGMT :	<i>O<sup>6</sup>-methylguanine DNA methyltransferase</i>
MITC :	<i>5-(3-methyltriazen-1-yl)-imidazole-4-carboxiamide</i>
MLC-2 :	<i>myosin light chain 2</i>
MLCK :	<i>myosin light-chain kinase</i>
MLCP :	<i>myosin light-chain phosphatase</i>
MMP :	métalloprotéase matricielle
MMP-2/9 :	métalloprotéase matricielle de type 2/9
moxLDL :	<i>minimally-oxdized low density lipoprotein</i>
mTOR :	<i>mammalian target of rapamycin</i>
mUII :	urotensine II murine
N.D. :	non déterminée
NADPH :	nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
N-cadhérine :	cadhérine de type neural
NCAM :	<i>neural cell adhesion molecule</i>
NCID :	<i>Notch intracellular cytoplasmic domain</i>
NDS :	<i>normal donkey serum</i>
NEFL :	protéine du neurofilament
NF1 :	neurofibromine 1
NF-κB :	<i>nuclear factor-kappa B</i>
Nip-1 :	<i>neuropilin-interacting protein-1</i>
NO :	monoxyde d'azote
NOS :	<i>Not otherwise specified</i>
NOX2 :	NADPH oxydase de type 2
Nrarp :	<i>Notch-regulated ankyrin repeat protein1</i>
Nrp1 :	co-récepteur neuropilline 1
OLIG2 :	<i>oligodendrocyte transcription factor</i>
OMS :	organisation mondiale pour la santé
p14ARF :	<i>p14 alternate reading factor</i>
p16INK4a :	<i>CDK4 inhibitor</i>
p38/42/44MAPK :	<i>p38/42/44 mitogen-activated protein kinases</i>
PAI-1 :	<i>plasminogen activator inhibitor-1</i>
PAS :	<i>period-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-single minded homolog 2</i>
PBS :	tampon phosphate salin
PDGF-A/B :	<i>platelet-derived growth factor A/B</i>
PDGFR-α/β :	<i>platelet-derived growth factor receptor α/β</i>
PECAM :	<i>platelet-endothelial cell adhesion molecule</i>
PF4 :	<i>platelet factor 4</i>

PHD2 :	<i>prolyl hydroxylase domain-containing protein 2</i>
PI <sub>3</sub> K :	phosphoinositide-3 kinase
PIGF :	<i>placental growth factor</i>
PKC :	protéine kinase C
PKD :	protéine kinase D
PLC :	phospholipase C
PIGF :	<i>placental growth factor</i>
PROX1 :	<i>Prospero homeobox protein 1</i>
PTEN :	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
PTX :	toxine pertussique
Rac :	GTPase de la famille Rho
RB :	gène du rétinoblastome
R-GABA <sub>A</sub> :	récepteur de l'acide $\gamma$ -aminobutyrique de type A
RGD :	acide arginylglycylaspartique
RhoA :	<i>Ras homolog gene family member</i>
RMN :	résonnance magnétique nucléaire
Robo4 :	<i>roundabout receptor 4</i>
ROCK :	<i>rho-associated protein kinase 1</i>
ROS :	<i>reactive oxygen species</i>
R-SAT :	<i>receptor selection and amplification technology</i>
S1PR :	<i>sphingosine 1-phosphate receptor</i>
SCL/Tal-1 :	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1</i>
SDF-1 :	<i>stromal cell-derived factor 1</i>
SDF-1 $\alpha$ :	<i>stromal cell-derived factor 1<math>\alpha</math></i>
SDS :	dodécyl sulfate de sodium
SENR :	<i>sensory epithelium neuropeptide-like receptor</i>
SH3 :	<i>src homology 3 domain</i>
SHP-2 :	<i>src homology 2 containing tyrosine phosphatase</i>
shRNA :	<i>short hairpin ribonucleic acid</i> , petit ARN interférent
SLC12A5 :	symporteur de type 5 du KCl
SNC :	système nerveux central
SOX :	<i>sex determining region on Y-box</i>
SPECT :	<i>single-photon emission computed tomography</i>
SS1-6 :	somatostatine de type 1 à 6
SYT1 :	synaptotagmine de type 1
TAD-N/C :	<i>transactivation domain-N-C terminal</i>
TGF- $\beta$ 1/2 :	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math>1/2</i>
TGF- $\beta$ R :	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math> receptor</i>
TIE-1/2 :	<i>tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains 1/2</i>
TIMP 1/4 :	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase</i> de type 1/4
TM 1-7 :	domaines transmembranaires 1 à 7
TMZ :	temozolomide
TNF- $\alpha$ :	<i>tumor necrosis factor</i>
TP53 :	gène codant l'oncosupresseur p53
tPA :	<i>tissue-plasminogen activator</i>
TSP :	thrombospondine
U11 :	urotensine II
Unc5b :	récepteur des nétrines
uPA :	<i>urokinase-type plasminogen activator</i>
URP :	<i>urotensin II-related peptide</i>

URP1/2 :	<i>urotensin II-related peptide 1/2</i>
UT :	récepteur de l'urotensine II
VCAM-1 :	<i>vascular cell adhesion molecule 1</i>
VE-cadhérine :	cadhérine de l'endothélium vasculaire
VEGFA :	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFR1/2/3 :	<i>vascular endothelial growth factor receptor 1/2/3</i>
VHL :	von Hippel-Lindau
VIP :	<i>vasoactive intestinal polypeptide</i>
Wi-Fi :	<i>wireless fidelity</i>
ZO-1 :	<i>tight junction protein-1</i>



## Résumé

La néoangiogenèse est un processus physiologique majeur permettant l'apport constant et adéquat en oxygène et nutriments à l'ensemble des tissus d'un organisme. Dès le développement embryonnaire, la vasculogenèse résulte de l'association des cellules endothéliales en tubes, capillaires puis réseau veineux dans un élégant ballet coordonné par un orchestre cellulaire et moléculaire. Des facteurs de croissance et des peptides définissent l'orientation des cellules, tantôt migrantes de manière directionnelle, tantôt adhésives pour renforcer la structure finale du vaisseau. Chez l'adulte, ce mécanisme intervient dans des phénomènes physiologiques, comme les cycles menstruels ou le remodelage vasculaire adaptatif au développement tissulaire, et physiopathologiques comme la dégénérescence maculaire liée à l'âge, le diabète ou le cancer.

Parmi les cancers, les plus agressifs et chimiorésistants sont ceux qui se caractérisent par une néoangiogenèse particulièrement complexe, dérivant du réseau vasculaire préexistant. C'est notamment le cas des tumeurs cérébrales d'origine gliale, constituées de cellules gliomales malignes, dont les cycles accélérés de mitoses consomment une énorme quantité d'énergie. Ecrasés par la masse tumorale grandissante et sous-dimensionnés pour une telle demande énergétique, les capillaires intracérébraux répondent aux signaux pro-angiogéniques libérés par les cellules cancéreuses, elles-mêmes activées par l'hypoxie progressive qu'elles subissent. Il s'agit du même orchestre de molécules impliquées dans la néoangiogenèse physiologique, comme le *stromal-derived factor 1* (SDF-1) ou le *vascular endothelial growth factor* (VEGF), mais dont les fortes quantités libérées donne lieu à une interprétation qui s'éloigne de l'œuvre originale, et *in fine* donne naissance à un réseau souvent chaotique, peu fonctionnel voire hémorragique. Au regard de la sensibilité du tissu cérébral aux anévrismes et/ou œdèmes, ce dernier point s'avère dramatique dans le cas de tumeurs centrales.

Le système urotensinergique regroupe deux neuropeptides, l'urotensine II (UII) et son paralogue *urotensin II-related peptide* (URP), qui activent un RCPG de classe 1 dénommé UT. Classiquement impliqué dans la modulation de paramètres cardiovasculaires et/ou vasoactifs, il a récemment été décrit que ce système est surexprimé dans de nombreux néoplasmes périphériques et centraux. Des travaux menés dans l'équipe « Astrocytes et Niche Vasculaire » (dirigée par le Dr Hélène Castel), ont mis en évidence une nouvelle activité du peptide UII qui agit comme une puissante chimiokine dans le développement des gliomes, *i*) en induisant la migration directionnelle de cellules tumorales soumises à un gradient de concentration, ou *ii*) en stimulant leur adhésion lorsqu'elles sont traitées par une concentration homogène d'UII. Ces propriétés, complétées par les données de la littérature montrant que l'UII est impliquée dans le remodelage vasculaire, plaident en faveur d'un rôle central du système urotensinergique dans le développement des tumeurs cérébrales d'origine gliale.

Les travaux présentés dans cette thèse de doctorat ont pour objectif de déterminer l'implication du système urotensinergique dans les processus qui concourent au développement des gliomes malins. Par une approche expérimentale sur des cultures de cellules endothéliales humaines, nous avons testé différents ligands de l'UT, *i.e.* agonistes naturels ou synthétiques et antagonistes. Nous montrons que seule l'UII est capable de stimuler la migration directionnelle et la formation de tubes endothéliaux. Dans un modèle de chimioattraction *in vivo*, l'UII entraîne le recrutement de populations cellulaires impliquées dans la formation de capillaires fonctionnels, *a priori*, à savoir des cellules endothéliales, musculaires lisses et des macrophages.

Des cellules tumorales humaines U87-MG, greffées dans des souris immunodéprimées *Nude*, forment des tumeurs hétérotopiques, qui expriment l'UT aux niveaux vasculaire et tumoral, que nous avons soumises à des traitements par des agonistes (UII, URP, UII<sub>4-11</sub>) ou antagonistes (palosuran, urantide) de l'UT. L'administration d'UII provoque une accélération

drastique de la tumorigenèse, associée à une médiane de survie significativement inférieure au groupe témoin. Le blocage de l'UT avec un antagoniste non peptidique, le palosuran, ou un antagoniste peptidique présentant les caractéristiques d'un ligand biaisé, l'urantide, retardent durablement la croissance tumorale.

L'analyse histologique des tumeurs révèle que l'administration d'UII augmente l'index de prolifération des cellules tumorales, accompagnée d'une densification du réseau vasculaire intratumoral tandis que les antagonistes de l'UT, et a fortiori l'urantide, diminuent l'index prolifératif et bloquent l'angiogenèse. Paradoxalement, la balance angiogénique, qui repose sur un équilibre entre les concentrations de facteurs pro- et anti-angiogéniques au voisinage des vaisseaux en formation, est fortement perturbée par les doses d'UII pro-angiogénique et génère une angiotection fortement altérée. En résulte un réseau de capillaire certes dense, mais peu fonctionnel et hémorragique, responsable de la formation de zones nécro-hypoxiques de plus en plus étendues. Administré sur une longue période, l'urantide induit également une nécrose tissulaire massive, par la diminution drastique du réseau vasculaire, devenant insuffisant pour alimenter le tissu tumoral.

Afin de développer des outils théranostiques innovants pour suivre l'évolution des gliomes chez les patients, nous avons développé, en collaboration avec le Laboratoire LITIS (EA4108 équipe QuanTiF, Pr Pierre Véra et Dr Pierre Bohn, Rouen), un protocole d'imagerie *single-photon emission computed tomography* (SPECT) à l'aide de sondes spécifiques des intégrines  $\alpha_v\beta_3$  couplées à du technétium radioactif ( $^{99m}\text{Tc}$ -RGD), validé dans des souris *Nude* xénogreffées avec des cellules de gliomes humain U87-MG et traitées avec de l'UII ou de l'urantide. Nous avons montré qu'au début du développement tumoral, l' $\alpha_v\beta_3$  est essentiellement localisée dans l'endothélium vasculaire en croissance. L'intégrine est ensuite progressivement retrouvée dans l'ensemble des cellules tumorales. Au terme de nos expériences, la captation de la sonde diminue à mesure de l'apparition de la nécrose



intragliomale et de la faible perfusion intratumorale par les néo-vaisseaux malformés. En accord avec cette cinétique, nous avons démontré par immunohistochimie que l'Ull et d'une manière surprenante l'urantide, induisent une surexpression d' $\alpha_v$  suggérant fortement que l'urantide agirait comme un ligand biaisé.

L'ensemble de ces données participe à la compréhension des mécanismes tumorigéniques dans les gliomes malins et à l'identification de nouveaux facteurs. Les systèmes de peptides vasoactifs, de nouveaux candidats identifiés, semblent être des éléments cruciaux impliqués dans la régulation des processus de néoangiogenèse, hypoxie et nécrose, caractéristiques des tumeurs centrales et périphériques de haut grade.

## *Summary*

The mechanisms leading to new blood vessel formation is a prerequisite for adequate oxygenation and nutrient distribution in whole organism tissues. Starting during embryonic development, blood vessel formation results of the association of tubulogenic structures composed of endothelial cells, surrounded by smooth muscle cells and fibroblasts that stabilize the final network. The whole process is orchestrated by molecular factors, coordinating cell migration and orientation until adhesion at their final localization. These identified pro- and anti-angiogenic factors belong to growth factor and peptide families, and altogether tightly regulate the equilibrium of the angiogenic balance. In adults, such phenomenon occurs in physiological functions, such as menstrual cycles or vascular remodeling, and also in diseases like diabetes, age-related macular degeneration or cancer.

Among cancers, particular subtypes are characterized by neo-angiogenic capacities, correlated with chemo resistance and aggressiveness. Deriving the normal preexisting vascular network for its own purpose, glial-derived brain tumors are highly proliferative and malignant neoplasms, incurable at this date. In particular, glioblastoma multiform (GBM) is a World Health Organization classified grade IV brain tumor, composed of pernicious infiltrative gliomal cells generating massive but diffuse tumor mass that literally crush normal brain vasculature, leading to necrotic foci and edema formation. Tumor cells are known to release pro-angiogenic molecules such as stromal-derived factor 1 (SDF-1) and vascular endothelial growth factor (VEGF), in concentrations so high that the newly formed blood vessels appear aberrant, leaky and hemorrhagic. Consistent with the cerebral tissue sensibility for aneurisms and edema, this last point is a source of concern in the clinical management of this disease.

The urotensinergic system is composed of two neuropeptides, urotensin II (UII) and its paralog urotensin II-related peptide (URP) activating a class 1 GPCR called UT. Classically,

this vasoactive system is involved in the cardiovascular parameters and tonic activity of blood vessels modulations. It has been demonstrated an up-regulation of UII and UT in multiple peripheral and central neoplasms. Recent work conducted in the research group “Astrocyte and Vascular Niche”, coordinated with Dr Hélène Castel, demonstrated that UII neuropeptide is a potent chemokine involved in glioma development, presenting a dual profile *i*) induction of directional migration of gliomal cells in a gradient concentration and *ii*) promotion of cell adhesion in homogenous concentration. These characteristics, supplemented with numerous reports indicating a central role of UII in vascular remodeling, strongly suggest that urotensinergic system is implied in GBM tumorigenesis.

The present PhD thesis work aims to characterize the ability of UT agonist and antagonist to modulate glioma development. Experiments conducted on human endothelial cells from central and peripheral origins as well as on glioma cells showed that UII stimulated directional migration *in vitro*. Tridimensional cultures of endothelial cells reproducing extracellular matrix interaction allowed the recreation of capillaries-like tubes. We identified that UII is the only urotensinergic ligand that can orchestrate tubular structures formation. Subcutaneous implantation of plugs enriched with UT ligands in C57/Bl6 mice, showed that human and murine UII are recruiting peptides for peripheral macrophages as well as smooth muscle and endothelial cells.

Human glioblastoma cell line U87-MG, naturally expressing UT, were grafted in immunodepressed *Swiss Nude* mice. The subcutaneous formed neoplasms overexpressed UT and UII in the vascular and gliomal components. We then dissected the impact of a series of agonists (hUII, URP, UII<sub>4-11</sub>) and antagonists (palosuran, urantide) to modulate xenografts growth and animal survival. Our results first demonstrated that daily intra-tumoral injections of hUII can greatly accelerate tumorigenesis, correlated with weak survival. Blockage of UT

with non peptidic antagonist palosuran, and in a more extent with peptidic antagonist/biased ligand urantide were both able to slow down GBM tumorigenesis.

Histological features of such treated tumors were then analyzed. We showed that the natural ligand hUII enhanced mitotic index, supported by an intense densification of the tumoral vascular network, whereas UT antagonists, and urantide in particular, diminished tumor proliferation and intra-tumoral blood vessel formation. Paradoxically, the angiogenic balance described as equivalent concentrations of pro- and anti-angiogenic molecules in the neighborhood of growing blood vessels, was greatly perturbed by high doses of pro-angiogenic UII, and generated poorly functional and hemorrhagic capillaries, forming hypoxic necrotic areas within xenografts. Administered during long time periods, urantide also induced such necrosis, probably provoked by the insufficient tumor perfusion due to an inadequate angiogenesis.

The development of theranostic tools to follow GBM growth in patients has been initiated in our research group, in collaboration with the LITIS laboratory (EA 4108, Quantif team, Pr Pierre Véra and Dr Pierre Bohn, Rouen, France). MicroSPECT imaging of  $\alpha_v\beta_3$  integrins with a specific  $^{99m}\text{Tc}$ -RGD probe have been validated in U87-MG xenografted *Nude* mice, treated either with hUII or urantide. We showed that in early tumoral growth, integrins were confined in newly forming blood vessels and can be a confident marker of GBM angiogenesis. After a prolonged development period,  $\alpha_v\beta_3$  is also overexpressed in non necrotic gliomal cells, despite a lower global  $^{99m}\text{Tc}$ -RGD capitation due to massive necrosis and weak probe diffusion by poorly functional blood vessels. Indeed, immunohistochemical staining of integrins in these tumors brought to the conclusion that UII and urantide can induce a massive switch of integrin expression in the entire tumor. While UII and urantide present divergent activities, integrin quantification and measurement of necrosis both suggest that urantide may act as a biased ligand.

Altogether, our data participate to better understanding of GBM development biology, and identification of new candidates for therapeutic options. Use of biased synthetic ligands for multiple vasoactive systems could lead to better clinical management of this lethal disease.

# Introduction



## Préambule

L'angiogenèse correspond au processus de formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants. Chez les mammifères, elle joue un rôle primordial lors du développement embryonnaire, au cours de la transformation cyclique de la vascularisation de l'endomètre, du développement et de la différenciation du corps jaune ovarien, de l'adaptation du tissu musculaire à une hypoxie au cours d'un exercice physique, mais également dans les phénomènes de cicatrisation tissulaire ou d'inflammation locale. L'angiogenèse normale est finement régulée, et requiert la coordination de plusieurs systèmes de signalisation, sous la forme d'une balance de molécules pro- et anti-angiogéniques, qui assurent la formation d'un réseau fonctionnel. De nombreuses pathologies provoquent un dérèglement de cette balance, induisant une perturbation aussi bien quantitative que qualitative des capillaires sanguins nouvellement formés. Parmi ces pathologies, la tumorigenèse et la formation de métastases dépendent d'une très forte augmentation du nombre de microcapillaires sanguins qui assurent un apport soutenu en oxygène et en nutriments, nécessaires à l'intense prolifération cellulaire caractéristique des néoplasmes fortement malins (Favier et Corvol, 2001).

Au milieu du XIX<sup>ème</sup> siècle, les observations macroscopiques de Rudolph Virchow, publiées dans son ouvrage « *Die Cellularpathologie* » sont les premières à décrire des phénomènes de prolifération vasculaire dans des tumeurs malignes (Editions August Hirschwald, 1859). Ces constatations ne trouvent écho qu'en 1971, lorsque Judah Folkman propose que l'expansion des cancers dépend intimement de la création d'un néoréseau vasculaire. Durant les années suivantes, son confrère Steven Brem imagine un outil méthodologique capable de quantifier l'angiogenèse tumorale et ainsi de déterminer le grade de malignité des tumeurs. Il s'agit de réaliser chez des lapins l'implantation intra-cornéenne de fragments frais provenant de tumeurs cérébrales de patients, en l'occurrence de glioblastomes, qui induisent alors une forte prolifération de l'endothélium capillaire de l'hôte en périphérie proche du greffon. Encore récemment, il était suggéré que la croissance tumorale s'effectuait en deux phases, dites avasculaire puis vasculaire, l'activité angiogénique ne débutant que lorsque la tumeur atteint un volume critique, provoquant un déficit d'approvisionnement en nutriments par diffusion passive (Zetter, 1998). Désormais, il est admis que deux phases vasculaires consécutives entrent en jeu dans la croissance tumorale, la première lorsque la tumeur utilise le réseau de capillaires sanguins préexistant, et la seconde pour la création d'un réseau de vaisseaux sanguins tumoraux par angiogenèse (remodelage et/ou réorientation de vaisseaux sanguins normaux), vasculogenèse (*via* le recrutement de précurseurs endothéliaux) ou intussusception (scission de capillaires sanguins préexistants).





## Chapitre I : la tumorigenèse des gliomes

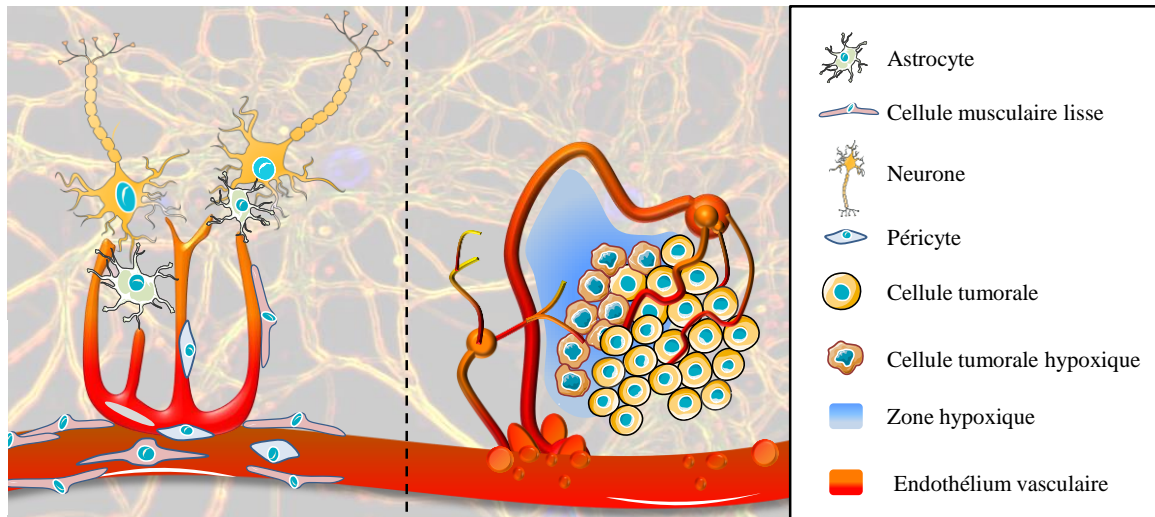
### 1. Mécanismes moléculaires et cellulaires de la tumorigenèse gliale

Ces trois dernières décennies furent témoin d'une considérable avancée des connaissances scientifiques dans le domaine du développement des tumeurs touchant les organes périphériques et le système nerveux central (SNC). L'essor de nouveaux outils moléculaires et cellulaires, en particulier dans le domaine de l'imagerie médicale, a permis de caractériser les mécanismes de la tumorigenèse, entre-aperçus il y a plus de cent cinquante ans par Virchow sur des coupes histologiques observées à l'aide de simples lentilles binoculaires. Il est aujourd'hui admis que l'acquisition de la malignité par un tissu néoplasique est corrélée avec l'apparition de phénomènes de métastases périphérique/invasion intraparenchymateuse du SNC, et la formation *de novo* d'un réseau vasculaire intratumoral. Ces deux caractéristiques sont également fréquemment responsables de l'apparition de récurrences. C'est grâce à la compréhension de ces processus et à l'identification des facteurs moléculaires à l'origine de l'invasion et de la néoangiogenèse tumorales, que peuvent émerger de nouvelles cibles thérapeutiques innovantes.

#### 1.1. Angiogenèse normale et néo-vascularisation intragliomale

En dépit d'un but partagé, *i.e.* la formation d'un réseau vasculaire fonctionnel qui permet l'oxygénation du tissu et achemine les nutriments, la structuration de l'angiogenèse normale se distingue fortement de l'angiogenèse tumorale (Fig. 1). Alors qu'elle est soumise à un contrôle régi par un équilibre délicat entre libération de facteurs pro- et anti-angiogéniques par le tissu normal, la néoangiogenèse tumorale se caractérise par une surprolifération des composantes cellulaires formant les capillaires sanguins, due à la sécrétion intense et dérégulée de molécules mitogéniques et chimioattractantes pour l'endothélium vasculaire, produites par les cellules

cancéreuses. Dotés d'une architecture anormale et peu fonctionnels, les vaisseaux sanguins tumoraux sont donc la plupart du temps responsables d'œdèmes cérébraux particulièrement délétères pour le tissu nerveux (Tate et Aghi, 2009).



**Figure 1 : Schématisation des niches vasculaires cérébrales et tumorales.** *Gauche*, la niche vasculaire cérébrale est composée de microcapillaires formés par un réseau de cellules endothéliales qui émergent d'un vaisseau sanguin plus important, bordé de cellules musculaires lisses et de fibroblastes. L'apport de nutriments aux neurones est assuré par les astrocytes, situés à l'interface. *Droite*, la formation *de novo* de vaisseaux tumoraux est stimulée par l'hypoxie, résultante de l'augmentation de l'activité métabolique des cellules tumorales. En raison d'un manque de soutien par les péricytes et les cellules musculaires lisses, les capillaires néoformés présentent une architecture anormale et peu efficace. Le caractère fragile et fuyant de ces vaisseaux anormaux est à l'origine des phénomènes d'embolies et d'hémorragies péri-tumorales.

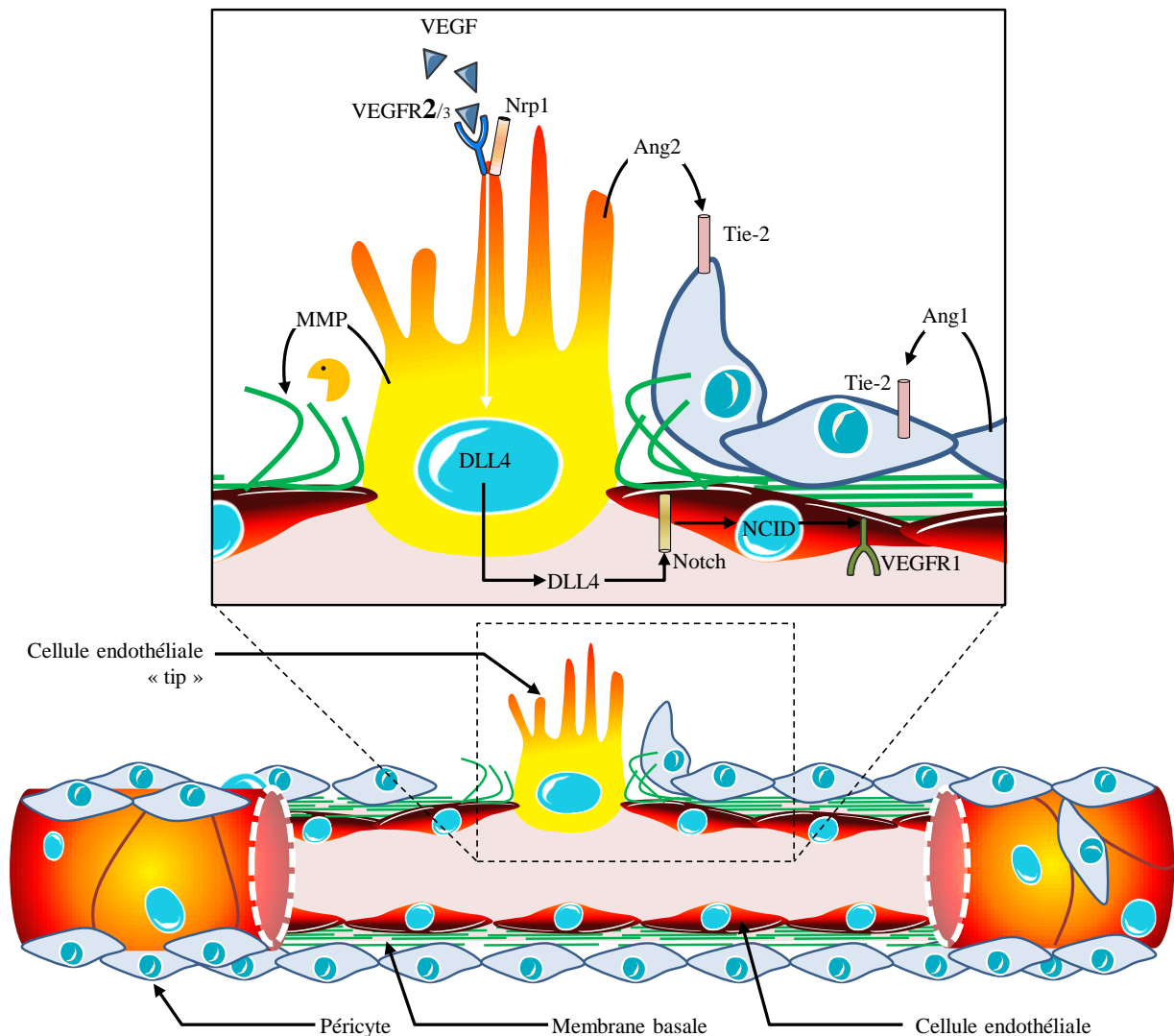
### 1.1.1. Mécanistique de l'angiogenèse physiologique

Il existe un lien fort entre le sang et le tissu vasculaire en charge d'assurer sa circulation, les cellules sanguines et endothéliales partageant une origine embryonnaire commune ; les précurseurs endothéliaux dérivant des progéniteurs hématopoïétiques. Au cours du développement embryonnaire, les vaisseaux sanguins fournissent l'oxygène nécessaire aux organes en croissance et en marge de ce rôle purement nourricier, ils libèrent un certain nombre de signaux trophiques indispensables à la morphogenèse de ces organes. Formés par l'association de progéniteurs endothéliaux, un labyrinthe primitif de petits capillaires, au cours d'un processus appelé vasculogenèse (Carmeliet, 2005). De manière précoce, ce réseau archaïque possède déjà des indications sur l'orientation de sa structuration, tantôt artérielle,

veineuse ou lymphatique, déterminée de manière génétique. Il est ainsi admis que l'orientation vers le phénotype veineux semble être le choix par défaut offert aux néo-vaisseaux, coordonné toutefois par une inhibition du facteur *neuropilin-interacting protein-1* (Nip-1) et l'activation du récepteur *chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor 2* (COUP-TFII). L'activation du gène codant la *Prospero homeobox protein 1* (PROX1), induit la différenciation du réseau veineux en réseau lymphatique, le couple moléculaire Notch/éphrine-B2 coordonne quant à lui l'orientation artérielle (Carmeliet, 2005 ; Phng et Gerhardt, 2009). En outre, de nombreuses molécules et leurs récepteurs interviennent aux différents stades de développement du réseau vasculaire, à l'image du *vascular endothelial growth factor* (VEGF) et son homologue le *placental growth factor* (PlGF), ainsi que les angiopoïétines 1 et 2 (Ang1/Ang2). Le récepteur du VEGF (VEGFR) existe sous trois formes, aux rôles bien distincts, *i*) le VEGFR1 est activé par le VEGF de type B, permettant la croissance des branches et/ou vaisseaux coronaires et le PlGF qui active l'artériogénèse et l'angiogénèse pathologique, *ii*) le VEGFR2 qui représente le sous-type pro-angiogénique majoritaire, activé par le VEGF et nécessitant son association avec le corécepteur de la neuropiline-1 (Nrp-1) (Fig. 2) pour induire le bourgeonnement endothélial des vaisseaux et *iii*) le VEGFR3, qui lie les VEGFC et D, associé au co-récepteur Nrp-2, relayant essentiellement l'activité lymphangiogénique. Les facteurs Ang1 et 2 activent le récepteur Tie, présent sous deux formes 1 et 2, chargées de la maturation et de l'équilibre du réseau endothélial final (Pour revue, Saharinen *et al.*, 2011).

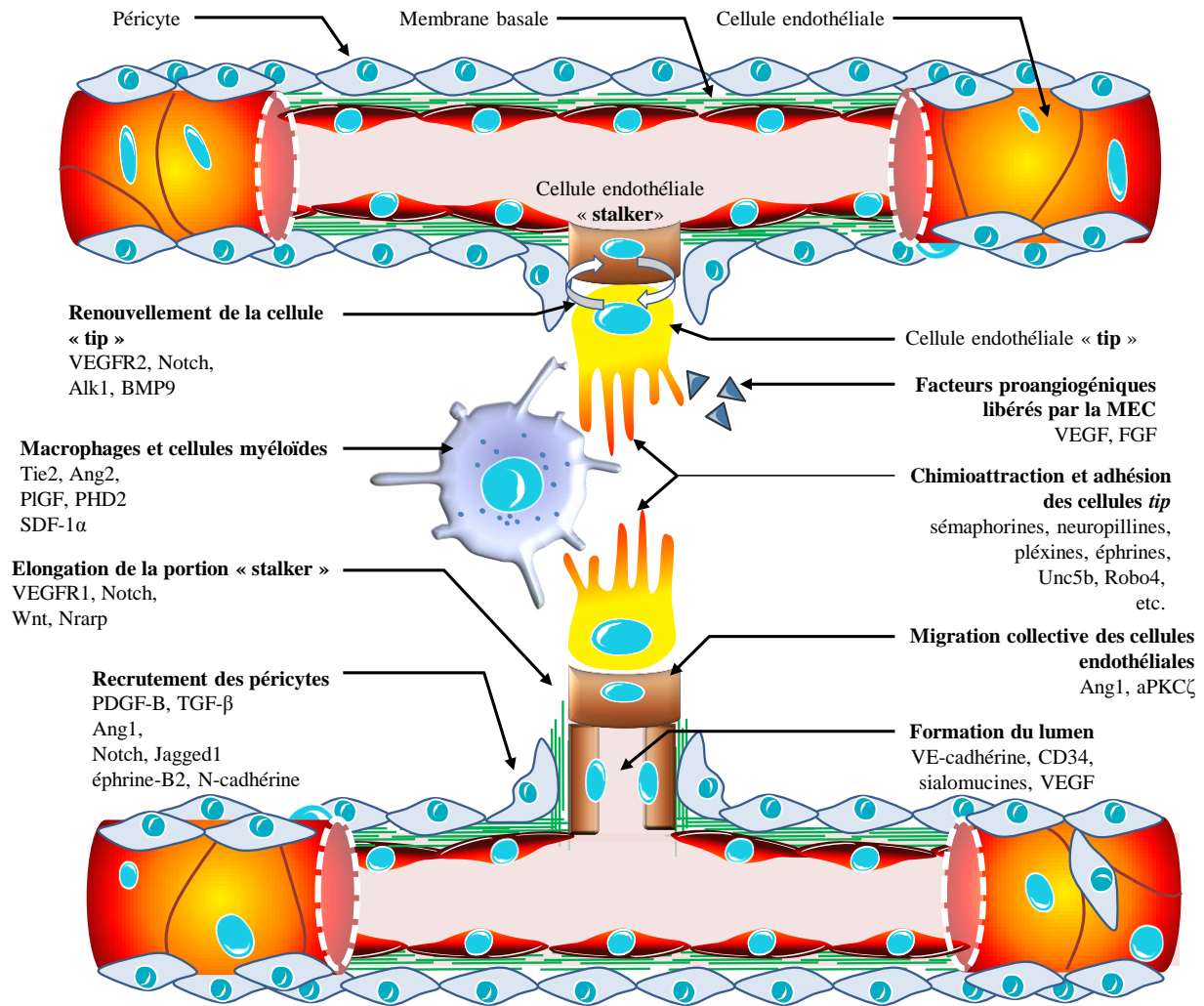
L'angiogénèse proprement dite s'opère le plus fréquemment sous la forme de bourgeonnements de vaisseaux préexistants. L'initiation du bourgeon est provoquée par la formation d'un gradient local de VEGF, qui active le VEGFR2 présent à la surface de cellules endothéliales. Ces cellules changent alors de phénotype pour prendre l'apparence d'une cellule « *tip* », caractérisée par une forte motilité et la présence de nombreuses protrusions

membranaires (Welti *et al.*, 2013) (Fig. 2).



**Figure 2 : Sélection et activation d'une cellule endothéliale *tip*.** Le bourgeonnement vasculaire est initié par la libération locale de facteurs pro-angiogéniques, tels que le VEGF. Ce dernier se lie au VEGFR2 (tout en étant capable d'activer de manière anecdotique le VEGFR3), relayant les activités pro-migratoires de la cellule *tip* ainsi sélectionnée. Ce phénotype fortement motile est également augmenté par l'association avec le co-récepteur Nrp1, un remodelage de la matrice extracellulaire via une libération de MMP, le relâchement des jonctions cellulaires des cellules endothéliales adjacentes par la modulation des VE-cadhérine et ZO-1, et la surexpression d'intégrines. Le VEGF est également responsable d'une extravasation de protéines plasmatiques (fibrinogène, fibronectine) se déposant de manière provisoire pour assurer la formation d'une membrane basale primaire. La cellule *tip* agit également sur son voisinage cellulaire *i*) en libérant de l'Ang2 qui se lie au récepteur Tie-2 présent à la surface des péricytes et provoquant leur détachement (un signal paracrine relayé par Ang1 assure la cohésion du manteau péricytaire sur le reste de la portion du vaisseau) et *ii*) la sécrétion de DLL4 et/ou Jag-1, surexprimé suite à l'activation du VEGFR2/Nrp1, qui active le récepteur Notch présent à la surface des cellules endothéliales proches. Ces dernières voient alors leur expression de VEGFR2 fortement réprimée à l'avantage du VEGFR1, par une surexpression du facteur de transcription NCID, avec pour finalité de limiter la propension migratoire de ces cellules. Ang1/2, angiopoïétine 1/2 ; DLL4, delta-like ligand 4 ; Jag-1, Jagged-1 ; MMP, métalloprotéases matricielles ; N-cadhérine, cadhérine de type neural ; NCID, Notch intracellular cytoplasmic domain ; Nrp1, co-récepteur neuropiline 1 ; Tie-1/2, tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1/2 ; VE-cadhérine, cadhérine vasculaire et endothéliale ; VEGF, vascular endothelial growth factor ; VEGFR1/2/3, vascular endothelial growth factor receptor 1/2/3 ; ZO-1, tight junction protein-1. Adapté de Welti *et al.*, 2013.

La croissance du bourgeon, dirigé par la cellule *tip* chimioattractée par un gradient de VEGF est suivie de près par une cohorte de cellules endothéliales de type *stalker*, au phénotype prolifératif et capables d'une migration collective (Fig. 3). Les cellules endothéliales impliquées dans le bourgeonnement peuvent à tout moment assurer la doublure de la cellule *tip* initialement sélectionnée. En effet, les phénotypes *tip* et *stalker* sont fluctuants, et pivotent autour d'un élément régulateur central, le récepteur Notch (Fig. 3) (Phng et Gerhardt, 2009). Le récepteur Notch exprimé à la surface des cellules *stalker* sous une forme hétérodimérique (association des sous-types Notch 1 à 4), s'associe à des facteurs tels que le *delta-like ligand 4* (DLL4) ou Jag-1 (Jagged-1) surexprimés par les cellules *tip*. Cette liaison provoque la dissociation de la portion extracellulaire de Notch, le monomère restant associé à la membrane de la cellule *stalker* est alors successivement clivé par une *a disintegrin and metalloprotease* (ADAM) et une  $\gamma$ -sécrétase. L'ultime fragment formé, appelé *Notch intracellular cytoplasmic domain* (NICD) est internalisé et agit comme un facteur transcriptionnel represser pour des gènes-cibles tels que le *Vegfr2* et *Nrp-1* et activateur pour *Flt-1* (Phng et Gerhardt, 2009). Ce dernier gène code le VEGFR1 (Fig. 2), qui dans ce cas précis agit notamment comme un piège pour le VEGF extracellulaire. De fait, une compétition va s'opérer entre les cellules endothéliales d'une portion d'un vaisseau activé par le VEGF, la cellule exprimant le plus fortement le VEGFR2 étant alors capable de réprimer le phénotype *tip* de sa voisine par le biais de la communication DLL4/Notch. Ce concours est constant, et donne lieu à un renouvellement régulier de la cellule *tip* présente au front de migration (Fig. 3) (Walti *et al.*, 2013).

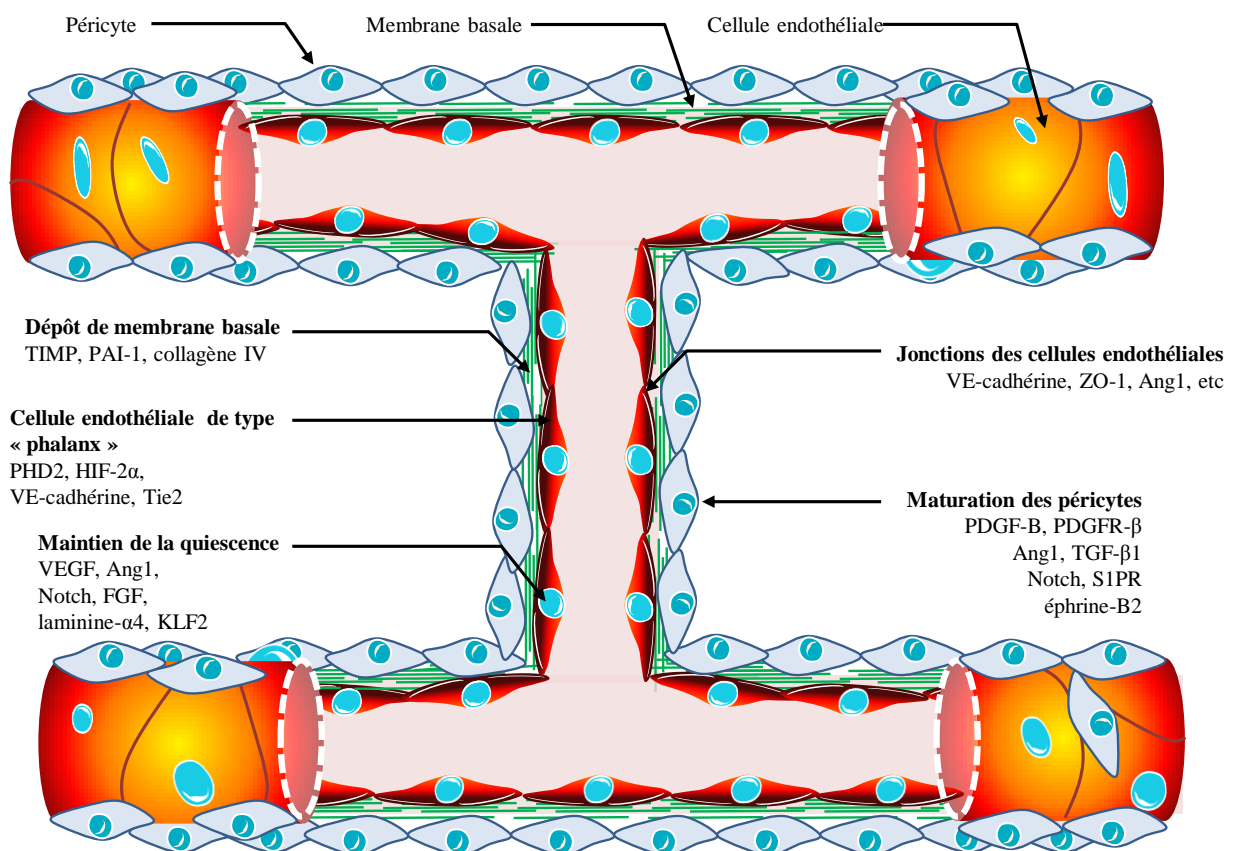


**Figure 3 : Elongation du bourgeon et guidance des cellules tip.** Le bourgeon croît sous la coordination d'un gradient de VEGF. Les cellules tip alternent entre adhésion à la MEC, modulée par les intégrines, et migration directionnelle intimée par des molécules telles que les sémaphorines et les éphrines. Les cellules stalker en retrait prolifèrent sous l'impulsion de la voie Wnt, dont l'activation est permise par la présence de la protéine Nrarp aux points de branchement, ceci pour assurer l'élongation du bourgeon et la formation du lumen du futur vaisseau. Une migration collective de ces cellules est permise par l'Ang1, qui induit une relocalisation de la PKCζ qui forme alors un complexe avec les β-caténines, interagissant avec des protéines de la polarisation cellulaire et des jonctions adhérentes. Les cellules tip et stalker interchangent régulièrement leur phénotype, sous une régulation orchestrée par majoritairement par une compétition VEGFR2/Notch dépendante, mais également des facteurs secondaires tels que Alk1 et BMP9. Lorsque les deux cellules tip de vaisseaux adjacents se rencontrent, elles fusionnent par anastomose. Ce mécanisme est assisté par des cellules chaperonnes, les macrophages, qui s'accumulent aux points de contact pour agir comme des ponts physiques en interagissant avec les filopodes des cellules tip. Afin d'orienter les cellules endothéliales, les macrophages libèrent des molécules fortement chimioattractantes telles que le SDF-1α. Enfin, les cellules stalker produisent des dépôts de membrane basale et recrutent des précurseurs péricytaires grâce au PDGF-B, ces précurseurs mésenchymateux se différencient sur site grâce au TGF-β1, ces péricytes inhibent la migration et la prolifération cellulaire (Notch/Jag-1), diminuent l'extravasation plasmatique et renforcent la structure du vaisseau (Ang1, N-cadhérine). Alk1, *activin receptor-like kinase 1* ; Ang1/2, angiopoïétine 1/2 ; aPKCζ, *atypical protein kinase C ζ* ; BMP9, *bone morphogenetic protein 9* ; CD34, *hematopoietic progenitor cell antigen* ; FGF, *fibroblast growth factor* ; Jag-1, *Jagged-1* ; N-cadhérine, *cadhérine de type neural* ; Nrarp, *Notch-regulated ankyrin repeat protein1* ; PHD2, *prolyl hydroxylase domain-containing protein 2* ; PDGF-B, *platelet-derived growth factor B* ; PlGF, *placental growth factor* ; Robo4, *roundabout receptor 4* ; SDF-1α, *stromal cell-derived factor 1α* ; Tie2, *tyrosine kinase with immunoglobulin-like and EGF-like domains 1/2* ; Unc5b, récepteur des nétrines ; VE-cadhérine, *cadhérine vasculaire et endothéliale* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor* ; VEGFR2, *vascular endothelial growth factor receptor 2*. Adapté de Welti et al., 2013.

La chimioattraction des cellules endothéliales *tip* est une étape particulièrement importante de l'angiogenèse. Son issue étant de permettre la liaison de deux portions naissantes de vaisseaux dans un phénomène d'anastomose, permettant enfin d'initier la maturation du néo-capillaire. Dans cette optique, les cellules endothéliales du front de migration expriment un assortiment de récepteurs dédiés au guidage, utilisés comme senseurs du microenvironnement (Fig. 3). Le co-récepteur Nrp1, seul ou lié à une protéine de la famille des pléxines, est capable d'interagir avec les sémaphorines (Sema), qui constituent des régulateurs de l'expression de VEGFR2, comme c'est le cas de Sema6a (Segarra *et al.*, 2012), ou de son activité intracellulaire, comme Sema3E, un activateur de la pléxine D1 des cellules *tip* et un modulateur de l'expression du DLL4 (Kim *et al.*, 2011a). Le récepteur *roundabout receptor 4* (Robo4) (Fig. 3) fait également partie de la classe des acteurs du guidage des cellules *tip* avec toutefois une activité tantôt chimioattractante ou chimioréulsive. L'interaction physique de ce récepteur avec Unc5B (un récepteur sensible aux nétrines) diminue l'angiogenèse et améliore ainsi la stabilité vasculaire en inhibant la signalisation évoquée par le VEGF (Koch *et al.*, 2011). L'hypothèse d'un rétrocontrôle négatif de l'activité de VEGFR2 par Robo4 est appuyée par le fait que le VEGF augmente les niveaux d'expression du facteur de transcription *H2.0-like homeobox protein 2* (Hlx2), qui augmente l'expression de Unc5B, de la pléxine 5 et de Sema3G (Testori *et al.*, 2011), des facteurs surexprimés notamment par les cellules *stalker* (Herbert *et al.*, 2012). Enfin, les protéines de la famille des éphrines, activant des récepteurs à activité tyrosine kinase nommés Eph, régulent la morphogenèse développementale des vaisseaux (Fig. 3). On distingue les cellules endothéliales exprimant l'éphrine-B2, du lignage artériel, des cellules exprimant EphB4 aux propriétés chimiorépulsives, orientant vers le lignage veineux (pour revue, Salvucci et Tosato, 2012). D'un point de vue purement mécanistique, les éphrines régulent l'internalisation et l'adressage des VEGFR2 et 3, un phénomène prépondérant dans le *sensing* et la chimioattraction du VEGF (Wang *et al.*, 2010).



La maturation finale du vaisseau s'opère par le recrutement de nombreux péricytes muraux qui limitent la prolifération et la migration des cellules endothéliales qu'ils recouvrent (Fig. 3 et 4). Le rôle initialement présupposé d'Ang1 sur la stabilisation du mur péricytaire a été récemment remis en cause concernant les vaisseaux quiescents, et son action porterait plutôt sur la réponse à un stress lésionnel du vaisseau (Jeansson *et al.*, 2011). Ce rôle serait assuré par le couple des facteurs *platelet derived growth factor B* (PDGF-B) et *transforming growth factor  $\beta$ 1* (TGF- $\beta$ 1), responsables de la chimioattraction et de la maturation des péricytes, respectivement (Fig. 4) (pour revue, Murakami, 2012). En outre, les *sphingosine-1-phosphate receptor* (S1PR) régulent la barrière endothéliale en induisant la surexpression des cadhérines de type neural assurant la jonction péricytes/cellules endothéliales ainsi qu'en inactivant le bourgeonnement par l'inhibition de la signalisation du VEGF et du renforcement des VE-cadhérines endothéliales (Fig. 4) (Gaengel *et al.*, 2012).



**Figure 4 : Maturation de la portion néo-formée par l'induction de la quiescence des cellules endothéliales « phalanx ».** Une fois la fusion effectuée, le lumen se connecte pour permettre le flux sanguin au travers du vaisseau.

La perfusion du tissu initialement hypoxique induit la diminution progressive du signal pro-angiogénique, l'inactivation des senseurs oxygéniques présents à la surface des cellules endothéliales et l'augmentation de la libération de molécules participant à la quiescence de l'endothélium. De plus, l'établissement du flux sanguin induit un stress physique à la surface des cellules endothéliales détecté par le facteur de transcription KLF2, participant au remodelage global du vaisseau sous la forme d'une fine monocouche de cellules endothéliales reliées par des jonctions serrées. Cette maturation se poursuit au niveau péricytaire et par le dépôt d'une membrane basale endothéliale. Des signaux autocrine/paracrine sont libérés par les cellules endothéliales et péricyitaires, notamment du VEGF, FGF, de l'Ang1 et Notch, tous participant à maintenir le phénotype quiescent des cellules de type phalanx et protègent le vaisseau des stress du microenvironnement. En effet, une modification de la balance angiogénique par une diminution locale des taux de facteurs de croissance conduit rapidement à la rétraction du vaisseau et l'apoptose des cellules endothéliales. Ang1, angiopoïétine 1 ; FGF, *fibroblast growth factor* ; HIF-2 $\alpha$ , *hypoxia inducible factor 2 $\alpha$*  ; KLF2, *Krüppel-like factor 2* ; PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1* ; PDGF-B, *platelet-derived growth factor B* ; PDGFR- $\beta$ , *platelet-derived growth factor receptor  $\beta$*  ; PHD2, *prolyl hydroxylase domain-containing protein 2* ; S1PR, *sphingosine 1-phosphate receptor* ; TGF- $\beta$ 1, *transforming growth factor  $\beta$ 1* ; VE-cadhérine, cadhérine vasculaire et endothéliale ; VEGF, *vascular endothelial growth factor* ; ZO-1, *tight junction protein-1*. Adapté de Welte *et al.*, 2013.

La quiescence vasculaire est maintenue au niveau endothélial par des signaux autocrine, incarnés par le VEGF, Ang1, le *fibroblast growth factor* (FGF) et Notch (Fig. 4). Ang1 notamment, est capable d'activer l'expression de DLL4 et ainsi de maintenir la signalisation NICD. En outre, le dépôt d'une membrane basale autour des cellules endothéliales stabilise davantage les vaisseaux en plus d'induire une activation de la voie Notch par la présence de laminine- $\alpha$ 4 (Fig. 4). Enfin, la stabilisation du phénotype *phalanx* passe par une stabilisation de l'*hypoxia inducible factor 2 $\alpha$*  (HIF-2 $\alpha$ ) qui induit une inactivation de la *prolyl hydroxylase domain-containing protein 2* (PHD2), un senseur de l'oxygène.

### 1.1.2. L'angiogenèse chez l'adulte : physiologie et pathologie

Au cours des cycles ovariens, l'angiogenèse est particulièrement sollicitée. L'augmentation de l'activité métabolique nécessaire à la formation du follicule secondaire (vasculaire) à partir du follicule primordial (avasculaire) induit une diminution locale de la teneur en oxygène, induisant à son tour la stabilisation des facteurs HIF. Ces facteurs de transcription stimulent de manière soutenue l'expression puis la libération de VEGF, activateur de la formation de microvaisseaux en périphérie du follicule. L'augmentation de l'apport en oxygène permet la poursuite des divisions mitotiques. Si la fécondation a lieu, cette sécrétion de VEGF perdure

pendant la génération du follicule pré-ovulatoire, jusqu'à la formation du corps jaune qui est sujet à une invasion vasculaire de la thèque interne jusque dans la granulosa. L'absence de VEGF et l'augmentation des taux d'Ang-2 induisent la disparition du follicule secondaire (phénomène d'atrésie) accompagnée d'une régression du corps jaune (Okada *et al.*, 2014).

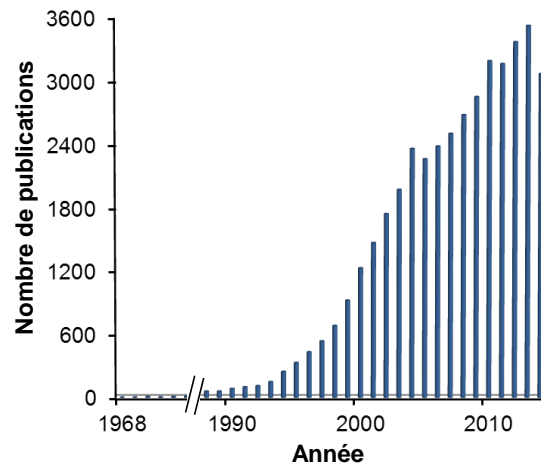
De manière similaire, l'exercice physique est également responsable d'une hypoxie musculaire locale qui active les facteurs HIF, stimulant à leur tour l'expression de facteurs angiogéniques responsables de l'augmentation de la densité capillaire.

La croissance et le renouvellement vasculaire interviennent essentiellement lors de la cicatrisation de tissus, après une lésion superficielle de la peau et stimulent la migration de neutrophiles et de cellules épithéliales sur le site du caillot sanguin. En l'espace de trois à sept jours, les neutrophiles sont remplacés par des macrophages, chargés d'éliminer les débris cellulaires, de stimuler le recrutement et la prolifération de cellules pro-angiogéniques (fibroblastes, cellules endothéliales) et de stabiliser les néo-vaisseaux. La connexion de cellules endothéliales par anastomose (fusion cellulaire) est relayée par les macrophages (Fig. 3) qui se comportent comme des cellules chaperonnes, *via* une libération de molécules chimioattractantes (Fantin *et al.*, 2010). Après plusieurs semaines, une régression vasculaire est observée, laissant place à une cicatrice composée d'un enchevêtrement de fibres de collagène, restes de la membrane basale des vaisseaux sanguins.

Les pathologies relatives à l'angiogenèse touchent certains organes, notamment les yeux qui constituent un terrain particulièrement sensible. On observe ainsi des cas de rétinopathies de la prématurité, une affection qui se déclare chez des nouveaux nés fortement prématurés qui sont alors soumis à une oxygénothérapie intensive pour compenser l'immaturité du tissu pulmonaire. A ce stade du développement, les artères de la rétine du nouveau-né ne sont pas définitivement formées et donc particulièrement sensibles au taux d'oxygène sanguin. L'effet vasoconstricteur de l'O<sub>2</sub> provoque l'apparition de voiles fibreux et favorise le risque de

décollement de la rétine. Les stades les plus sévères se traduisent par une rétraction et une fibrose massive de la rétine de l'enfant, synonymes de cécité (Fleck, 2013). Les adultes ne sont pas épargnés puisqu'un défaut d'angiogenèse peut être à l'origine d'une dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Au cours du vieillissement normal de la *macula* se forment des dépôts de *drusen*, de petites taches jaunâtres visibles sur le fond de l'œil. Les patients souffrant de DMLA présentent une multiplication de ces amas, qui détruisent rapidement la rétine par le biais d'une réaction inflammatoire dérégulée (Blasiak *et al.*, 2014). La libération locale et massive de VEGF, conséquence de l'inflammation, stimule un arrangement anarchique des composantes endothélio-capillaires, responsables de la formation de vaisseaux sanguins particulièrement fragiles et hémorragiques, qui seront à l'origine d'une fibrose (Jager *et al.*, 2008). D'autres défauts de l'angiogenèse sont associés à diverses maladies telles que l'asthme, l'obésité, le psoriasis, le diabète ou la polyarthrite rhumatoïde.

Cependant, au rythme de plus de trois mille publications annuelles au cours des cinq dernières années (Fig. 5), l'effervescence de la recherche scientifique dans ce domaine porte principalement sur la compréhension du rôle de l'angiogenèse dans le cadre du développement tumoral et de l'induction des métastases. En effet, la plupart des tumeurs solides malignes se caractérisent par une forte dépendance aux phénomènes angiogéniques, indispensables à la croissance tumorale. C'est tout particulièrement le cas des gliomes, tumeurs cérébrales malignes du SNC. Dans les gliomes, les vaisseaux sanguins intratumoraux se forment selon différentes modalités décrites dans le paragraphe suivant. Cependant, la machinerie moléculaire du bourgeonnement vasculaire physiologique tel qu'il est décrit dans le § 1.1.1. reflète également toute la complexité du phénomène et la nécessité d'une régulation fine coordonnant la formation puis la maturation du réseau endothélial ; ces derniers points s'avèrent fortement altérés voire manquants dans le contexte du microenvironnement tumoral.



**Figure 5 : Nombre annuel de publications, référencées dans PubMed Research, en utilisant les mots-clés « angiogenesis & tumor ».** La *primo* publication de Folkmann *et al.* en 1971 ouvre la marche des études sur l'angiogenèse tumorale qui connaissent leur essor à partir des années 2001, avec les premiers essais thérapeutiques prometteurs du blocage de l'angiogenèse par le bevacizumab. Consultation en date du 6 novembre 2014.

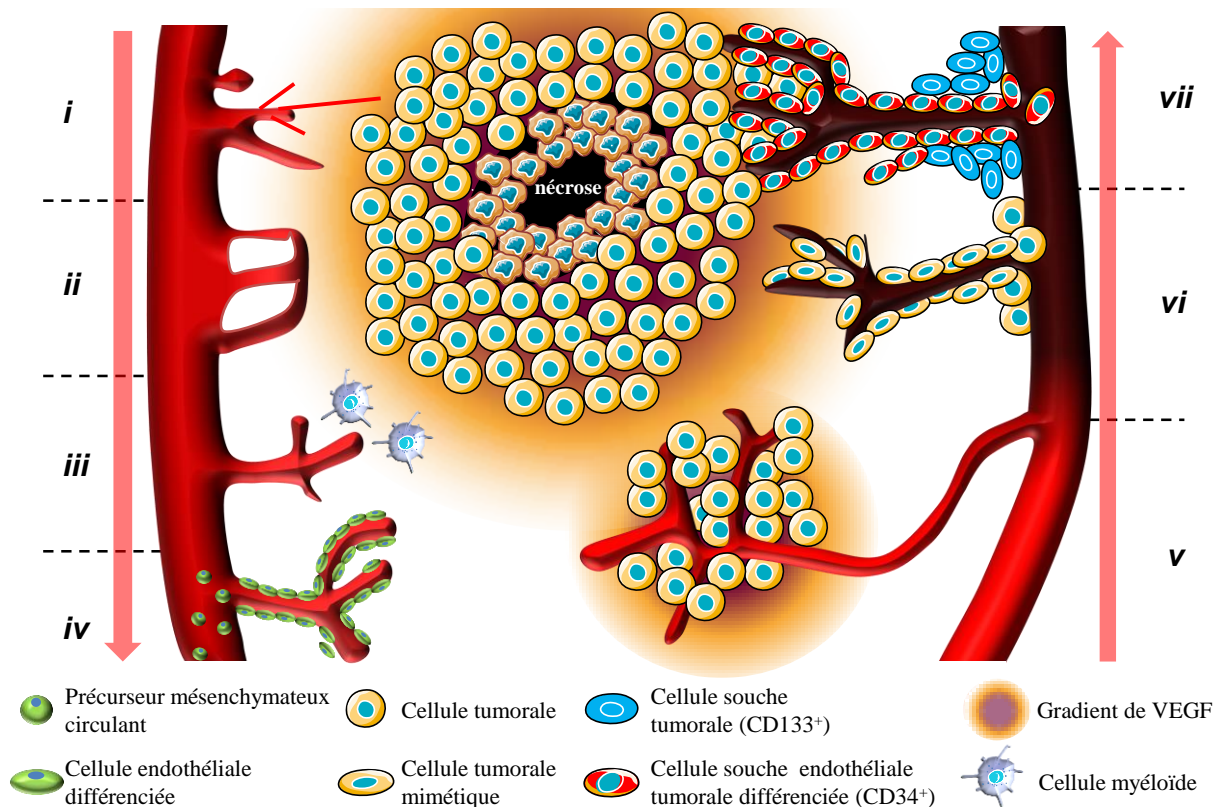
### 1.1.3. Angiogenèse tumorale

Chez l'adulte, la barrière hémato-encéphalique (BHE) est établie par la coordination de trois types cellulaires (Fig. 1), *i.e.* cellules endothéliales, péricytes et astrocytes, qui agissent comme un « corridor » sélectif pour le flux de molécules circulantes susceptibles de pénétrer dans le parenchyme nerveux. Les composés hydrophiles sont sélectionnés par les cellules endothéliales sur le critère de leur petite taille qui leur permet de franchir des jonctions serrées. En revanche, le passage de molécules plus complexes nécessite l'usage de transporteurs actifs, endothéliaux et/ou astrocytaires. L'établissement de cette structure est sous-tendu par des mécanismes de vasculogenèse (bourgeonnement et/ou intussusception) et d'angiogenèse décrits dans le § 1.1.1. et les figures 2 à 4. Il a été postulé que les acteurs moléculaires et vasculaires de l'angiogenèse physiologique sont similaires en cancérologie, tout en étant soumis à une dérégulation drastique de leur expression. Par exemple, la couverture péricytaire dans de nombreux cancers, gliomes compris, est très insuffisante notamment à cause de l'altération de l'expression du PDGF-B, cette transition épithélio-mésenchymateuse globale participant alors activement aux phénomènes de métastase et d'infiltration intraparenchymateuse (Cooke *et al.*, 2012). Les cellules endothéliales cancéreuses souffrent également de modification massives de

leur activité métabolique, permettant notamment une augmentation dérégulée de leur prolifération (pour revue, Verdegem *et al.*, 2014).

Du point de vue de leur structuration, sept mécanismes distincts sont observés au cours de la formation de néo-vaisseaux tumoraux, mécanismes eux-mêmes classés en deux groupes, fonction de la part d'incorporation des cellules tumorales dans l'architecture finale du vaisseau tumoral (Fig. 6). La première implique successivement *i)* le bourgeonnement, *ii)* l'intussusception, *iii)* la vasculogénèse guidée par des cellules myéloïdes (Fig. 3), *iv)* la vasculogénèse *via* l'attraction de précurseurs hématopoïétiques circulants ; la seconde est organisée autour de phénomènes de *v)* cooption vasculaire, *vi)* mimétisme angiogénique et *vii)* vasculogénèse par différenciation de cellules souches cancéreuses (Plate *et al.*, 2012 ; Welte *et al.*, 2013).

La cooption angiogénique (Fig. 6) peut se décrire comme l'infiltration de cellules tumorales au sein du tissu normal, et l'utilisation du réseau vasculaire préexistant (Holash *et al.*, 1999). Dans le cas des tumeurs cérébrales malignes, ce phénomène est particulièrement fréquent, et à mettre en relation avec leur caractère fortement invasif. En effet, l'infiltration du parenchyme cérébral par les cellules tumorales est facilitée par le recrutement de structures nerveuses ou vasculaires alors utilisées comme des « rails » physiques. La proximité avec la circulation sanguine permet d'assurer aux cellules tumorales un soutien métabolique robuste ; les molécules composant la membrane basale des vaisseaux sont par ailleurs utilisées comme points d'ancrage pour le déplacement cellulaire. Pour autant, le réseau vasculaire normal atteint ses limites lorsque la taille de la tumeur augmente de manière conséquente, l'apport en oxygène devient insuffisant dans certaines zones qui se nécrosent inexorablement. C'est notamment ce phénomène hypoxique qui est responsable du *switch* angiogénique qui ordonne la formation *de novo* de vaisseaux sanguins.



**Figure 6 : Les sept mécanismes de néoangiogenèse impliqués dans la tumorigenèse.** La formation de néovaisseaux au sein de la tumeur intervient en réponse à un stress hypoxique, qui induit une nécrose intratumorale, au centre de la figure, et la libération de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF par les cellules tumorales. Les vaisseaux sont générés par le biais de processus identiques aux conditions physiologiques, soit *i*) bourgeonnement, *ii*) intussusception, *iii*) guidance par des cellules myéloïdes (macrophages) et/ou *iv*) recrutement de précurseurs mésenchymateux qui se différencient en cellules endothéliales fonctionnelles. Récemment, des phénomènes d'angiogenèse qui impliquent structurellement les cellules tumorales ont été mis en évidence, *v*) la cooption angiogénique, qui intervient précocement dans le développement tumoral, sous la forme d'un soutien mécanique et moléculaire (libération de VEGF) par les cellules cancéreuses adjacentes d'un vaisseau sanguin pré-existant, *vi*) le mimétisme vasculaire lorsque des cellules tumorales s'intègrent physiquement à la paroi des vaisseaux sanguins et enfin *vii*) par la formation de vaisseaux sanguins tumoraux *via* la différenciation de cellules souches tumorales en cellules endothéliales tumorales, qui expriment alors des marqueurs d'indifférenciation (CD133<sup>+</sup>), de l'endothélium (CD34<sup>+</sup>) en plus des marqueurs de tumorigénicité. Le degré d'implication des cellules cancéreuses dans la structure du vaisseau néoformé est signalisé par un assombrissement de sa couleur. VEGF, *vascular endothelial growth factor*. Adapté de Plate *et al.*, 2012.

La néoangiogenèse pourrait potentiellement faire intervenir des cellules tumorales de deux manières. D'une part, le mimétisme vasculaire (Fig. 6), un phénomène rare pour la première fois décrit dans des mélanomes (Maniotis *et al.*, 1999) et par la suite dans plusieurs cas de gliomes (Yue & Chen, 2005 ; Liu *et al.*, 2011a ; 2011b), qui se caractérise par la présence de cellules non endothéliales (n'exprimant pas la glycoprotéine CD34), mais exprimant un marqueur de l'endothélium mature *endothelial Per Arnt Sim 1* (EPAS1). De la même manière, il est parfois observé au sein des vaisseaux la présence de cellules tumorales exprimant la *glial*

*fibrillary acidic protein* (GFAP), un marqueur astroglial, et le *vascular endothelial growth factor receptor 2* (VEGFR2), récepteur dont l'expression est principalement cantonnée aux cellules endothéliales (Francescone *et al.*, 2012). Cependant, au regard de la rareté de l'évènement, la part du mimétisme vasculaire dans la formation de vaisseaux tumoraux reste encore sujette à discussion. D'autre part, des études très récentes font état de phénomènes de transdifférenciation de cellules gliomales souches en cellules endothéliales *in vitro* (Ricci-Vitiani *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2010). Pourvues entre autre de mutations sur le gène codant l'*epidermal growth factor receptor* (EGFR), ces cellules spécifiques des gliomes, sont en tous points semblables à des cellules endothéliales, et intègrent parfaitement *in vivo*, dans des xénogreffes, le néoréseau vasculaire (Fig. 6) (Chen *et al.*, 2014a). Malheureusement, compte tenu de la rareté des observations de mimétisme chez les patients, ce phénomène est l'objet de vives discussions au sein de la communauté scientifique (Rodriguez *et al.*, 2012). En effet, dans la réalité de la pathologie, les cellules vasculaires mutantes sont le plus souvent cantonnées à la zone périvasculaire, sans être retrouvées dans le *lumen* des vaisseaux sanguins. Une dernière zone d'ombre subsiste sur l'existence de macrophages polarisés (Fig. 6), qui présentent des phénotypes différents et dont l'implication dans la tumorigenèse de gliomes chez l'animal est en cours d'étude. On distingue ainsi les monocytes de type M1 antitumoraux, du phénotype M2 pro-angiogénique et pro-tumoral (Sica *et al.*, 2006). Ces macrophages tumoraux libèrent une grande quantité de facteurs de croissance, y compris le VEGF, qui accélère fortement la croissance de gliomes humains xénogreffés. Cependant, il n'existe à l'heure actuelle aucune observation chez l'Homme qui atteste l'existence d'un tel détournement de ces cellules à l'avantage du glioblastome.

## **1.2. Invasion tumorale**

Avec l'angiogenèse, l'infiltration intraparenchymateuse est un autre mécanisme fortement



impliqué dans la résurgence des gliomes. Des cellules tumorales profitent de voies de guidance naturelles, *i.e.* microvaisseaux cérébraux, cellules nerveuses myélinisées, cellules gliales ou structures cérébrales pour quitter le foyer principal de prolifération tumorale (Gritsenko *et al.*, 2012), s'installer à distance et parfois entrer en état de dormance. Du fait de leur petite taille et des limitations résolutive du matériel, ces cellules sont invisibles en imagerie par résonance magnétique (IRM), et sont à terme responsables de rechutes violentes chez des patients supposés en rémission depuis plusieurs mois. Ces récurrences insidieuses sont fréquemment plus agressives que la tumeur initiale, principalement en raison d'une accumulation de mutations et une pression de sélection qui s'exerce sur ces cellules tumorales invasives au cours des mois suivant l'exérèse, lorsque le patient est traité par radio- et chimiothérapies.

### **1.2.1. Séquences de l'invasion tumorale : le détachement des cellules tumorales**

Le détachement des cellules gliomales invasives du nœud tumoral primaire implique une succession d'événements cellulaires (Tate et Aghi, 2009, Onishi *et al.*, 2011).

Le premier événement consiste en une déstabilisation et une désorganisation des jonctions de cadhérine qui maintiennent l'intégrité et délimitent la masse tumorale. Ces cadhérines sont de trois types (E, P et N) et forment, sous la dépendance d'une signalisation calcique, des jonctions adhérentes transmembranaires. À cause de leur contribution dans des processus tels que la différenciation et l'inhibition de la croissance et la motilité par contact cellulaire, ces protéines sont considérées comme des suppresseurs de tumeur (Demuth et Berens, 2004). En effet, au cours de la progression du développement tumoral, il a été montré qu'une diminution de l'expression des cadhérines est corrélée avec les phénomènes de dédifférenciation et de métastase, et plus largement avec un mauvais pronostic pour des patients atteints par des carcinomes pulmonaires (Bremnes *et al.*, 2002).

Le second événement cellulaire est une forte diminution de l'expression de la connexine 43,

isoforme fortement présente dans le SNC notamment dans les astrocytes (Dermietzel et Spray, 1993), qui conduit à une raréfaction des jonctions communicantes (*gap*). La communication cellule/cellule est importante dans le contrôle de la prolifération et la différenciation, par le biais notamment de ces jonctions *gap* et de seconds messagers qui circulent au travers (Goodenough *et al.*, 1996). *In vitro*, la perte de cette communication intercellulaire perturbe le contrôle de la mitose et de la dédifférenciation cellulaire (Ruch, 1994) et provoque une augmentation de la motilité de cellules gliomales humaines (McDonough *et al.*, 1999). Dans des coupes histologiques de gliomes de patients, la diminution de la formation des jonctions *gap* et la sous expression de la connexine 43 est corrélée avec l'augmentation de la malignité (Soroceanu *et al.*, 2001). Ces observations vont dans le sens de l'hypothèse de Demuth et Berens (2004), qui suggère que l'augmentation des adhésions cellulaires entrave la tumorigenèse en réduisant fortement l'infiltration tumorale.

La dernière étape de ce mécanisme requiert le clivage de la glycoprotéine transmembranaire CD44, membre de la superfamille des récepteurs aux immunoglobulines, qui participe à l'ancrage la masse tumorale à la matrice extracellulaire (MEC), par liaison à l'acide hyaluronique de la MEC intracérébrale (Nagano et Saya, 2004). De manière expérimentale, il a été montré *in vitro* et *in vivo* qu'une immunoneutralisation du CD44 bloque le processus d'invasion cellulaire dans des gliomes. Le clivage du CD44 est assuré par les métalloprotéases ADAM de types 10 et 17. Libérés dans les espaces extra- et intracellulaires, les fragments moléculaires ont été caractérisés comme agents stimulant la migration cellulaire (Okamoto *et al.*, 1999).

### 1.2.2. Séquences de l'invasion tumorale : l'adhésion à la MEC

L'adhésion des cellules gliomales à la MEC est permise par les intégrines, des glycoprotéines transmembranaires composées de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ . Ces intégrines interagissent essentiellement avec des protéines de la MEC. Parmi elles, l' $\alpha_v\beta_3$  (Tab. 1), qui lie

les fibronectine, vitronectine et ténascine-C de la MEC, joue un rôle crucial dans l'invasion tumorale (Leavesley *et al.*, 1992). Il a par exemple été montré que l'augmentation de son expression dans les cellules gliomales stimule fortement leur motilité tout en diminuant leur sensibilité à l'apoptose (Platten *et al.*, 2000). Dans les gliomes, certains facteurs ont été identifiés comme régulateurs de l'expression des intégrines, notamment l'*urokinase-type plasminogen activator* (uPA), libéré par les cellules tumorales, qui entraîne une surexpression de  $\alpha_v\beta_3$  via un mécanisme autocrine. Il existe également des molécules présentes à la surface des membranes des différents types cellulaires (cellules nerveuses, endothéliales et tumorales), membres de la superfamille des immunoglobulines, tels que les *intercellular*, *neuronal* et *vascular cell-adhesion molecule* (ICAM, NCAM et VCAM, respectivement) (Tab. 1).

### 1.2.3. Séquences de l'invasion tumorale : la dégradation de la MEC

Afin de libérer un espace extracellulaire propice à la motilité, les cellules tumorales libèrent des enzymes de la famille des métalloprotéases matricielles (MMP), qui dégradent les protéines constitutives de la MEC. La première preuve expérimentale de leur rôle fut publiée au début des années 80, dans un modèle d'invasion et de métastases de mélanome (Liotta *et al.*, 1980). Dans les cancers infiltrants et/ou métastatiques, leur suractivation est sous contrôle *i*) de facteurs de croissance comme le *nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) (Li *et al.*, 2007a), des isoformes 1 et 2 du TGF- $\beta$  (Rooprai *et al.*, 2000) ou l'*insulin-like growth factor binding protein-2* (IGF-1) (Wang *et al.*, 2003), *ii*) de glycoprotéines-récepteurs comme la *low-density lipoprotein receptor-related protein 1* (LRP-1) (Song *et al.*, 2009) ou *iii*) de peptides vasoactifs comme l'adrénomédulline (ADM) (Hikosaka *et al.*, 2011) ou l'urotensine II (UII) (Zhou *et al.*, 2012). Surexprimées dans les glioblastomes, les MMP de types 2 et 9 sont clairement impliquées dans les mécanismes de migration *in vitro* et d'invasion *in vivo* (Wick *et al.*, 2001 ; Hagemann *et al.*, 2012).

Tableau 1 : Molécules de l'adhésion cellulaire et matricielle intervenant dans l'invasion gliomale.

Récepteur cellulaire	Ligand cellulaire/matriciel	Expression dans le tissu glial tumoral	Référence
<b>Intégrines</b>			
$\alpha_1\beta_1$	laminines, collagène I et IV	—	Paulus <i>et al.</i> , 1993
$\alpha_2\beta_1$	collagène I et IV	↔	Paulus <i>et al.</i> , 1993
$\alpha_3\beta_1$	laminines, collagène I et IV	↑	Paulus <i>et al.</i> , 1993; Gingras <i>et al.</i> , 1995
$\alpha_6\beta_1$	laminines	↔	Paulus <i>et al.</i> , 1993; Gingras <i>et al.</i> , 1995; Previtali <i>et al.</i> , 1996
$\alpha_6\beta_4$	laminines	↑	Previtali <i>et al.</i> , 1996
$\alpha_9\beta_1$	ténascines, fibronectine	↑	Brown <i>et al.</i> , 2008
$\alpha_5\beta_1$	fibronectine	↔ / —	Paulus <i>et al.</i> , 1993; Gingras <i>et al.</i> , 1995
$\alpha_v\beta_3$	vitronectine, collagène IV, laminine, thrombospondine, téna-scines, ostéopondine, périostine, tropoélastine	↑	Paulus <i>et al.</i> , 1993; Gingras <i>et al.</i> , 1995; Bello <i>et al.</i> , 2001
$\alpha_v\beta_5$	vitronectine, collagène IV, laminine, thrombospondine, téna-scines, ostéopondine, périostine	↑	Bello <i>et al.</i> , 2001
<b>Syndécanes</b>			
Types 1 à 4	laminines, collagène I, téna-scines, fibronectine, thrombospondine, vitronectine	↔	Watanabe <i>et al.</i> , 2006
<b>Dystroglycanes</b>			
Types $\alpha$ et $\beta$	laminine, perlecan	↓	Calogero <i>et al.</i> , 2006
CD44	hyaluronane, collagène IV	↑	Kuppner <i>et al.</i> , 1992; Paulus <i>et al.</i> , 1993
<b>Cell Adhesion Molecule (CAM)</b>			
ICAM-1	hyaluronane, LFA-1	↑	Paulus <i>et al.</i> , 1993; Burim <i>et al.</i> , 2009
NCAM	NCAM, L1-CAM, neurocane	↓	Todaro <i>et al.</i> , 2007; Duenisch <i>et al.</i> , 2011
L1-CAM	L1-CAM, NCAM	↑	Izumoto <i>et al.</i> , 1996; Tsuzuki <i>et al.</i> , 1998; Yang <i>et al.</i> , 2009
<b>Cadhérines</b>			
Type Neural	N-cadhérine	↓	Asano <i>et al.</i> , 1997; Utsuki <i>et al.</i> , 2002
Type Endothélial	E-cadhérine	—	Utsuki <i>et al.</i> , 2002

L'expression de ces molécules dans des échantillons tumoraux est comparée à celle des échantillons de cerveau normal: —, non exprimé; ↔, non altéré; ↑, surexprimé; ↓, réprimé. Adapté d'après Gritsenko *et al.*, 2012. ICAM-1, *intercellular adhesion molecule-1*; L1-CAM, *L1-cell adhesion molecule*; LFA-1, *lymphocyte function-associated antigen-1*, NCAM, *neuronal cell adhesion molecule*.

#### 1.2.4. Séquences de l'invasion tumorale : la motilité et contractilité cellulaire

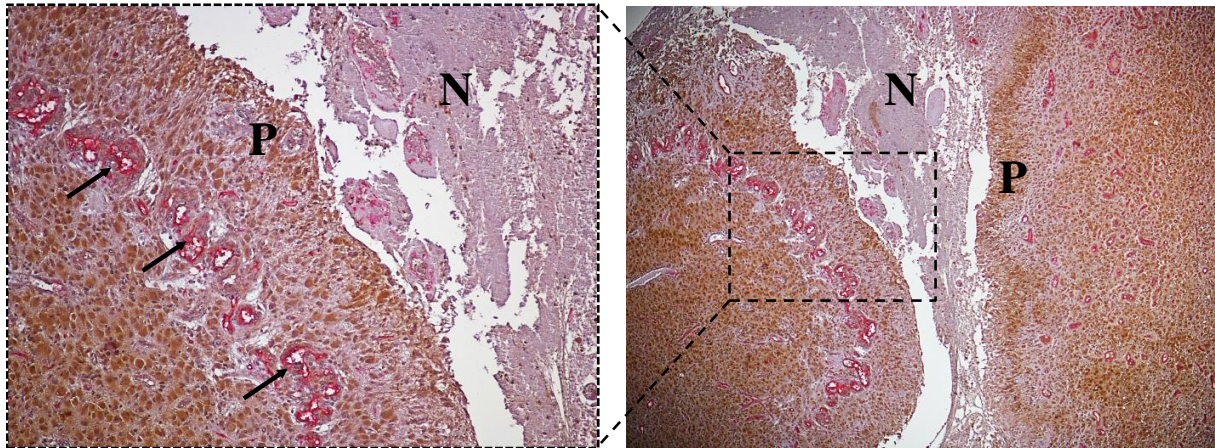
De la même manière que leurs homologues neurax non transformés, les cellules gliomales migrent grâce à une capacité d'émission d'un cône de croissance et de contraction cytoplasmiques, suivis par un mouvement vers l'avant du corps cellulaire. Comme observé en

conditions physiologiques, la mobilité cellulaire dépend des isoformes A et B de la myosine II, sources principales de force contractile. Ainsi, la myosine II permet aux cellules tumorales gliales de franchir des espaces dont le diamètre est inférieur à leur propre noyau cellulaire, caractéristique importante lorsque l'on sait que les espaces intercellulaires dans le cerveau sont particulièrement serrés (Beadle *et al.*, 2008). L'activation de la myosine II se fait *via* la phosphorylation d'un site régulateur (une sérine située sur sa chaîne légère) par la *myosin light chain kinase* (MLCK) ; son inactivation par déphosphorylation est confiée à la *myosin light chain phosphatase* (MLCP). L'activité de la myosine II se fait ainsi au gré de la balance des activités des MLCK et MLCP. Enfin, il a également été décrit que des GTPases, telles que RhoA, Rac et cdc42, interagissent avec les chaînes légères de la myosine et sont particulièrement impliquées dans les processus d'invasion de cellules gliales tumorales (Bornhauser et Lindholm, 2005 ; Salhia *et al.*, 2005).

### **1.3. Hypoxie et nécrose intratumorales**

Intimement liée aux phénomènes de néoangiogenèse intratumorale et d'infiltration du parenchyme cérébral, l'hypoxie cytotoxique joue un rôle crucial dans l'évolution maligne des gliomes. Le siège du stress oxydatif se présente sous la forme de plages de nécrose bien délimitées par des zones hypercellulaires, également appelées pseudopalissades (Fig. 7). En raison de leur localisation au cœur du néoplasme, et/ou d'un relatif éloignement des vaisseaux sanguins cérébraux, les cellules pseudopalissadiques sont particulièrement exposées à des épisodes hypoxiques. La détection de ce stress se fait de manière particulièrement sensible par les cellules tumorales qui consomment une grande partie de leur énergie dans des cycles de mitoses qui s'opèrent à un rythme accéléré. Plus précisément, la machinerie cellulaire dispose de *sensors* de l'hypoxie, de la famille des HIF dont l'activation et la surexpression conduisent à la libération de molécules pro-angiogéniques, chimioattractantes et/ou pro-inflammatoires.

Il s'agit notamment du VEGF, du *stromal-derived growth factor 1* (SDF-1) ou de l'interleukine 8 (IL-8) (Rong *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2012).



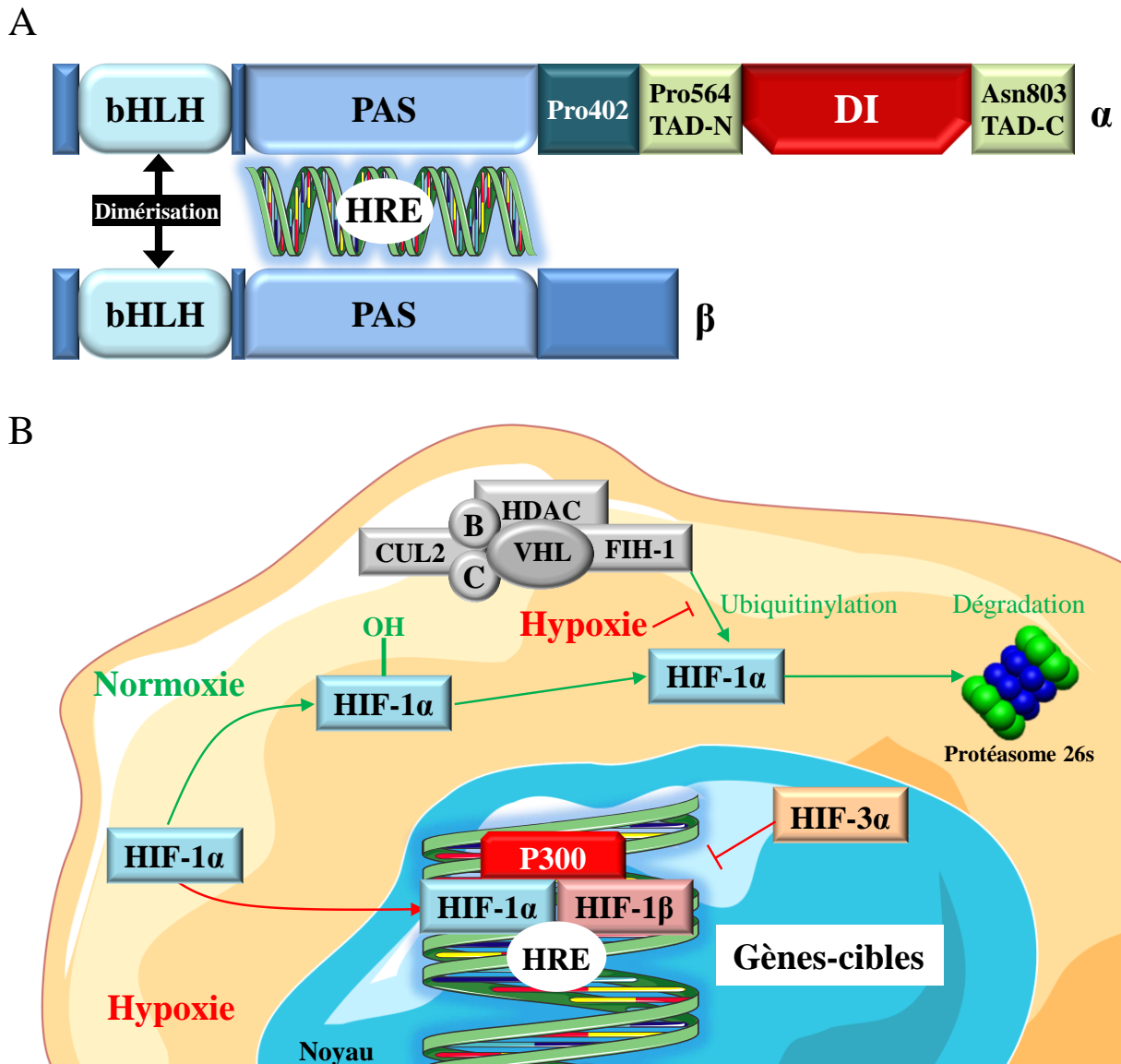
**Figure 7 : Microphotographies illustrant les pseudopalissades hypoxiques dans un GBM de patient.** Les zones de nécrose (N) se caractérisent par une prise de coloration moindre. Les zones pseudopalissadiques (P) périnécrotiques se situent à l'interface entre la nécrose et le tissu tumoral en prolifération. La néoangiogenèse, stimulée par le microenvironnement hypoxique, est révélée par une coloration rose des vaisseaux sanguins (CD31, flèches noires).

### 1.3.1. Description du système HIF

D'un point de vue structurel, les HIF sont constitués d'une sous-unité sensible à l'oxygène (HIF- $\alpha$ ) et d'une sous-unité dite constitutive (HIF- $\beta$ ) qui s'associent pour former un hétérodimère fonctionnel. Ces sous-unités partagent des caractéristiques structurales, *i.e.* un enchaînement hélice-coude-hélice basique (bHLH) et un domaine de translocation et de liaison au noyau PAS, acronyme des trois protéines PER-ARNT-SIM (*period-aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-single minded homolog 2*) qui constituent ce motif (Bracken *et al.*, 2003, pour revue). La dimérisation est relayée par l'interaction bHLH-PAS, les régions basiques des deux sous-unités assurant la reconnaissance de la portion d'ADN des gènes incluant des séquences de type *hypoxia response element* (HRE) (Fig. 8A). Il existe trois formes de sous-unités de type HIF- $\alpha$  (1 $\alpha$  à 3 $\alpha$ ) sensibles à l'oxygène (Kaur *et al.*, 2005), avec pour chacune d'entre elles d'une expression soumise à des conditions particulières. HIF-1 $\alpha$  est ubiquiste, rapidement exprimée et active dans l'ensemble des types cellulaires natifs ou tumoraux lorsque la concentration en oxygène diminue. Il s'agit de la « réponse initiale » des

cellules soumises à un stress hypoxique d'une durée inférieure à 24 heures. L'expression de l'isoforme HIF-2 $\alpha$  est quant à elle sous tendue par des périodes hypoxiques supérieures à 24 heures ; HIF-2 $\alpha$  est ainsi associée à la « réponse chronique » (Koh et Powis, 2012). Dépourvue de domaine d'activation transcriptionnelle, HIF-3 $\alpha$  jouerait un rôle de dominant négatif permettant la séquestration de la sous-unité constitutive HIF- $\beta$  (Fig. 8B) (Kaur *et al.*, 2005). Cette dernière est exprimée dans tous les types cellulaires, sans dépendance vis-à-vis de la concentration en oxygène. Il est intéressant de noter que l'ensemble des gènes codants les isoformes de HIF possèdent des séquences HRE de liaison à HIF- $\alpha$ , illustrant un mécanisme d'autocrinie pour une réponse rapide au stress hypoxique (Semenza, 2003).

La régulation des HIF est un mécanisme continuellement actif. En normoxie (20% d'O<sub>2</sub>), HIF-1 $\alpha$  subit une hydroxylation de ses résidus proline 402 et 564 (Fig. 8A), ce qui permet sa reconnaissance et son ubiquitinylation par le macrocomplexe associant le facteur de von-Hippel-Lindau (VHL) et l'histone désacétylase (HDAC), nécessaires à son adressage vers le protéasome 26S (Fig. 8B). Cette dégradation continue permet de maintenir de basses concentrations cytosoliques de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules normales (Yang *et al.*, 2012). En conditions hypoxiques, l'activité des prolyl-hydroxylases est fortement diminuée, altérant ainsi la capacité du facteur VHL à reconnaître HIF-1 $\alpha$ , qui s'accumule alors rapidement dans le cytoplasme (Fig. 8B). Une régulation supplémentaire s'opère *via* l'hydroxylation oxygène-dépendante d'un résidu Asn803 de HIF-1 $\alpha$ , capable d'inhiber sa reconnaissance par le co-activateur P300 (Semenza *et al.*, 2003).



**Figure 8 : Représentation schématique de la structure moléculaire de base des isoformes HIF- $\alpha$  et de la voie de signalisation régulant l'activité de HIF-1 $\alpha$  (d'après Yang *et al.*, 2012). **A**, la portion hélice-coude-hélice basique (bHLH) régule la dimérisation de HIF- $\alpha$  avec la sous-unité HIF-1 $\beta$ . Le domaine PAS assure la liaison à la portion d'ADN du gène cible contenant une séquence de type HRE. L'activité transcriptionnelle est sous le contrôle de domaines de transactivation amino- (TAD-N) et carboxy-terminaux (TAD-C) et d'un domaine inhibiteur (DI). La séquence délimitée par des résidus proline en position 402 (Pro402) et 564 (Pro 564) renferme le domaine régissant la dégradation de HIF-1 $\alpha$  par le facteur von-Hippel-Lindau (VHL). **B**, en condition normoxique (vert), HIF-1 $\alpha$  est rapidement hydroxylé (en Pro402 et Pro 564) ce qui permet la prise en charge par le macrocomplexe d'ubiquitinylation, lui-même constitué d'une histone désacétylase (HDAC), du corépresseur FIH-1, des élongines B et C, de la culline-2 et du facteur VHL. Rendue ainsi possible, l'interaction physique avec HIF-1 $\alpha$  permet l'adressage au protéasome 26S et une dégradation de la protéine. En conditions hypoxiques (rouge), la liaison du facteur VHL à HIF-1 $\alpha$  est inhibée, amenant à une accumulation d'HIF-1 $\alpha$  dans le cytosol. Après translocation dans l'espace nucléaire, HIF-1 $\alpha$  se dimérise à HIF-1 $\beta$  et forme le complexe de reconnaissance des séquences HRE localisées sur l'ADN, ce qui permet la fixation du co-activateur transcriptionnel P300 sur les gènes-cibles. B, élongine B ; bHLH, *basic helix-loop-helix* ; C, élongine C ; CUL2, culline-2 ; DI, domaine inhibiteur ; FIH-1, *factor inhibiting HIF-1 $\alpha$*  ; HDAC, histone désacétylase ; HIF-1 $\alpha/\beta$ , *hypoxia-inducible factor-1 $\alpha/\beta$*  ; HRE, *hypoxia response element* ; PAS, PER-ARNT-SIM ; TAD-N/C, *transactivation domain-N/C* ; VHL, von-Hippel-Lindau.**



### 1.3.2. Séquence de l'apparition de la nécrose dans les tumeurs cérébrales gliales

Dans les gliomes, les plages de nécrose bordées de cellules pseudopalisadiques ne sont observées qu'à partir des grades III, et représentent ainsi d'excellents indicateurs de malignité (cf. § 2.1.). L'apparition de ces aires nécrotiques dans les glioblastomes est en accord avec l'hypothèse formulée par Zetter en 1998 concernant la phase de croissance tumorale biphasique, *i.e.* avasculaire puis vasculaire. L'utilisation récente de modèles précliniques de xénogreffes a permis de poser les bases d'une chronologie de la mort cellulaire intratumorale qui n'est observée que tardivement chez le patient, lors du dépistage par IRM. Au cours de la première phase de croissance, dite avasculaire ou non angiogénique, l'apport en oxygène et nutriments est assuré par les vaisseaux préexistants, jusqu'à la formation d'une masse tumorale de 1 à 2 mm<sup>3</sup> (Jensen, 2009 ; Yang *et al.*, 2012). La tumorigenèse rapide couplée à l'absence de régulation du cycle cellulaire autorise le néoplasme à croître au-delà de cette taille limite, amorçant alors l'installation et l'aggravation progressive de l'hypoxie subie par les cellules distantes des vaisseaux sanguins. Il est estimé qu'à une distance de 100 à 200 µm d'un vaisseau sanguin, le stress oxygénique est suffisant pour activer la signalisation HIF décrite en amont (cf. § 1.3.1.) (Helmlinger *et al.*, 1997 ; Zagzag *et al.*, 2000 ; Bai *et al.*, 2011). Si cette hypoxie se poursuit, les cellules enclenchent la cascade apoptotique. Les plus touchées par le déficit métabolique meurent par nécrose de type ischémique, une mort non programmée rapide provoquée notamment par une coagulation croissante de l'albumine cytosolique (Oliver *et al.*, 2009). Pour autant, la taille de la tumeur n'est pas systématiquement un indicateur fiable de l'état hypoxique ou prédictif de la présence de zones nécrotiques. Il a en effet été montré que des tumeurs allant jusqu'à 4 mm de diamètre, caractérisées par une angiogenèse réduite mais fonctionnelle, sont faiblement hypoxiques (Li *et al.*, 2007b), suggérant que la nécrose n'est pas simplement due à un apport vasculaire inadéquat mais qu'elle serait la résultante d'un état moléculaire et génétique de la tumeur (Raza *et al.*, 2002 ; 2004) propice à apparition.

### 1.3.3. Conséquences de l'hypoxie dans la tumorigenèse gliale

L'analyse par *microarray* des ADNc extraits de tissus pseudopalissadiques d'astrocytomes malins humains, a révélé une surexpression notable d'un grand nombre de gènes, impliqués dans l'invasion cellulaire, la néoangiogenèse ou l'inflammation (Raza *et al.*, 2004 ; Zagzag *et al.*, 2006). Les cellules qui composent cette palissade se caractérisent par un index de prolifération en deçà (10 à 38%) des niveaux retrouvés dans le tissu tumoral non hypoxique (20 à 41%), des taux d'apoptose décuplés et une forte surexpression de HIF-1 $\alpha$  (+30%) (Brat *et al.*, 2004). De manière particulièrement intéressante, ces cellules présentent une activité MMP-2 et -9 élevée et font preuve *in vitro* d'une forte motilité (Brat *et al.*, 2004). L'observation attentive de coupes histologiques de patients a permis de mettre en évidence dans les zones de nécrose massive (> 500  $\mu$ m) qui s'organisent autour d'un vaisseau malformé, d'une « fuite » des cellules tumorales observables sous la forme de travées de cellules migrant en direction de capillaires fonctionnels situés à distance de la nécrose (Brat *et al.*, 2004). En accord avec cette étude, les travaux de Zagzag et coll. (2006), rapportent une colocalisation quasi systématique de cellules surexprimant la chimiokine SDF-1, avec HIF-1 $\alpha$  dans les zones pseudopalissadiques.

Le couple hypoxie/néoangiogenèse est indissociable avec toutefois un paradoxe, propre au gliome, concernant le *primo* facteur qui enclencherait l'activation de l'autre. Il est en effet admis en physiologie et en cancérologie que l'hypoxie est responsable d'une libération massive de facteurs pro-angiogéniques (Rong *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2013), qui permettent la formation de nouveaux vaisseaux capables d'apporter un soutien métabolique en adéquation avec la prolifération tumorale. Toutefois, les travaux de Brat et coll. (2004) ont mis en lumière le fait que la majeure partie des vaisseaux tumoraux sont anormaux, faiblement fonctionnels et peuvent donc être la source même de l'hypoxie. Le microenvironnement tumoral, saturé de molécules pro-angiogéniques libérées par les cellules tumorales, perturbe dramatiquement le

*switch* angiogénique en faveur de la surabondance d'une angiotection fragile au demeurant (Vartanian *et al.*, 2014).

Finalement, au sein d'un même néoplasme, il est admis que ce microenvironnement varie drastiquement, créant donc différents types de nécrose de taille et d'origine différentes, rendant encore plus complexe la description des mécanismes responsables de son apparition (Vartanian *et al.*, 2014) et la description des cellules qui la composent, *i.e.* cellules tumorales hypoxiques, pseudopalissadiques voire cellules souches tumorales (Yang *et al.*, 2012). Les communautés scientifique et médicale s'accorde néanmoins sur le fait que la présence d'aires nécrotiques constitue un pronostic sombre pour le patient (Mabjeesh et Amir, 2007 ; Oliver *et al.*, 2009) et représente un obstacle considérable dans la gestion de leur traitement. En effet, ces territoires renferment des sous-populations de cellules tumorales fortement radio- et chimiorésistantes qui mettent en échec les thérapies conventionnelles et/ou ciblées utilisées dans le traitement des glioblastomes (López-Lázaro, 2006).

## **2. Données cliniques sur les tumeurs cérébrales d'origine gliale**

La prise en charge des patients porteurs d'une tumeur cérébrale requiert une étroite coopération de plusieurs services hospitaliers. En premier lieu, les neuroradiologues interviennent pour localiser de façon précise le foyer néoplasique, dont les coordonnées sont indispensables au travail des neurochirurgiens, qui confieront après exérèse un prélèvement tissulaire au service d'anatomo-pathologie. Le type histologique et le grade de malignité des gliomes sont alors déterminés, en se référant à une série de critères histologiques et génomiques prédictifs de l'évolution tumorale (cf. § 2.1.). Les résultats de ces études guident les neurochirurgiens et oncologues dans la prise en charge thérapeutique, le plus souvent organisée sous la forme d'une combinaison de radiothérapie et de chimiothérapies ciblées (Philippon, 2004).

## 2.1. Classification anatomo-cytopathologique des tumeurs cérébrales gliales

Proposée par l'Organisation Mondiale pour la Santé (OMS), la classification des tumeurs cérébrales repose sur un ensemble de critères anatomo-cytopathologiques tels que le nombre d'anaplasies et d'atypies cytonucléaires, la proportion de cellules mitotiques, la prolifération endothélio-capillaire et les indices de nécrose tissulaire (Louis *et al.*, 2007). L'identification histologique peut être affinée par l'utilisation d'approches moléculaires et génomiques qui définissent des sous-types au sein de chaque classe histologique, parfois corrélés avec un meilleur pronostic et/ou une plus grande sensibilité aux molécules administrées en chimiothérapie (Louis *et al.*, 2001 et 2007, voir § 2.3.). Sur cette base, quatre grades (I à IV) de malignité croissante ont été identifiés. Le grade I, bénin, correspond aux lésions néoplasiques composées de cellules astrogliales (astrocytes, épendymocytes et tancytes) anormales mais enkystées à l'image des astrocytomes pilocytiques. Plus agressifs, les grades II à IV regroupent des astrocytomes malins, des oligodendrogliomes et des oligoastrocytomes mixtes, formant des lésions diffuses dans le parenchyme nerveux (Tab. 2).

**Tableau 2 : Classification des lésions néoplasiques d'origine histologique gliale par l'OMS.**

Tumeurs astrocytaires	Grade
Astrocytome pilocytique Astrocytome subépendymaire	I
Xanthoastrocytome pléomorphe Astrocytome pilomyxoïde Astrocytome fibrillaire	II
Astrocytome anaplasique	III
Glioblastome	IV
Tumeurs d'origine oligodendrogliale	
Oligodendrogliome	II
Oligodendrogliome anaplasique	III
Tumeurs gliales mixtes oligo-astrocytaires	
Oligoastrocytome	II
Oligoastrocytome anaplasique	III
Tumeurs d'origine épendymaire	
Subépendymome Ependymome myxopapillaire	I
Ependymome	II
Ependymome anaplasique	III

Autres types de tumeurs gliales	
Gangliogliome	I
Gliosarcome	IV

Les tumeurs gliales sont répertoriées par grades (I à IV) de malignité croissante (d'après Louis *et al.*, 2007).

### 2.1.1. Les astrocytomes

Ainsi nommés en raison de leur origine astrocytaire, les astrocytomes correspondent à une large variété de néoplasmes qui diffèrent selon leur localisation au sein du SNC, leurs caractéristiques histologiques et leur pronostic. Le grade I regroupe les lésions tumorales bénignes, *e.g.* astrocytomes pilocytiques et subépendymaires à cellules géantes (Louis *et al.*, 2007). Majoritairement observés chez l'enfant, ces tumeurs relativement bien circonscrites sont constituées de cellules astrocytaires tumorales effilées possédant des inclusions intracellulaires particulières, appelées « fibres de Rosenthal », typiques d'une astroglie réactionnelle prolongée (Fig. 9). De croissance lente, ces tumeurs bien délimitées font l'objet d'une exérèse chirurgicale complète, ce qui leur confère un pronostic très favorable. Le grade II regroupe les néoplasmes faiblement malins, appelés selon les cas xanthoastrocytomes pléomorphiques, astrocytomes pilomyxoïdes ou astrocytomes fibrillaires. Ils présentent tous un fort degré de différenciation et une densité cellulaire modérée, mais évoluent fréquemment vers des grades supérieurs (Gilbert et Lang, 2007).

Classés en grade III, les astrocytomes anaplasiques sont des tumeurs diffuses constituées de cellules tumorales infiltrantes dans le parenchyme cérébral, ce qui exclut une résection chirurgicale optimale. Du point de vue anatomopathologique, ils se distinguent des grades inférieurs par une augmentation du nombre d'atypies cytonucléaires et l'apparition croissante de nouveaux vaisseaux sanguins, avec une morphologie caractéristique en « patte de poulet » (Fig. 9). Ces tumeurs à tendance évolutive peuvent atteindre en quelques années le grade maximal (grade IV), particulièrement agressif et incurable (Ohgaki et Kleihues, 2005a et 2005b ; Louis *et al.*, 2007).

Les gliomes de haut grade ou glioblastomes multiformes (GBM) doivent leur nom à la forte hétérogénéité du tissu tumoral (Vartanian *et al.*, 2014), se traduisant par une profonde infiltration du parenchyme cérébral par des populations de cellules tumorales à hypertrophie variable, une prolifération endothélio-capillaire massive à proximité de zones nécroshypoxiques, bordées de cellules tumorales palissadiques (Fig. 9). Sur le plan épidémiologique, les GBM constituent les tumeurs les plus fréquentes et les plus malignes de l'ensemble des cancers touchant le tissu nerveux. Particulièrement agressifs, ils sont associés à un très mauvais pronostic, avec 80% de mortalité douze mois après leur diagnostic (Stupp *et al.*, 2005 ; Dolecek *et al.*, 2012). Parmi ces gliomes, les GBM primitifs ou *de novo* (Fig. 9) qui apparaissent en l'absence de tumeur préexistante, se distinguent des GBM secondaires qui proviennent de l'évolution d'une tumeur astrogliale de grade inférieur et préalablement identifiée (Louis *et al.*, 2007). On différencie également ces deux catégories de GBM par des caractéristiques génétiques, une amplification des gènes codant l'EGFR et de la *mouse double minute 2 homolog* (MDM2), des mutations du gène codant pour la *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) et des délétions du gène p16 constatés dans les GBM primitifs. Les GBM secondaires sont quant à eux typiquement porteurs de mutations du gène p53 (Kleihues et Ohgaki, 1999 ; Riemenschneider *et al.*, 2010). Ces caractéristiques génétiques sont vraisemblablement responsables des évolutions cliniques divergentes entre ces deux types de néoplasmes. Enfin, alors que les GBM *de novo* surviennent généralement chez des populations âgées (62 ans en moyenne) avec un pronostic particulièrement sombre (médiane de survie de 4,7 mois), les GBM secondaires sont observés chez des patients relativement plus jeunes (45 ans en moyenne) pour lesquels le pronostic est sensiblement meilleur (médiane de survie de 7,8 mois) (Louis *et al.*, 2007).

### **2.1.2. Les tumeurs d'origine oligodendrogliale**

Les tumeurs oligodendrogliales surviennent fréquemment au niveau des lobes frontaux et temporaux. L'OMS distingue deux grades (Tab. 2), *i.e.* oligodendrogliomes de grade II et oligodendrogliomes anaplasiques de grade III (Louis *et al.*, 2007), avec dans les deux cas, des cellules tumorales qui présentent les caractéristiques des cellules oligodendrogliales gémistocytiques, à savoir un noyau rond et uniforme entouré d'un halo périnucléaire, rappelant la forme des « œufs au plat » (Fig. 9). Les oligodendrogliomes se caractérisent aussi par l'apparition de micro-calcifications au sein de la tumeur et d'un réseau vasculaire dense mais non tumoral, et composé (comme dans le cas des astrocytomes anaplasiques) de microcapillaires fins en « pattes de poulet ». Concernant les oligodendrogliomes anaplasiques malins, dont le pronostic varie fortement en fonction de leur profil génétique, des zones de nécrose peuvent parfois être observées (Louis *et al.*, 2007).

La délétion des bras chromosomiques court 1p et long 19q (Fig. 9) constitue un critère favorable pour les patients (Riemenschneider *et al.*, 2010) puisqu'il offre une meilleure réponse à la chimiothérapie et une survie prolongée avec un risque de récurrence 5,7 fois plus faible comparé à celui de patients porteurs de gliomes aux allèles intacts (Cairncross *et al.*, 1998). De ce fait, la découverte d'une lésion néoplasique gliale implique systématiquement la recherche de ces mutations retrouvées dans 5% des GBM (Decaestecker *et al.*, 1998 ; He *et al.*, 2001).

### **2.1.3. Les tumeurs mixtes oligo-astrocytaires**

Comme leur nom l'indique, les tumeurs gliales oligo-astrocytaires associent des cellules astrogliales et oligodendrogliales. On distingue le type biphasique faiblement malin de grade II, dans lequel les composantes astrocytaires et oligodendrogliales sont relativement bien cloisonnées (Fig. 9), et le type diffus plus agressif, de grade III, où les deux composantes sont

mélangées (Louis *et al.*, 2007). Dans ce dernier cas, l'observation histologique révèle une augmentation de l'index de prolifération cellulaire (cellules Ki67 positives), une néoangiogenèse plus intense, et la présence de petites aires de nécrose et de calcifications, similaires à celles observées dans les oligodendrogliomes.

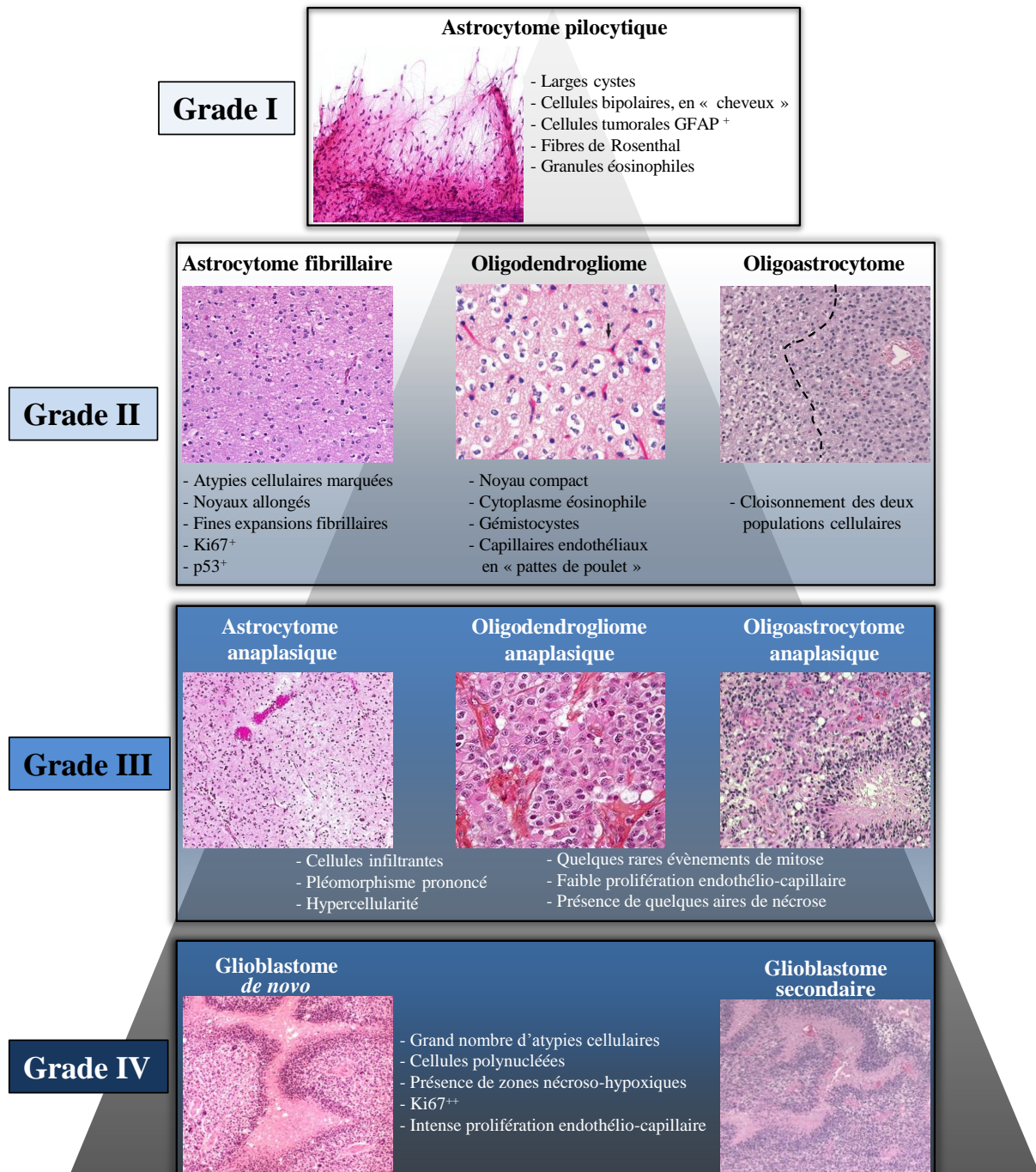


Figure 9 : Caractéristiques anatomo-cytopathologiques des quatre grades de tumeurs gliales selon la classification de l'OMS. Dans les tumeurs de grade IV, on distingue les glioblastomes secondaires, issus de la transformation maligne progressive d'une lésion gliale antérieure ou d'une récurrence post-opératoire, du glioblastome *de novo*. Le triangle en arrière-plan symbolise l'augmentation progressive de l'agressivité. GFAP<sup>+</sup>,



cellules exprimant la *glial fibrillary acidic protein* ; Ki67<sup>+/++</sup>, cellules exprimant le marqueur de prolifération Ki67 ; p53<sup>+</sup>, cellules porteuses d'une mutation de la protéine p53.

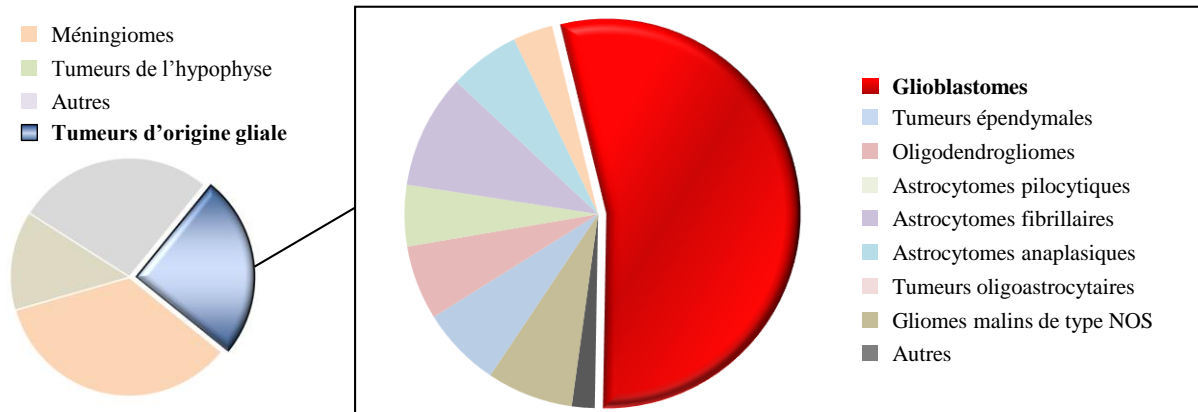
#### **2.1.4. Autres types de tumeurs cérébrales gliales**

En marge des tumeurs listées ci-dessus, d'autres formes plus rares de gliomes ont été répertoriées. Ils apparaissent essentiellement pendant l'enfance, comme c'est le cas des épendymomes, dérivés des cellules épendymaires qui bordent les cavités ventriculaires cérébrales (6,7% des néoplasmes cérébraux), et particulièrement fréquentes au niveau du IV<sup>e</sup> ventricule (70% des cas). Ces gliomes présentent des risques d'évolution maligne anaplasique (Rousseau *et al.*, 1994), avec une survie à 5 ans n'excédant pas 30%, contre 83% pour les épendymomes faiblement malins. Par ailleurs, le gangliogliome est une tumeur nerveuse rare (1% des cas), plus fréquente chez les jeunes adultes et survenant préférentiellement au niveau du lobe temporal, habituellement bien différenciée, caractérisée par une croissance lente et la présence de cellules neuroganglionnaires matures mêlées à une composante gliale de grade I ou II, et beaucoup plus rarement anaplasique (grade III).

#### **2.2. Epidémiologie et facteurs de risques**

Associée à une incidence en constante augmentation dans les pays industrialisés, la connaissance encore limitée des facteurs de risque et l'absence de traitement efficace pour la plupart d'entre eux, font des cancers du SNC un problème majeur de santé publique. Les études épidémiologiques les plus complètes ont été réalisées par deux organismes, le *Central Brain Tumor Registry of the United States* (CBTRUS) et le *Brain Tumor Epidemiology Consortium* (BTEC). Le premier émane d'une collaboration entre des hôpitaux de 49 états américains pour regrouper l'ensemble des données épidémiologiques concernant l'ensemble des tumeurs cérébrales (bénignes et malignes). Le second s'appuie sur des données mondiales, essentiellement collectées dans les pays industrialisés membres de ce consortium (États-Unis,

France, Allemagne, Autriche ou Israël). Les données statistiques de ces deux organismes révèlent qu'un quart des cancers du SNC ont une origine histologique gliale (Fig. 10), avec une augmentation plus marquée de l'incidence des GBM depuis 1980, ce qui suggère une sensibilité particulière du tissu glial dans la survenue de tumeurs.



**Figure 10 : Distribution des tumeurs cérébrales primaires selon leur type histologique, rapportée par le CBTRUS (d'après Dolecek *et al.*, 2012).** Nettement majoritaires, les glioblastomes (grade IV) représentent 54% des tumeurs d'origine gliale répertoriées. Dans la catégorie « autres », on distingue notamment les pathologies cancéreuses de la myéline (8,5%), les tumeurs neuroépithéliales (5%) et les lymphomes (2,3%). NOS : *not otherwise specified*.

### 2.2.1. Données épidémiologiques

L'incidence annuelle de l'ensemble des tumeurs (malignes et bénignes) affectant le SNC est de 16,5 cas pour 100 000 individus. À l'échelle mondiale, si l'on ouvre ce calcul aux pays industrialisés, plus de 70% des tumeurs malignes ont une origine gliale et touchent 5,8 personnes sur 100 000 individus, ce chiffre étant sensiblement plus faible dans les pays en voie de développement (3/100 000). D'une manière générale, les tumeurs cérébrales d'origine gliale représentent 2% des pathologies cancéreuses de l'adulte et 20% des cancers de l'enfance (Baldwin et Preston-Martin, 2004). Observée depuis les dernières décennies, cette augmentation de l'incidence serait principalement imputable à l'amélioration des techniques d'imagerie utilisées en diagnostic clinique (Radhakrishnan *et al.*, 1995), au vieillissement de la population (Fisher *et al.*, 2007), mais aussi à certains facteurs de risques/sensibilité, tels que les prédispositions, le sexe, ou l'exposition à des environnements toxiques (cf. § 2.2.2.).

### 2.2.2. Facteurs de risques

Les facteurs susceptibles d'être corrélés avec l'apparition de tumeurs cérébrales sont d'origine endogène ou exogène. Parmi les premiers, l'âge et le sexe sont fortement aggravants dans le cas des gliomes de haut grade. Dès 64 ans, on note une incidence maximale de 10 cas pour 100 000 individus (Fisher *et al.*, 2007). De plus, les GBM sont plus fréquents (+ 40%) chez les hommes que chez les femmes (Fisher *et al.*, 2007). Des études complémentaires mettent en relief le possible effet « anti-oncogène » des œstrogènes (Plunkett *et al.*, 1999 ; McKinley *et al.*, 2000).

Les facteurs exogènes regroupent principalement les sources de radiations et d'ondes électromagnétiques, et des molécules potentiellement tératogènes comme les pesticides. Plusieurs études indépendantes ont permis de corréler l'apparition de GBM à une irradiation thérapeutique préalable prescrite dans le cadre du traitement d'un cancer (Madden *et al.*, 2010 ; Joh *et al.*, 2011, Ahn et Kim, 2012). D'autres données ont été collectées à partir d'une cohorte d'une dizaine de milliers de patients souffrant de la teigne des cheveux (*tinea capitis*) et dont le traitement consistait en une irradiation de 1 à 6 grays de manière localisée sur le crâne (Werner *et al.*, 1968 ; Ron *et al.*, 1988). Dans ce cas, le risque de développer un gliome malin était multiplié par 8,4 chez l'adulte. L'impact d'une faible dose de radiations sur la survenue de méningiomes a également été le sujet d'une étude réalisée sur les survivants des bombardements d'août 1945 de Nagasaki et Hiroshima. Elle a révélé une incidence multipliée par cinq et corrélée à la distance de l'épicentre de l'explosion (Sadamori *et al.*, 1996 ; Shintani *et al.*, 1999). D'autres travaux rapportent l'apparition de gliomes chez *i*) des patients ayant subi au préalable un traumatisme crânien, très probablement des suites d'une astrogliose réactionnelle pathologique concomitante à la cicatrisation du tissu nerveux lésé (Magnavita *et al.*, 2003 ; Salvati *et al.*, 2004 ; Anselmi *et al.*, 2006) et *ii*) des individus fortement exposés aux pesticides (Ruder *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2005 ; Provost *et al.*, 2007). Plus récemment,

des inquiétudes ont été soulevées concernant l'impact de la multiplication des sources d'ondes électromagnétiques dans notre environnement (Baldi *et al.*, 2011), notamment *via* les réseaux sans fil de type *wireless fidelity* (Wi-Fi) (Carpenter et Sage, 2008) ou l'usage intensif du téléphone mobile (Hardell *et al.*, 2007 ; Ahlbom *et al.*, 2009 ; Little *et al.*, 2012 ; Lagorio et Rösli, 2014). Ces études font écho à des expériences conduites sur des rongeurs soumis à des expositions électromagnétiques fortes et prolongées (Repacholi, 2001). Pour autant, qu'il s'agisse des pesticides, des traumatismes crâniens, du Wi-Fi et de la téléphonie sans fil, aucun lien formel n'a encore pu être établi à ce jour.

Parmi les prédispositions transmissibles, les polymorphismes touchant les gènes codant les protéines du contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose (Rajaraman *et al.*, 2007, Bethke *et al.*, 2008) mais également la présence de variants des gènes codant la O6-méthylguanine-DNA-méthyltransférase (MGMT), chargée de la réparation de l'ADN lésé par des alkyles (Wiencke *et al.*, 2005), sont fortement corrélés à l'apparition de gliomes. De même, les patients souffrant de syndromes familiaux tels que l'ataxie télangiectasique (syndrome de Louis-Bar) sont porteurs de la mutation de l'oncosuppresseur *Ataxia-telangiectasia-mutated* (ATM) impliqué dans la réparation des cassures de l'ADN double-brin et probablement responsable d'une forte prédisposition de ces individus à développer des méningiomes. Causé par la mutation du gène de la *tumor protein 53* (*TP53*), surnommée « gardienne du génome » en raison de sa fonction prépondérante de suppresseur de tumeur, le syndrome de Li-Fraumeni provoque quant à lui l'apparition de nombreuses tumeurs dans l'ensemble des tissus mous, dont le SNC (Aury-Landas *et al.*, 2013). Dans le même registre, les patients souffrant d'un cancer colorectal familial non polyposique sont, suite à une mutation du gène oncosuppresseur *Adenomatous polyposis coli* (APC), particulièrement sujets au développement de GBM (Qualman *et al.*, 2003). Enfin, des cas de gliomes se déclarent chez certains patients porteurs d'une mutation sur le gène *RB* du Rétinoblastome (Gu *et al.*, 2013),

ainsi que chez des femmes atteintes d'un cancer du sein ou des ovaires, associés à un polymorphisme de la *breast cancer A1-interacting protein 1* (BRIP<sub>1</sub>) (Ciriello *et al.*, 2012).

### 2.3. Génétique des gliomes

L'ensemble des données collectées sur le sujet au cours de la dernière décennie a clairement établi qu'une accumulation de mutations génétiques et d'altérations de voies intracellulaires de signalisation participent à l'induction et/ou la transformation maligne des gliomes (Fig. 11). Une meilleure connaissance des causes et des mécanismes responsables de l'apparition et du développement de tumeurs gliales permet ainsi d'aborder l'aspect des thérapies de manière ciblée, voire individuelle. Plus récemment, des travaux d'analyse génomique portés par le *Cancer Genome Atlas Network* ont amené ce consortium à proposer une nouvelle classification des glioblastomes (Verhaak *et al.*, 2010) selon la présence d'aberrations ou l'expression de certains gènes. Quatre sous-types de tumeurs gliales sont ainsi répertoriées, *i.e.* proneural, neural, classique ou mésoenchymateux (cf. § 2.3.4). En pratique, plusieurs aberrations génétiques ou fonctionnelles sont couramment recherchées pour confirmer le grade histologique, et ainsi faciliter le choix des chimiothérapies.

#### 2.3.1. Mutations somatiques des astrocytomes bénins et faiblement malins

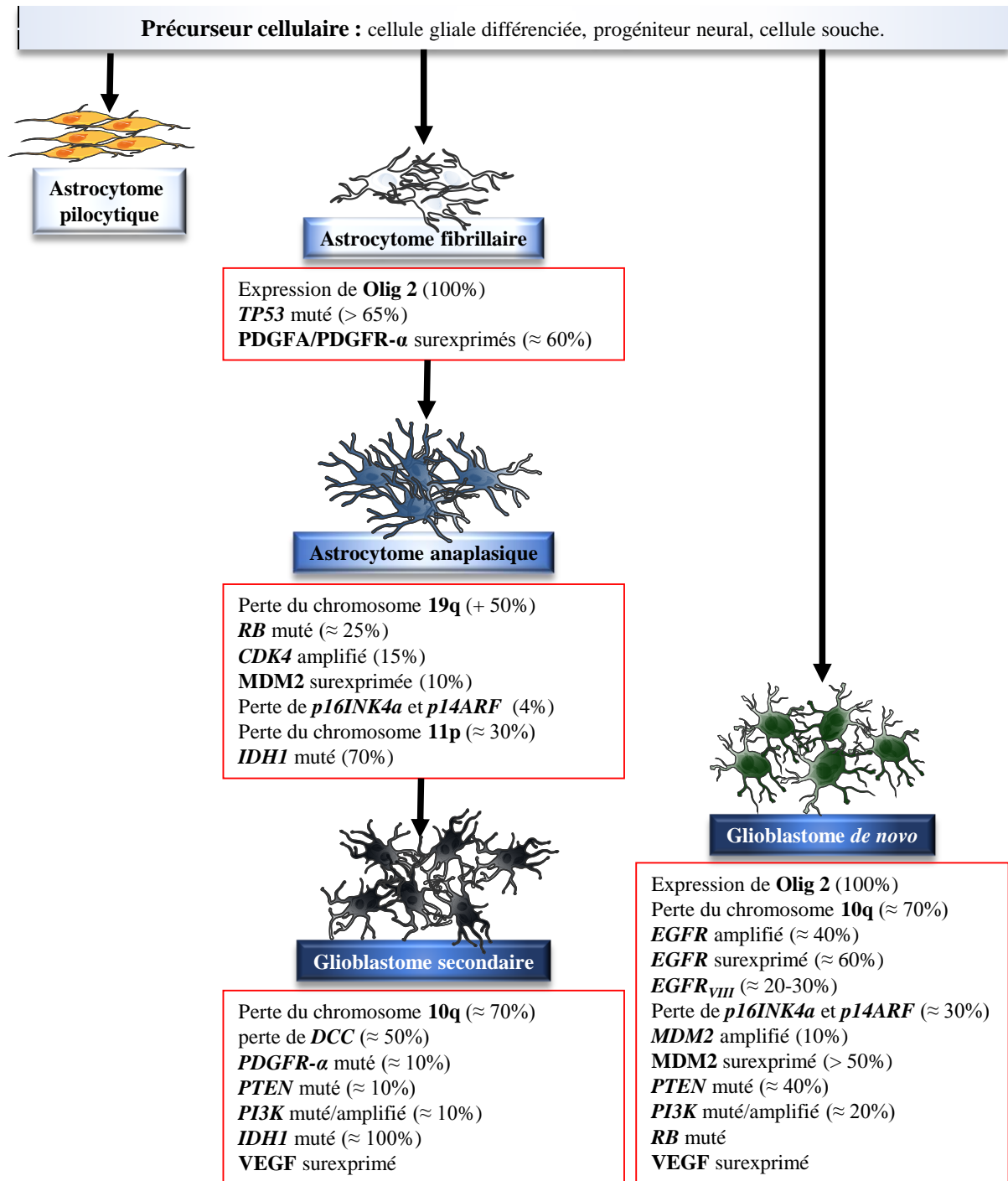
En raison de leur rareté relative, les mutations génétiques potentiellement responsables de l'apparition d'astrocytomes pilocytiques sont à ce jour peu caractérisées. Contrairement à leurs homologues malins, les gliomes de grade I ne présentent aucune mutation du gène *TP53* (Ishii *et al.*, 1998). Toutefois, une étude récente a montré que plus de 80% de ces tumeurs abritent des mutations dans l'ADN mitochondrial (Lueth *et al.*, 2009). Sur les 34 mutations répertoriées, la moitié porte sur les voies de phosphorylation oxydatives.

Étonnamment, la quasi-totalité des astrocytomes fibrillaires (Fig. 11) exprime le marqueur oligodendrocytaire Olig 2 (Takei *et al.*, 2008 ; Wen et Kesari, 2008), expression corrélée avec une prolongation significative de la survie sans progression tumorale des patients. Le facteur de transcription p53 est un élément central dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la néoangiogenèse (Bogler *et al.*, 1995). Présente dans 65% des tumeurs de grade II (Wen et Kesari, 2008) et dans la totalité des grades supérieurs, cette invalidation « précoce » est responsable d'un dérèglement global du fonctionnement cellulaire et d'une accumulation de mutations qui conduisent progressivement à la transformation maligne (Faria *et al.*, 2012).

Dans près de 60% des gliomes de grade II est aussi observée l'apparition d'une boucle d'amplification autocrine des isoformes du PDGFR- $\alpha$  (Wen et Kesari, 2008), un récepteur dont l'activation est liée aux processus de vasculogenèse embryonnaire (Lindahl *et al.*, 1998) et de la formation des plaquettes chez l'adulte. Au niveau histologique, la présence d'une forme mutée de PDGFR- $\alpha$  se limite à certaines populations cellulaires de la tumeur (Motomura *et al.*, 2013), notamment celles qui seraient directement impliquées dans la transformation maligne du gliome.

### **2.3.2. Mutations somatiques des astrocytomes anaplasiques**

La tumorigenèse gliale s'accompagne d'une augmentation de la fréquence des mutations observées dans les grades inférieurs, notamment celles du PDGFR- $\alpha$  (Wen et Kesari, 2008). La dérégulation du cycle cellulaire causée par le dysfonctionnement de p53 se retrouve amplifiée par la surexpression de la protéine MDM2 et l'inactivation du *p14 alternate reading factor* (p14ARF) (Fig. 11) (Furnari *et al.*, 2007). De même, les mutations de la protéine Rb1 et d'un inhibiteur des cyclines, la p16INK4a, abolissent dans ces astrocytes tumoraux le contrôle du cycle cellulaire lors du passage de la phase G1 à la phase S (Killela *et al.*, 2014).



**Figure 11 : Principales altérations génétiques et protéiques accompagnant la transformation maligne** (Figure adaptée d'après Wen et Kesari, 2008). La distinction entre GBM *de novo* et GBM secondaires peut reposer sur la présence d'un dysfonctionnement de l'EGFR et/ou la présence d'un mutant constitutivement actif (EGFR<sub>vIII</sub>), spécifique des entités nouvellement formées. Les gènes sont indiqués en italique. 10q, bras long du chromosome 10 ; 11p, bras court du chromosome 11 ; 19q, bras long du chromosome 19 ; CDK4, *cyclin-dependent kinase 4* ; DCC, *deleted in colorectal cancer* ; EGFR, *epidermal growth factor receptor* ; EGFR<sub>vIII</sub>, variant 3 de l'*epidermal growth factor receptor* ; IDH1, *isocitrate deshydrogénase 1* ; LOH, *loss of heterozygosity* ; MDM2, *mouse double minute 2* ; Olig 2, *oligodendrocyte transcription factor* ; p14ARF, *p14 alternate reading factor* ; p16INK4a, *CDK4 inhibitor* ; PDGFA, *platelet-derived growth factor A* ; PDGFR-α, *platelet-derived growth factor receptor-α* ; PTEN, *phosphatase and tensin homolog* ; PI<sub>3</sub>K, *phosphoinositide-3 kinase* ; RB, gène du rétinoblastome ; TP53, gène codant l'oncosuppresseur p53 ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*.

L'absence de contrôle du cycle cellulaire se traduit par l'apparition d'erreurs non corrigées dans le génome des cellules tumorales, jusqu'à une réorganisation chromosomique massive sous la forme de pertes d'hétérozygotie. Ainsi, la moitié des gliomes de grade III subit une perte du bras long du chromosome 19, considérée de bon augure pour la réponse thérapeutique aux nitrosurées. Une autre coupure dans le bras court du chromosome 11 est fréquente dans les astrocytomes anaplasiques, avec une valeur pronostique et thérapeutique négative (Fig. 11) (Wooten *et al.*, 1999 ; Alentorn *et al.*, 2013, 2014).

### **2.3.3. Mutations somatiques des GBM primaires et secondaires**

Parmi les caractéristiques des gliomes de grade IV, la néoangiogenèse incontrôlée peut trouver en partie son origine dans la présence de mutations suractivatrices de facteurs de croissance stimulant le recrutement et la prolifération de cellules endothéliales. En particulier, il est systématiquement observé une surexpression du VEGFR dont l'activation agit de manière synergique avec le PDGFR (Fig. 11). L'amplification de l'EGFR est également fréquente (40%) dans les GBM primaires (Ohgaki et Kleihues, 2009), mais absente dans les tumeurs secondaires (Hoang-Xuan *et al.*, 2005). A la suite de la délétion des exons 2-7, ce récepteur peut être exprimé sous une forme tronquée constitutivement active appelée EGFR<sub>vIII</sub> (Fig. 11) (Huang *et al.*, 1997). Enfin, sans pour autant être associée à un assombrissement du pronostic ou une mauvaise réponse aux thérapies, une perte du gène *deleted in colorectal cancer (DCC)* est observée dans la moitié des cas de GBM (Hara *et al.*, 2001 ; Hilton *et al.*, 2004 ; Jung *et al.*, 2012).

### **2.3.4. Apport de la génétique des GBM dans la classification de Verhaak**

Comme indiqué en introduction du § 2.3., l'analyse du transcriptome de GBM primaires a permis de définir quatre sous-classes de tumeurs dont le profil transcriptionnel est déterminé



par la présence d'altérations génétiques majeures, *i.e.* GBM classiques, mésoenchymateux, proneuraux et neuraux (Verhaak *et al.*, 2010).

Les GBM « classiques » se caractérisent par une perte du chromosome 10 (dans 97% des cas), de polysomie du chromosome 7 (jusqu'à quatre copies) qui contient notamment le gène codant l'EGFR. Cette surexpression du récepteur n'est pas retrouvée dans les autres profils. De manière surprenante, bien que les altérations de *TP53* soient très fréquemment observées dans l'ensemble des GBM, le sous-type classique est rarement porteur de ces mutations. Par ailleurs, la délétion homozygote du locus du gène *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)*, qui code les protéines p16INK4a et p14ARF (Uhrbom *et al.*, 2005) est un évènement courant, associé à l'amplification de l'EGFR dans 94% des cas, et représente la seule aberration de la voie de signalisation Rb. Enfin, cette sous-classe intègre l'expression de protéines spécifiques des précurseurs et des cellules souches neurales tels que la nestine, la Notch, le CD133 et la *sonic hedgehog*.

Les GBM « mésoenchymateux » sont porteurs de délétions chromosomiques partielles, au niveau de la région 17q11.2 contenant le gène de la neurofibromine (*NFI*), observées dans 53% des cas. Cette classe doit son nom à l'expression de marqueurs dits mésoenchymateux, comme la *chitinase 3-like protein 1*, un facteur de survie cellulaire inhibant l'entrée en apoptose, et également impliqué dans les mécanismes d'invasion et de prolifération tumorales (Ku *et al.*, 2011). Est aussi relevée l'expression du proto-oncogène *MET*, qui code l'*hepatocyte growth factor receptor* (HGFR). Ce récepteur est impliqué dans la réponse antiapoptotique, l'angiogenèse, la progression du cycle cellulaire, l'adhésion et la migration cellulaires (Benvenuti *et al.*, 2007 ; You *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2008a ; Zhou *et al.*, 2008). Enfin, les gènes de la voie de signalisation de la famille du *tumor necrosis factor* (TNF) sont surexprimés, vraisemblablement à la suite des phénomènes de nécrose massive et d'infiltrats inflammatoires (Wright et Merchant, 1997 ; Bhat *et al.*, 2013).

Les GBM « proneuraux » sont principalement définis par la présence d'altérations des gènes codant *i*) le PDGFR (*via* une amplification du locus 4q12, voire des mutations qui empêchent la liaison du ligand) et *ii*) la protéine isocitrate deshydrogénase 1 (IDH1), une enzyme catalysant la décarboxylation de l'isocitrate en 2-oxoglutarate, et spécifique des GBM secondaires (Yan *et al.*, 2009). Des mutations et pertes d'hétérozygotie de TP53 sont majoritairement retrouvées dans ce groupe. Les gliomes proneuraux sont par ailleurs caractérisés par une forte expression de gènes impliqués dans le développement oligodendrocytaire tels que le *PDGFR* et l'*oligodendrocyte transcription factor (Olig2)* (Noble et Dietrich, 2004) mais également des marqueurs neuronaux, comme les protéines Sox et doublecortine, faisant de ces tumeurs gliales des cas atypiques. En outre, la forte expression d'*Olig2* diminue l'expression du suppresseur de tumeur p21, augmentant de manière globale l'index de prolifération tumorale (Ligon *et al.*, 2007).

En dernier lieu, les GBM de type « neural » se distinguent par la présence de neurones normaux au sein du tissu tumoral, ce qui explique en partie l'expression par la tumeur de marqueurs de différenciation des oligodendrocytes et des neurones, ainsi que de protéines spécifiques des neurites, axones et synapses. Il s'agit notamment des gènes codant la protéine du neurofilament (*NEFL*), le récepteur GABAergique de type A (R-GABA<sub>A</sub>), la synaptotagmine de type 1 (*SYT1*, impliquée dans le *calcium-sensing*) et le symporteur de type 5 du KCl (*SLC12A5*).

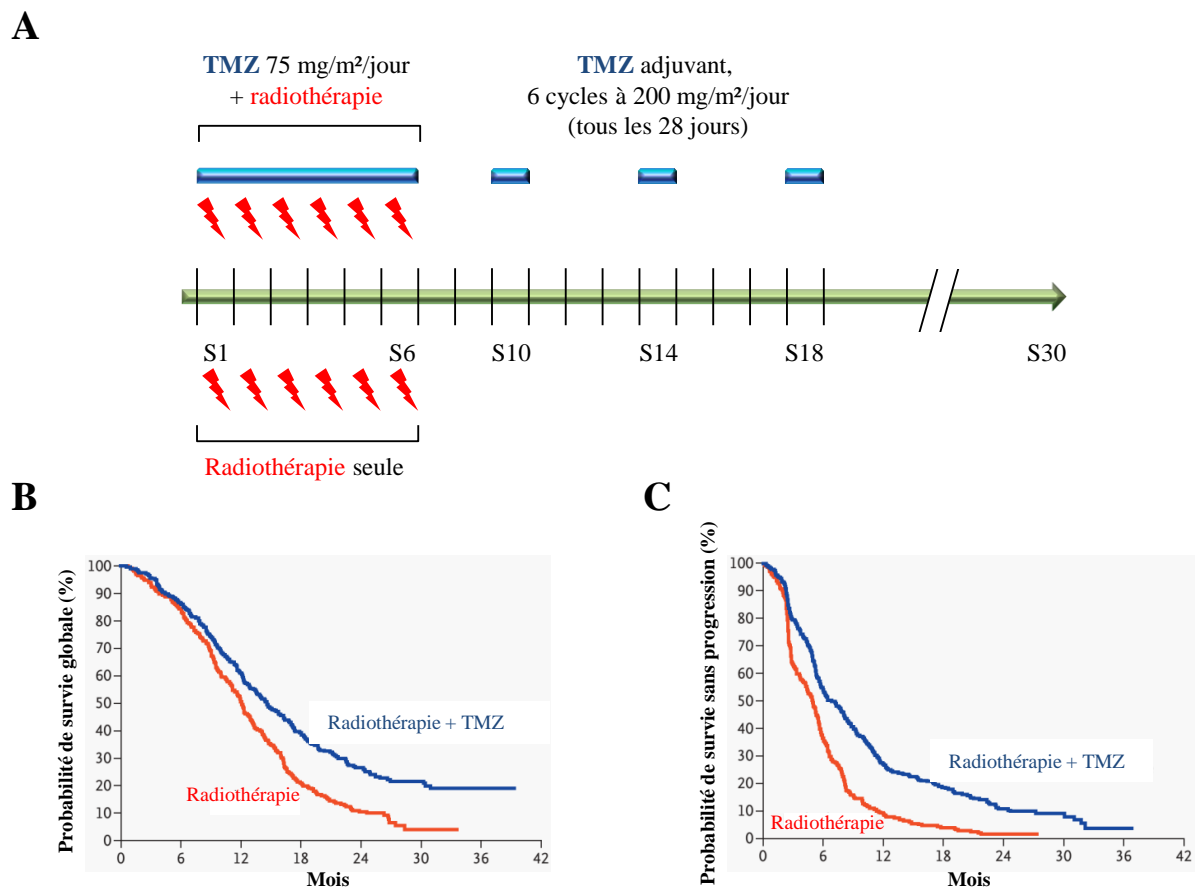
En *addendum* des informations apportées par la classification moléculaire sur le développement des GBM, Verhaak et coll. ont par ailleurs mis en relief des corrélations entre le sous-type de gliome et *i*) la survie des patients, qui est par exemple deux fois plus réduite pour la classe proneurale, et *ii*) l'impact des traitements chimio- et radiothérapeutiques, qui s'avèrent encourageants pour les tumeurs classiques et mésenchymateuses, en prolongeant la vie des patients d'une dizaine de mois.

## 2.4. Traitement des gliomes

Le bénéfice de la radiothérapie dans le traitement des tumeurs cérébrales a été initialement démontré à l'aide d'un modèle focal réalisé en préopératoire (Salcman, 1980a et 1980b). La chimiothérapie a, quant à elle, été validée après une série de protocoles thérapeutiques, montrant l'efficacité des agents alkylants de l'ADN (Chinot *et al.*, 2010) dont le témozolomide (TMZ) ou Temodal<sup>®</sup> (Newlands *et al.*, 1997 ; Friedman *et al.*, 1998). Cependant, les premiers essais combinant radio- et chimiothérapie n'ont pas montré d'effet probant sur la médiane de survie des patients, reléguant ainsi leur utilisation au traitement des cas de récurrences (Yung *et al.*, 2000). L'intérêt de la chimiothérapie adjuvante a été relancé par le résultat d'une méta-analyse montrant un bénéfice modeste, mais réel, à la fois sur la médiane de survie et la proportion de patients survivants à long terme (Stewart, 2002). La recherche de l'optimisation du nombre de lésions de l'ADN induite par ces deux voies d'attaque s'avère limitée par le fait que le tissu cérébral sain est particulièrement sensible aux rayonnements, tandis que les cellules tumorales des GBM sont, pour une importante proportion, très résistantes.

### 2.4.1. Protocole de Stupp

Actuellement, le traitement classique des gliomes malins consiste en une résection chirurgicale la plus importante possible, suivie d'une chimio- et radiothérapie (Fig. 12A) (Stupp *et al.*, 2005). L'agent chimiothérapeutique de référence est le TMZ, dont l'autorisation de mise sur le marché a été accordée en 1999. L'étude de Stupp et coll. montre une augmentation (> 10%) de la survie des patients traités par la chimiothérapie concomitante (Fig. 12B), ainsi qu'une stabilisation de la progression tumorale sur une durée de sept mois (Fig. 12C). D'une manière générale, le traitement par le protocole de Stupp permet de doubler sur deux ans la survie des malades.



**Figure 12 : Protocole de Stupp.** **A**, Schématisation du protocole initialement éprouvé en phase clinique (d'après Stupp *et al.*, 2005). Après exérèse chirurgicale, deux cohortes de patients ont été traitées par radiothérapie seule (rouge) ou par radio- et chimiothérapie à l'aide de témozolomide (TMZ, bleu). Le TMZ est administré *per os* en six doses de 75 mg/m<sup>2</sup>/jour pendant les six semaines suivant l'opération, puis après quatre semaines de récupération, en six cycles de traitement adjuvant à hauteur de 200 mg/m<sup>2</sup>/jour tous les 28 jours. **B**, Courbes de Kaplan-Meier illustrant la survie moyenne des patients traités par radiothérapie seule (courbe rouge) ou en combinaison avec le TMZ (courbe bleue). Globalement, la chimiothérapie concomitante permet d'élever le taux de survie à deux ans de 10,4 à 26,5%. **C**, Survie moyenne prenant en compte l'absence de progression tumorale qui se traduit classiquement par une augmentation de plus de 25% de la taille de la tumeur ou l'apparition de nouvelles lésions conjointes à un besoin accru en corticostéroïdes prescrits pour traiter l'œdème cérébral.

La radiothérapie n'agit pas directement sur l'ADN mais sur son interaction avec des molécules du compartiment intracellulaire, en provoquant des ionisations, l'arrachement d'électrons ou des excitations responsables d'un transfert d'électrons au travers des sous-couches électroniques. Contrairement aux ionisations qui entraînent des réactions physico-chimiques aboutissant à une perturbation du fonctionnement cellulaire, les excitations ont peu d'impact sur la cellule. Les radiations peuvent ainsi provoquer des interactions entre les électrons libérés et les molécules du compartiment intracellulaire, dont l'ADN, ou induire la formation de radicaux libres (H<sub>2</sub>O<sup>°</sup>, OH<sup>°</sup>, H<sup>°</sup>, HO<sub>2</sub><sup>°</sup>) hautement réactifs avec l'ADN. Ces

interactions induisent des cassures simple ou double brin de l'ADN, qui, lorsqu'elles ne sont pas réparées, provoquent d'importantes aberrations chromosomiques conduisant à une mort cellulaire.

Le TMZ se caractérise par une excellente biodistribution dans le SNC ainsi qu'une grande stabilité à pH acide, rendant possible une administration *per os*. Le mécanisme d'action précis de cette molécule passe par son hydrolyse en 5-(3-methyltriazén-1-yl)-imidazole-4-carboxiamide (MITC), composé plus actif mais de faible diffusion dans les tissus, dont la décomposition spontanée en ion méthyldiazonium très réactif s'effectue à pH plus alcalin. La fenêtre de valeurs de pH permettant l'hydrolyse du TMZ en MITC, puis en groupement alkylant pour l'ADN est donc relativement réduite (Stevens *et al.*, 1987 ; Newlands *et al.*, 1997). Toutefois, le pH relevé au cœur des tumeurs cérébrales est plus alcalin que celui du tissu sain environnant, ce qui favorise la production intratumorale du métabolite hautement réactif avec l'ADN, et diminue sa toxicité sur le parenchyme cérébral (Vaupel *et al.*, 1989).

Les lésions de l'ADN observées après traitement au TMZ sont une méthylation en position N<sup>7</sup>-guanine (70%), O<sup>3</sup>-adénine ou O<sup>6</sup>-guanine (5%) (Denny *et al.*, 1994). Lors de la réplication de l'ADN, une désoxycytidine ou thymidine est incorporée en face de la liaison, entraînant un mésappariement de bases dans le double brin d'ADN. Ainsi, lors des réplifications suivantes, le système *Mismatch Repair* excise la portion d'ADN entourant la base mésappariée et la nouvelle tentative de l'ADN polymérase pour combler ce vide introduit un nouveau mésappariement. L'activation de ce système de manière répétitive génère davantage de cassures et bloque alors le cycle cellulaire en phase G2/M, déclencheur d'apoptose *via* la protéine p53 (Karran *et al.*, 1993 ; Hirose *et al.*, 2001). Cet effet est renforcé par la diminution du taux d'expression de l'enzyme de réparation de l'ADN, la MGMT, observée après l'exposition de cellules tumorales au TMZ. En temps normal, l'élimination du résidu alkyl par la MGMT se fait par transfert de ce groupement depuis la base azotée vers l'enzyme,

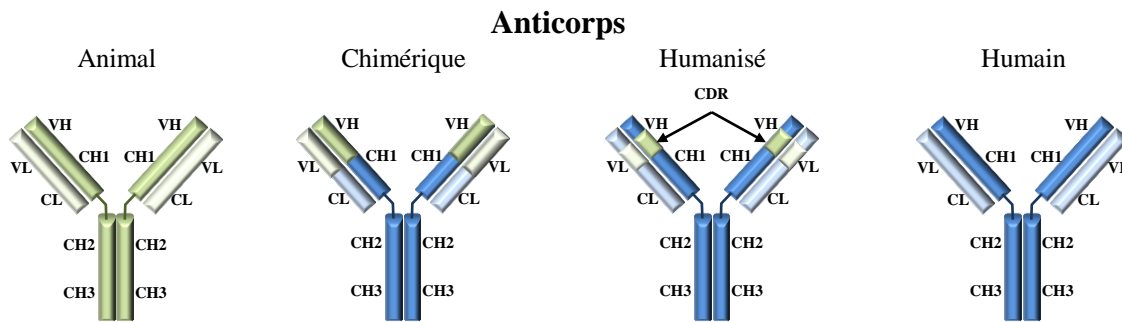
réduisant par conséquence l'action cytotoxique du TMZ (Olsson et Lindahl, 1980). La MGMT étant inactivée de façon irréversible durant ce processus, elle ne diminue donc pas les effets du TMZ (Tolcher *et al.*, 2003).

#### 2.4.2. Innovations récentes dans le traitement des GBM

Bien que le protocole de Stupp (dont l'efficacité a été prouvée ces dernières années) soit envisagé dans plus de 80% des cas de GBM, d'autres molécules chimiques ont été approuvées par la *Food and Drug Administration* (FDA) pour le traitement des gliomes, avec à l'esprit la volonté de limiter les effets indésirables induits par le TMZ, qu'il s'agisse de sa toxicité ou de son administration *per os* qui impacte les voies digestives en provoquant constipations, nausées et vomissements. D'une façon plus globale, la qualité de vie peut être profondément perturbée en raison de céphalées ou de phénomènes d'anorexie, de dépression, d'extrême fatigue, voire de convulsions.

Parmi les nouveaux traitements disponibles, la carmustine est un autre agent alkylant de l'ADN, dont l'administration se fait sous forme de patchs disposés dans la cavité de résection lors de l'intervention chirurgicale, afin de tuer les cellules tumorales infiltrantes invisibles à l'imagerie. Autorisée depuis 2002, son action est plus modérée que celle du TMZ, mais plus prolongée dans le temps. Pour autant, le traitement combiné du TMZ et de la carmustine ne permet pas d'améliorer de manière notable la survie des patients (Noël *et al.*, 2012), soulevant clairement la nécessité de trouver des combinaisons thérapeutiques complémentaires en termes de cibles et d'efficacité.

Le bevacizumab (Avastin<sup>®</sup>) est un anticorps monoclonal qui cible le VEGF de type A, humanisé par une procédure de remplacement des régions hypervariables d'un anticorps humain par son équivalent produit chez l'animal, limitant ainsi les réactions immunogènes causées par des anticorps (Fig. 13).



**Figure 13 : Anticorps utilisés en thérapeutique.** Afin de prévenir une réponse immunitaire du patient à l'encontre d'un anticorps à visée thérapeutique, et donc d'augmenter sa tolérance, il est nécessaire de réduire les séquences d'origine animale à la simple portion de reconnaissance de l'antigène. Un anticorps chimérique, humain à 60%, consiste en un remplacement des chaînes lourdes et légères (CH et CL) d'anticorps humains sur les parties variables respectives (VH et VL) d'un anticorps animal. L'anticorps humanisé est humain à 90%, des parties hypervariables d'un anticorps animal sont greffées sur une immunoglobuline humaine, ce qui augmente fortement sa tolérance par le patient ainsi que sa demi-vie dans l'organisme. CDR, *complementary determining region* ; CH, partie constante de la chaîne lourde ; CL, partie constante de la chaîne légère ; VH, domaine variable de la chaîne lourde ; VL, domaine variable de la chaîne légère.

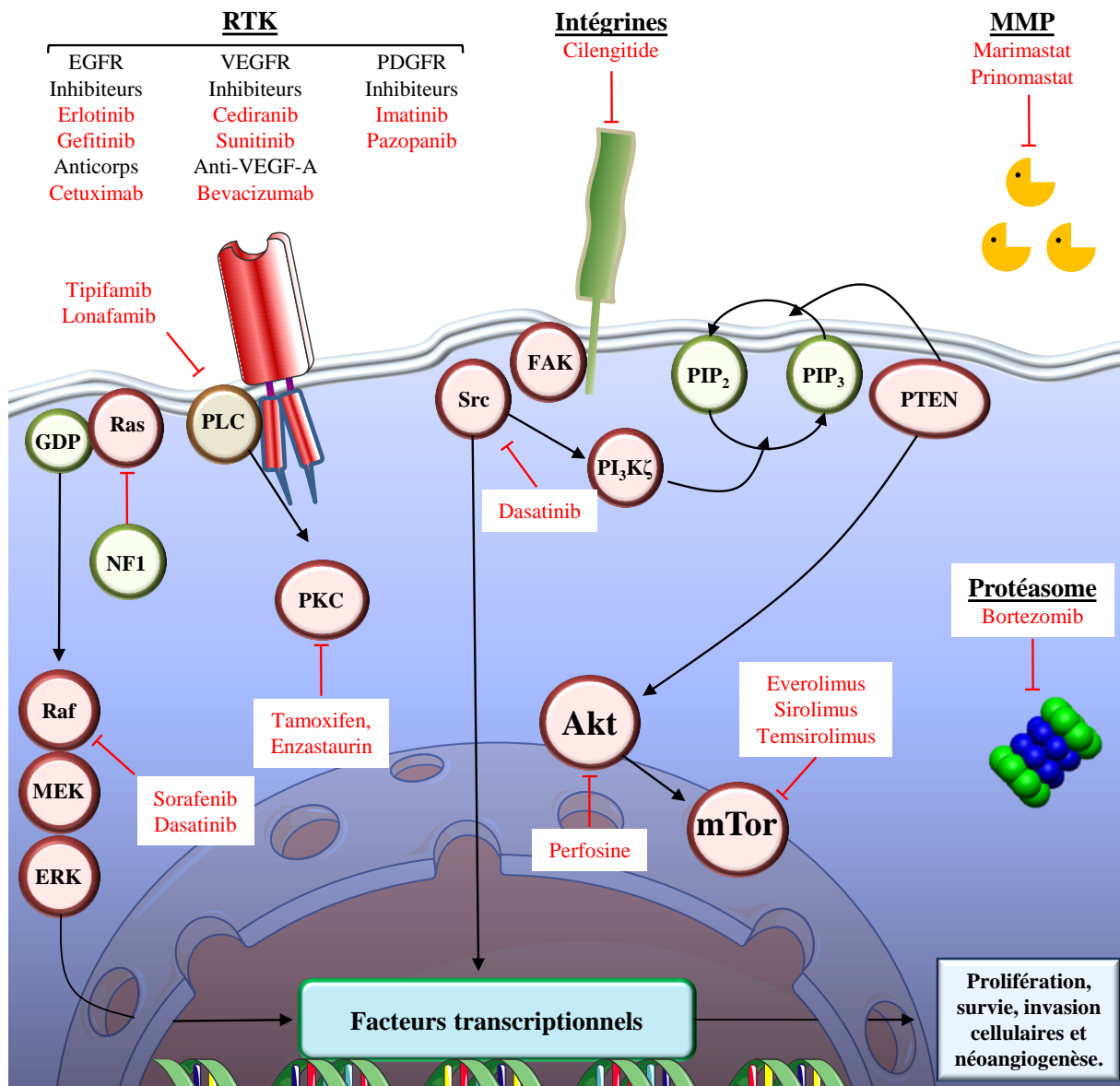
Testée sur de nombreuses tumeurs solides, qui présentent un développement angiogénique élevé, cette immunoglobuline a prouvé son intérêt thérapeutique. Les premières études réalisées sur des cancers colorectaux (Berlin, 2002 ; Kabbinavar *et al.*, 2003) et prostatiques (Figg *et al.*, 2002) ont montré une excellente réponse de la quasi-totalité des patients soumis au traitement, avec une augmentation significative de la survie de sept à onze mois. Depuis 2009, l'Avastin est utilisé dans le traitement des GBM, en complément du protocole de Stupp et dans les cas de récurrences (Cohen *et al.*, 2009). On constate notamment une normalisation de la néovascularisation tumorale et une réduction durable de l'œdème vasogénique tumoral, permettant d'augmenter la survie sans progression tumorale de six mois (Nagpal *et al.*, 2011).

Cette immunothérapie est actuellement testée dans de nombreux essais cliniques de traitement de glioblastomes *de novo* (Narayana *et al.*, 2012). Les résultats sont malheureusement décevants, en raison d'une adaptation rapide du tissu tumoral qui « sélectionne » les cellules chimiorésistantes capables d'initier une croissance vasculaire *via* la surexpression d'autres facteurs pro-angiogéniques, tels que le bFGF, le SDF-1 ou la *tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains* (TIE-2). Il est également

évoqué la possibilité que la tumeur stimule l'attraction de progéniteurs endothéliaux provenant de la moelle osseuse (Arbab, 2012). En outre, l'analyse des rechutes systématiques des patients a mis en évidence une modification du comportement de certaines tumeurs gliales, par le biais d'un basculement de la tumorigenèse d'un phénotype pro-angiogénique à un phénotype particulièrement infiltrant (Guillamo, 2011 ; Narayana *et al.*, 2012 ; Baker *et al.*, 2014).

Actuellement, près de 1400 essais cliniques sont répertoriés sur les glioblastomes (Source : *clinicaltrials.gov*, consultation en date de novembre 2014). La plupart des molécules éprouvées ciblent les voies de signalisation recrutées pour la survie cellulaire ou l'apoptose. Des anticorps humanisés ou des inhibiteurs chimiques des voies de signalisation intracellulaire impliquant les récepteurs à activité tyrosine kinase, ou les kinases Ras et la phosphoinositide 3-kinase (PI<sub>3</sub>K), constituent les principaux agents thérapeutiques utilisés (Fig. 14 ; Tab. 3). En particulier, deux inhibiteurs (Erlotinib et Gefitinib) du domaine à activité tyrosine kinase de l'EGFR ont été développés. Malheureusement, et c'est encore une particularité des GBM, aucun bénéfice n'est observé sur la survie des patients. De plus, l'immunoneutralisation de l'EGFR induit l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1, rendant ainsi les cellules moins sensibles au TMZ et aux radiations utilisés en combinaison. Des inhibiteurs de la protéine kinase B (Akt) ou de la voie des *mammalian target of rapamycin* (mTor) (Tab. 3) ont également été testés mais ils s'avèrent peu efficaces et induisent même par rétrocontrôle une suractivation de la boucle PI<sub>3</sub>K/Akt (O'Reilly *et al.*, 2006). Enfin, un inhibiteur des MMP, le Marimastat (Fig. 14 ; Tab. 3), a été administré chez des malades pour limiter l'infiltration tumorale dans le SNC. Les résultats, là encore, se sont avérés très décevants en entraînant une réponse partielle sur seulement 2% de la cohorte et montrant une toxicité élevée, avec 65% de patients souffrant d'importantes douleurs musculaires et articulaires (Groves *et al.*, 2006).





**Figure 14 : Représentation schématique des principales chimiothérapies ciblées utilisées dans le traitement des gliomes** (d'après Arko *et al.*, 2010). Les thérapies actuellement développées ciblent les RTK, les intégrines membranaires et les cascades intracellulaires qui leur sont associées, avec pour finalité d'entraver la prolifération, la survie et la résistance à l'apoptose des cellules tumorales. Les phénomènes d'invasion cellulaire dans le parenchyme sont limités par l'usage d'inhibiteurs de MMP. Caractéristique des gliomes fortement malins, la néoangiogenèse est normalisée à l'aide d'anticorps dirigés contre le VEGF circulant. L'inhibition du protéasome limite la dégradation de facteurs et métabolites pro-apoptotiques, ce qui réduit davantage la survie cellulaire. Akt, protéine kinase B ; EGFR, *epidermal growth factor receptor* ; ERK, *extracellular signal-regulated kinase* ; FAK, *focal adhesion kinase* ; GDP, *guanosine diphosphate* ; HIF-1 $\alpha$ , *hypoxia-inducible factor 1 alpha* ; MEK, *mitogen-activated protein kinase kinase* ; MMP, *metalloprotéases matricielles* ; mTOR, *mammalian target of rapamycin* ; NF1, *neurofibromine 1* ; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor* ; PI<sub>3</sub>K, *phosphoinositide 3-kinase* ; PIP<sub>2</sub>, *phosphoinositide diphosphate* ; PIP<sub>3</sub>, *phosphoinositide triphosphate* ; PKC, *protéine kinase C* ; PLC, *phospholipase C* ; PTEN, *phosphatase and tensin homolog* ; Ras, *Ras GTPase* ; Raf, *sérine/thréonine kinase* ; RTK, *récepteurs à activité tyrosine kinase* ; Src, *sarcoma tyrosine kinase* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor* ; VEGFR, *vascular endothelial growth factor receptor*.

**Tableau 3 : Inventaire des thérapies ciblées actuellement développées pour le traitement des gliomes.**

Molécule	Cibles	Type	Références bibliographiques	
CDX110	EGFR <sub>vIII</sub>	Vaccin	Heimberger <i>et al.</i> , 2009; Del Vecchio <i>et al.</i> , 2012	
Marimastat	MMP-1, -2, -7, -9, -14	Inhibiteur de métalloprotéinase	Groves <i>et al.</i> , 2006; Gabelloni <i>et al.</i> , 2010; Ulasov <i>et al.</i> , 2013	
Prinomastat	MMP-1, -2, -9, -13, -14		Price <i>et al.</i> , 1999; Scatena, 2000	
Tamoxifen	œstrogènes	Inhibiteur d'œstrogènes	Patel <i>et al.</i> , 2012; D.I. Cristofori <i>et al.</i> , 2013	
Cetuximab	EGFR	Anticorps monoclonaux	Eller <i>et al.</i> , 2002; Combs <i>et al.</i> , 2007; Blesa <i>et al.</i> , 2012	
Nimotuzumab			Diaz-Miqueli <i>et al.</i> , 2013; Solomón <i>et al.</i> , 2013	
Erlotinib		Inhibiteurs de RTK	Raizer <i>et al.</i> , 2010a; Raizer <i>et al.</i> , 2010b; Peereboom <i>et al.</i> , 2010; Schulte <i>et al.</i> , 2013	
Gefitinib			Rich <i>et al.</i> , 2004; Uhm <i>et al.</i> , 2011; Joshi <i>et al.</i> , 2012	
Lapatinib			Erb-2	Gao <i>et al.</i> , 2012; Fouladi <i>et al.</i> , 2013
Canertinib			Erb-1 à 4	Christensen <i>et al.</i> , 2005
Vandetanib		EGFR		Kreisl <i>et al.</i> , 2012; Broniscer <i>et al.</i> , 2013
Bevacizumab		VEGFR	Anticorps monoclonal	Lai <i>et al.</i> , 2011; Reardon <i>et al.</i> , 2012; Chen <i>et al.</i> , 2013
VEGF-Trap	Bloqueur		Gomez-Manzano <i>et al.</i> , 2008; de Groot <i>et al.</i> , 2013	
Vatalanib	CSF1R	Inhibiteurs de RTK	Reardon <i>et al.</i> , 2009b; Gerstner <i>et al.</i> , 2011	
Cediranib	PDGFR, c-Kit		Batchelor <i>et al.</i> , 2010; Kim <i>et al.</i> , 2011b	
Pazopanib			VEGFR	Iwamoto <i>et al.</i> , 2010; Scott <i>et al.</i> , 2010; Reardon <i>et al.</i> , 2013
Sunitinib			Flt3	de Boüard <i>et al.</i> , 2007; Reardon <i>et al.</i> , 2011; Kreisl <i>et al.</i> , 2013
Tandutinib				Cheng & Paz, 2008; Lehky <i>et al.</i> , 2011
Imatinib mesylate	Bcr-Abl		Morris et Abrey 2010 Le Jeune <i>et al.</i> , 2006; Reardon <i>et al.</i> , 2009a	
Sirolimus	mTor	Inhibiteurs	Doherty <i>et al.</i> , 2006; Reardon <i>et al.</i> , 2006; Nghiemphu <i>et al.</i> , 2012	
Temsirolimus			Mounier <i>et al.</i> , 2006; Georger <i>et al.</i> , 2012; Lassen <i>et al.</i> , 2013	
Everolimus			Chinnaiyan <i>et al.</i> , 2013; Krueger, 2013; Mukherjee <i>et al.</i> , 2013	
Ridaforolimus			Panner <i>et al.</i> , 2006; Reardon <i>et al.</i> , 2012	
Enzastaurin	PKC	Inhibiteur	Omuro, 2008; Kreisl <i>et al.</i> , 2010; Butowski <i>et al.</i> , 2011	
Lonafarnib	Raf, MEK, ERK	Inhibiteur de farnésyl-transférase	Chaponis <i>et al.</i> , 2011; Desjardins <i>et al.</i> , 2011; Yust-Katz <i>et al.</i> , 2013	
Tipifarnib			Moyal <i>et al.</i> , 2007; Lustig <i>et al.</i> , 2008; Nghiemphu <i>et al.</i> , 2011	
Cilengitide	Intégrines	Inhibiteur des intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$	Reardon <i>et al.</i> , 2008; Stupp <i>et al.</i> , 2010; MacDonald <i>et al.</i> , 2013	

Bcr-Abl, *breakpoint cluster region-Abelson* ; c-Kit, *Mast/stem cell growth factor receptor* ; CSF1R, *colony stimulating factor 1 receptor* ; EGFR, *epidermal growth factor receptor* ; EGFR<sub>vIII</sub>, variant de type III du récepteur de l'EGF ; Erb1-4, *eukaryotic ribosome biogenesis* ; ERK, *extracellular signal-regulated kinase* ; Flt3, *FMS-like tyrosine kinase 3* ; MEK, *mitogen-activated protein kinase* ; MMP-1, -2, -7, -9, -13, -14, métalloprotéases matricielles de type 1, 2, 7, 9, 13, 14 ; mTOR, *mammalian-target of rapamycin* ; PDGFR, *platelet-derived growth factor receptor* ; PKC, protéine kinase C ; Raf, *serine/threonine-protein kinase B-Raf* ; RTK, récepteur à activité tyrosine kinase ; VEGFR, *vascular endothelial growth factor receptor*.

En conclusion, la plupart des traitements qui reposent sur une monothérapie chimique offrent des bénéfices nuls ou très modérés par rapport au traitement de référence. Sur cette base, de nombreux laboratoires ont ces dernières années focalisés leurs recherches sur des thérapies dites « biologiques ». Cette stratégie consiste à s'appuyer sur des médicaments préexistants (développés dans le cadre d'autres pathologies) et sur l'utilisation de cellules modifiées prélevées du patient. Dans une perspective plus lointaine, des modifications du génome, l'usage de nanoparticules, ou de molécules naturelles et leurs dérivés modifiés sont également des pistes envisagées (Lima et al., 2012).

#### **2.4.3. Thérapies « biologiques »**

Surexprimées par les cellules tumorales invasives, les MMP sont également libérées par la microglie concentrée dans la zone péri-tumorale, population cellulaire dont l'activité est particulièrement intense dans cet espace (Charles *et al.*, 2011). La dégradation de la MEC qui s'ensuit est extrêmement délétère pour le tissu nerveux sain et provoque une inflammation sévère susceptible de provoquer la formation d'un œdème cérébral (Wang *et al.*, 2014). Il a été récemment montré que l'usage d'une statine (Atorvastatin), utilisée dans le traitement de l'hypercholestérolémie, offre des perspectives prometteuses pour freiner ce phénomène inflammatoire (Yongjun *et al.*, 2013). Bien que son rôle soit *a priori* néfaste dans l'expansion des GBM, des données obtenues sur un modèle de xénogreffes orthotopiques de GBM humain ont révélé que la microglie peut constituer un outil de choix pour la thérapie cellulaire. Plus précisément, ces cellules microgliales sont transformées pour être utilisées comme « transporteurs » de chimiothérapies (Zhao *et al.*, 2011) ou comme vecteur infectieux pour thérapie génique (Lun *et al.*, 2010a ; 2010b).

La thérapie génique sur les gliomes a fait l'objet de nombreuses études chez l'animal, notamment par l'utilisation de vecteurs viraux modifiés capables d'insérer des portions de

génomique altérant la tumorigenèse, ou de petits ARN interférants (siRNA). Malgré ces efforts, un seul essai clinique s'est finalement avéré concluant (Rolle *et al.*, 2010). La stratégie utilisée consistait à traiter la cavité de résection de patients, opérés pour des gliomes de grades II à IV, à l'aide de siRNA dirigés contre les mRNA codant la ténascine-C, une protéine de la MEC surexprimée dans les gliomes (Brösicke *et al.*, 2013). Cette thérapie génique améliore très significativement la qualité de vie, évite la résurgence tumorale aux sites d'injection, et permet de doubler la survie des patients.

L'acheminement des thérapies sur le site de développement tumoral est actuellement assuré par la circulation sanguine, lors de l'administration intraveineuse, mais la diffusion de ces molécules est fortement limitée par la BHE. En effet, la présence de jonctions serrées entre les cellules endothéliales des capillaires sanguins et d'une lame basale, constitue un obstacle physique et chimique qui nécessite l'élaboration de stratégies thérapeutiques particulières dans le traitement des GBM. A ce jour, seul l'accès direct à la tumeur lors de l'intervention chirurgicale permet de s'assurer d'une relative diffusion du médicament dans le foyer tumoral (patches de Carmustine), avec une efficacité thérapeutique malheureusement réduite (cf. § 2.4.2.). Ces dernières années ont été le sujet de réflexion sur l'ingénierie de *carriers* synthétiques, qui assurent la protection physique, l'acheminement et la libération de molécules à visée thérapeutique et ce, de manière spécifique sur le site de la tumeur. Parmi les *carriers* actuellement développés, des micelles incorporant de l'hydroxycamptothécine sont capables de retarder durablement la croissance de xénogreffes orthotopiques de glioblastomes humains, de manière plus efficace qu'en absence d'incorporation micellaire préalable (Kuroda *et al.*, 2010). Les liposomes synthétiques, utilisés comme réservoirs intracellulaires diffuseurs de chimiothérapie, ont été évalués sur des cellules de glioblastomes de Rat et montrent une augmentation significative du pouvoir cytotoxique de l'Etoposide, un inhibiteur de la topoisomérase II (Lamprecht et Benoit, 2006). Enfin, des nanoparticules synthétiques

incorporées dans des cellules souches mésenchymateuses provoquent une diminution notable de la croissance de gliomes humains implantés dans le SNC d'animaux immunodéprimés (Roger *et al.*, 2010 ; 2011).

#### **2.4.4. Nouvelles cibles thérapeutiques, perspectives pour le traitement des GBM**

En dépit des efforts et des innovations apportées continuellement dans l'élaboration de nouvelles stratégies médicamenteuses, les GBM restent des cancers incurables. La réflexion actuelle s'attache à cibler des molécules naturellement produites par l'organisme et à bloquer spécifiquement le fonctionnement de récepteurs nouvellement caractérisés pour leur implication dans la tumorigenèse cérébrale. Très récemment, le groupe de Parsons a ainsi identifié un variant de PTEN, appelé *PTEN-long*, fruit d'une translocation alternative ajoutant 173 acides aminés à la forme native de la protéine (Hopkins *et al.*, 2013). Dans un modèle de transfection, cette phosphatase liposoluble et fonctionnelle, se retrouve sécrétée et agit comme un suppresseur de tumeur sur des lignées tumorales, notamment issues de GBM. Sur des gliomes greffés de manière hétérotopique, l'administration intraveineuse de *PTEN-Long* induit une forte régression du développement tumoral.

Les neuropeptides vasoactifs naturels, à l'image de l'angiotensine II ou de l'adrénomédulline (ADM), constituent des candidats particulièrement prometteurs. En 2008, l'équipe de Sotelo montrait une surexpression des récepteurs angiotensinergiques de type 1 (AT1) dans des GBM, corrélée à un mauvais pronostic pour la survie des patients (Arrieta *et al.*, 2008). Chez l'animal, le blocage sélectif des récepteurs AT1 par le Losartan inhibe le développement de gliomes murins et diminue efficacement la néoangiogenèse tumorale (Rivera *et al.*, 2001 ; Arrieta *et al.*, 2005). De plus, des inhibiteurs de l'*angiotensin-converting enzyme* (ACEI) et des bloqueurs du récepteur de l'angiotensine II (Ang II) (ARB), administrés chez des patients opérés pour des GBM, diminuent l'œdème post-opératoire de

manière plus efficace que les stéroïdes prescrits en routine (Carpentier *et al.*, 2012). Le blocage sélectif du récepteur d'un autre peptide vasoactif, l'endothéline 1 (ET-1) par l'Atrasentan est en phase 1 d'étude clinique ; les patients traités montrent des réponses partielles voire des stabilisations durables sur la progression de GBM (Phuphanich *et al.*, 2008). L'immunoneutralisation de l'ADM circulante entraîne une réduction spectaculaire du développement de tumeurs prostatiques et de GBM xénogreffés chez des souris *Nude* (Ouafik *et al.*, 2002 ; Kaafarani *et al.*, 2009 ; Berenguer-Daize *et al.*, 2013). Pour ces deux types de cancers, dont la croissance dépend fortement de la néoangiogenèse, la neutralisation de l'ADM s'explique, en partie, par une baisse drastique de la densité vasculaire intratumorale. D'autres travaux et/ou essais thérapeutiques réalisés avec le *vasoactive intestinal peptide* (VIP) (Sharma *et al.*, 2001 ; Dufes *et al.*, 2003 ; D'Amico *et al.*, 2013), la cholécystokinine (CCK) (Oikonomou *et al.*, 2008), le *gastrin-releasing peptide* (GRP) (Kanashiro *et al.*, 2005a ; Farias *et al.*, 2008 ; Flores *et al.*, 2008 ; de Oliveira *et al.*, 2009), la bombésine (Kanashiro *et al.*, 2005a ; 2005b), la somatostatine (Pozsgai *et al.*, 2010), qui sont tous dotés de certaines propriétés vasoactives, confirment le rôle crucial de ce type de composés endogènes dans le développement des tumeurs gliales.

L'ensemble des données indique clairement que les peptides vasoactifs participent aux processus de développement des gliomes. Sur cette base, l'équipe « Astrocytes et Niche Vasculaire » (Inserm U982, Rouen) dirigée par le Dr Hélène Castel s'intéresse à l'impact de l'UII, le neuropeptide vasoactif le plus puissant identifié à ce jour (Douglas *et al.*, 2004a ; Maguire *et al.*, 2004), sur la tumorigenèse cérébrale.

## Chapitre II : le système urotensinergique

### 1. Le système urotensinergique, de l'Aplysie à l'Homme

Découvertes conjointement par deux biologistes, Howard Bern de l'Université de Berkeley (Californie) et Karl Lederis de l'Université de Calgary (Canada) à la fin des années 1960, les « urotensines » sont des neuropeptides isolés initialement à partir du système neurosécréteur (urophyse) d'un poisson téléostéen, le *Gillichthys mirabilis*, et ainsi nommés pour leur capacité à stimuler la musculature lisse (Bern & Lederis, 1969). Parmi eux, l'UII fut identifiée chez de nombreuses espèces de poissons (Pearson *et al.*, 1980), puis au début des années 1990, dans le cerveau d'un tétrapode, la grenouille verte *Rana ridibunda* (Conlon *et al.*, 1992). A la suite de cette découverte, le gène codant l'UII fut séquencé chez d'autres espèces de mammifères y compris l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998 ; Ames *et al.*, 1999).

#### 1.1. Structure des peptides urotensinergiques

Hendécapeptide chez les primates, *Homo sapiens* inclus, et composé de dix-sept acides aminés (aa) chez la Souris, l'UII montre une remarquable conservation de sa structure au cours de l'évolution, notamment au sein d'une portion hexapeptidique CFWKYC C-terminale formée par l'association covalente de deux cystéines *via* un pont disulfure (Tab. 4). L'identité de cette séquence a été rigoureusement respectée au cours des 560 millions d'années d'évolution qui séparent la Lamproie de l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998), suggérant une importance capitale du cycle dans l'activité biologique. A ce jour, l'UII a été caractérisée chez une seule espèce d'invertébré, le Lièvre de mer ou *Aplysia californica* (González *et al.*, 1992), sous une forme composée de vingt aa et dont l'hexapeptide cyclique ne diffère de celui des vertébrés par deux résidus seulement (Romanova *et al.*, 2012).

En 2003, un peptide paralogue de l'UII, l'*urotensin II-related peptide* (URP) a été isolé à

partir d'extraits de cerveaux de rats (Sugo *et al.*, 2003). Le clonage des ADNc codant les prépro-URP de l'Homme, de la Souris et du Rat a révélé que les précurseurs possèdent 54% d'homologie entre l'Homme et le Rat, contre 47% entre l'Homme et la Souris (Sugo & Mori, 2008). Identique chez tous les mammifères, la séquence de l'URP est très proche de celle de l'UII puisqu'elle correspond à l'Ala<sup>1</sup>-UII<sub>5-11</sub> humaine (Tab. 4).

**Tableau 4 : Comparaison des séquences de l'UII et de l'URP au cours de l'évolution.**

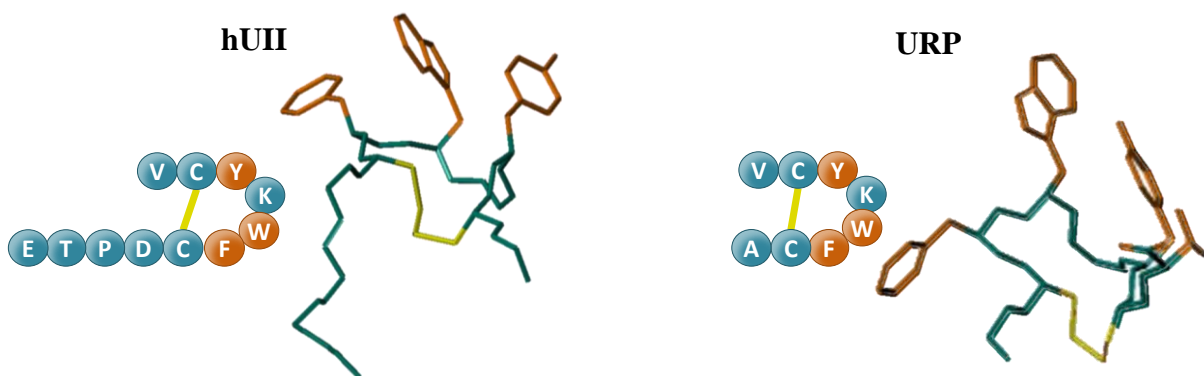
Famille	Nom de l'espèce		Séquences peptidiques	
	Scientifique	Commun	UII	URP
<b>Gastéropode</b>	<i>Aplysia californica</i>	Aplysie	SGGMSL <b>CLWKV</b> CPAAPWLIS (Romanova <i>et al.</i> , 2012)	
	<i>Lethenteron camtschaticum</i>	Lamproie	NNFS <b>DCFWKY</b> CW (Waugh <i>et al.</i> , 1995)	
<b>Téléostéens</b>	<i>Danio rerio</i>	Poisson zèbre	GGGAD <b>CFWKY</b> CV (Parmentier <i>et al.</i> , 2008)	DDT <b>CFWKY</b> CV (Quan <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Gillichthys mirabilis</i>	Gobie	AGTAD <b>CFWKY</b> CV	
	<i>Takifugu rubripes</i>	Tétraodon	TGNNE <b>CFWKY</b> CV	SEP <b>CFWKY</b> CV (Quan <i>et al.</i> , 2012)
<b>Tétrapodes</b>	<i>Pelophylax ridibundus</i>	Grenouille	AGNLSE <b>CFWKY</b> CV (Conlon <i>et al.</i> , 1992)	
	<i>Gallus gallus</i>	Poulet	GNLSE <b>CFWKY</b> CV	AC <b>FWKY</b> CI
	<i>Felis catus</i>	Chat	GSPSE <b>CFWKY</b> CV	
	<i>Bos taurus</i>	Bovin	GSPSSE <b>CFWKY</b> CV	AC <b>FWKY</b> CV
	<i>Rattus norvegicus</i>	Rat	QHGTAPE <b>CFWKY</b> CI (Coulouarn <i>et al.</i> , 1999)	AC <b>FWKY</b> CV
	<i>Mus musculus</i>	Souris	QHKQHGA <b>CFWKY</b> CI (Coulouarn <i>et al.</i> , 1999)	AC <b>FWKY</b> CV
	<i>Papio anubis</i>	Babouin	ETPD <b>CFWKY</b> CV	AC <b>FWKY</b> CV
	<i>Macaca mulatta</i>	Macaque	ETPD <b>CFWKY</b> CV	AC <b>FWKY</b> CV
	<i>Gorilla gorilla</i>	Gorille	ETPD <b>CFWKY</b> CV	AC <b>FWKY</b> CV
	<i>Pan troglodytes</i>	Chimpanzé	ETPD <b>CFWKY</b> CV (Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002)	AC <b>FWKY</b> CV
	<i>Homo sapiens</i>	Homme	ETPD <b>CFWKY</b> CV (Coulouarn <i>et al.</i> , 1998)	AC <b>FWKY</b> CV

La séquence hautement conservée formant le cycle des peptides urotensinergiques (rouge) est retrouvée de manière précoce chez l'Aplysie, seules des variations de la partie N-terminale sont observées entre les espèces. UII, urotensine II ; URP, *urotensin II related-peptide*.

Des études de résonance magnétique nucléaire (RMN) ont révélé qu'en solution aqueuse, la partie cyclique de l'UII adopte une structure contrainte, sans tour canonique, *i.e.* une structure tertiaire constituée d'interactions stables de type hydrogène entre des aa, au lieu d'appariements classiques de type covalent (Flohr *et al.*, 2002). Les Drs Isabelle Milazzo et Laure Guilhaudis (COBRA, IRCOF, Rouen) ont aussi démontré que l'UII humaine présente



dans l'eau un  $\gamma$ -turn inverse (Lescot *et al.*, 2007) (Fig. 15) alors qu'en milieu micellaire sodium dodécyl sulfate (SDS), sa forme tronquée (hUII<sub>4-11</sub>) possède un  $\beta$ -turn de type II (Carotenuto *et al.*, 2004). Les différences de conformation entre l'UII et l'URP ou les formes courtes d'analogues plaident en faveur d'une modulation allostérique de la forme liée du récepteur, susceptible de conduire à l'activation de voies de couplage distinctes. Cette hypothèse pourrait expliquer les activités biologiques parfois variables de l'UII et de l'URP (Prosser *et al.*, 2008 ; Jarry *et al.*, 2010 ; Doan *et al.*, 2012 ; Chatenet *et al.*, 2013).

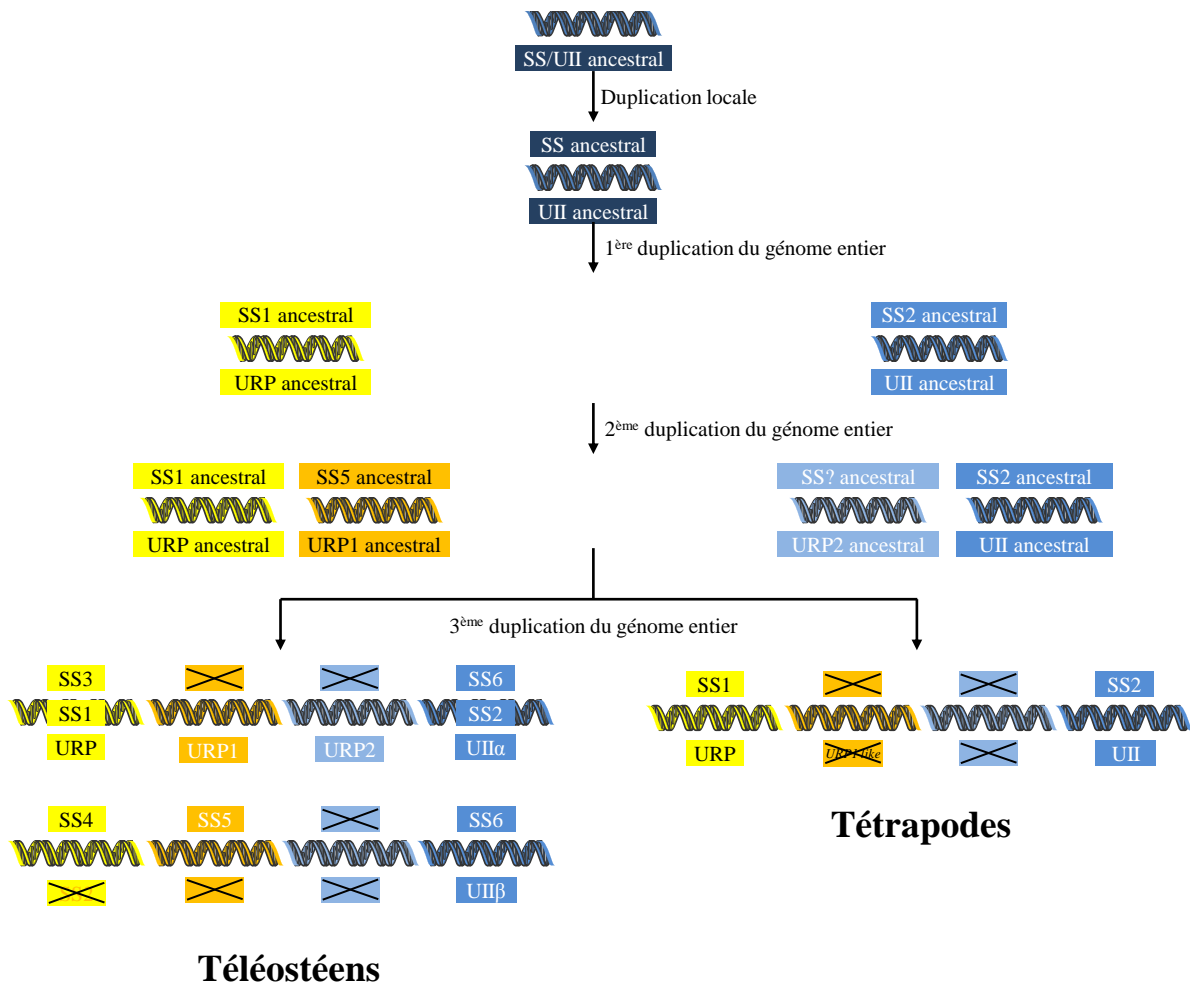


**Figure 15 : Comparaison de la séquence peptidique et de la structure tridimensionnelle de l'hUII et de l'URP.** Le pont disulfure (jaune) et les acides aminés (orange) du cycle correspondent à une portion hydrophobe indispensable dans l'interaction du ligand avec son récepteur. D'après les travaux de Milazzo et Guilhaudis (COBRA UMR 6014 CNRS, Rouen). hUII, urotensine II humaine ; URP, *urotensin II-related peptide*.

## 1.2. Gènes codant les peptides urotensinergiques

Chez l'Homme, les gènes codant les préproUII et préproURP sont localisés dans les régions p36 du chromosome 1 et q28 du chromosome 3, respectivement (Sugo *et al.*, 2003). Les séquences de l'UII, l'URP et de la somatostatine (SS) présentent de grandes similitudes, notamment au niveau de l'hexapeptide cyclique, région active de la SS (Pearson *et al.*, 1980 ; Conlon *et al.*, 1997 ; Tostivint *et al.*, 2006). Chez le Poisson zèbre, le Poulet et l'Homme, la comparaison des gènes codant ces peptides montre que les couples de gènes *UII/SS2* et *URP/SS1* présentent des homologies structurales significatives (Tostivint *et al.*, 2006). Selon cette étude, deux gènes ancestraux, le *protoUII* et le *protoSS*, auraient respectivement donné naissance aux gènes *UII/SS2* et *URP/SS1* (Fig. 16). A l'appui de cette hypothèse, d'autres

gènes comme *MASP2*, *CLCN6* et *TP73* de la région 1p36 possèdent aussi un paralogue dans la région 3q28 (Tostivint *et al.*, 2006).



**Figure 16 : Schéma de l'évolution des gènes codant la somatostatine, l'UII ou l'URP.** Les cases cochées correspondent aux gènes perdus au cours de l'évolution. Les gènes *UIIα* et *UIIβ* présents chez les téléostéens représentent deux copies du même gène. Modifié d'après Tostivint *et al.* (2014). UII, urotensine II ; URP1/2, urotensin II-related peptide ; SS1-6, somatostatine de type 1 à 6.

L'existence de deux isoformes de l'URP a aussi été avancée chez les téléostéens. Appelés *URP1* et *URP2*, ces peptides auraient disparu dans le lignage des tétrapodes (Parmentier *et al.*, 2011) (Fig. 16). De façon intéressante, la séquence génétique codant les résidus AFWKYCQN retrouvée sur le chromosome 5 dans le génome humain, possède de fortes similitudes avec le peptide issu de l'*URP1* et représenterait ainsi un éventuel pseudogène *URP1-like*. En accord avec ces données, d'autres gènes (*PTTG1* et *LMNB1*), voisins chez les téléostéens du locus d'*URP1*, sont également retrouvés aux alentours de ce gène « *URP1-*

like » chez l'Homme (Parmentier *et al.*, 2011). Enfin, alors qu'il était admis que l'URP n'existait que dans la lignée des tétrapodes (Parmentier *et al.*, 2011), son gène a récemment été identifié dans le génome de plusieurs poissons téléostéens (Quan *et al.*, 2012 ; Tostivint *et al.*, 2014) (Fig. 16).

### 1.3. Localisation de l'UII et de l'URP

#### 1.3.1. Localisation périphérique

L'UII et l'URP présentent une large distribution périphérique, en particulier au niveau des systèmes cardiovasculaire, rénal et endocrine (Tab. 5).

**Tableau 5 : Localisation périphérique de l'UII et de l'URP chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris.**

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
<b>Système cardiovasculaire</b>				
<b>Cœur</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Sugo <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004	Ames <i>et al.</i> , 1999	Ames <i>et al.</i> , 1999; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i> , 2008*
<i>Myocarde</i>	Douglas <i>et al.</i> , 2002		Dai <i>et al.</i> , 2008; Nakayama <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
<i>Oreillettes</i>	Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Douglas <i>et al.</i> , 2002; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Sugo <i>et al.</i> , 2003	
<i>Ventricules</i>	Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Tzanidis <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Dai <i>et al.</i> , 2008; Nakayama <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
<b>Aorte thoracique</b>	Matsushita <i>et al.</i> , 2001	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Maguire <i>et al.</i> , 2008	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
<b>Veines saphènes</b>	Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004			
<b>Plasma</b>	Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Dschietzig <i>et al.</i> , 2002; Ng <i>et al.</i> , 2002; Richards <i>et al.</i> , 2002; Russel <i>et al.</i> , 2003; Heringlake <i>et al.</i> , 2004; Lapp <i>et al.</i> , 2004; Joyal <i>et al.</i> , 2006; Ban <i>et al.</i> , 2009		Song <i>et al.</i> , 2006a; Wang <i>et al.</i> , 2011	
<b>Système endocrinien</b>				
<b>Hypophyse</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Totsune <i>et al.</i> , 2001		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Dubessy <i>et al.</i> , 2008
<b>Pancréas</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003; Silvestre <i>et al.</i> , 2004	
<b>Surrénales</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Maguire <i>et al.</i> , 2004		Sugo <i>et al.</i> , 2003; Albertin <i>et al.</i> , 2006	

## Le système urotensinergique

<b>Testicules</b>	Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i> , 2008
<b>Ovaires</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	
<b>Placenta</b>	Totsune <i>et al.</i> , 2001; Sugo <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004			
<b>Systèmes uro-génital et gastro-intestinal</b>				
<b>Reins</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Nothacker <i>et al.</i> , 1999; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Sugo <i>et al.</i> , 2003; Langham <i>et al.</i> , 2004	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Song <i>et al.</i> , 2006a; Tian <i>et al.</i> , 2008; Mori <i>et al.</i> , 2009*	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
<i>Tube contourné</i>	Shenouda <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004; Balat <i>et al.</i> , 2007		Song <i>et al.</i> , 2006; Tian <i>et al.</i> , 2008	
<i>Glomérule</i>	Shenouda <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004; Balat <i>et al.</i> , 2007			Adebiyi <i>et al.</i> , 2014
<i>Tube collecteur</i>	Shenouda <i>et al.</i> , 2002; Maguire <i>et al.</i> , 2004		Song <i>et al.</i> , 2006a	
<b>Prostate</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	
<b>Estomac</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Dubessy <i>et al.</i> , 2008
<b>Intestin</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Dubessy <i>et al.</i> , 2008*
<b>Foie</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003*; Wang <i>et al.</i> , 2011	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
<b>Autres tissus</b>				
<b>Thymus</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003		Sugo <i>et al.</i> , 2003	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999
<b>Rate</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
<b>Poumons</b>	Sugo <i>et al.</i> , 2003; Maguire <i>et al.</i> , 2004		Sugo <i>et al.</i> , 2003*	Qi <i>et al.</i> , 2004
<b>Muscles squelettiques</b>		Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002		Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i> , 2008; Wang <i>et al.</i> , 2009
<b>Cellules immunitaires</b>	Sugo <i>et al.</i> , 2003; Bousette <i>et al.</i> , 2004; Kristof <i>et al.</i> , 2010			

Les références suivies d'une étoile (\*) indiquent la présence simultanée des deux peptides. En noir, travaux ayant démontré la présence dans les différents tissus des ARNm de l'UII ou de l'URP ; en rouge, travaux rapportant la présence d'une immunoréactivité *UII-like*.

Chez l'Homme, des niveaux élevés d'expression de l'UII sont retrouvés dans le myocarde (Douglas *et al.*, 2002), les oreillettes et les ventricules (Matsushita *et al.*, 2001 ; Dschietzig *et al.*, 2002 ; Maguire *et al.*, 2004). Ce peptide est également retrouvé dans le cœur de Rat (Ames *et al.*, 1999 ; Sugo *et al.*, 2003) et de Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002 ; Dubessy *et al.*, 2008). Au niveau vasculaire, les ARNm codant la prépro-UII ont été détectés dans le réseau artériel, essentiellement dans l'aorte thoracique, les artères pulmonaires et les artérioles. En

revanche, ils sont quasiment absents du réseau veineux, exception faite des veines saphènes et ombilicales (Matsushita *et al.*, 2001 ; Dschietzig *et al.*, 2002 ; Maguire *et al.*, 2004).

### 1.3.2. Localisation centrale

Initialement observée dans le SNC de poissons téléostéens (Yulis et Lederis, 1986), la présence de l'UII a par la suite été décrite dans le cerveau d'un tétrapode, la Grenouille verte *Rana ridibunda* (Chartrel *et al.*, 1996) avec une immunoréactivité principalement associée aux motoneurons du noyau hypoglosse du tronc cérébral et de la corne ventrale de la moelle épinière. L'expression de l'UII dans cette sous-population neuronale existe également dans les noyaux des nerfs crâniens abducens, facial, trijumeau et hypoglosse de Rat (Coulouarn *et al.*, 1999 ; Dun *et al.*, 2001) et ceux de la partie caudale de la moelle épinière de Souris (Coulouarn *et al.*, 1999 ; Egginger *et al.*, 2006), de Rat (Coulouarn *et al.*, 1999 ; Dun *et al.*, 2001) et de l'Homme (Coulouarn *et al.*, 1998 ; Ames *et al.*, 1999) (Tab. 6). De façon inattendue, l'UII est apparemment absente du tronc cérébral chez le Singe (Ames *et al.*, 1999 ; Elshourbagy *et al.*, 2002). Enfin, de faibles quantités de ce peptide ont été détectées dans des extraits de LCR chez l'Homme (Thompson *et al.*, 2003 ; Cowley *et al.*, 2005).

**Tableau 6 : Localisation centrale de l'UII et de l'URP chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris.**

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
<b>Cerveau</b>	Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Sugo <i>et al.</i> , 2003*	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
<i>Hypothalamus</i>	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Egginger <i>et al.</i> , 2011	Dubessy <i>et al.</i> , 2008
<b>Tronc cérébral</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2001; Ng <i>et al.</i> , 2002		Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Dun <i>et al.</i> , 2001; Pelletier <i>et al.</i> , 2002	
<b>Moelle épinière</b>	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Ames <i>et al.</i> , 1999; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Coulouarn <i>et al.</i> , 1998; Dun <i>et al.</i> , 2001; Pelletier <i>et al.</i> , 2002; Sugo <i>et al.</i> , 2003	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Pelletier <i>et al.</i> , 2002; Dubessy <i>et al.</i> , 2008; Egginger <i>et al.</i> , 2011
<b>Cervelet</b>	Sugo <i>et al.</i> , 2003	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999	Coulouarn <i>et al.</i> , 1999; Dubessy <i>et al.</i> , 2008
<b>LCR</b>	Thompson <i>et al.</i> , 2003; Cowley <i>et al.</i> , 2005			

Les références suivies d'une étoile (\*) indiquent la présence simultanée des deux peptides. En noir, travaux ayant démontré la présence dans les différents tissus des ARNm de l'UII ou de l'URP ; en rouge, travaux rapportant la présence d'une immunoréactivité *UII-like*. LCR, liquide céphalo-rachidien.

Malgré sa découverte en 2003, la distribution de l'URP dans le SNC n'est pas encore clairement établie. Les ARNm codant le peptide sont présents dans la moelle épinière chez l'Homme et le Rat, avec des niveaux d'expression largement inférieurs à ceux de l'UII (Sugo *et al.*, 2003). Chez la Souris, ces ARNm sont retrouvés au niveau du tronc cérébral et dans des motoneurons de la corne antérieure de la moelle épinière ainsi que dans les somas neuronaux de l'aire préoptique, au niveau des fibres de l'organe vasculaire de la lame terminale et de l'éminence médiane (Dubessy *et al.*, 2008).

## **2. Le récepteur de l'urotensine II**

### **2.1. Découverte et structure**

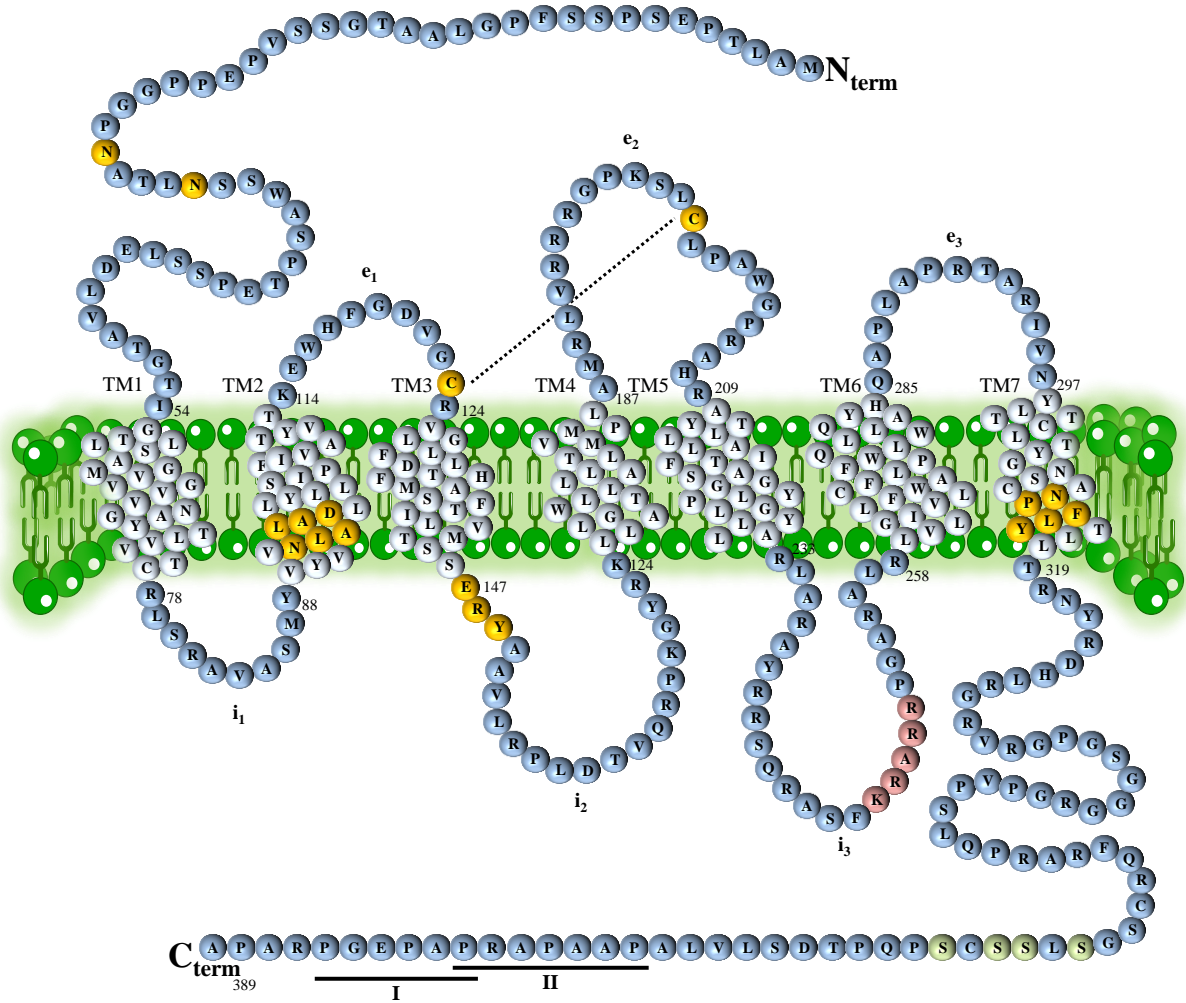
Le récepteur de l'UII a initialement été découvert par deux approches différentes, d'une part à partir d'extraits de tissus sensoriels de rats (Tal *et al.*, 1995) et d'autre part *in silico* dans une banque de données génomiques (Marchese *et al.*, 1995). A ce stade, ce récepteur orphelin fut nommé *sensory epithelium neuropeptide-like receptor* (SENR) par le premier groupe et GPR14 (selon la nomenclature en vigueur) par le second. Par une stratégie de pharmacologie inverse, consistant à cribler une série de ligands potentiels sur une lignée exprimant le récepteur d'intérêt, plusieurs équipes ont par la suite démontré que l'UII est le ligand naturel du GPR14 (Ames *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 1999 ; Mori *et al.*, 1999 ; Nothacker *et al.*, 1999), depuis renommé par l'Union Internationale de la Pharmacologie de Base et Clinique (IUPHAR) *urotensin II receptor* ou UT (Douglas et Ohlstein, 2000). L'UT est retrouvé chez de nombreuses espèces de tétrapodes avec une séquence protéique particulièrement conservée chez les primates (Tab. 7), suggérant que le système urotensinergique rempli des fonctions particulièrement importantes.

**Tableau 7 : Pourcentages d'homologie des séquences protéiques de l'UT entre différentes espèces de tétrapodes.**

Bonobo	Homme	Gorille	Gibbon	Babouin	Macaque	Marmouset	Otolemur	Souris	Rat	Vache	Mouton	Chien	Chat	Poulet	
98	98	90	97	95	95	94	77	75	75	72	71	73	75	54	<b>Chimpanzé</b>
	98	86	97	94	94	92	75	71	72	69	60	71	70	54	<b>Bonobo</b>
		89	97	95	95	93	76	74	74	72	70	73	74	54	<b>Homme</b>
			89	88	88	87	75	70	71	70	68	69	71	49	<b>Gorille</b>
				95	95	93	77	75	75	72	70	73	75	54	<b>Gibbon</b>
					98	92	78	74	75	73	71	74	75	54	<b>Babouin</b>
						92	78	74	75	73	71	73	75	54	<b>Macaque</b>
							76	74	74	72	71	72	74	53	<b>Marmouset</b>
								77	77	76	73	79	79	57	<b>Otolemur</b>
									90	75	74	76	77	59	<b>Souris</b>
										76	74	76	77	58	<b>Rat</b>
											93	84	83	56	<b>Bovin</b>
												81	79	55	<b>Mouton</b>
													89	56	<b>Chien</b>
														58	<b>Chat</b>

Les valeurs sont calculées grâce au logiciel ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>).

A l'image de l'ensemble des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG) de classe A, à laquelle il appartient, l'UT possède deux sites de N-glycosylation dans sa région N-terminale, un motif NLxxxD (où « x » représente un résidu quelconque) localisé dans sa deuxième portion transmembranaire (TM2) ainsi qu'un pont disulfure entre la première et la deuxième boucle extracellulaire (Fig. 17). Le récepteur UT renferme également un motif E/DRY d'interaction aux protéines G, à la jonction du TM3 et de la boucle intracellulaire, un motif NPxxY dans le TM7, des sites potentiels de phosphorylation par des protéines kinases A et C, la *casein kinase I* et la *glycogen synthase kinase 3* au niveau des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> boucles intracellulaires (Marchese *et al.*, 1995 ; Tal *et al.*, 1995 ; Proulx *et al.*, 2008a). Plus récemment, des séquences incluses dans les TM 3, 4 et 5 ont été identifiées comme responsables de la formation d'une « poche » physique permettant la liaison du ligand (Sainsily *et al.*, 2014), ainsi qu'une séquence de localisation nucléaire (KRARR), présente dans la 3<sup>ème</sup> boucle intracellulaire, permettant l'adressage du récepteur dans le compartiment nucléaire (Chatenet *et al.*, 2012) (Fig. 17).



**Figure 17 : Représentation schématique de la structure de l'UT humain.** Les acides aminés représentés en jaune sont des résidus hautement conservés au sein de la classe A des RCPG dont l'UT fait partie : deux sites de N-glycosylation dans la partie N<sub>term</sub>, un motif NLxxxD dans le TM2, un pont disulfure entre la 1<sup>ère</sup> et la 2<sup>ème</sup> boucle extracellulaire (e<sub>1</sub> et e<sub>2</sub>), un motif ERY d'interaction aux protéines G dans la boucle intracellulaire 2 (i<sub>2</sub>) et un motif NPxxY dans le TM7. En plus de ces motifs consensus, l'UT humain possède des sites de phosphorylation (en vert) ainsi que deux motifs polyprolines I et II dans la partie C<sub>term</sub>. Une séquence de localisation nucléaire (en rouge) a également été identifiée dans la boucle i<sub>3</sub>. C<sub>term</sub>, extrémité C-terminale ; N<sub>term</sub>, extrémité N-terminale ; TM1-7, domaines transmembranaires 1 à 7.

Ce phénomène d'internalisation de récepteur a déjà été décrit par le passé pour d'autres RCPG liant des peptides vasoactifs, *i.e.* les récepteurs de l'ET-1 (Boivin *et al.*, 2003) et de l'Ang-2 (Lee *et al.*, 2004). L'hypothèse d'une internalisation de l'UT est corroborée par de nombreuses études indépendantes, qui montrent que l'UT est notamment localisé dans les noyaux de cellules cardiaques de Rat (Doan *et al.*, 2012) et cérébrales de Singe (Nguyen *et al.*, 2012), ainsi que dans des lignées cellulaires issues d'un neuroblastome et d'un glioblastome (Nguyen *et al.*, 2012). En comparant les séquences des UT hominoïdes et



murines, seules les formes humaines du récepteur possèdent dans l'extrémité C-terminale deux motifs polyprolines de types I et II, essentiels pour l'interaction avec des protéines contenant des domaines de type *src homology 3* (SH3). Ces caractéristiques interspèces suggèrent que certaines voies de signalisation seraient sélectivement activées par la liaison de différents ligands sur les récepteurs de primates ou murins.

Des études d'interaction entre l'UII et l'UT de Rat ont notamment révélé l'importance des aa des segments TM6 et 7 (Holleran *et al.*, 2009) et des résidus M<sup>184</sup> et M<sup>185</sup> du TM5 (Boucard *et al.*, 2003). Dans le cas de l'UT humain, seules les 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> boucles extracellulaires adoptent une conformation en hélice  $\alpha$  (Boivin *et al.*, 2006 ; 2008). En revanche, dépourvue de structure tridimensionnelle particulière, la 1<sup>ère</sup> boucle n'est pas recrutée dans la liaison avec les peptides (Boivin *et al.*, 2006), indiquant que cette conformation en hélice  $\alpha$  des deux TM suivants est indispensable. Il a été également proposé que le résidu Asp<sup>4</sup> de l'UII humaine se rapproche des résidus Leu<sup>288</sup> et Ala<sup>289</sup> du récepteur et que la portion cyclique partage des liaisons hydrophobes avec le TM7 (Boivin *et al.*, 2008). Finalement, le développement d'une modélisation 3D du récepteur UT humain a confirmé l'implication des boucles extracellulaires 2 et 3 dans l'interaction ligand-récepteur et a démontré que les TM3, 4, 6 et 7 sont également sollicités dans cette interaction (Lescot *et al.*, 2008).

## **2.2. Localisation de l'UT**

### **2.2.1. Localisation périphérique**

La présence de quantités importantes d'UII dans le système cardiovasculaire a conduit plusieurs groupes à rechercher l'expression des ARNm codant l'UT dans les différents tissus qui le composent (Tab. 8). Chez l'Homme ou les primates non humains, des niveaux élevés d'ARNm codant l'UT ont été relevés dans le myocarde (Douglas *et al.*, 2002), les oreillettes

## Le système urotensinergique

(Ames *et al.*, 1999 ; Matsushita *et al.*, 2001 ; Totsune *et al.*, 2001 ; Elshourbagy *et al.*, 2002)

et les ventricules (Ames *et al.*, 1999 ; Maguire *et al.*, 2000 ; Totsune *et al.*, 2001).

**Tableau 8 : Localisation périphérique de l'UT chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris.**

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
<b>Système cardiovasculaire</b>				
Cœur	Ames <i>et al.</i> , 1999; Totsune <i>et al.</i> , 2003; Douglas <i>et al.</i> , 2004b		Nothacker <i>et al.</i> , 1999; Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Tzanidis <i>et al.</i> , 2003; Gong <i>et al.</i> , 2004; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Doan <i>et al.</i> , 2012	Liu <i>et al.</i> , 1999; Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Myocarde	Douglas <i>et al.</i> , 2002		Dai <i>et al.</i> , 2008	
Oreillettes	Ames <i>et al.</i> , 1999; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Totsune <i>et al.</i> , 2003; Leonard <i>et al.</i> , 2009	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Zhang <i>et al.</i> , 2007; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
Ventricules	Ames <i>et al.</i> , 1999; Maguire <i>et al.</i> , 2000; Totsune <i>et al.</i> , 2001	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Johns <i>et al.</i> , 2004; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	
Aorte thoracique	Ames <i>et al.</i> , 1999; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Leonard <i>et al.</i> , 2009	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Maguire <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Artère basilaire			Porras-González <i>et al.</i> , 2014	
<b>Système endocrinien</b>				
Hypophyse	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Jégou <i>et al.</i> , 2006	
Pancréas	Ames <i>et al.</i> , 1999; Douglas <i>et al.</i> , 2004b	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Surrénales	Totsune <i>et al.</i> , 2001; Takahashi <i>et al.</i> , 2003; Zeng <i>et al.</i> , 2006; Morimoto <i>et al.</i> , 2008; Giuliani <i>et al.</i> , 2009	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Albertin <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Testicules	Douglas <i>et al.</i> , 2004b		Gartlon <i>et al.</i> , 2001	
Placenta	Totsune <i>et al.</i> , 2001			
<b>Systèmes uro-génital et gastro-intestinal</b>				
Reins	Maguire <i>et al.</i> , 2000; Matsushita <i>et al.</i> , 2001; Totsune <i>et al.</i> , 2001; 2003; Langham <i>et al.</i> , 2004	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Song <i>et al.</i> , 2006a; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Tian <i>et al.</i> , 2008; Hirose <i>et al.</i> , 2009; Mori <i>et al.</i> , 2009; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Adebiyi, 2014
Vessie				Liu <i>et al.</i> , 1999; Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002
Estomac		Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002		
Foie			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<b>Autres tissus ou cellules</b>				
Rate			Gartlon <i>et al.</i> , 2001	
Poumons		Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002	Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
Muscles squelettiques	Douglas <i>et al.</i> , 2004b; Qi <i>et al.</i> , 2005; Maguire <i>et al.</i> , 2008	Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Wang <i>et al.</i> , 2009
Cellules immunitaires	Bousette <i>et al.</i> , 2004; Segain <i>et al.</i> , 2007		Segain <i>et al.</i> , 2007	

Au niveau vasculaire, l'UT est localisé dans l'aorte thoracique (Ames *et al.*, 1999 ; Matsushita *et al.*, 2001 ; Leonard *et al.*, 2009) ainsi que dans les artères pulmonaires et coronaires (Maguire *et al.*, 2000). En revanche, le récepteur est très faiblement exprimé voire absent dans les veines caves (Ames *et al.*, 1999) et saphènes (Matsushita *et al.*, 2001 ; Maguire *et al.*, 2008) (Tab. 8).

A l'image de l'UII, l'expression de l'UT est particulièrement importante au niveau rénal chez le Rat (Gartlon *et al.*, 2001 ; Song *et al.*, 2006 ; Maguire *et al.*, 2008 ; Tian *et al.*, 2008 ; Hirose *et al.*, 2009 ; Mori *et al.*, 2009 ; Nguyen *et al.*, 2012) et l'Homme (Maguire *et al.*, 2000 ; Matsushita *et al.*, 2001 ; Totsune *et al.*, 2001, 2003 ; Langham *et al.*, 2004) avec toutefois des niveaux d'expression modérés chez le Singe (Nguyen *et al.*, 2012). L'UT est aussi présent dans le système endocrinien, notamment dans l'hypophyse, le pancréas ou la glande surrénale chez l'Homme (Ames *et al.*, 1999 ; Totsune *et al.*, 2001), le Singe et la Souris (Elshourbagy *et al.*, 2002). Dans une moindre mesure, des niveaux d'ARNm ont été détectés chez le Rat et l'Homme dans le testicule et le corps caverneux (Gartlon *et al.*, 2001 ; d'Emmanuele di Villa Bianca *et al.*, 2010) et l'hypophyse de Rat (Jégou *et al.*, 2006) et de la Daurade (Kalamarz-Kubiak *et al.*, 2014). Enfin, d'autres tissus périphériques présentent des niveaux d'expression significatifs d'UT, variables d'une espèce à l'autre (Tab. 8).

### **2.2.2. Localisation centrale**

Largement exprimés dans le SNC, les ARNm codant l'UT sont particulièrement abondants au niveau du tronc cérébral et de la moelle épinière (Liu *et al.*, 1999 ; Gartlon *et al.*, 2002 ; Totsune *et al.*, 2001 ; 2003 ; Jégou *et al.*, 2006). Les autres régions du SNC, *i.e.* le cortex, l'hypothalamus ou le thalamus présentent des niveaux d'expression relativement faibles avec une variabilité inter-espèces. L'UT est aussi associé aux vaisseaux sanguins cérébraux, principalement dans les cellules endothéliales des microvaisseaux (Spinazzi *et al.*, 2006).

Enfin, dans le tronc cérébral et l'hypothalamus de Rat, l'expression du récepteur a été relevée à la fois dans les neurones (Jégou *et al.*, 2006) et dans une sous-population d'astrocytes (Lin *et al.*, 2003a).

**Tableau 9 : Localisation centrale de l'UT chez l'Homme, le Singe, le Rat et la Souris.**

Tissus	Homme	Singe	Rat	Souris
<b>Cerveau</b>		Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Clark <i>et al.</i> , 2001; Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<i>Amygdale</i>			Jégou <i>et al.</i> , 2006	
<i>Bulbe olfactif</i>			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006	
<i>Cortex</i>			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<i>Hippocampe</i>			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<i>Hypothalamus</i>	Totsune <i>et al.</i> , 2001		Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Lin <i>et al.</i> , 2003a; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<i>Thalamus</i>			Jégou <i>et al.</i> , 2006	
<b>Cervelet</b>			Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<b>Tronc cérébral</b>	Totsune <i>et al.</i> , 2001;		Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Lin <i>et al.</i> , 2003a; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2007; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	
<b>Moelle épinière</b>	Totsune <i>et al.</i> , 2001;	Elshourbagy <i>et al.</i> , 2002; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Gartlon <i>et al.</i> , 2001; Jégou <i>et al.</i> , 2006; Maguire <i>et al.</i> , 2008; Nguyen <i>et al.</i> , 2012	Liu <i>et al.</i> , 1999

## 2.3. Pharmacologie de l'UT

### 2.3.1. Relations structure/activité

Les puissantes propriétés vasoactives de l'UII ont rapidement conduit plusieurs groupes à développer des analogues urotensinergiques susceptibles d'être utilisés dans le traitement de pathologies du système cardiovasculaire. Les premiers travaux menés dans cette perspective ont consisté à caractériser la portion cyclique (hUII<sub>4-11</sub>) biologiquement active des ligands naturels de l'UT, *i.e.* l'UII humaine (hUII) et l'URP, comme étant la séquence minimale biologiquement active des ligands naturels. La substitution du résidu Cys<sup>5</sup> par une Ala

entraîne une perte importante (200 à 1000 fois) de la puissance biologique (Perkins *et al.*, 1990 ; Flohr *et al.*, 2002 ; Labarrère *et al.*, 2003).

Le remplacement par une Ala ou par son énantiomère dextrogyre de chacun des trois résidus N-terminaux de l'UII n'a aucun impact sur l'activité biologique du peptide (Flohr *et al.*, 2002 ; Kinney *et al.*, 2002 ; Brkovic *et al.*, 2003 ; Labarrère *et al.*, 2003). De manière similaire, l'[Ala<sup>11</sup>]UII-NH<sub>2</sub> et la [D-Val<sup>11</sup>]UII-NH<sub>2</sub> conservent tous deux des propriétés contractiles modérées, le second analogue est deux fois moins puissant que le premier, indiquant que l'orientation de la chaîne C-terminale est essentielle (Labarrère *et al.*, 2003).

Concernant la partie cyclique des peptides, les résultats montrent de façon unanime que toute modification structurale se traduit par un changement drastique de leur efficacité. A titre d'exemple, la substitution par une alanine ou par leur énantiomère dextrogyre des résidus Phe<sup>6</sup>, Trp<sup>7</sup>, Lys<sup>8</sup> ou Tyr<sup>9</sup> pour l'UII, et Phe<sup>3</sup>, Lys<sup>5</sup> et Trp<sup>6</sup> pour l'URP conduit systématiquement à des analogues inactifs (Brkovic *et al.*, 2003 ; Labarrère *et al.*, 2003 ; Chatenet *et al.*, 2004). Une perte d'activité biologique est également observée après remplacement des résidus Cys responsables de la formation du pont disulfure (Labarrère *et al.*, 2003 ; Chatenet *et al.*, 2004 ; Guerrini *et al.*, 2005). En revanche, le maintien de la structure cyclique à l'aide d'une unité alanyl-alanyl, en lieu et place des Cys formant le pont disulfure des ligands naturels, permet de conserver une activité agoniste des ligands synthétisés (Foister *et al.*, 2006). Ces données mettent clairement en évidence le rôle essentiel de la portion cyclique des peptides urotensinergiques. De façon intéressante, des « super agonistes » ont été obtenus après substitution de la Cys<sup>5</sup> par une pénicillamine (Pen<sup>5</sup>) (Grieco *et al.*, 2002, Carotenuto *et al.*, 2014) (Tab. 10).

Sur la base de ces données, des modifications du domaine cyclique de l'UII et de l'URP ont été réalisées pour développer des antagonistes peptidiques de l'UT (Tab. 10). Les premiers candidats intéressants ont été obtenus par substitution de la Lys<sup>8</sup> de l'hUII ou de la

Lys<sup>5</sup> de l'URP par une ornithine, un aa dont la chaîne latérale est plus courte d'un carbone, permettant ainsi d'agir sur l'occupation du ligand sur le site de liaison du récepteur (Camarda *et al.*, 2002 ; Vergura *et al.*, 2004 ; Guerrini *et al.*, 2005) (Tab. 10). Testée sur la contraction d'anneaux d'aorte de rats induite par l'UII humaine, l'[Orn<sup>8</sup>]hUII se comporte comme un antagoniste compétitif tout en conservant une activité agoniste modérée sur la mobilisation calcique de cellules exprimant l'UT de Rat ou d'Homme (Camarda *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'[Orn<sup>5</sup>]URP qui agit comme un antagoniste sur l'UT de Rat (Diallo *et al.*, 2008), conserve une activité agoniste résiduelle sur l'UT humain (Chatenet *et al.*, 2004 ; Desrues *et al.*, 2012) (Tab. 10). Ces différentes observations ont été mises à profit pour élaborer l'analogue [Pen<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7</sup>, Orn<sup>8</sup>]hUII<sub>4-11</sub> ou urantide, un puissant antagoniste dépourvu d'activité intrinsèque sur des modèles d'aorte de rats (Patacchini *et al.*, 2003 ; Camarda *et al.*, 2004). Toutefois, testé *in vitro* sur des cellules *chinese ovary hamster* (CHO) exprimant la forme humaine de l'UT, ce candidat potentiellement intéressant possède lui-aussi, dans ce modèle, une activité agoniste résiduelle (Camarda *et al.*, 2004).

**Tableau 10 : Principaux composés agonistes et antagonistes du récepteur UT.**

Nature	Composé		Espèce cible	Modèle expérimental	Références
	Nom	Activité			
Peptidique	[Pen <sup>5</sup> ]UII <sub>4-11</sub> (P5U)	Agoniste	Rat	Contraction d'aorte	Carotenuto <i>et al.</i> , 2014
	[Orn <sup>8</sup> ]hUII	Agoniste	Homme	Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2002
		Antagoniste	Rat	Mobilisation calcique Contraction d'aorte	
	[Orn <sup>5</sup> ]URP	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	
		Agoniste	Rat	Mobilisation calcique Contraction d'aorte	Diallo <i>et al.</i> , 2008 Chatenet <i>et al.</i> , 2004
	[D-W <sup>4</sup> ]URP	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Chatenet <i>et al.</i> , 2004; Diallo <i>et al.</i> , 2008
		Agoniste	Rat	Mobilisation calcique	Diallo <i>et al.</i> , 2008
	[D-W <sup>6</sup> ]URP	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Chatenet <i>et al.</i> , 2004
		Agoniste	Rat	Mobilisation calcique	Diallo <i>et al.</i> , 2008
	[Pen <sup>5</sup> , D-W <sup>7</sup> , Orn <sup>8</sup> ]hUII <sub>4-11</sub> (urantide)	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Patacchini <i>et al.</i> , 2003; Camarda <i>et al.</i> , 2004; Behm <i>et al.</i> , 2006
Rat/Homme			Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2004	
Rat			Sécrétion de TGFβ et synthèse de collagène	Dai <i>et al.</i> , 2007	

<b>Peptidique</b>	<b>[Pen<sup>5</sup>, D-W<sup>7</sup>, Orn<sup>8</sup>]hU<sub>II</sub><sub>4-11</sub></b> (urantide)	Antagoniste	Rat	Rougisement de l'oreille	Qi <i>et al.</i> , 2007
			Lapin	Rigidité des muscles papillaires du myocarde	Fontes-Sousa <i>et al.</i> , 2007
			Rat	Sécrétion d'insuline	Marco <i>et al.</i> , 2008
			Rat	Synthèse et sécrétion de collagène	Zhang <i>et al.</i> , 2008b
			Rat	Hypertrophie de cardiomyocytes	Gruson <i>et al.</i> , 2010; Gao <i>et al.</i> , 2010; Esposito <i>et al.</i> , 2011
			Homme	Motilité et invasion des cellules LNCaP	Grieco <i>et al.</i> , 2011
			Rat	Phosphorylation d'Akt et ERK	Chen <i>et al.</i> , 2012
			Rat	Cardio-protection	Gao <i>et al.</i> , 2012
		Agoniste	Homme	Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2004; 2006
			Chat	Contraction d'aorte et d'artère fémorale	Behm <i>et al.</i> , 2006
	Singe		Contraction d'artères rénale et mésentérique		
	<b>[Pen<sup>5</sup>, D-W<sup>7</sup>, Dab<sup>8</sup>]hU<sub>II</sub><sub>4-11</sub></b> (UFP-803)	Antagoniste	Rat	Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2006
			Homme	Contraction d'aorte	
		Souris	Extravasation de plasma		
		Rat	Mobilisation calcique Sécrétion de neurotransmetteurs	Ono <i>et al.</i> , 2008	
	Agoniste	Homme	Mobilisation calcique	Camarda <i>et al.</i> , 2004	
	<b>SB-710411</b>	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Behm <i>et al.</i> , 2002; 2004; 2006
				Formation d'IP <sub>3</sub>	Behm <i>et al.</i> , 2004a
			Chat	Contraction d'artère fémorale	Behm <i>et al.</i> , 2004b; 2006
		Rat	Prolifération de cellules hépatiques Fibrose hépatique Sécrétion de TGFβ	Wang <i>et al.</i> , 2009	
		Agoniste	Singe	Contraction d'artère rénale et mésentérique	Behm <i>et al.</i> , 2004a; 2006
	<b>GSK-248451</b>	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Behm <i>et al.</i> , 2004b; 2006
			Chat	Contraction d'aorte et d'artère fémorale	
Singe			Contraction d'artères rénale et mésentérique		
Agoniste	Rat	Contraction d'aorte			
<b>Urocontrine</b>	Antagoniste	Rat	Contraction d'aorte	Chatenet <i>et al.</i> , 2012	

Non-peptidique	<b>AC7954</b> (Isochromanone)	Agoniste	Rat/Homme	R-SAT	Croston <i>et al.</i> , 2002
	<b>FL68</b>	Agoniste	Homme	R-SAT	Lehmann <i>et al.</i> , 2005
	<b>FL204</b>	Agoniste	Homme	R-SAT	Lehmann <i>et al.</i> , 2007
	<b>ACT-058362</b> (Palosuran)	Antagoniste	Homme	Mobilisation calcique Phosphorylation des MAPK	Clozel <i>et al.</i> , 2004
			Rat	Contraction d'aorte	
			Rat	Flux sanguin rénal	Clozel <i>et al.</i> , 2006
			Homme	Excrétion urinaire d'albumine	Sidharta <i>et al.</i> , 2006
			Homme	Angiogenèse	Spinazzi <i>et al.</i> , 2006 Albertin <i>et al.</i> , 2009
			Rat	Flux sanguin rénal Excrétion de sodium	Trebicka <i>et al.</i> , 2008
			Rat	Fibrose pulmonaire	Onat <i>et al.</i> , 2012
			Rat	Hypertension artérielle pulmonaire	Onat <i>et al.</i> , 2013; Pehlivan <i>et al.</i> , 2014
	<b>SB-706375</b>	Antagoniste	Souris/Rat/ Singe/ Homme	Mobilisation calcique	Douglas <i>et al.</i> , 2005
			Rat	Contraction d'aorte	
	<b>SB-611812</b>	Antagoniste	Rat	Resténose après angioplastie	Rakowski <i>et al.</i> , 2005
				Pressions diastolique et systolique Œdème pulmonaire Hypertrophie des cardiomyocytes Dilatation ventriculaire	Bousette <i>et al.</i> , 2006a
Prolifération des fibroblastes cardiaques Fibrose myocardiaque Expression de collagène				Bousette <i>et al.</i> , 2006b	
<b>GSK1562590</b>	Antagoniste	Chat/ Homme	Contraction d'artère fémorale et d'aorte thoracique	Behm <i>et al.</i> , 2010	

Le tableau répertorie les composés de nature peptidique (colonne bleue) et non peptidique (colonne blanche). ERK, *extracellular signal-regulated kinase* ; IP<sub>3</sub>, inositol triphosphate ; MAPK, *mitogen-activated protein kinases* ; R-SAT, *receptor selection and amplification technology* ; TGF-β, *transforming growth factor β*.

### 2.3.2. Découverte du palosuran

En 2004, la société Actélion (Bâle, Suisse) a développé un dérivé de l'urée qui se comporte *in vitro*, dans des tests de mobilisation calcique sur des cellules exprimant l'UT humain recombinant, comme un puissant antagoniste (Clozel *et al.*, 2004) (Tab. 10). Appelé ACT-058362 ou palosuran, ce composé a par la suite été testé chez des rats atteints d'une



insuffisance rénale aiguë ischémique (cf. § 4.2). Les résultats montrent que le palosuran améliore la fonction rénale et diminue les lésions associées à la pathologie (Clozel *et al.*, 2004 ; 2006). Ces mêmes auteurs ont observé que l'affinité du palosuran pour l'UT de Rat est modérée, excluant la possibilité de considérer ce composé comme un antagoniste universel.

Compte tenu de ses propriétés prometteuses révélées chez l'animal, le palosuran fut le premier antagoniste de l'UT testé chez l'Homme, sur des patients souffrant d'un diabète de type 2, une pathologie associée au dysfonctionnement rénal (cf. § 4.3.). Malgré des premiers résultats prometteurs (Sidharta *et al.*, 2006), une seconde série de tests n'a pas permis de confirmer l'intérêt thérapeutique du palosuran dans le traitement du diabète (<http://www.actelion.com/en/our-company/news-and-events/index.page?newsId=1209557>), cette molécule s'avérant inefficace dans la modulation de la synthèse d'insuline et la glycémie (Sidharta *et al.*, 2009).

Chez des sujets hypertendus atteints d'une néphropathie diabétique de type 2, il est sans effet notable sur l'albuminurie, la pression sanguine ou le taux de filtration glomérulaire (Vogt *et al.*, 2010). Ces résultats décevants pourraient s'expliquer par une affinité faible des récepteurs pour le palosuran, lorsqu'ils sont exprimés dans le contexte de cellules et de tissus intacts. En effet, l'ensemble des études pharmacologiques sur cet antagoniste présentent la limite d'avoir été réalisées sur des extraits de membranes cellulaires (Behm *et al.*, 2008).

### **3. Rôles physiologiques et physiopathologiques du système urotensinergique**

#### **3.1. Activités biologiques *in vitro* et *ex vivo***

##### **3.1.1. Effets vasoactifs**

La distribution de l'UT et de ses ligands endogènes a amené de nombreux groupes à s'intéresser aux effets de l'UII sur le système cardiovasculaire. Appliquée sur des anneaux aortiques désendothélialisés de Rat (Ames *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 1999 ; Labarrère *et al.*,

2003 ; Chatenet *et al.*, 2004), de Lapin (Saetrum Opgaard *et al.*, 2000), de Macaque (Ames *et al.*, 1999) ou d'Homme (MacLean *et al.*, 2000 ; Maguire *et al.*, 2000 ; 2004 ; 2008 ; Russel *et al.*, 2001 ; Camarda *et al.*, 2002), l'UII provoque une vasoconstriction dose-dépendante. Cet effet est observé à de très faibles doses, à tel point que ce neuropeptide est considéré comme le composé vasoactif naturel le plus puissant, *e.g.* chez le Rat, l'UII est 660 et 16 fois plus puissante que la sérotonine et l'endothéline, respectivement (Ames *et al.*, 1999). L'utilisation d'un inhibiteur de phospholipase C (PLC) et la mesure de l'incorporation d'inositol [<sup>3</sup>H] sur des aortes thoraciques de Lapin ont permis à Saetrum Opgaard et coll. (2000) de démontrer que cette activité vasoconstrictrice est principalement relayée par une mobilisation de calcium d'origines intra- (récepteurs-canaux de l'IP<sub>3</sub> du réticulum endoplasmique) et extracellulaire (canaux calciques de type L de la membrane plasmique) (Gibson, 1987 ; 1988 ; Itoh *et al.*, 1987 ; Rossowski *et al.*, 2002). Plus précisément, l'élévation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> entraîne l'activation de la calmoduline, dont le blocage inhibe les effets de l'UII de Gobie sur la contraction des anneaux d'aortes de Rat (Gibson, 1987), qui stimule à son tour la MLCK responsable de la phosphorylation de la *myosin light chain-2* (MLC-2) et de la contraction d'actomyosine (cf. Chapitre 1, §1.2.4) (Russel et Molenaar, 2004 ; Tasaki *et al.*, 2004). En marge de cette voie principale de signalisation intracellulaire, d'autres mécanismes sont recrutés dans les activités contractiles de l'UII, par le biais notamment de PKC/*extracellular signal-regulated kinase* (ERK) ou RhoA/*rho-associated protein kinase 1* (ROCK) (Sauzeau *et al.*, 2001 ; Rossowski *et al.*, 2002 ; Russel et Molenaar, 2004 ; Tasaki *et al.*, 2004). Bien avant la caractérisation de l'UT, certains travaux avaient aussi établi un lien entre la vasoconstriction induite par l'UII et la production d'acide arachidonique par une phospholipase A<sub>2</sub> (Gibson, 1987), en particulier sur des muscles lisses de Grenouille (Yano *et al.*, 1995). Cette production d'acide arachidonique a ensuite été confirmée dans différentes lignées cellulaires exprimant la forme recombinante de l'UT humain (Mori *et al.*, 1999 ; Lehner *et al.*, 2007).

Appliquée sur des vaisseaux intacts, comme des artères mésentériques, coronaires et basilaires murines (Ames *et al.*, 1999 ; Bottril *et al.*, 2000 ; Porras-González *et al.*, 2014) ou félines (Behm *et al.*, 2004b), ou des artères pulmonaires humaines (MacLean *et al.*, 2000 ; Stirrat *et al.*, 2001), l'UII provoque une vasodilatation relayée par la libération d'oxyde nitrique (NO) (Bottril *et al.*, 2000 ; Katano *et al.*, 2000 ; MacLean *et al.*, 2000 ; Prosser *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2010 ; Bianca *et al.*, 2012). En effet, le blocage spécifique du NO libéré par le compartiment endothélial permet d'observer une vasoconstriction d'artères basilaires de Rat induite par l'UII sur les cellules musculaires lisses (Porras-González *et al.*, 2014). Toujours chez le Rat, la vasodilatation coronaire met également en jeu la production de prostaglandines (Ishihata *et al.*, 2005 ; Chen *et al.*, 2010). Les études réalisées sur le réseau veineux montrent que le peptide exerce une activité vasoconstrictrice sur les veines saphènes et ombilicales humaines (Maguire *et al.*, 2000) ou sur la veine jugulaire de Lapin (Camarda *et al.*, 2002).

En conclusion, les données de la littérature actuellement disponibles indiquent que l'effet vasoactif de l'UII varie selon la nature et la composition des vaisseaux, ainsi que les espèces considérées (Douglas *et al.*, 2000 ; Douglas et Ohlstein, 2000 ; Ross *et al.*, 2010).

### **3.1.2. Effets sur la prolifération, la survie, l'hypertrophie et la migration cellulaires**

Historiquement, l'UII est connue pour ses effets hypertrophiques sur des cardiomyocytes en culture (Tab. 11). De nombreuses études réalisées sur des lignées transfectées avec l'UT humain (Ziltener *et al.*, 2002) et des cellules natives qui expriment le récepteur, *i.e.* cellules épithéliales rénales de Porc (Matsushita *et al.*, 2003) et cellules musculaires lisses de Rat (Zhang *et al.*, 2012), démontrent par ailleurs que l'UII posséderait des propriétés pro-mitogènes qui sont essentiellement relayées par la voie ERK (Tab. 11).

Parmi les voies de signalisation relatives à ERK et associées à l'UT, la transactivation de l'EGFR, sous la dépendance d'une production de *reactive oxygen species* (ROS) par la NADPH oxydase de type 2 (NOX2), a été décrite dans plusieurs modèles expérimentaux (Chen *et al.*, 2008 ; Sue *et al.*, 2009 ; Tsai *et al.*, 2009) ; l'activité de la NOX2 se fait en outre sous contrôle direct de l'UT (Djordjevic *et al.*, 2005). Les ROS lèvent l'inhibition exercée par la protéine *src homology 2 containing tyrosine phosphatase* (SHP-2) sur l'EGFR et permettent la transduction du signal de prolifération cellulaire (Liu *et al.*, 2009 ; Tsai *et al.*, 2009). Ce phénomène de transactivation peut également être sous-tendu par l'activation d'une ADAM qui clive le précurseur de l'EGF, l'*heparin-binding EGF-like growth factor* (HB-EGF), et libère le ligand qui active l'EGFR en conséquence (Onan *et al.*, 2004 ; Sue *et al.*, 2009).

Les effets promitogènes de l'UT sont également relayés par d'autres seconds messagers, comme les PLC et PI<sub>3</sub>K, par le biais d'un couplage du récepteur avec des protéines G sensibles à la toxine pertussique (PTX) (Ziltener *et al.*, 2002), ou plus spécifiquement avec une protéine G de type *i/o*, comme cela a pu être observé sur des cellules recombinantes pour l'UT (Ziltener *et al.*, 2008 ; Song *et al.*, 2006b ; Jarry *et al.*, 2010), des cultures d'astrocytes corticaux natifs de Rat (Desrues *et al.*, 2008 ; Jarry *et al.*, 2010) et des lignées de rhabdomyosarcome (Douglas *et al.*, 2004b). Dans ce dernier cas, les auteurs montrent qu'en présence de PTX, le signal calcique est diminué de 40%, ce qui suggère un double couplage G<sub>q</sub> et G<sub>i/o</sub> du récepteur UT.

Tableau 11 : Voies de transduction associées à l'activation du récepteur UT et impliquées dans les effets promotogènes, hypertrophiques et chimoattractants de l'UHL.

Effets cellulaires	Type cellulaire	Espèce	Voies de Transduction	Références
<b>Prolifération</b>	CML vasculaires	Lapin	PKC, src, MAPK	Watanabe <i>et al.</i> , 2001
	CML vasculaires	Rat	RhoA, ROCK	Sauzeau <i>et al.</i> , 2001
	CHO-UT	Hamster	G <sub>i/o</sub> , PI <sub>3</sub> K, PLC, calmoduline, MEK, Ca <sup>2+</sup> extracellulaire	Ziltener <i>et al.</i> , 2002
	Cellules épithéliales rénales	Porc	Ca <sup>2+</sup> (canaux voltage-dépendant), PKC, MAPK, ERK, c-myc	Matsushita <i>et al.</i> , 2003
	CML des voies aériennes	Rat	PKC, MAPK, Ca <sup>2+</sup> , calcineurine	Chen <i>et al.</i> , 2001
	Fibroblastes cardiaques		Transactivation de l'EGFR, ERK, ROS	Chen <i>et al.</i> , 2008
	Cellules tubulaires		ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR via HB-EGF	Sue <i>et al.</i> , 2009
	CML		Ca <sup>2+</sup> , CaMK, ERK, PKD	Iglewski et Grant, 2010
	Précurseurs endothéliaux	Rat	ERK, p38MAPK	Xu <i>et al.</i> , 2012
	CML pulmonaires		ERK, TGFβ	Zhang <i>et al.</i> , 2012
	CML pulmonaires	Homme	NOX, ROS, ERK, p38MAPK, c-jun, Akt, expression de PAI-1	Djordjevic <i>et al.</i> , 2005
			NOX4, ROS, FoxO3, JNK, MMP-2	Diebold <i>et al.</i> , 2011
	Astrocytes	Rat	PLC, Ca <sup>2+</sup> intra- et extracellulaire (canaux de type T), IP <sub>3</sub> , G <sub>i/o</sub>	Jarry <i>et al.</i> , 2010
	Fibroblastes		MAPK, expression de VEGF, production de collagène	Song <i>et al.</i> , 2012
	CML aortiques		ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR	Tsai <i>et al.</i> , 2009
	Cellules endothéliales ombilicales	Homme	p38MAPK, ERK	Lee <i>et al.</i> , 2014
Précurseurs cardiaques	Souris	JNK, LRP6	Chen <i>et al.</i> , 2014	
<b>Survie</b>	CML vasculaires	Rat	N.D.	Esposito <i>et al.</i> , 2011
	Cardiomyocytes		PI <sub>3</sub> K, ERK	Chen <i>et al.</i> , 2012
<b>Hypertrophie</b>	Cardiomyocytes-UT	Rat	G <sub>q</sub> , Ras	Tzanidis <i>et al.</i> , 2003
			Transactivation de l'EGFR via HB-EGF, ERK, p38MAPK	Onan <i>et al.</i> , 2004
	ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR		Liu <i>et al.</i> , 2009	
	Cardiomyocytes		PI <sub>3</sub> K, Akt, GSK-3β	Gruson <i>et al.</i> , 2010
ROS, NADPH oxydase, Akt, GSK-3β, PTEN		Chao <i>et al.</i> , 2014		

<b>Migration, motilité</b>	Monocytes	Homme	RhoA, ROCK	Segain <i>et al.</i> , 2007
	Progéniteurs endothéliaux	Rat	RhoA/ROCK, MLC	Xu <i>et al.</i> , 2009
	Adénocarcinome prostatique (LNCaP)	Homme	RhoA, FAK	Grieco <i>et al.</i> , 2011
	CML vasculaires		MEK	Matsusaka et Wakabayashi, 2006
	Fibroblastes vasculaires	Rat	PKC, ROCK, calcineurine, MAPK	Zhang <i>et al.</i> , 2008b; 2011
	Progéniteurs endothéliaux		N.D.	Yi <i>et al.</i> , 2012
	Carcinomes colorectaux	Homme	N.D.	Federico <i>et al.</i> , 2014
	Cancer de la vessie		N.D.	Franco <i>et al.</i> , 2014

Akt, protéine kinase B ; CaMK, calmoduline kinase ; CHO-UT, lignée *chinese hamster ovary* transfectée avec la forme humaine du récepteur UT ; CML, cellules musculaires lisses ; EGFR, *epidermal growth factor receptor* ; ERK, *extracellular signal-regulated kinase* ; FAK, *focal adhesion kinase* ; FoxO3, *forkhead box O3* ; GSK-3 $\beta$ , *glycogen synthase kinase 3 $\beta$*  ; HB-EGF, *heparin-binding EGF-like growth factor* ; IL-8, interleukine 8 ; IP<sub>3</sub>, inositol triphosphate ; LRP6, *low density lipoprotein receptor-related protein 6* ; JNK, c-Jun N-terminal kinase ; MAPK, *mitogen-activated protein kinase* ; MEK, *extracellular signal-regulated kinase* ; MLC, *myosin light chain* ; MMP-2, métalloprotéase matricielle de type 2 ; NOX, NADPH oxydase ; p38MAPK, p38 *mitogen-activated protein kinase* ; PAI-1, *plasminogen activator inhibitor-1* ; PI<sub>3</sub>K, phosphoinositide-3 kinase ; PKC, protéine kinase C ; PKD, protéine kinase D ; PLC, phospholipase C ; PTEN, *phosphatase and tensin homolog* ; Ras, petites GTPases ; ROCK, *rho-associated protein kinase* ; ROS, *reactive oxygen species* ; SHP-2, *src-homology 2 containing tyrosine phosphatase* ; TGF- $\beta$ , *transforming growth factor- $\beta$*  ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*. N.D., non déterminée.

A l'image de la diversité des propriétés vasoactives de l'UII selon la nature du lit vasculaire, une étude récente a montré que l'UII peut aussi exercer des activités antimitogènes sur des cellules progénitrices cardiaques, chargées de reconstituer des portions tissulaires lésées (Chen *et al.*, 2014b). Dans le contexte d'une extension physique de ces cellules, mimant une surcharge de pression intracardiaque, l'UII inhibe fortement la prolifération de ces cellules, un effet bloqué par l'urantide, un antagoniste peptidique de l'UT (Chen *et al.*, 2014b). Les effets cellulaires de l'UT seraient donc également dépendants du contexte cellulaire et/ou physiologique ou pathologique pour un unique type cellulaire considéré, suggérant une signalisation particulièrement complexe du récepteur.

Un nombre croissant de travaux indépendants plaident en faveur d'activités chimioattractantes de l'UII (Tab. 11) qui seraient, dans le cas de fibroblastes, de progéniteurs endothéliaux murins (Zhang *et al.*, 2008b ; Xu *et al.*, 2009) ou encore de monocytes humains

(Segain *et al.*, 2007), relayés par la voie Rho/ROCK. Sur ce dernier modèle, l'UII agirait en modifiant l'organisation du cytosquelette d'actine. L'utilisation sur des lignées humaines issues de tumeurs prostatiques ou colorectales, d'antagoniste de l'UT, d'inhibiteur de la voie Rho ou d'ARN interférents (shRNA) dirigés contre l'UT se traduit par une baisse de la motilité cellulaire, suggérant un effet autocrine/paracrine de l'UII (Grieco *et al.*, 2011 ; Federico *et al.*, 2014). Quelques travaux mettent en cause d'autres éléments de signalisation intracellulaire tels que la PKC, les MAPK ou l'ostéopontine, mais ces données restent fragmentaires et ne permettent pas de conclure sur l'ensemble des voies de signalisation recrutées par l'UII pour contrôler la motilité cellulaire.

### **3.1.3. Effets sur la néoangiogenèse**

Les propriétés vasoactives importantes associées aux effets pro-migratoires et pro-mitogènes de l'UII suggèrent l'implication du système urotensinergique dans les processus de néoangiogenèse. Il a été montré que l'UII stimule la tubulogenèse de cellules endothéliales cérébrales de Rat et provoque une augmentation de la densité vasculaire de la membrane chorioallantoïde d'œufs de Poulet (Spinazzi *et al.*, 2006). Dans ces deux modèles expérimentaux le palosuran, un antagoniste non peptidique de l'UT, inhibe la néoangiogenèse. Les études sur les cellules endothéliales veineuses du cordon ombilical humain (HUVEC) ont plus récemment permis d'identifier les cascades de signalisation activées par l'UII (Albertin *et al.*, 2009 ; Guidolin *et al.*, 2010 ; Diebold *et al.*, 2012 ; Lee *et al.*, 2014), avec notamment un rôle majeur joué par les kinases de types ERK et MAPK dans les mécanismes de migration, extension et adhésion cellulaires amenant à la formation de tubes endothéliaux *in vitro* (Tab. 12).

L'impact de l'UII sur les autres composantes vasculaires, *i.e.* cellules musculaires lisses et fibroblastes (Fig. 18), a donné lieu à d'intenses recherches dans le cadre de la compréhension

du développement de pathologies cardiaques telles que l'athérosclérose, l'hypertension ou les lésions des parois artérielles et veineuses. Dans ce dernier contexte, la réparation des vaisseaux anormaux et/ou lésés, processus également connu sous le nom de remodelage vasculaire, consiste en des séquences de prolifération (Chen *et al.*, 2008) et de migration des fibroblastes de l'adventice vers l'intima (Song *et al.*, 2012) (Fig. 18) ainsi qu'une prolifération (Diebold *et al.*, 2011) et une contraction (Sauzeau *et al.*, 2001) des cellules musculaires lisses contenues dans la média. Chaque étape de cette activité néo-angiogénique est sujette à une régulation fine par le système urotensinergique décrite en figure 19. La source principale d'UII proviendrait majoritairement des cellules endothéliales (Féléto *et al.*, 2011) et sa libération serait probablement consécutive au stress mécanique, oxydatif et inflammatoire concomitants à la rupture du vaisseau (González *et al.*, 2014). Les processus qui régissent sa libération ne sont toutefois pas connus à ce jour.

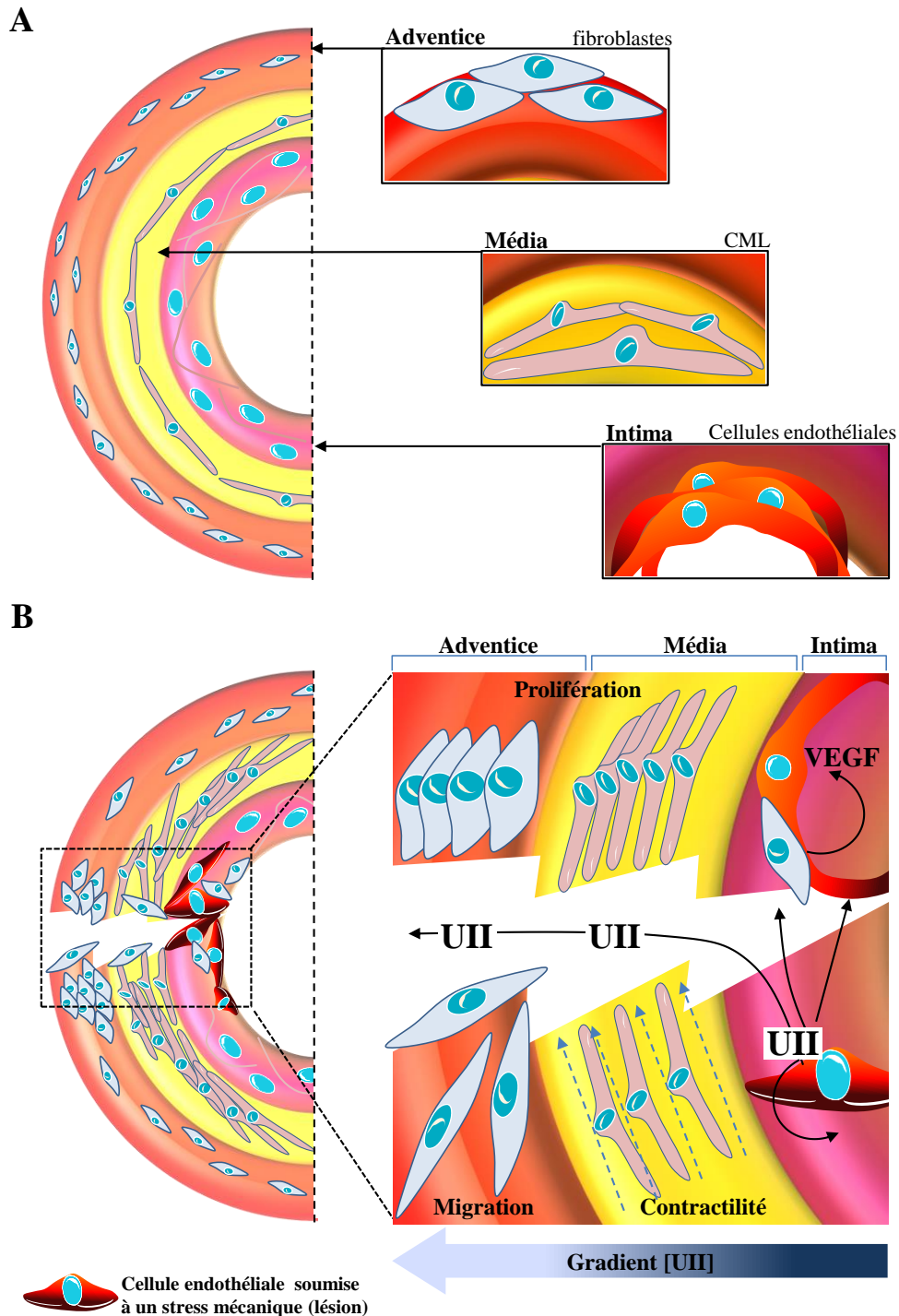
**Tableau 12 : Voies de transduction associées à l'activation du récepteur UT et impliquées dans les mécanismes de formation et/ou remodelage des vaisseaux sanguins : effets sur les cellules endothéliales, musculaires lisses, macrophages et fibroblastes.**

Type cellulaire	Espèce	Mécanisme angiogénique	Voies de transduction	Références
Cellules endothéliales	Rat	Perméabilité vasculaire, extravasation de plasma	N.D.	Gendron <i>et al.</i> , 2004
	Homme	Libération d'ADM	Ca <sup>2+</sup> , MAPK, CaMK p38MAPK	Shi <i>et al.</i> , 2005
		Blocage de l'apoptose, prolifération cellulaire	p42/44MAPK	Shi <i>et al.</i> , 2006
	Rat Poulet	Tubulogenèse Angiogenèse	N.D.	Spinazzi <i>et al.</i> , 2006
	Homme	Expression de molécules d'adhésion	RhoA	Cirillo <i>et al.</i> , 2008
		Prolifération cellulaire, tubulogenèse	N.D.	Albertin <i>et al.</i> , 2009
	Rat	Migration cellulaire	RhoA/ROCK, MLC	Xu <i>et al.</i> , 2009
	Homme	Migration cellulaire, tubulogenèse	PLC, Ca <sup>2+</sup> , PKC, PI <sub>3</sub> K, ERK1/2, FAK	Guidolin <i>et al.</i> , 2010
		Expression de VEGF, ET-1, ADM	N.D.	Albertin <i>et al.</i> , 2011
		Tubulogenèse, angiogenèse	HIF-1, ROS, NOX2	Diebold <i>et al.</i> , 2012
	Rat	Migration cellulaire	ERK, p38/p42/ p44MAPK	Xu <i>et al.</i> , 2012
	Homme	Prolifération cellulaire, libération d'IL-8	p38MAPK, ERK	Lee <i>et al.</i> , 2014



<b>Cellules musculaires lisses</b>	Rat	Prolifération cellulaire, contractilité	RhoA	Sauzeau <i>et al.</i> , 2001
	Lapin	Prolifération cellulaire, action synergique avec moxLDL et 5-HT	G <sub>q</sub> , c-Src, PKC, MAPK	Watanabe <i>et al.</i> , 2001a; 2001b
	Rat	Prolifération cellulaire, expression d'ET-1	ROS, inhibition de SHP-2, transactivation de l'EGFR	Tsai <i>et al.</i> , 2009
	Souris	Remodelage vasculaire	JNK, ERK, ROCK, MLCK	Papadopoulos <i>et al.</i> , 2008a; 2008b
	Homme	Prolifération cellulaire et remodelage vasculaire	FoxO3, MMP-2	Diebold <i>et al.</i> , 2011
	Rat	Inhibition de MCP-1, expression de TGF- $\beta$ par l'urantide	N.D.	Zhao <i>et al.</i> , 2014
<b>Monocytes/Macrophages</b>	Homme	Migration cellulaire	RhoA, ROCK	Segain <i>et al.</i> , 2007; Loirand <i>et al.</i> , 2008
		Activation de monocytes en macrophages, expression d'ACAT-1	protéines G, c-Src, PKC, MEK, ROCK	Watanabe <i>et al.</i> , 2005
		Adhésion monocytes-cellules endothéliales, stimulation de l'inflammation	VCAM-1, IL-1 $\beta$ , IL-6	Park <i>et al.</i> , 2013
<b>Fibroblastes vasculaires</b>	Rat	Prolifération cellulaire	Transactivation de l'EGFR, ERK, ROS	Chen <i>et al.</i> , 2008
		Synthèse de collagène	ERK1/2	Dai <i>et al.</i> , 2011
		Différenciation phénotypique, sécrétion de TGF- $\beta$	N.D.	Zhang <i>et al.</i> , 2010
		Migration cellulaire	PKC, ROCK, Calcineurine, MAPK, ostéospondine	Zhang <i>et al.</i> , 2008b; 2011
		Sécrétion de VEGF, action synergique avec Ang II	MAPK	Song <i>et al.</i> , 2012
		Expression et libération de MCP-1	Rho, PKC, MAPK, calcineurine, Ca <sup>2+</sup>	Zhang <i>et al.</i> , 2014

ACAT-1, Acétyl-CoA acétyltransférase de type 1 ; ADM, adrénomédulline ; Ang II, angiotensine II ; CaMK, calmoduline kinase ; EGFR, *epidermal growth factor receptor* ; ERK1/2, *extracellular signal-regulated kinase 1/2* ; ET-1, endothéline-1 ; FAK, *focal adhesion kinase* ; FoxO3, *forkhead box O3* ; HIF-1, *hypoxia inducible factor-1* ; 5-HT, sérotonine ; IL-1 $\beta$ , -6, -8, interleukines 1 $\beta$ , 6 et 8 ; JNK, *c-Jun N-terminal kinase* ; p38/42/44MAPK, *mitogen-activated protein kinases* ; MCP-1, *monocyte chemoattractant protein-1* ; MLC, *myosin light chain* ; MLCK, *myosin light chain kinase* ; MMP-2, métalloprotéase matricielle de type 2 ; moxLDL, *minimally-oxidized low density lipoprotein* ; NOX2, NADPH oxydase de type 2 ; PI<sub>3</sub>K, phosphoinositol-3 kinase ; PKC, protéine kinase C ; PLC, phospholipase C ; ROCK, *rho-associated protein kinase* ; ROS, *reactive oxygen species* ; SHP-2, *Src-homology 2 containing tyrosine phosphatase* ; TGF- $\beta$ , *transforming growth factor- $\beta$*  ; VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule-1* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*. N.D., non déterminée.



**Figure 18 : Implication de l'UII dans le remodelage vasculaire.** A, schématisation de l'agencement des trois composantes cellulaires de la paroi d'un vaisseau sanguin, *i.e.* les fibroblastes localisés dans l'adventice, les CML de la média et les cellules endothéliales de l'intima. B, réponses cellulaires après une lésion vasculaire. Dans un premier temps, une vasoconstriction s'opère pour limiter l'hémorragie, par contraction simultanée des cellules musculaires lisses. Simultanément, les cellules endothéliales sujettes au stress mécanique et inflammatoire concomitants à la rupture d'une portion du vaisseau, libèrent des molécules chimioattractantes et/ou pro-mitotiques, dont l'UII, qui stimulent le recrutement de fibroblastes qui vont migrer de la couche adventice vers l'intima, puis libèrent du VEGF pour permettre la reformation et la stabilisation d'un réseau endothélial fonctionnel. Dans un second temps, le tissu cicatriciel se met en place par prolifération des trois types cellulaires. L'urotensine II interviendrait dans la guidance, prolifération/contraction/motilité cellulaire par le biais d'un gradient de concentration dans les différentes couches du vaisseau sanguin. CML, cellules musculaires lisses ; UII, urotensine II ; VEGF, vascular endothelial growth factor.

### **3.1.4. Effets sur les cellules du système immunitaire**

Une étude conduite par l'équipe de Giaid a révélé la présence d'UT à la surface de certaines cellules immunitaires, *i.e.* lymphocytes B et macrophages (Bousette *et al.*, 2004), qui infiltrent des zones présentant elles-mêmes une immunoréactivité accrue pour l'UII (Maguire *et al.*, 2004).

Des composés pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , le lipopolysaccharide (LPS) ou encore l'interféron  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) favorisent l'expression de l'UT (Segain *et al.*, 2007). L'UII agirait comme un facteur chimioattractant sur des monocytes humains (Segain *et al.*, 2007) et serait capable d'activer l'extravasation plasmatique chez la Souris (Vergura *et al.*, 2004) et le Rat (Gendron *et al.*, 2004). En revanche, l'UII favorise la sécrétion d'interleukines telles que l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-8 par des cardiomyocytes, des cellules d'adénocarcinome de poumon et des cellules endothéliales ombilicales (Johns *et al.*, 2004 ; Zhou *et al.*, 2012 ; Park *et al.*, 2013 ; Lee *et al.*, 2014). Ces données montrent que l'UII interviendrait dans la réponse immunitaire en participant notamment à la production de cytokines et en favorisant l'infiltration des cellules immunitaires.

## **3.2. Effets biologiques *in vivo***

### **3.2.1. Sur le système vasculaire**

L'administration d'UII sous forme de bolus intra-artériel (au niveau de l'arc aortique) chez la Grenouille taureau (*Lithobates catesbeianus*) entraîne une élévation de la pression artérielle (Yano *et al.*, 1995). Injectée en bolus intraveineux chez des rats anesthésiés, l'UII (Gardiner *et al.*, 2001 ; Abdelrahman et Pang, 2002 ; Hassan *et al.*, 2003) ou l'URP (Sugo *et al.*, 2003) provoque une diminution lente et prolongée de la pression artérielle consécutives à une vasodilatation ; ces modifications des paramètres cardiovasculaires ne sont pas retrouvées lorsque l'UII est administrée de manière chronique (Kompa *et al.*, 2004). Des études

similaires ont été conduites chez des primates, notamment chez le Macaque anesthésié chez lequel l'UII a été injectée en doses croissantes. La plus forte dose testée (3 nmol/kg) induit une diminution catastrophique des paramètres cardiovasculaires, *i.e.* fréquence cardiaque (-50%), pressions sanguine (-65%) et artérielle (-38%), tout en augmentant fortement la pression intrapulmonaire (+30%), responsables à terme d'un collapsus et d'un arrêt cardiaque (Zhu *et al.*, 2004). Chez l'Homme, les conclusions demeurent contradictoires, puisqu'après injection intraveineuse au niveau de l'avant-bras, l'UII provoque une vasoconstriction locale dose-dépendante dans l'étude de Bôhm et Pernow (2002) mais reste sans effet apparent dans celles de Wilkinson et coll. (2002) et de Cheriyan et coll. (2009) ; ces résultats sont assez surprenants lorsque l'on sait que ces derniers auteurs ont reproduit rigoureusement la méthodologie employée par Bôhm et Pernow. Enfin, une dernière étude vient appuyer l'absence de variations des paramètres cardiovasculaires (hémodynamique et épaisseur des vaisseaux sanguins) aux niveaux central et périphérique lorsque l'UII est administrée en doses graduelles chez des volontaires sains (Affolter *et al.*, 2002).

Plusieurs groupes se sont intéressés aux effets centraux de l'UII sur le système cardiovasculaire. L'injection intracérébroventriculaire (icv) d'UII chez la Truite (Le Mevel *et al.*, 1996 ; Lancien *et al.*, 2004), l'Anguille (Nobata *et al.*, 2011) ou des rats normo- ou hypertendus (Lin *et al.*, 2003a ; 2003b) entraîne une élévation du rythme cardiaque et de la pression artérielle. Réalisées chez le Rat, des microinjections intracérébrales d'UII dans les noyaux paraventriculaire et arqué ont permis de montrer l'implication du système urotensinergique dans la régulation centrale des paramètres cardiovasculaires (Lu *et al.*, 2002).

Des patients souffrants d'une insuffisance cardiaque (Ng *et al.*, 2002 ; Richards *et al.*, 2002 ; Russel *et al.*, 2003 ; Gruson *et al.*, 2006 ; Jani *et al.*, 2012), d'hypertension systémique (Cheung *et al.*, 2004 ; Krum et Kemp, 2007) et portale (Heller *et al.*, 2002 ; Kemp *et al.*,

2007 ; Liu *et al.*, 2010 ; Pawar *et al.*, 2011) ou d'athérosclérose (Suguro *et al.*, 2007) présentent des taux circulants d'UII et/ou d'URP supérieurs à ceux relevés chez des volontaires sains, suggérant que le système urotensinergique serait impliqué dans ces pathologies cardiovasculaires. Une surexpression des peptides et de leur récepteur a également été mise en évidence dans le cœur de rats insuffisants cardiaques (Nakayama *et al.*, 2008).

Dans les cellules endothéliales d'artères coronaires issues de patients atteints d'athérosclérose (Maguire *et al.*, 2004 ; Hassan *et al.*, 2005), la forte immunoréactivité *UII-like* associée aux effets de l'UII sur la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires (Sauzeau *et al.*, 2001 ; Watanabe *et al.*, 2001) ou sur la formation de macrophages spumeux (Watanabe *et al.*, 2005 ; Shiraishi *et al.*, 2008), suggère une nouvelle fois que l'UII et/ou l'URP participeraient aux processus de remodelage tissulaire tout au long de l'établissement de la pathologie (Pakala, 2008). Comme introduit dans le § 3.3., les effets de l'UII sur la prolifération (Chen *et al.*, 2008), la migration (Zhang *et al.*, 2008b ; Zhang *et al.*, 2011) et l'expression de collagène (Tzanidis *et al.*, 2003 ; Onan *et al.*, 2004 ; Liu *et al.*, 2009 ; Gruson *et al.*, 2010) indiquent que le système urotensinergique jouerait un rôle délétère dans les pathologies d'hypertrophie et de fibrose cardiaque (Tzanidis *et al.*, 2003).

### **3.2.2. Sur le système rénal**

Plusieurs équipes ont relevé la présence de quantités significatives d'UII (Shenouda *et al.*, 2002 ; Maguire *et al.*, 2004), de sites de liaison à l'UII et d'ARNm de l'UT (Maguire *et al.*, 2000 ; Matsushita *et al.*, 2001 ; Totsune *et al.*, 2001 ; Hirose *et al.*, 2009 ; Mori *et al.*, 2009) au niveau rénal. En raison d'une forte expression du précurseur préproUII retrouvée uniquement dans le tissu rénal humain, ce dernier est considéré comme la principale source d'UII circulante (Nothacker *et al.*, 1999 ; Ulas *et al.*, 2013 ; Langham et Kelly, 2013, pour

revue). Plus précisément, une intense immunoréactivité liée au peptide est observée dans les reins au niveau du tube contourné proximal et du canal collecteur. L'UUI peut aussi être détectée dans les urines chez l'Homme (Matsushita *et al.*, 2001) et le Rat (Song *et al.*, 2006a) à des concentrations jusqu'à 1300 fois supérieures à celles retrouvées dans le plasma. Cette dernière indication d'une clairance urinaire supérieure au taux de filtration glomérulaire appuie l'hypothèse d'une origine tubulaire, et donc rénale, de l'UUI retrouvée dans les urines. Les rôles physiologiques de l'UUI sur la fonction rénale restent pour autant controversés puisque son administration chez le Rat provoque une augmentation (Zhang *et al.*, 2003) ou une diminution (Song *et al.*, 2006a) du taux de filtration glomérulaire. Ce dernier effet est confirmé par des études du groupe de Nick Ashton dans laquelle l'UUI, infusée à fortes doses (6 pmol/min/100 g) chez des rats normotendus (Abdel-Razik *et al.*, 2008a) ou spontanément hypertendus (Abdel-Razik *et al.*, 2008b), entraîne une diminution du taux de filtration glomérulaire, résultante de ses effets hémodynamiques (réduction du flux sanguin rénal). En revanche, une dose dix fois inférieure exerce une action au niveau tubulaire produisant une diminution de la réabsorption des électrolytes. Plus récemment, des résultats similaires ont été décrits sur un modèle porcin (Soni et Adebisi, 2013).

Sur le terrain pathologique, les quantités d'*UUI-like* mesurées dans le plasma et l'urine de patients souffrant d'une néphropathie consécutive au *diabetes mellitus* sont considérablement élevées (Langham *et al.*, 2004 ; Totsune *et al.*, 2004). Chez les malades en stade terminal, les niveaux circulants d'*UUI-like* sont inversement corrélés au débit cardiaque (Mallamaci *et al.*, 2005 ; Zoccali *et al.*, 2006) et aux complications cardiovasculaires létales, indiquant que l'UUI jouerait dans ce cas un rôle cardioprotecteur (Zoccali *et al.*, 2008). Dans une perspective de traitement des pathologies rénales, des études portant sur le blocage de l'UT par le palosuran (Vogt *et al.*, 2010) ou l'urantide (Nitescu *et al.*, 2010) se sont malheureusement avérées décevantes, en l'absence de modifications des fonctions rénales. Pour autant, dans le cas

particulier d'une insuffisance rénale aiguë ischémique, le palosuran est capable de prévenir la diminution du débit sanguin rénal, responsable de lésions tubulo-interstitielles (Clozel *et al.*, 2004 ; 2006) ce qui plaide en faveur d'une implication délétère du système urotensinergique. Appuyant cette hypothèse, une étude de Mosenkis et coll. (2011) montre que les concentrations d'UII plasmatique déclinent avec l'aggravation de l'insuffisance rénale, ce mécanisme d'autoprotection s'opérant soit par diminution de la production du peptide et/ou augmentation de la clairance rénale. En définitive, les articles récemment publiés sur des cohortes allant jusqu'à une centaine de patients et dix mille échantillons maintiennent un doute sur la réelle corrélation entre pathologie rénale/hypertension et expression du système urotensinergique (Debiec *et al.*, 2013). La modulation de ce système serait plutôt à mettre en relation avec l'état inflammatoire du tissu rénal (Hursitoglu *et al.*, 2012 ; Balat et Büyükçelik, 2012, pour revue). Ces exemples apparemment contradictoires, illustrent la complexité de l'action du système urotensinergique, tantôt délétère ou protecteur, mais toujours sous la dépendance du contexte physiopathologique et/ou du microenvironnement tissulaire (Langham et Kelly, 2013).

### **3.2.3. Sur le système endocrinien**

La distribution de l'UT et de ses ligands endogènes dans plusieurs organes et tissus endocrines a conduit de nombreux groupes à rechercher l'existence d'autres fonctions physiologiques de l'UII et l'URP. Les premières études réalisées chez un poisson, le Tilapia du Mozambique (*Sarotherodon mossambicus*), ont démontré que l'UII inhibe la libération de prolactine (PRL) (Grau *et al.*, 1982 ; Rivas *et al.*, 1986) et augmente la cortisolémie (Arnold-Reed et Balment, 1994 ; Kelsall et Balment, 1998). En revanche, l'administration icv d'UII entraîne une hausse des concentrations plasmatiques de *thyroid-stimulating hormone* (TSH) et de PRL chez le Rat (Gartlon *et al.*, 2001), mais aussi de l'hormone corticotrope (ACTH) et de

l'adrénaline chez la Brebis (Watson *et al.*, 2003). Ces données sont à rapprocher de celles d'Albertin et coll. (2006) qui montrent qu'une application d'UII sur des cultures de cellules corticosurréaliennes de Rat diminue de façon dose-dépendante la sécrétion basale de corticostérone. Par ailleurs, sur des pancréas perfusés de rats, l'UII inhibe la libération d'insuline induite par le glucose (Silvestre *et al.*, 2001 ; 2004) tandis que le palosuran et l'urantide ont des propriétés inverses (Marco *et al.*, 2008), suggérant que l'UII endogène inhiberait l'activité sécrétrice des cellules pancréatiques de type  $\beta$  (Silvestre *et al.*, 2009). Cette implication potentielle du système urotensinergique dans le contrôle de la glycémie est confortée par deux études indépendantes qui rapportent la présence de concentrations plasmatiques d'*UII-like* particulièrement élevées chez des patients souffrant de diabète de type 2 (Totsune *et al.*, 2003 ; Suguro *et al.*, 2008). Finalement, plusieurs polymorphismes de l'UII et de l'UT ont été décrits chez l'Homme et associés au diabète de type 2 (Suzuki *et al.*, 2004 ; Okumus *et al.*, 2012) ou à une résistance à l'insuline (Ong *et al.*, 2006 ; Sáez *et al.*, 2011).

#### **3.2.4. Sur le comportement animal**

En accord avec la distribution de l'UII et de l'UT dans le SNC (Coulouarn *et al.*, 1998 ; 1999 ; Ames *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 1999 ; Clark *et al.*, 2001), l'administration icv d'UII a de multiples répercussions comportementales. L'UII induit des effets anxiogènes et un comportement de « résignation » chez le Rat (Matsumoto *et al.*, 2004) et la Souris (Do-Rego *et al.*, 2005) dans les tests de la planche à trou, le labyrinthe en croix surélevé, la nage forcée ou la suspension par la queue. Ce neuropeptide augmente de façon dose-dépendante les phénomènes de toilettage et de redressement, tout en diminuant le temps d'inactivité chez des rats soumis à un environnement familier, comportements relatifs à l'activité exploratoire des



animaux (Gartlon *et al.*, 2001). Une élévation de l'activité motrice a aussi été rapportée chez la Truite arc-en-ciel (Lancien *et al.*, 2004) et la Souris (Do-Rego *et al.*, 2005).

L'expression de l'UT dans l'hypothalamus (aire ventromédiane, noyaux arqué et supraoptique) et le tronc cérébral (noyaux du tractus solitaire et parabranchial) indique que l'UII participerait, à l'instar de nombreux autres neuropeptides, au contrôle de la prise alimentaire (Gartlon *et al.*, 2001 ; Jégou *et al.*, 2006). De fait, dans les 30 minutes suivant son injection icv, l'UII exerce chez la Souris des propriétés orexigènes (Do-Rego *et al.*, 2005), laissant entrevoir de possibles applications thérapeutiques pour ce peptide dans le traitement des troubles de la prise alimentaire.

Le sommeil est classiquement divisé en trois phases, *i.e.* sommeil léger, profond et paradoxal. Ce dernier s'accompagne de mouvements rapides des yeux (*rapid eye movements* ou REM) contrôlés par des neurones cholinergiques localisés dans le tegmentum (de Lecca et Bourgin, 2008). De façon intéressante, cette aire sous-corticale est particulièrement riche en ARNm codant l'UT (Clark *et al.*, 2001 ; Jégou *et al.*, 2006) et une microinjection d'UII dans cette zone se traduit chez le Rat par une augmentation du nombre et de la durée des phases de sommeil paradoxal (Huitron-Resendiz *et al.*, 2005 ; de Lecca et Bourgin, 2008). Le locus cœruleus, un noyau noradrénergique du tronc cérébral, présente également de forts niveaux d'ARNm codant l'UT (Jégou *et al.*, 2006) et l'application d'UII sur des tranches cérébrocorticales de Rat provoque la libération de noradrénaline, un neurotransmetteur fortement impliqué dans le contrôle de l'attention et de l'éveil (Ono *et al.*, 2008), suggérant que le système urotensinergique participerait à la régulation des cycles de veille-sommeil.

### 3.2.5. Dans le développement tumoral

La présence de l'UII et de l'UT a été observée dans de nombreuses lignées et échantillons tumoraux humains issus de différents tissus ou organes, du système endocrinien, uro-génital, gastro-intestinal et du SNC (Tab. 13).

**Tableau 13 : Localisation de l'UII et de l'UT dans différents types de néoplasmes humains.**

Type de tumeur	Origine	Expression d'UII	Expression d'UT
<b>Système endocrinien</b>			
Carcinome adrénocortical	Lignée SW13	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	
	Echantillon tumoral	Takahashi <i>et al.</i> , 2003	
Morimoto <i>et al.</i> , 2008			
Takahashi <i>et al.</i> , 2003			
Zeng <i>et al.</i> , 2006			
Pheochromocytome	Lignée PC12	Morimoto <i>et al.</i> , 2008	
		Aita <i>et al.</i> , 2010	
Adénome adrénocortical	Echantillon tumoral	Takahashi <i>et al.</i> , 2003	
		Morimoto <i>et al.</i> , 2008	
<b>Système uro-génital et gastro-intestinal</b>			
Carcinome rénal	Echantillon tumoral	Shenouda <i>et al.</i> , 2002	
Adénocarcinome prostatique	Lignée LnCap		Grieco <i>et al.</i> , 2011
Choriocarcinome	Lignée BeWo	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	
Adénocarcinome colorectal	Lignée DID-1		
	Echantillon tumoral		Federico <i>et al.</i> , 2014
Cancer du col de l'utérus	Lignée HeLa	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	
Cancer de la vessie	Echantillon tumoral		Franco <i>et al.</i> , 2014
<b>Système nerveux central</b>			
Glioblastome	Lignée T98G	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	
	Lignées U87-MG		Desrués <i>et al.</i> , 2012; Nguyen <i>et al.</i> , 2012
Neuroblastome	Lignée IMR-32	Takahashi <i>et al.</i> , 2001	
	Lignée NB69		Takahashi <i>et al.</i> , 2001
	Lignée SH-SY5Y		Nguyen <i>et al.</i> , 2012
	Echantillon tumoral	Takahashi <i>et al.</i> , 2003	
<b>Autres tissus</b>			
Rhabdomyosarcome	Lignée TE-671		Birker-Robaczewska <i>et al.</i> , 2003
	Lignée SJRH30		Douglas <i>et al.</i> , 2004b
	Lignée SJCRH30		Batuwangala <i>et al.</i> , 2009
Adénocarcinome pulmonaire	Lignée A549	Wu <i>et al.</i> , 2010; Zhou <i>et al.</i> , 2012	
Cancer du sein	Echantillon tumoral	Balakan <i>et al.</i> , 2014	

En accord avec cette expression, il a notamment été montré que l'UII favorise la prolifération de cellules issues d'une lignée d'adénocarcinome pulmonaire humain *in vitro* et *in vivo* dans un modèle préclinique de xénogreffes dans des souris immunodéficientes *Nude* (Wu *et al.*, 2010). Plus récemment, cette même équipe a démontré que l'UII stimule la

libération de cytokines pro-inflammatoires et de MMP-9, et participe à l'infiltration de macrophages dans la tumeur (Zhou *et al.*, 2012). Enfin, l'utilisation de l'urantide et/ou de shRNA dirigés contre l'UT, sur des cellules d'origine humaine issues de tumeurs prostatiques (LnCap) (Grieco *et al.*, 2011), colorectales (LOVO) (Federico *et al.*, 2014) ou de la vessie (T24) (Franco *et al.*, 2014) se traduit par une diminution marquée de leur motilité. En dépit d'une origine tissulaire très variable, l'ensemble de ces cancers ont la particularité commune d'être agressifs avec de forts risques de métastases. Dans ce contexte, le système urotensinergique surexprimé dans les tumeurs malignes, jouerait un rôle capital dans les mécanismes tumorigéniques (inflammation, prolifération et néoangiogenèse) ainsi que dans la dissémination de cellules cancéreuses invasives/métastatiques.

# **Matériel et Méthodes**



## Matériel et Méthodes

### 1. Réactifs et consommables

Le milieu DMEM, la trypsine-EDTA (1X), la solution d'antibiotiques/antifongique (pénicilline 10000 U/mL; streptomycine 10000 U/mL; fungizone 25 U/mL), la solution d'acides aminés non essentiels, l'héparine, le collagène de type I, l'HEPES, les anticorps secondaires DAR (*donkey anti-rabbit*) 488/594 et DAG (*donkey anti-goat*) 488/594 (2 mg/mL), la poly-L-lysine, la solution de lipides, le paraformaldéhyde (PFA) en poudre, le bFGF-2, l'EGF, l'hydrocortisone, le tampon *Beckman Coulter Isoton II* et le pyruvate de sodium sont commercialisés par Invitrogen (Cergy Pontoise, France). Les anticorps primaires et le NDS (*normal donkey serum*) sont commercialisés par Santa Cruz Biotechnology (Tebu, Le Perray en Yvelines, France). Miltenyi Biotec SAS (Paris, France) a fourni le EG-VEGF. Le sérum bovin foetal (SBF) décomplémenté, le sérum *Gold defined* et le milieu de culture EBM-2 proviennent de Lonza (Levallois-Perret, France). La fibronectine humaine 0,1 %, le Dulbecco's PBS (*phosphate buffer saline*), l'eau Ultrapure, le Triton (100X), le 4',6' di-amidino-2-phényl indole (DAPI) et les flasques de 25, 75 et 150 cm<sup>2</sup> sont distribués par Sigma-Aldrich (Lyon, France). L'acutase provient de Millipore (Billerica, USA). Le Mowiol 4-88 solide est commercialisé par Calbiochem (Meudon, France). Les tubes Falcon 15 et 50 mL et le Matrigel *Factor Reduced* sont fournis par Becton Dickinson SAS (Le Pont-De-Claix, France). Les chambres de Boyden modifiées (*Transwell*) et les plaques de culture 12 et 24 puits proviennent de Corning (Bagneaux Sur Loing, France). Le kit de révélation de zones hypoxiques au pimonidazole hypochloridique est distribué par la société Hypoxyprobe (Burlington, USA).

L'urotensine II humaine et murine, l'URP, l'UII<sub>4-11</sub> et l'UII<sub>5-11</sub> sont synthétisés et fournis par Phoenix Pharmaceuticals (Strasbourg, France). L'urantide est distribué par Peptides International (Louisville, USA). Le palosuran provient d'Actelion Pharmaceuticals (Bâle, Suisse).

## 2. Cultures cellulaires

### 2.1. Cellules de GBM humain

La lignée U87-MG, isolée en 1969 par J. Ponten et collaborateurs à partir d'un glioblastome humain de grade IV, est distribuée par l'ATCC (LGC Promochem, Molsheim, France).

Les cellules sont cultivées dans un milieu, dont la composition est détaillée dans le tableau 14, et placées en atmosphère humide à 37°C dans un incubateur gazé (5% CO<sub>2</sub>/95% air). Lorsque les cultures atteignent 90% de confluence, le milieu est éliminé et après rinçage au PBS, les cellules sont incubées (5 min, 37°C) en présence d'une solution de trypsine-EDTA (1 mM). Du SBF (10%) est ajouté pour inhiber l'activité enzymatique, la suspension cellulaire est centrifugée (100 g, 5 min), et après comptage, les flasques sontensemencées avec 5.10<sup>5</sup> cellules.

### 2.2. Cellules endothéliales humaines

Les cellules *human umbilical vein-endothelial cells-C* (HUV-EC-C) et la lignée *human cerebral microvessel endothelial cells* (HCMEC-D3) ont été généreusement fournies par le Pr Pierre-Olivier Couraud (Paris, France).

Les cellules sont cultivées dans des flasques préalablement recouvertes de collagène I (50 µg/mL) dans un milieu dont la formulation est définie dans le tableau 14 et placées en atmosphère humide à 37°C dans un incubateur gazé (5% CO<sub>2</sub>/95% air). Lorsque les cultures

atteignent 95% de confluence, le milieu est éliminé et après rinçage au PBS, les cellules sont incubées (5 min, 37°C) en présence d'une solution d'acutase (1 mM). Du milieu de culture frais est ajouté pour inhiber l'activité enzymatique, la suspension cellulaire est centrifugée (100 g, 5 min), et après comptage, les flasques (75 cm<sup>2</sup>) sontensemencées avec 10<sup>6</sup> cellules.

**Tableau 14 : Milieux de culture utilisés pour les lignées U87-MG et HCMEC-D3 et les cellules HUV-EC-C.**

Type cellulaire	Milieu minimum	Additifs de culture
U87-MG (gliome humain)	DMEM Pyruvate de sodium (1%) Acides aminés non essentiels (1%) Antibiotiques (1%)	SBF décomplémenté (10%)
HCMEC-D3 HUV-EC-C (cellules endothéliales humaines)	EBM-2 Mélange de lipides (1%) HEPES (1%) Hydroxycortisone (0,2 µg/mL) Acide ascorbique (1 µg/mL)	bFGF-2 (50 ng/mL) SBF <i>Gold Defined</i> (5%)

bFGF-2, *basic fibroblast growth factor-2* ; DMEM, *Dulbecco's modified essential medium* ; HCMEC-D3, *human cerebral microvessel endothelial cell-D3* ; HUV-EC-C, *human umbilical vein endothelial cell-C* ; EBM-2, *endothelial basal medium-2* ; HEPES, acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique ; SBF, sérum bovin foetal.

### 3. Croissance cellulaire

Des plaques 24 puits sontensemencées à hauteur de 2,5.10<sup>5</sup> cellules/cm<sup>2</sup>, incubées dans du milieu de culture minimum contenant un agoniste (hUII, mUII, URP, UII<sub>4-11</sub> ou UII<sub>5-11</sub>; 10<sup>-12</sup> à 10<sup>-7</sup> M ; chacun) et/ou un antagoniste (palosuran, urantide; 10<sup>-10</sup> à 10<sup>-7</sup> M, chacun) de l'UT. L'incubation des cellules dans du milieu additionné de SBF (5%) permet de mesurer une prolifération de référence. Après 12 à 48h d'incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air), les cultures sont rincées au PBS frais, les cellules sont décollées à l'aide d'une solution de trypsine-EDTA (1 mM) et resuspendues dans du tampon *Beckman Coulter Isoton II* pour un volume final de 10 mL. La densité cellulaire est déterminée dans chaque puits à l'aide d'un compteur de cellules (Z2 Beckman Coulter). Les données sont exprimées par le ratio du nombre de cellules normalisé par la valeur contrôle moyenne.



#### 4. Migration cellulaire

Des chambres de Boyden modifiées (*Transwell*, pores  $\varnothing = 8 \mu\text{m}$ ) sont coatées au collagène I (50  $\mu\text{g/mL}$ ) sur leurs faces interne et externe (300  $\mu\text{L/puits}$ , 100  $\mu\text{L/insert}$ , 4°C, 15h). Après ajout dans chaque puits de 600  $\mu\text{L}$  de milieu de culture minimum ou contenant du SBF *Gold Defined* (5%, contrôle positif) ou les molécules d'intérêt (agonistes ou antagonistes du récepteur UT), une suspension cellulaire ( $2,5 \cdot 10^3$  cellules, 100  $\mu\text{L}$ ) est déposée sur la membrane du *Transwell*. Après adhésion, la chambre est placée dans le puits et les cellules sont incubées 24h (37°C, 5%  $\text{CO}_2/95\%$  air).

La partie supérieure des inserts est délicatement nettoyée au coton tige et la partie inférieure est rincée au PBS. Les cellules sont fixées par passages successifs dans des bains de méthanol (50, 70, 90, 100% ; 2 min). Les cellules ayant migré sur la face inférieure sont colorées à l'aide d'une solution d'éosine (30 s) puis d'hématoxyline (30 s). Les membranes colorées sont découpées et montées entre lame et lamelle avec une solution de Mowiol. L'observation de la morphologie des cellules et leur comptage sont réalisés à l'aide d'un microscope optique (Nikon Eclipse TS 100) et le logiciel d'analyse d'images *Image J* (*National Institute of Mental Health, Bethesda, USA*).

#### 5. Tubulogenèse *in vitro*

Des plaques 24 puits maintenues sur glace sont coatées avec 100  $\mu\text{L}$  de Matrigel *Factor Reduced* froid. La polymérisation du gel s'effectue par une incubation de 2h en atmosphère humide gazée (5%  $\text{CO}_2/95\%$  air). Une suspension de cellules endothéliales HUV-EC-C ou HCMEC-D3 ( $10^5$  cellules/ $\text{cm}^2$ ) dans du milieu de culture minimum (Tab.14) est déposée dans chaque puits. Après 4h d'adhésion, les cellules flottantes sont éliminées et le surnageant est remplacé par du milieu de culture minimum seul (contrôle négatif) ou contenant une molécule d'intérêt, *i.e.* agoniste (hUII, mUII, URP, UII<sub>4-11</sub> ou UII<sub>5-11</sub>;  $10^{-12}$  à  $10^{-6}$  M ; chacun) et/ou

antagoniste (palosuran ou urantide;  $10^{-10}$  à  $10^{-6}$  M ; chacun) de l'UT, ou du SBF (contrôle positif, 5%). Après 18 à 48h d'incubation (37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air), l'observation et l'acquisition d'images de l'organisation du tapis cellulaire sont réalisées à l'aide d'un microscope optique (Nikkon Eclipse TS 100) et les paramètres tubulogéniques sont analysés à l'aide du logiciel d'analyse d'images *Image J*.

## 6. Chimioattraction *in vivo*

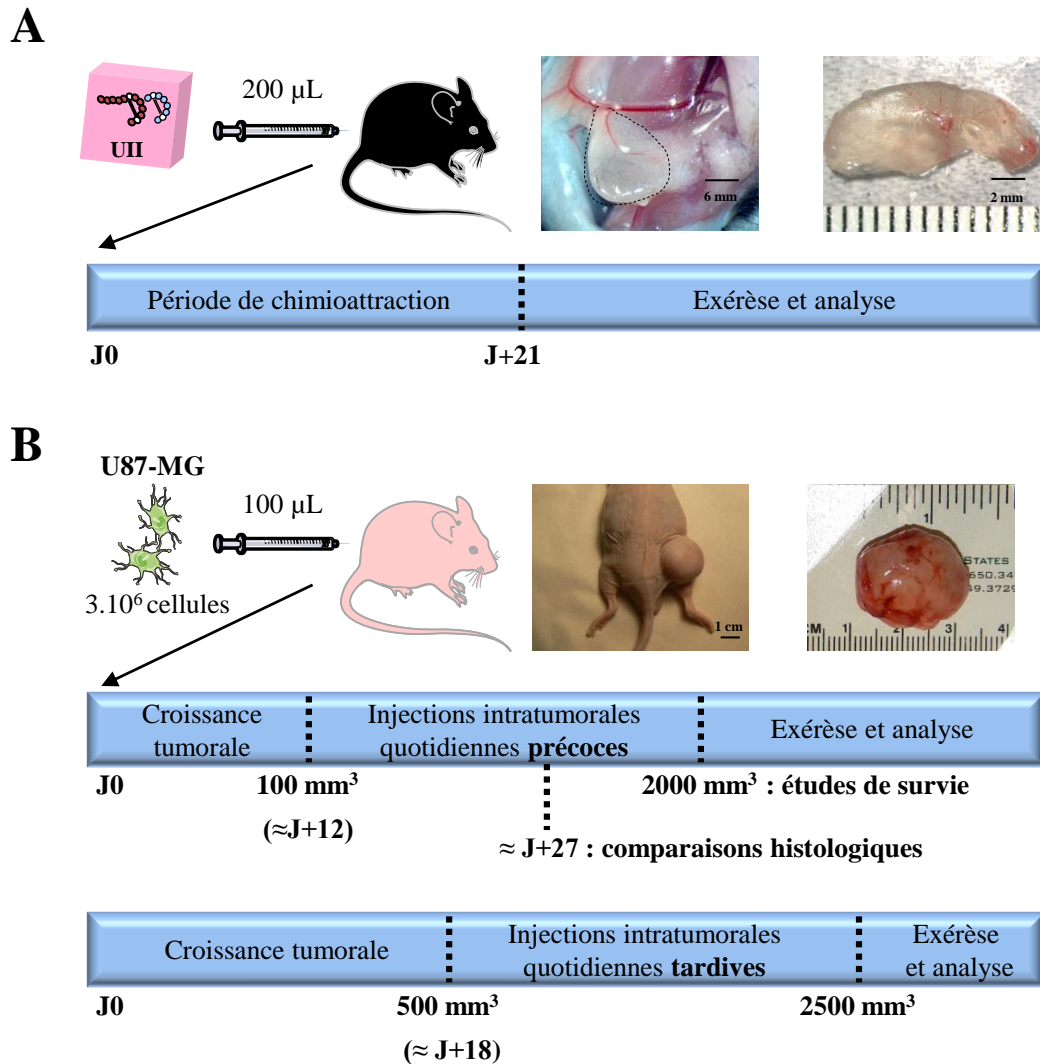
Des souris mâles de souche C57Bl/6 (Janvier, Saint-Berthevin, France) sont gardés à 23°C avec une photopériode de 12h/12h, nourriture et eau *ad libitum*. Afin de limiter l'adiposité tissulaire, les expériences sont réalisées sur des souris juvéniles (3-5 semaines).

Les animaux sont préalablement sédatés dans une chambre d'inhalation contenant de l'isoflurane (3%), en vérifiant l'analgésie préopératoire par le test de pression interdigitale. La zone opératoire (*rectus abdominus*) est rasée et aseptisée avec une solution de Biseptine et le Matrigel liquide (200 µL, 4°C), additionné des molécules d'intérêt (Tab. 15), est implanté sous le derme au voisinage de la veine fémorale à l'aide d'une seringue à insuline stérile Myjector (Terumo Europe, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) (Fig. 19A).

**Tableau 15 : Liste des composés additionnés au Matrigel, et testés *in vivo* pour leurs propriétés chimioattractantes.**

Traitements	Composé testé	Concentration	Volume injecté
Contrôle négatif	∅	-	200 µL
Contrôles positifs	EGF	500 ng/mL	
	VEGF	500 ng/mL	
Ligands urotensinergiques	<u>Ligands agonistes de l'UT :</u> mUII, hUII, URP, UII <sub>4-11</sub> , UII <sub>5-11</sub>	1 µg/mL	
	<u>Ligands antagonistes de l'UT :</u> urantide, palosuran	10 µg/mL	

Chaque composé est additionné dans le Matrigel avant polymérisation et injection sous-cutanée. EGF, *epidermal growth factor* ; hUII, urotensine II humaine ; mUII, urotensine II de Souris ; UT, *urotensin II receptor* ; URP, *urotensin II-related peptide* ; VEGF, *vascular endothelial growth factor*.



**Figure 19 : Protocoles d'études in vivo de chimioattraction et de tumorigénèse.** **A**, protocole d'étude des effets chimioattractants de l'U11. Des éponges de Matrigel contenant un agoniste (hU11, mU11, URP, U11<sub>4-11</sub> ou U11<sub>5-11</sub>; 1 $\mu$ g/mL; chacun) et/ou un antagoniste (palosuran ou urantide; 10 $\mu$ g/mL; chacun) de l'UT sont injectées chez des souris C57Bl/6. Après trois semaines, les éponges sont prélevées et les aspects *in situ* (gauche, pointillés) et après exérèse (droite) sont illustrés par les photographies. **B**, croissance de xéno greffes hétérotopiques issues d'un GBM humain. Les cellules U87-MG ( $3 \cdot 10^6$  cellules/100  $\mu$ L) sont injectées chez des souris immunodéprimées *Swiss Nude* et forment un bourgeon tumoral ( $\approx 100 \text{ mm}^3$ ) après une douzaine de jours. Les molécules d'intérêt (hU11, mU11, URP, U11<sub>4-11</sub>, urantide ou palosuran) sont administrées quotidiennement de manière intratumorale dans une étude dite « précoce ». La moitié des effectifs est euthanasiée lorsque le volume tumoral du groupe hU11 atteint 2000  $\text{mm}^3$  (environ 27 jours post implantation) pour comparer les effets des traitements sur une durée équivalente, l'autre moitié des animaux est utilisée pour des études de survie. Résumée dans la dernière frise chronologique, l'étude de l'impact de traitements tardifs débute lorsque les tumeurs atteignent un volume moyen de 500  $\text{mm}^3$ . La croissance tumorale est mesurée tous les deux jours. hU11, urotensine II humaine; mU11, urotensine II de Souris; UT, *urotensin II receptor*; URP, *urotensin II-related peptide*.

Après trois semaines, les animaux anesthésiés par une brève exposition à l'isoflurane (5%), sont sacrifiés par élongation vertébrale et les éponges solides de Matrigel sont photographiées, réséquées et congelées dans de l'isopentane (-50°C). Pour les expériences

d'immunohistochimie, des tranches microscopiques (9  $\mu\text{m}$ ) sont réalisées à l'aide d'un Cryostat CM3050 (Leica Microsystems SAS, Nanterre, France).

## 7. Xénogreffes hétérotopiques de GBM humain

Des souris mâles de souche *Swiss Nude* (Charles River Laboratory, L'Arbresle, France) sont gardées dans un box de type EOPS par groupe de 4 dans des cages collectives filtrées et maintenues dans une armoire ventilée, (23°C, photopériode 12h/12h), avec la nourriture et l'eau préalablement autoclavées *ad libitum*.

Les animaux sont préalablement sédatés dans une chambre d'inhalation contenant de l'isoflurane (3%) et la peau de la zone d'injection (flanc droit) est aseptisée avec une solution de Biseptine. Une suspension de cellules U87-MG ( $3.10^6$  cellules/100  $\mu\text{L}$  PBS) est injectée de manière sous-cutanée à l'aide d'une seringue à insuline stérile Myjector (Fig. 19B). Tous les deux jours, les animaux sont pesés et le développement du bourgeon tumoral est suivi par mesure à l'aide d'un pied à coulisse numérique (Fisher Scientific SAS, Illkirsh, France) après immobilisation préalable par une brève anesthésie gazeuse dans une chambre d'inhalation contenant de l'isoflurane (3%). Le volume tumoral (V) est déterminé comme suit :  $V = (1/2) a \times b^2$  (a et b, longueur et largeur de la masse tumorale apparente, respectivement).

Pour les expériences portant sur la tumorigenèse « précoce » (Fig. 19B), les groupes d'animaux sont répartis de manière aléatoire. Lorsque le volume tumoral atteint  $100 \text{ mm}^3$ , les injections intratumorales débutent, *i*) pendant 15 jours pour une première moitié (études histologiques comparatives) ou *ii*) jusqu'à obtention d'un volume maximal de  $2000 \text{ mm}^3$  pour la seconde moitié (étude de survie). Pour les expériences de tumorigenèse « tardive » (Fig. 19B), les injections intratumorales commencent lorsque les tumeurs atteignent  $500$  à  $600 \text{ mm}^3$  et se terminent lorsque les tumeurs atteignent un volume maximal de  $2500 \text{ mm}^3$ . Les

molécules d'intérêt sont injectées (10 µL) quotidiennement de manière intratumorale à l'aide d'une seringue à insuline stérile Myjector aux doses reportées dans le tableau 16.

**Tableau 16 : Liste des composés utilisés dans les études de tumorigenèse de xénogreffes hétérotopiques.**

Traitement		Traitement	Dose	Volume injecté
Contrôle	PBS	Précoce/tardif	0,9%	10 µL
Agonistes naturels	hUII		0,1 µg	
	mUII			
	URP			
Agoniste synthétique	hUII <sub>4-11</sub>	Précoce	1 µg	
Antagoniste	urantide	Tardif	10 µg	
		Précoce	0,1+1 µg	
Mélange	hUII+urantide		1 µg	
Antagoniste non peptidique	palosuran		0,1+1 µg	
Mélange	hUII+palosuran			

hUII, urotensine II humaine ; mUII, urotensine II de Souris ; PBS, *phosphate-buffered saline* ; URP, *urotensin II-related peptide*.

En fin d'expérience, les animaux sont anesthésiés par une brève exposition à l'isoflurane (5%), sacrifiés par élongation vertébrale et les tumeurs sont prélevées, photographiées et congelées dans l'isopentane (-50°C), dans l'attente des analyses histologiques par coloration (cf. § 8.1.) ou immunofluorescence (cf. § 8.3.). Dans cette optique, des tranches micrométriques (9 µm d'épaisseur) sont réalisées à l'aide d'un Cryostat Leica CM1950.

## 8. Analyses histologiques

Pour la coloration éosine/hématoxyline, les tranches micrométriques de tissu congelé sont rincées au PBS (3 x 5 min) et plongées dans des bains successifs dont la composition est décrite dans le tableau 17. Des photographies des zones nécrotiques hypodenses (coloration claire), des palissades hyperdenses (zones violettes) et du parenchyme tumoral (alternance de noyaux cellulaires violets et de cytoplasmes clairs) sont réalisées à l'aide d'un microscope optique Nikon Eclipse TS 100, et les quantifications des aires de chacune de ces zones sont mesurées grâce au logiciel *Image J*.

**Tableau 17 : Liste des bains et temps d'incubation pour la coloration, la déshydratation et la fixation de tranches micrométriques de tissu tumoral.**

Bains	PBS	Eosine	H <sub>2</sub> O	Hématoxyline	Fixateur	H <sub>2</sub> O	Ethanol		
							75%	90%	100%
Temps d'incubation	3x5 min	60 s	3x5 min	30 s	Passage	3x5 min	Passages		

PBS, phosphate-buffered saline.

Afin de révéler les zones hypoxiques, des animaux porteurs de xénogreffes reçoivent, deux heures avant leur euthanasie, une injection dans la veine caudale de pimonidazole-HCl. Les tumeurs sont rapidement collectées et congelées dans de l'isopentane (-50°C). Dans les zones de stress oxygénique, le pimonidazole forme des adduits (associations moléculaires covalentes) avec les groupements thiol des protéines, peptides et acides aminés des cellules. Ces complexes sont reconnus par un anticorps primaire spécifique (Hypoxyprobe Omni-Kit, Burlington, USA) et révélés à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa (cf. ci-après).

Les expériences d'immunocyto- et histochimie sont réalisées sur des cultures de cellules (lamelles) et des tranches micrométriques (de Matrigel ou de xénogreffes). Après rinçage au PBS (3 x 5 min, 4°C) et fixation au PFA (4%, 10 min, RT), les cellules ou tranches sont à nouveau rincées au PBS (3 x 5 min), puis perméabilisées au Triton (0,3%, 7 min) pour faciliter l'interaction des anticorps primaires avec leur cible intracellulaire. Les échantillons sont ensuite rincés et incubés (1 h) avec une solution de blocage (PBS, Triton 0,03%, SBF 10%, NDS 1/50°) servant également à la dilution des anticorps primaires (Tab. 18, 4°C, 12h).

**Tableau 18 : Liste des différents anticorps primaires utilisés dans les analyses cyto- et histologiques.**

Anticorps	Cible	Espèce	Fournisseur	Dilution
F4/80	Macrophages	Chèvre	Santa Cruz	1/200
E18	UT murin			
UII	UII murine			
H90	UT hominoïde	Lapin	AbCAM	1/400
Ki67	Cellules en prolifération			
MMP-2	Cellules invasives, vaisseaux sanguins en formation			
MMP-9				
α-SMA	Cellules musculaires lisses	Rat	1/100	
CD31	PECAM-1, cellules endothéliales			
UII	UII humaine	Lapin	Sigma Prestige	1/800
collagène IV	Membrane basale des cellules endothéliales		Millipore	

$\alpha$ -SMA,  *$\alpha$ -smooth muscle cell actin* ; MMP2/9, métalloprotéases matricielles de types 2/9 ; PECAM-1, *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* ; UII, urotensine II ; UT, *urotensin-II receptor*.

Les lames sont rincées puis incubées (2h, 20°C, à l'abri de la lumière) avec les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome Alexa, *i.e.* DAR 488, 540 ou 594 (*donkey anti-rabbit* excités à 488, 540 ou 594 nm), ou DAG (*donkey anti-goat* excité à 594 nm), en adéquation avec l'espèce d'origine de l'anticorps primaire utilisé (Tab. 18). Après rinçage et incubation au DAPI (1/1000°, 5 min), les lames sont lavées une dernière fois au PBS en vue du montage entre lame et lamelle réalisé avec du Mowiol 4-88, et conservées dans une boîte noire à 4°C jusqu'à leur observation au microscope confocal droit Leica TCS SP2. Les analyses d'images sont réalisées à l'aide des logiciels Leica LCS AF et *Image J*.

## 9. Analyse des données

Les analyses biostatistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad PRISM 5 (GraphPad Software Inc, La Jolla, USA). Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  l'erreur standard moyenne (SEM). Les tests *t* de Student (paramétrique) et *U* de Mann-Whitney (non paramétrique) ont été appliqués pour les comparaisons de variables deux à deux. Les analyses de variance multiple ont été réalisées à l'aide d'une *one-way* ANOVA, suivie des *post tests* de Dunnet (analyses *in vitro*) ou de Bonferroni (analyses *in vivo*). Les courbes et médianes de survie ont été obtenues par la méthode de Kaplan-Meier. L'ensemble des données présentées dans la partie Résultats est considéré significatif d'un point de vue biostatistique lorsque la *p-value* est au moins inférieure à 0,05.

# Résultats



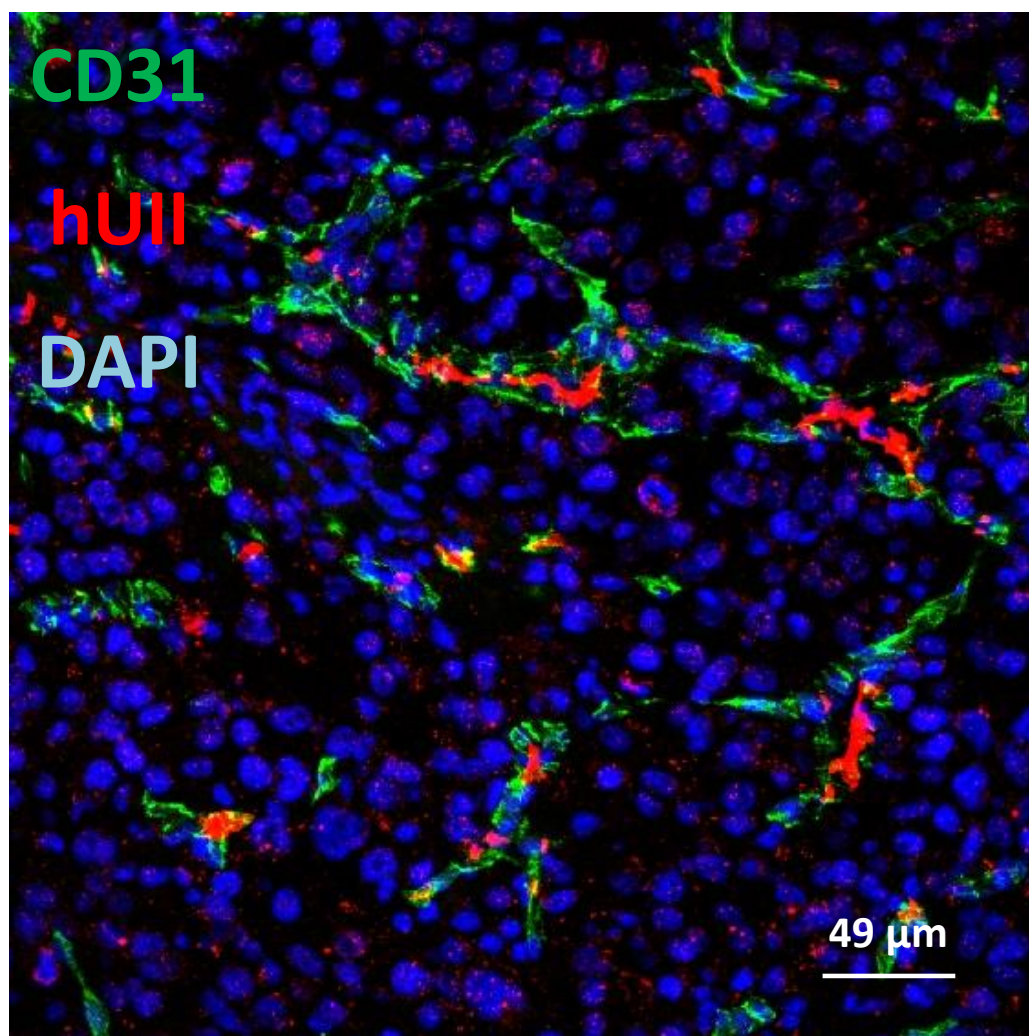


## Résultats

Vadim Le Joncour, Céline Lecointre, Pierre-Olivier Guichet, Laurence Desrues, Romain Modzelevski, Pierre Bohn, Pierre-Olivier Couraud, Jérôme Honnorat, Marie-Christine Tonon, Fabrice Morin, Hélène Castel\* and Pierrick Gandolfo\*

\*Co-last authors

# Urotensin II induced acquisition of neoangiogenic and necrotic features in glioblastomas. Therapeutic potentials of UT receptor specific ligands.





## *Résultats*

### **Objectifs de l'étude**

Le système urotensinergique est intimement lié à la régulation des mécanismes angiogéniques tels que le remodelage vasculaire. L'urotensine II se comporte comme une véritable chimiokine capable de recruter divers types cellulaires, comme des macrophages, des cellules musculaires lisses et des précurseurs endothéliaux. Des travaux de l'équipe « Astrocytes et Niche Vasculaire » récemment publiés (Lecointre *et al.*, 2014) ont mis en évidence la capacité de l'UII à stimuler la migration de lignées humaines d'astrocytome anaplasique (SW1088) ou de glioblastome (U87-MG). En fonction de la distribution extracellulaire du peptide UII, sous forme d'une concentration graduelle ou homogène, l'activation de l'UT entraîne soit une migration cellulaire directionnelle, soit un renforcement des adhésions cellules-matrice et cellules-cellules. Pour autant, aucune étude *in vivo* ne montre à ce jour l'implication du système urotensinergique dans les mécanismes de tumorigenèse des glioblastomes. Leur développement est sous-tendu par un fort taux de divisions et l'établissement d'une néoangiogenèse intratumorale corrélée à la présence de zones de nécrose. Ces caractéristiques soulignent le phénotype anaplasique des gliomes, s'accompagnent d'une invasion massive du parenchyme cérébral et entraînent la récurrence tumorale.

Nos objectifs consistaient donc dans un premier temps à *i*) confirmer le caractère chimioattractant de l'UII sur des lignées humaines de gliome (U87-MG) et des cellules endothéliales humaines d'origine ombilicale (HU-VEC-C) ou issues de microvaisseaux cérébraux (HCMEC-D3), *ii*) vérifier le potentiel pro-angiogénique d'une série d'analogues de l'UII, capables d'activer l'UT ou d'antagoniser les effets de l'UII sur des cellules HU-VEC-C et HCMEC-D3 cultivées en matrices tridimensionnelles, ces dernières permettant l'établissement d'un réseau tubulaire de pseudocapillaires, *iii*) déterminer *in vivo* la nature des cellules angiogéniques, potentiellement impliquées dans la vascularisation intratumorale et

## *Résultats*

répondantes aux signaux chimiokines des agonistes de l'UT, ajoutés dans des éponges de Matrigel greffées de manière sous-cutané chez des souris C57/B16. Dans un second temps, nous avons recherché l'implication du système urotensinergique dans la tumorigenèse et la néoangiogenèse *in vivo* de gliomes humains issus de xénogreffes hétérotopiques de cellules U87-MG dans des souris immunodéprimées *Nude* ; ainsi que le rôle du système urotensinergique sur la cinétique du développement tumoral. Nous avons émis l'hypothèse d'un rôle du système UII/UT sur *i*) la mise en place de capillaires tumoraux plus ou moins fonctionnels *via* l'attraction de cellules pro-angiogéniques, *ii*) l'augmentation de la production de protéines extracellulaires impliquées dans la néoangiogenèse, *iii*) l'expression de protéases spécialisées dans le remodelage du microenvironnement, *iv*) l'expression d'intégrines de l'adhésion cellulaire responsables de la croissance des vaisseaux et de l'invasion tumorale, *v*) un index mitotique corrélé à l'expansion du néoplasme et *vi*) la modulation de l'hypoxie et de la nécrose intratumorale concomitante, signes de malignité.

Grâce à l'amélioration des connaissances du rôle de l'UII et de son récepteur UT dans la croissance des tumeurs, nous souhaitons développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant le récepteur UT et capables de bloquer plusieurs séquences du développement des glioblastomes et d'autres types de cancers dans lesquels le système urotensinergique est fortement exprimé.

## *Résultats*

### **Résumé**

Les glioblastomes font partie des néoplasmes centraux les plus fréquents et les plus agressifs, caractérisés par un phénotype fortement infiltrant et néo-angiogénique. De nombreux neuropeptides vasoactifs ont été identifiés comme participant dans leur tumorigenèse et parmi eux, les peptides urotensinergiques sont impliqués dans les phénomènes de croissance tumorale, d'invasion cellulaire et d'angiogenèse intraglomulaire. Notre étude démontre que l'urotensine II humaine (hUII) stimule la migration cellulaire et la tubulogenèse *in vitro* de cellules endothéliales humaines provenant de microvaisseaux périphériques (HUV-EC-C) et cérébraux (HCMEC-D3). Le paralogue naturel de l'hUII, l'URP, des analogues synthétiques de l'hUII ainsi que le ligand biaisé urantide présentant tous des séquences modifiées et/ou plus courtes sont capables de diminuer la néoangiogenèse *in vitro*, alors qu'un antagoniste non peptidique de l'UT, le palosuran, ne parvient pas à modifier la tubulogenèse basale. Cependant, l'urantide et le palosuran s'avèrent capables d'inhiber la tubulogenèse induite par l'hUII. Ajoutés dans des éponges de Matrigel implantées de manière sous-cutanée dans des souris, l'hUII et l'UII murine au contraire des peptides courts (URP, UII<sub>4-11</sub>) et des ligands biaisés/antagonistes, stimulent significativement l'invasion de la matrice gélifiée par des macrophages, des cellules endothéliales et musculaires lisses. Xénogreffés dans des souris immunodéprimées *Nude*, des gliomes humains issus de la lignée U87-MG, exprimant l'UT et l'UII, et injectés quotidiennement de manière intratumorale avec différents ligands urotensinergiques. L'administration d'hUII accélère le développement tumoral, alors que le palosuran et de manière encore plus spectaculaire, l'urantide, retardent significativement la cinétique de tumorigenèse. En outre, l'hUII provoque la formation d'un réseau vasculaire tortueux, accompagné d'une forte augmentation de l'index de prolifération (Ki67), de l'expression de protéases de la famille des gélatinases (MMP-2 et -9) et des intégrines pro-angiogéniques, ainsi qu'une augmentation globale de l'hypoxie et de la nécrose

### *Résultats*

intratumorales. De manière intéressante, le palosuran et l'urantide sont capables de bloquer l'apparition de ce profil mésenchymateux et de prévenir les effets de l'administration d'hUII, bien que l'urantide administré sur de longues périodes (+ 30 jours) mime les effets de l'hUII concernant l'index nécrotique et l'augmentation de l'expression des intégrines par les cellules tumorales. Ces résultats démontrent que l'UII est un peptide vasoactif pro-tumoral, capable de recruter des cellules pro-angiogéniques, de stimuler la néoangiogenèse et les adhésions cellulaires, associés à un renforcement des caractéristiques histologiques de malignité telles que l'hypoxie et la nécrose. Le blocage spécifique de la signalisation du récepteur UT, à l'aide d'antagonistes ou de ligands biaisés d'origine peptidique, constituent de nouveaux candidats pour l'élaboration de molécules à visée thérapeutique.

## **Urotensin II induced acquisition of neoangiogenic and necrotic features in glioblastomas. Therapeutic potentials of UT receptor specific ligands**

Vadim Le Joncour<sup>1</sup>, Céline Lecointre<sup>1</sup>, Pierre-Olivier Guichet<sup>1</sup>, Laurence Desrues<sup>1</sup>, Romain Modzelevski<sup>2</sup>, Pierre Bohn<sup>2</sup>, Pierre-Olivier Couraud<sup>3</sup>, Jérôme Honorat<sup>4</sup>, Marie-Christine Tonon<sup>1</sup>, Fabrice Morin<sup>1</sup>, Hélène Castel<sup>1\*</sup> and Pierrick Gandolfo<sup>1\*</sup>

\*Co-last authors

<sup>1</sup>Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, DC2N, Astrocyte and Vascular Niche, Biomedical Research Institute (IRIB), TC2N network, University of Rouen, 76821, France.

<sup>2</sup>EA 4108, Laboratoire d'Informatique, de Traitement de l'Information et des Systèmes (LITIS), University of Rouen, 76000, France.

<sup>3</sup>Inserm U1016, Cochin Institute, University of Paris Descartes, 75014, France

<sup>4</sup>Neuro-Oncology Department, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Neurologique, F-69677 Bron, France; Lyon Neuroscience Research Center INSERM U1028/CNRS UMR 5292, F-69372 Lyon, France; University of Claude Bernard - Lyon 1, Villeurbanne, France

The authors declare no conflict of interest.

**Running title:** Urotensin system in glioma neo-angiogenesis and necrosis

**Key Words:** Glioblastoma, Urotensin II, UT receptor, Neo-angiogenesis, Tumor growth

\*Address for correspondence: Hélène Castel, Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, DC2N, Astrocyte and Vascular Niche, Biomedical Research Institute (IRIB), TC2N network, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

E-mail: helene.castel@univ-rouen.fr; Tel: (33) 235-14-6630; Fax: (33) 235-14-6946.

Manuscript word count: 11,511 words

Figures and table: 6

Supplementary Figures: 3



## *Résultats*

### **Abstract**

Gliomas are the most common primary brain tumors and are characterized by strong invasion and neo-vascularization. Several vasoactive peptides have been shown to be involved in tumor growth, invasion and neo-angiogenesis including the atypical vasoactive chemokine urotensin II (UII). In the present study, we established that human UII (hUII) stimulates human endothelial HUV-EC-C and HCMEC-D3 cell migration, as well as tubulogenesis *in vitro*. In contrast, urotensin peptide analogs exhibiting shorter sequences as URP or the biased UT ligand urantide, inhibited *in vitro* neo-angiogenesis whereas the UT antagonist palosuran fails to significantly modify basal tubulogenesis. However, urantide and palosuran are shown to prevent the UII-induced tubulogenesis. In mice-transplanted Matrigel sponges, hUII/mUII, unlike short sequence peptides (URP/UII<sub>4-11</sub>) and biased/antagonists, markedly stimulated invasion of matrices by macrophages, endothelial and smooth muscle cells. In *Nude* mice, U87-MG glioblastoma cells were heterotopically xenografted and then treated with the different UT ligands. These tumors expressed UT and UII and intratumoral injections of hUII accelerate glioblastoma development whereas palosuran and more drastically urantide, significantly delay tumor growth. In these tumors, UII induces the appearance of a "tortuous" vascular network, accompanied by an increase in proliferation index (Ki67), metalloprotease-2 and -9 (MMP-2 and -9) and integrin expression, hypoxia and necrosis. Most often, urantide and palosuran constitutively inhibited this mesenchymal spectrum and prevent the effects of UII. An exception concerns the UII-induced integrin expression in glioma cells and necrosis that is shown to be mimicked by urantide. These findings show that UII promotes the recruitment of pro-angiogenic cells and neo-angiogenesis, induces cell adhesions, associated with necrosis, and accelerates GBM tumor growth. The specific blockade of UT receptor signaling by means of UT antagonists or biased ligands constitutes a new option in the therapeutic treatment of GBM.

## *Résultats*

### **Introduction**

Gliomas are the most common form of primary tumors of the central nervous system (CNS). The glioblastoma multiforme (GBM), the most aggressive glioma (Louis *et al.*, 2007), is particularly resistant to chemo/radiotherapy and recurrence is almost systematic (Shinojima *et al.*, 2003; Wen and Brandes, 2009). Despite the significant therapeutic and conceptual advances, there is to date no cure, resulting in a median survival of about 15 months (Wen and Kesari, 2008). Indeed, these tumors are characterized by unique histopathological features including regional heterogeneity with necrotic foci, often surrounded by a hyper-cellular area of “pseudo-palisading” cells (Wen and Kesari, 2008). Pseudo-palisades are known to be hypoxic and show induction of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), as well as proangiogenic factors (Ron, 2006). Variations in the extent and degree of hypoxia/necrosis in combination with variable angiogenic patterns represent a considerable problem in radiotherapeutics and anti-angiogenic management of GBM (Sato *et al.*, 2010; Charles *et al.*, 2011; Takano *et al.*, 2012). In particular, the systematic relapse of GBM patient after anti-angiogenic treatment is associated with a modified behavior of gliomas, from a profuse neo-angiogenesis to major cell invasion of brain parenchyma (Narayana *et al.*, 2012) involving chemotaxic factors (Xie *et al.*, 2014). Thus, future treatments should consider a better understanding of the role of chemoattractant factors such chemokines, cytokines or vasoactive peptides activating G protein-coupled receptors (GPCRs) (Gritsenko *et al.*, 2012; Mimeault and Batra, 2011), to allow new therapeutic proposals targeting invasion and neo-angiogenesis.

Tumor cells are one of the major sources of chemoattractants and many tumor cells express one or more chemoattractant GPCRs to their advantage (Zhou *et al.*, 2014). In addition, tumor-derived chemoattractants are mediators of leucocyte attraction, in particular macrophages, that may result in the chronic inflammation in the tumor microenvironment together with vigorous angiogenesis (Glass and Synowitz, 2014). Then, the role of

## *Résultats*

chemoattractant GPCRs in chemotaxis, invasion, and production of mediators promoting angiogenesis by tumor cells and inflammatory cells, has to be specifically appreciated.

In this context, vasoactive peptides and their receptors, conventionally involved in the angiogenic, invasive and inflammatory processes, constitute promising therapeutic targets. Vasoactive neuropeptides, like angiotensin II (AngII) or adrenomedullin (ADM), have been particularly studied. The selective blockade of the Ang II receptor AT1 by Losartan inhibits the development of murine glioma and decreases tumor neo-angiogenesis (Rivera *et al.*, 2001; Arrieta *et al.*, 2005) while overexpression of AT1 has been correlated with a poor survival prognosis (Arrieta *et al.*, 2008) in GBM patients. The antagonism of the vasoactive peptide endothelin-1 (ET-1) receptor by atrasentan in a phase 1 clinical study showed partial responses lasting stabilization or even progression of GBM (Phuphanich *et al.*, 2008). The immunoneutralisation of ADM has been shown to cause a dramatic inhibition of prostate and GBM tumor development in *Nude* mice, accompanied by a drastic diminution of intratumoral vascular density (Ouafik *et al.*, 2002; Kaafarani *et al.*, 2009; Berenguer-Daize *et al.*, 2013). These data clearly indicate that vasoactive peptides are involved in glioma development processes.

Among potential interesting vasoactive peptides, urotensin II (UII) and its peptide paralog UII-related peptide (URP) identified in 2003 (Sugo *et al.*, 2003), are cyclic neuropeptides of 11 and 8 amino acids respectively and exhibit a fully conserved C-terminal cyclic hexapeptide CFWKYC core that plays a major role in biological activity (Brulé *et al.*, 2014). UII and URP are considered the most potent endogenous vasoactive molecules known so far, acting through a common GPCR called UT. Recent studies have established that the urotensinergic system is involved in migration of rat fibroblasts (Zhang *et al.*, 2008), rat endothelial progenitor cells (Xu *et al.*, 2009) or human monocytes (Segain *et al.*, 2007) and in *in vitro* neo-angiogenesis (Spinazzi *et al.*, 2006), thus stressing the potential chemokine and pro-angiogenic status of

## *Résultats*

U11. Moreover, it has been shown that UT receptor regulates migration of prostatic (Grieco *et al.*, 2011), bladder (Franco *et al.*, 2014) and colon (Federico *et al.*, 2014) cancer cell lines, and that U11 may activate tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6, metalloproteinase-9 (MMP-9) and nuclear factor-kappa B (NF- $\kappa$ B) while promoting lung adenocarcinoma growth (Wu *et al.*, 2010).

In the CNS, UT was detected in astroglial processes *in vivo* (Lin *et al.*, 2003), in cerebellar glial cells, in human native astrocytes and in a human glioblastoma cell lines (Jégou *et al.*, 2006; Desrues *et al.*, 2012; Nguyen *et al.*, 2012). Accordingly, we previously demonstrated that U11 and UT are expressed in GBM biopsies and that U11 induces chemotactic migration of glioma cells through G<sub>13</sub>/Rho/ROCK/actin polymerization and also a Gi/PI3K pathway in glial tumor cell lines (Lecointre *et al.*, in press). Then, the chemoattractant activity of the U11-UT system may play multiple roles in invasion of the brain parenchyma by glial tumor cells and in neo-angiogenesis, and thus constitutes a non-ubiquitous promising therapeutic target.

The powerful properties of U11, observed in numerous models, have led to the rapid development of urotensinergic analogs that can be used in the treatment of cancer. The first UT receptor antagonists were obtained by modifying the cyclic domain, leading to analogs such as [Orn<sup>8</sup>]U11, [Orn<sup>5</sup>]URP or urantide (Camarda *et al.*, 2002; Vergura *et al.*, 2004; Desrues *et al.*, 2008). In a disease context, these peptides did not always behave as antagonists, and they did not provide the expected benefits in diabetes (Sidharta *et al.*, 2009) or asthma (Portnoy *et al.*, 2013). Thus, a recently designed study helped to characterize the signaling pathways associated with UT. In HEK cells, U11, URP and also U11<sub>4-11</sub> synthetic analogs stimulate the UT coupling to G<sub>q</sub>, G<sub>i</sub>, G<sub>o</sub>, G<sub>13</sub> proteins and to the recruitment of  $\beta$ -arrestin 2, IP3, cAMP, NF- $\kappa$ B and ERK1/2 (Brulé *et al.*, 2014). In contrast, the ligands listed so far as "antagonists" such as urantide, recruit all these signaling pathways except the  $\beta$ -arrestin 2 and do not cause receptor internalization. Consequently, urantide represents rather a

### *Résultats*

biased UT ligand selecting some human UT transduction pathways, whose activity should be compared with UT antagonists such as palosuran, a non peptide UT antagonist exhibiting high affinity toward primate UT (Desrues *et al.*, 2012; Clozel *et al.*, 2004) in the context of GBM development.

In the present study, we established that human UII (hUII) promotes the recruitment of pro-angiogenic cells, promotes neo-angiogenesis, cell adhesions, associated with necrosis, and accelerates GBM tumor growth. The specific blockade of UT receptor signaling by means of UT antagonists or biased ligands thus constitutes a new option in the therapeutic treatment of GBM.

## *Résultats*

### **Materials and Methods**

#### **Cell lines in culture**

Cell lines were obtained from the American Type Culture Collection, and culture media components were purchased from Life Technologies or Lonza. Human glioblastoma U87-MG were maintained in minimum essential medium supplemented with sodium pyruvate (1%), non-essential amino acids (1%), antibiotics (1%) and heat-inactivated fetal bovine serum (10%). Human endothelial umbilical HUV-EC-C (ATCC) and cerebral microvessel HCMEC-D3 (Provided by P.O. Couraud) cell lines were maintained in endothelial basal medium-2 containing chemically defined concentrated lipids (1%), HEPES (1%), hydrocortisone (0.2 µg/mL), bFGF-2 (50 ng/mL), ascorbic acid (1 µg/mL) and gold-defined fetal bovine serum (5%). Cells were cultured in a humidified chamber containing 5% CO<sub>2</sub>, with fresh medium every two days. When cultures reached 90% of confluence, cells were harvested and prepared for *in vitro* experiments according to following procedures.

#### **Cell growing assay**

Cells were seeded at  $3 \times 10^6$  in 75 cm<sup>2</sup> flasks, harvested with trypsin-EDTA (1%) and centrifuged (5 min, 0.1 g). Cell pellet was resuspended in the appropriate culture media, seeded in 24-well plates ( $2.5 \times 10^5$  cells/well) and incubated in absence or presence of hUII (Phoenix Pharmaceuticals, Inc) ( $10^{-12}$  to  $10^{-7}$  M). Cell number was determined in each well after 48 hour incubation, with an electronic cell counter (Z2, Beckman Coulter). The data were represented as the ratio of cell number normalized to control.

## *Résultats*

### **Cell migration assay**

Transwell filters (24 wells, Corning, Fisher Scientific) with 8  $\mu\text{m}$  pores were coated with 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  collagen I (Invitrogen) ( $4^{\circ}\text{C}$ , 12 h). Endothelial and glioma cells ( $5 \times 10^4$ ) suspended in 100  $\mu\text{L}$  of culture medium (with 1% gold-defined fetal bovine serum for endothelial cells) were added onto the upper chamber of the Transwell and UT ligands (600  $\mu\text{L}$ ) were added in wells, in order to create chemotaxic diffusion through the microporous membrane. After 24h incubation period at  $37^{\circ}\text{C}$ , cells were rinsed with PBS and non-migrating cells on the upper surface of the filter were removed using a cotton-swab. Migrating cells were fixed in successive ethanol baths, stained with eosin and hemotoxilin and filters were mounted on glass slides with Mowiol (Calbiochem). Random phase contrast images of filters were then recorded, using a digital camera (Nikon D-600) connected to a Nikon microscope (Eclipse TS-100) and images analysis was carried out using *Image J's* Cell Counter plugin (NIH). The data were represented as the ratio between treatment and control conditions.

### ***In vitro* tubulogenesis assay**

Growth factor-reduced Matrigel (Becton-Dickinson) was thawed on ice overnight and spread homogeneously (100  $\mu\text{L}$ ) in 24-well plates for 30 minutes at  $37^{\circ}\text{C}$  to allow Matrigel polymerization. Endothelial cells ( $5 \times 10^4$  cells/ $\text{cm}^2$ ) were seeded in basal medium and incubated for 24 h in absence or presence of UT agonists (Phoenix Pharmaceuticals, Inc) (hUII, mUII, URP, UII<sub>4-11</sub>, UII<sub>5-11</sub>;  $10^{-12}$  to  $10^{-7}$  M, each) and/or the UT biased urantide (Peptides International) and antagonist palosuran (Actelion Pharmaceuticals) ( $10^{-10}$  to  $10^{-7}$  M, each) ligands. Phase contrast images of cultures were then recorded, using a digital camera (Nikon D-600) connected to a Nikon microscope (Eclipse TS-100) and image analysis was

## *Résultats*

carried out using *Image J* software. The data were represented as the ratio of treatment-induced tubulogenesis normalized to control.

### **Animal studies**

Animal procedures were carried out in accordance with recommendations of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators (authorization no. 76.A.25 from the Ministère de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Pêche). For the tumorigenesis studies, 6-week-old male athymic *Swiss (nu/nu)* mice (Charles River Laboratories) were used. For the *in vivo* chemoattraction assay, 3- to 6-week-old male C57Bl/6 mice (René Janvier Laboratories) were used. Mice were acclimated and housed in sterile cages in groups of six, in a temperature-controlled room with a 12-hours light/12-hours dark schedule, and fed with autoclaved food and water *ad libitum*.

### ***In vivo* chemoattraction assay**

Male C57/Bl6 mice were injected subcutaneously above the pelvis area with 200  $\mu$ L of liquid growth factor-reduced Matrigel combined either with EG-VEGF (Miltenyi Biotechnologies) or with human recombinant EGF (R&D Systems) (500 ng/mL, each), UT agonists (hUII, mUII, URP, UII<sub>4-11</sub>, UII<sub>5-11</sub>; 50 ng/mL each), and/or UT antagonists (palosuran, urantide; 1  $\mu$ g/mL each), or alone as a negative control. Subcutaneous plug incubation continued 21 days or until mice had to be sacrificed per institutional ethical guidelines criteria (*e.g.*, symptoms) or study end. Mice were then euthanized and Matrigel plugs were resected and immediately frozen in a -40°C isopentane solution until immunohistochemistry.



## *Résultats*

### **Xenografts studies**

U87-MG cells were injected subcutaneously into the right flank ( $3 \times 10^7$ ) of 6-week-old male athymic mice. Mice were randomized into treatment groups after tumors were developed (mean s.c. volume =  $100 \text{ mm}^3$ , 400-600  $\text{mm}^3$ ). UT agonists (hUII, mUII, URP, UII<sub>4-11</sub>; 2.9 ng/kg, each) or UT antagonists (palosuran, 29 ng/kg; urantide 290 ng/kg) or saline solution (vehicle) were administered intra-tumorally every day. Subcutaneous tumor volumes were measured with calipers every two days, by using the following formula: width x length x height x 0.52. Treatment continued until mice had to be sacrificed per institutional ethical guidelines criteria (*e.g.*, 2-cm<sup>3</sup> maximal tumor dimension, cutaneous ulceration or symptoms) or study end. In some experiments, 30 minutes before mice euthanasia, pimonidazole (60 mg/kg, Hypoxyprobe<sup>TM</sup>-1 Omni Kit) was administered intravenously, and tissues were collected and immediately frozen in a -40°C isopentane solution until immunohistochemistry.

### **Immunohistochemistry**

Matrigel plug cryostat sections (10  $\mu\text{m}$  in size) were processed in a Leica CM1900 cryostat, xenograft sections (9  $\mu\text{m}$  in size) were processed in a Leica CM1950 cryostat, mounted directly on slides and then fixed in 4% paraformaldehyde. Nonspecific binding sites were blocked with normal serum (10%) from the animal source of the appropriate corresponding secondary antibody. Immunolabelling was conducted using primary antibodies against UT receptor, F4/80 (Santa Cruz Biotechnologies); collagen IV (Merck-Millipore);  $\alpha$ -smooth muscle cell actin, Prestige-Graded UII (Sigma-Aldrich) and  $\alpha_v$  integrin, matrix metalloprotease (MMP) of type-2 or -9, CD31 and CD34 (Abcam), diluted according to the manufacturer's technical specifications in the incubation media [0.1 mol/L Tris (pH 7.5), 0.15 mol/L NaCl, 10% normal serum, and 0.03% Triton X-100] and then, incubated overnight at

## *Résultats*

4°C. Signal amplification utilized fluorochrome (Alexa 488 or Alexa 594) conjugated secondary antibodies (Life Technologies) and cell nuclei DNA stained with 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI, Sigma-Aldrich). Control sections were incubated in absence of the primary antibodies.

### **Statistical analyses**

The presented data are expressed as mean  $\pm$  SEM. GraphPad Prism (version 5; GraphPad Software, Inc) was used for statistical analyses. Student *t* test was used for parametric comparisons between paired variables, the Mann-Whitney *U* test was used for nonparametric pairwise comparisons, multivariate analyses were done with ANOVA with *post hoc* Dunnet (*in vitro* analyses) or Bonferroni tests (*e.g.*, *in vivo* studies) as appropriate and survival curves were generated by the Kaplan-Meier method. All reported *P* values were two-sided and considered to be statistically significant at  $P < 0.05$ .

## Résultats

### Results

#### **UT mediates motility of human glioblastoma and endothelial cells and stimulates tubulogenesis *in vitro***

To examine the role of hUII in glioma tumorigenesis, we used U87-MG glioblastoma cells, naturally expressing UII and functional UT (Fig. 1A) (Lecointre *et al.*, in press). We verified that UT activation by hUII leads to concentration-dependent chemotactic migration in Boyden's chamber assay (Fig. 1B). hUII ( $10^{-9}$  and  $10^{-8}$  M) significantly stimulated U87 cell migration by  $133.5 \pm 9.44\%$  and  $128.3 \pm 6.57\%$ , respectively after 24 hours compared with control (Fig. 1B, left). hUII did not regulate U87 cell density after a 48-hours treatment (Fig. 1B, right). In order to verify whether the urotensinerigic system may also be functional in endothelial cells, we tested the effects of hUII on two human endothelial cell lines, the transformed micro-arterial endothelial cells isolated from human brain, HCMEC-D3 and the umbilical venal transformed HUV-EC-C cells. Both HCMEC-D3 (Fig. 1C) and HUV-EC-C (Fig. 1E) cells endogenously expressed UT at the cytoplasmic membrane and exhibited UII-labelling in the cytoplasmic and nuclear compartments (Fig. 1C and E). When tested on HCMEC-D3, hUII ( $10^{-10}$  and  $10^{-9}$  M) robustly stimulated cell migration during a 24-hour treatment (Fig. 1D; left) with no measurable effects on cell density at these concentrations (Fig. 1D and F). However, hUII ( $10^{-8}$  M) induced a weak but significant decrease of HCMEC-D3 cell number (Fig. 1D, right), reflecting the tendency also observed on U87 MG cells. These results reveal that UT activation leads to endothelial and glioma cell migration *in vitro*, and suggest that UII stimulates glioma invasion/migration but also intra-tumoral neo-angiogenesis.

We then tested the ability of some UT natural "agonists" (hUII, URP), shorter synthetic peptide analogs referred as full agonist (hUII<sub>4-11</sub>), inactive analog (hUII<sub>5-11</sub>), biased ligand

## *Résultats*

(urantide) and antagonist (palosuran) (Tab. 1) to modify the tubular organization of HCMEC-D3 and HUV-EC-C cells on tridimensional Matrigel extracellular matrix. In order to define which neo-angiogenic mechanisms UT ligands can modulate, we performed a complete review of the parameters related to stalker-type endothelial cell adhesion, collective migration (junctions number) and proliferation (major junction number), or tip-type endothelial cells chemotactic motility (branches number) and intussusception (segments number), or related to both endothelial cell cooperation (branches length) and global network complexity (major segments and polygons number). Our results indicate that only hUII is able to enhance the endothelial network complexity in both HCMEC-D3 and HUV-EC-C, whereas shorter sequences URP and hUII<sub>4-11</sub> ( $10^{-7}$  M), and even UII<sub>5-11</sub> ( $10^{-7}$  M) disrupted endothelial cell association measured through the number of junctions, major junctions or major segments (Fig. 1G). It appears that hUII pro-angiogenic properties are mainly relayed by endothelial cell motility, as demonstrated by significant increased amount of endothelial junctions, segments and branches, resulting in a much more densified and complex tubular structure (Fig. 1H). In addition, UT biased ligand urantide ( $10^{-6}$  M) was able to drastically alter these endothelial associations and branches lengths mainly in HCMEC-D3 cells (Fig. 1G) and the antagonist palosuran ( $10^{-6}$  M) did not significantly modify the endothelial tubulogenesis by itself (Fig. 1G and F). Interestingly, both urantide and palosuran systematically prevented hUII-induced tubulogenic effects (Fig. 1H). These data indicate that hUII would play a major role in intra-cerebral capillaries migration, association and tube formation highlighting its pro-angiogenic role, at least *in vitro*. The endogenous paralog of UII, URP, or synthetic short sequence peptides (hUII<sub>4-11</sub> and hUII<sub>5-11</sub>) are able to diminish tubulogenesis and thus likely mimic urantide effects. Then, urantide and palosuran exhibit here remarkable anti-neo-angiogenic properties.

## *Résultats*

### **Chemotaxic action of hUII towards pro-angiogenic cells *in vivo***

In the context of the glioblastoma development, we tested the potential pro-angiogenic function of the urotensinergic system *in vivo*, by means of Matrigel plugs subcutaneously implanted in C57/Bl6 mice. To validate the assay, we first impregnated liquid matrigels with either VEGF or EGF (500 ng/mL, each) and then injected in mice for 3 weeks. Resected sponges revealed blood drops or blood vessels (Fig. 2A) and immunohistochemical analyses showed a strong increase of immunopositive cells for the macrophage marker F4/80, basal membrane of endothelial cells collagen IV (COLL IV) and  $\alpha$ -actin of smooth muscle cells ( $\alpha$ -SMA) (Fig. 2B). Using the same strategy, Matrigel containing hUII or mUII (50 ng/mL, each) contained such hemorrhagic drops (Fig. 2B) and immunoquantification showed a marked stimulation of macrophage invasion and of capillary-like structures, formed by the association of endothelial and smooth muscle cells (Fig. 1B). In the extension of our *in vitro* tubulogenesis studies, we added shorter peptides such as URP and hUII<sub>4-11</sub> (50 ng/mL) to Matrigel composition. It can be noticed that UT biased ligand urantide (50 ng/mL) and antagonist (palosuran, 50 ng/mL), exhibited a clear tendency to diminish attraction of macrophages, smooth muscle and endothelial cells (Fig. 2B), suggesting that inhibition of UT expressed by the first chemoattracted cells, led to the total prevention of plug invasion after 3 weeks *in vivo*. Altogether, these results strongly indicate that the urotensinergic system is involved in neo-angiogenesis, a key mechanism in glioblastoma development.

## *Résultats*

### **Urotensinergic system expression in glioblastoma and role of UT activation in tumor growth and mice survival**

Growth and expansion of high grade glioma tumors are associated with vascular endothelial cell proliferation and migration, leading to lumen formation as referred to neo-angiogenesis. To investigate the implication of the urotensinergic system in the tumorigenic processes of GBM, we tested the impact of daily intra-tumoral injections of hUII on U87-MG xenografts tumor growth and animal survival. Exogenous administration of hUII significantly accelerated tumor growth (Fig. 3A, D and E). In each experiment, tumor size was the only criteria to sacrifice the animal, no side effects on animal macroscopic health and weight specifically induced by molecules were detected (Supplementary Fig. S1A). Then, according to the tumor growth, a significant decrease of the median survival compared with control tumor bearing animals, was shown (Fig. 3A, D and E). The Vehicle tumor xenografts expressed UII and mostly UT in peri-necrotic areas of the tumor parenchyma, and in vascular components (Fig. 3B). In hUII-treated tumors, an intense immunostaining for both UII and UT was detected in the parenchyma and vascular areas (Fig. 3B). Consistent with our previous observations, shorter peptides URP (2.9 ng/kg ) and hUII<sub>4-11</sub> (2.9 ng/kg) did not significantly modify glioblastoma tumorigenic growth as well as mice median survival (Fig. 3C). Nevertheless, when administered in well-developed tumors (500 mm<sup>3</sup>), URP significantly exhibited anti-tumoral properties by delaying tumor growth (Supplementary Fig. S2), raising the hypothesis of a biased UT signaling in gliomas, leading to inverse hUII-induced mechanisms. Animals receiving intra-tumoral administration of palosuran featured diminished tumor growth and significantly longer survival (Fig. 3D,  $P = 0.2922$ ). Co-administered with hUII, palosuran prevented the hUII-evoked stimulation of tumor growth (Fig 3D). The biased UT ligand urantide showed a strong inhibitory effect on tumor growth by maintaining significantly smaller volume tumors for an extended time period (Fig. 3E)

## *Résultats*

whereas the survival was markedly increased. When added at a 10 fold dose (290 ng/kg) (Fig. S3A), or when tumors reached a large volume ( $>500 \text{ mm}^3$ ), urantide exhibited a marked anti-tumoral effect (Supplementary Fig. S3B). Again, urantide was able to prevent the hUII-induced tumor growth, stressing the therapeutic potential of this ligand in counteracting UII-induced tumorigenic mechanisms.

Similar experiments have been conducted on human explants of oligodendroglioma tumors (Sc1) heterotopically implanted in *Nude* mice. In this subtype of glioma exhibiting low levels of UT and UII expression, particularly glioma cells (Fig. 3G), daily intra-tumoral urantide (29 ng/kg) administration has no significant effect on the kinetic of tumor growth or on survival rate (Fig. 3G). Together, in addition to the UT expression on vascular components arising from the host mouse, UT and UII overexpressed in glioblastoma tumor cells are likely a prerequisite for UII-induced tumor growth and urantide anti-tumoral properties specific of glioblastoma.

### **The urotensinergic system is involved in glioblastoma neo-angiogenesis, metalloprotease 2/9 activation and integrin expression**

In vehicle-treated tumors, UT receptor is highly expressed in both tumor cells and endothelial cells stained with the anti-CD31, a specific endothelial marker (Fig. 4A). Also, these capillaries would serve as a reservoir of UII production, as illustrated by the co-labeling of UII and CD31 in xenografts (Fig. 4A, *top left*). We thus investigated the neo-angiogenic status of these xenografts under hUII, urantide or palosuran treatment after 15 days of daily injections and at the end of the experiment, when hUII-injected tumors reached 1000 to 1500  $\text{mm}^3$ . At 15 days, exogenous injection of hUII (2.9 ng/kg) strongly altered the blood vessel architecture, inducing the appearance of a tortuous and disorganized vascular network (Fig.

### *Résultats*

4A, top *middle*). Treatment with palosuran (29 ng/kg), and in a more extent, urantide (29 ng/kg), markedly diminished blood vessel density (Fig. 4A, top *right*). In long lasting treated large tumors, hUII maintained a strong angiogenic feature (Fig. 4A, bottom *left*) whereas palosuran but mostly urantide decreased the basal vascular density and number of branches. These two last ligands were also able to prevent *in vivo* the pro-neo-angiogenic phenotype of hUII-treated tumors (Fig. 4A, bottom *right*). Interestingly, urantide evoked a reduction in the diameter of capillary-like structures whereas palosuran mimicked the effect of UII by increasing the diameter of these structures (Fig. 4A, bottom *right*). These effects may be attributed to the known ability of hUII to stimulate collagen formation, and the discrepancies between urantide and palosuran could reflect the biased activity of urantide on human UT and its antagonist activity on rodent UT, while palosuran exerts efficient antagonist activities toward mostly human UT. This suggests that one part of the hUII-induced neo-angiogenesis is relayed by human UT and other part involves rodent UT probably on vascular components of host mice.

Neo-angiogenesis and glioma growth have been shown to be associated with MMPs production and activation, and more especially MMP-2 during the intra-tumoral reorganization of blood vessel and MMP-9 during glioma invasion. As illustrated in Figure 4B, MMP-2 was mainly localized in large capillaries-like structures and showed significant higher surface covered after treatment with hUII (2.9 ng/kg) (Fig. 4B, *left*). The pro-invasive, glioma-specific, MMP-9 is also observed in large blood vessels and surrounding tumor cells, with intense immunofluorescence in hUII-treated xenografts (Fig. 4B, *right*). Palosuran (29 ng/kg) and more efficiently urantide (29 ng/kg) showed a tendency to slow-down hUII-evoked MMP-2 detection and significantly prevent the hUII-evoked MMP-9 activation (Fig. 4C, *right*).



## Résultats

Accordingly, as neo-angiogenesis, tumor growth and invasion are accompanied by integrin reactivation, we tested the expression levels of  $\alpha_v$  integrin in tumor blood vessels but also within U87-MG glioma cells after 15 day treatment or when tumors reached  $>1000 \text{ mm}^3$ . At 15 days, it is observed that  $\alpha_v$ -immunolabeled structures are co-stained with components labeled with the antibody directed against the endothelial precursor marker CD34, more specifically in hUII-treated tumors and presented weak immunoreactivity in tumor cells (Fig. 4D, *left*). In large tumors,  $\alpha_v$  integrins were detected in scattered blood vessels in vehicle tumors, and nearly absent of tumor cells, whereas hUII administration led to significant increased expression of  $\alpha_v$  in vessels and in the whole non-necrotic tumoral parenchyma (Fig. 4D, *right*). Interestingly, urantide also induced  $\alpha_v$  integrin activation, suggesting that this phenomenon may be the consequence of the tumor relapse.

### **The urotensinergic system controls glioblastoma cell proliferation, hypoxia and necrosis**

As hUII drastically promotes tumor growth *in vivo*, and stimulated neo-angiogenesis, we next tested whether xenograft treatment results in UT-mediated glioblastoma proliferation. After a 15-day treatment, hUII (2.9 ng/kg) significantly increased the proliferation index, measured by the immunostaining of the proliferation marker Ki67 (Fig. 5A). Palosuran and urantide (29 ng/kg) significantly diminished endogenous cell proliferation by themselves, and hUII-induced proliferation was also prevented by palosuran or urantide (Fig. 5A, *bottom left*). Accordingly, a significant correlation (Pearson's  $r=0.6579$ ,  $R^2=0.4328$ ,  $P<0.0001$ ) between the proliferation index and tumor volumes was found at 15 days (Fig. 5A, *right*). It can be noticed that in large tumors, no clear effects of urotensinergic ligands on proliferation were observed (Fig. 5A *bottom left*), that can be due to intense necrosis, a hallmark of malignant gliomas. We then investigated hypoxia in U87-MG xenografts after a 15-day treatment or when tumors reached  $1000 \text{ mm}^3$ , by intravenous administration of pimonidazole before mice

### *Résultats*

sacrifice. In hUII-treated tumors, the number of hypoxic areas revealed by green fluorescence was strongly increased and the intense labeling indicates massive hypoxic status of the UII tumors. (Fig. 5B). After urantide treatment, a similar tendency can be observed without significance (Fig. 5B). In GBM, the sustained hypoxia is classically followed by necrosis. Necrotic areas have also been studied in hUII and urantide-treated tumors. Size of necrotic area was quantified after hematoxylin-eosin (HE) coloration on 15 day treated and on larger tumors ( $>1000 \text{ mm}^3$ ). In agreement with the hypoxic index, hUII strongly stimulated the size of necrotic areas (Fig. 5C), whereas urantide evoked a significant decrease of necrosis at day 15, and finally showed a necrotic index resembling those of the hUII-treated tumors after tumor relapse (Fig. 5C).

## **Discussion**

The chemotaxic behavior of UII has already been demonstrated on rat fibroblasts and endothelial progenitor cells (Zhang *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2009), human monocytes (Segain *et al.*, 2007) and recently in various neoplasia, such as human prostatic (Grieco *et al.*, 2011), bladder (Franco *et al.*, 2014), colon (Federico *et al.*, 2014) and glioma (Lecointre *et al.*, 2014, in press) tumor cells. In astrocytoma grade III and glioblastoma cell lines, the activation of UT by a gradient concentration of UII has been shown to stimulate directional glioma cell migration (Lecointre *et al.*, 2014, in press). Here, we confirmed the expression of UT and UII by glioma cells and we show that a gradient concentration of human UII induces chemotaxic migration of human transformed endothelial HCMEC-D3 and HUV-EC-C cells, without drastically regulating cell proliferation. The pro-migratory effects of UII obtained from brain and umbilical endothelial cells are in a good agreement with the previous work of Spinazzi *et al.* (2006), first establishing the tubulogenic activity of UT on cultured murine endothelial cells (Spinazzi *et al.*, 2006). However, only few studies investigated the complex urotensinergic system that would come from the existence of URP as a UII backup, and which apparently exhibit the same pharmacological characteristics as UII but exhibit differential vascular and glial activities (Prosser *et al.*, 2008; Hirose *et al.*, 2009; Jarry *et al.*, 2010). In addition, only fragmentary information are up to now available on potential UT pharmacological tools. Modifications of the cyclic domain of UII and URP have been carried out with the aim of generating antagonists. The first “peptide antagonists” of UT were obtained by focusing on residue 8 (Lys) of UII, and various functional assays have been used to develop urantide ([Pen<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7</sup>, Orn<sup>8</sup>]hUII<sub>4-11</sub>), a potent antagonist with no intrinsic activity in models of rat aorta (Patacchini *et al.*, 2003; Camarda *et al.*, 2004). However, when tested on CHO or HEK cells expressing recombinant hUT, this potentially interesting candidate also

## *Résultats*

appeared to possess residual agonistic activity (Camarda *et al.*, 2004) or biased activity (Brulé *et al.*, 2014).

We observed a marked inhibition of the *in vitro* neo-angiogenesis in the presence of the short biased ligand urantide, whereas the non-peptide antagonist palosuran did not modify constitutive tube formation. The absence of effect of palosuran rules out the possibility of an autocrine mechanism, involving secretion of UII by endothelial cells. Rather, our data are in favor of a biased UT receptor signaling cascade that could be specifically activated or blocked by UII or urantide, respectively, during *in vitro* tubulogenesis. However, the prevention of the UII-induced tubulogenesis by both urantide and palosuran, led us to propose that UT orchestrates neo-angiogenesis in agreement to its previously described effects on vascular remodeling (Diebold *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2012). This vasoactive chemokine acts on glioma cell motility as well as neo-angiogenesis, and would thus play a major role on glioblastoma development.

The Matrigel plug assay has become the method of choice for studies involving *in vivo* neo-angiogenesis. In this assay, angiogenic compounds such as bFGF or VEGF can be introduced into cold liquid Matrigel which, after subcutaneous injection in animals, solidifies and allows penetration by host cells and formation of new blood vessels (Akhtar *et al.*, 2002). Here, subcutaneous implantations of Matrigel containing urotensinergic ligands were used to test the ability of the different UT ligands to chemoattract and capture host cells likely expressing UT. Recruited cells attracted by mUII and hUII were immunostained, at least in part, by antibodies directed against specific markers of macrophages, smooth muscle and endothelial cells, suggesting pro-inflammatory and pro-angiogenic properties of UII. Interestingly, the presupposed UT agonists URP or hUII<sub>4-11</sub> exhibited different profiles than UII, *i.e.* did not allow the efficient recruitment of smooth muscle cells and endothelial cells.

## *Résultats*

These *in vivo* data confirmed the previous observations showing that UII favors the chemotactic migration of activated monocytes, strongly stimulates their adhesion to endothelial cells (Park *et al.*, 2013), and induces monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) release by smooth muscle cells. Moreover, a pro-migratory effect of UII has been previously reported *in vitro* towards smooth muscle and endothelial cells (Matsusaka and Wakabayashi, 2006; Zhao *et al.* 2013; Yi *et al.*, 2012). The formation of new, functional blood vessels requires the sprouting of pre-existing blood vessels and their subsequent fusion with other blood vessels, a process known as vascular anastomosis (Eichmann *et al.*, 2005; Carmeliet, 2005; Ribatti *et al.*, 2010). Little is known about the mechanisms by which the endothelial cells (ECs) present at the leading edge of vascular sprouts (named endothelial “tip” cells) integrate directional cues from the environment and fuse to form new functional blood vessels. The requirement of macrophage/EC cell-cell contacts for vascular network formation was suggested by studies showing that certain tumor-associated macrophages physically interact with tumor blood vessels and promote angiogenesis in mouse tumor models (Nucera *et al.*, 2011). In addition, pericytes expressing the  $\alpha$ -smooth muscle cell actin may govern the phenotypic change from a proliferative angiogenic sprout to a mature microvascular conduit possessing a quiescent capillary endothelium. Through both pericyte/endothelial cell contact-dependent as well as endothelial-independent mechanisms, pericytes suppress endothelial growth and migration (Kutcher and Herman, 2009). Together, our results indicate that UII plays a central role in the physiological angiogenesis and vascular remodeling and thus, would promote neo-angiogenesis during glioma development.

Herein, we aimed to dissect the involvement of urotensinergic system in glioma tumorigenesis, by using U87-MG xenografts in *Nude* mice, daily injected with UT agonists (hUII or URP or hUII<sub>4-11</sub>) or UT biased (urantide) or antagonist (palosuran) alone or in combination with hUII. We show that hUII dramatically accelerates glioma growth, correlated

## *Résultats*

with significantly reduced survival of animals, in contrast to URP or hUII<sub>4-11</sub> which remained inactive at the same tested doses. When URP was administered at a higher dose, in large tumors, a significant tumor slow-down was observed. Such a difference between the two natural forms of urotensinergic peptides has been previously described in the literature (Prosser *et al.*, 2008; Jarry *et al.*, 2010; Doan *et al.*, 2012; Chatenet *et al.*, 2013) and the only route of explanation may reside in the UII-mediated long-lasting effects through unsurmountable binding on UT, whereas URP usually induces transient responses. This raises the hypothesis that the 8 aa endogenous peptide URP could be a naturally produced antagonist/biased ligand of UT. Interestingly, the characterized UT biased ligand of 8 aa, urantide, drastically inhibited the glioma growth, promoted long-lasting survival, and exhibited an antagonistic activity on UII-induced tumor growth. By comparison, the most used non peptide primate UT antagonist palosuran only delayed gliomagenesis and survival. Such difference between the efficiency of the two molecules can be explained by pure antagonist behavior of palosuran, compared to the antagonist activity of urantide for the murine host cells involved in neo-angiogenesis, and its biased activity on human UT, allowing selective UT signalings (Brulé *et al.*, 2014). These effects are sustained by a marked expression of UT in glioblastoma cells (and not in oligodendrogliomas) and vascular compartments, which thus constitutes a key pharmacological target for the development of therapeutic compounds.

In order to better investigate the potential UT targeting at a multicellular level during glioblastoma development, we stressed that both receptor and UII-like peptides are expressed in endothelial cells, and in the tumor glioblastoma compartment. We demonstrated that daily injections of hUII favor the basement matrix collagen IV production likely from endothelial cells, overlapping the entire glioma tissue. In a good agreement, UII exhibits fibrosis activity and propensity for collagen I production from aortic vascular smooth muscle cells (Zhao *et*

## *Résultats*

*al.*, 2013). Beside, collagen IV can be produced during vascular remodeling (Tian *et al.*, 2008; Dai *et al.*, 2011), endothelial cell polarization (Egeblad *et al.*, 2010) and glioma cell invasion (Mammoto *et al.*, 2013). As observed here, the blood vessel network appears dramatically disorganized, generating hemorrhages in hUII-treated tumors. Palosuran, and more efficiently urantide significantly diminished collagen IV-related blood vessels, with distinct mechanisms after the long period of injections, since palosuran induced large surface covered by collagen IV surrounding vessels. MMP-2 and MMP-9 are both type IV collagenases that contribute to tumor invasion *in vitro* because of their ability to break down basement membrane, degrading collagen IV (Fan *et al.*, 2012). Expression of MMP-2 and -9 is a key factor for GBM progression by modulating neo-angiogenesis and cerebral intraparenchymateous infiltration (Levicar *et al.*, 2003). Their production and release can be controlled by UT activation, as described in physiopathological models (Diebold *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012). In hUII-treated xenografts, both MMPs are overexpressed, in both vascular and glioma cell parenchyma, participating in active remodeling during tumor progression. Despite only a small tendency of palosuran and urantide to diminish MMP expression when compared to control tumors, both of them are able to prevent the hUII-evoked MMP expression. This MMP activity under hUII, could lead to released RGD-containing proteolytic fragment from interaction with  $\alpha_v\beta_3$  integrins (Xu *et al.*, 2001). Extracellular matrix collagen IV and  $\alpha_v$  integrin are known to be scaffolding adhesion molecules for neo-angiogenesis and tumoral infiltration (Egeblad *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2014) and were correlated to progression of numerous cancers (Ha *et al.*, 2014; van der Horst *et al.*, 2014). We thus describe and quantify  $\alpha_v$  integrin patterns in vessels and glioma cells of U87-MG xenografts treated with either hUII or urantide, and establish a clear switch of expression from endothelium to tumor cells during the course of glioblastoma malignancy, a mechanism exacerbated by both UII and urantide. Since integrin upregulation has been characterized as a negative prognostic factor in

### *Résultats*

GBM (Schittenhelm *et al.*, 2013) and accompany the mesenchymal transformation, these data may explain the pro-tumorigenic action of UII and the relapse of tumors after long-term treatments with urantide.

To determine whether UII can indeed promote malignancy of glioma, detection of the key markers of the high grade glioblastoma, as defined by the World Health Organisation, as well as measurement of the proliferation index and hypoxo-necrotic areas (Louis *et al.*, 2007) should here provide evidence on the impact of the urotensinergic system on glioma genesis. Dividing cells, revealed by Ki67 expression, were quantified in all groups of treated tumors, and a significant correlation between proliferation and tumor volume is found. This shows that hUII injections significantly enhance the mitotic index, whereas palosuran and urantide inhibit mitogenic activity, even in presence of hUII, within glioblastoma tumors. This intense proliferative activity likely leads to hypoxic conditions, and a recent report suggested that proangiogenic features relayed by UT (Diebold *et al.*, 2012) can be controlled by HIF-1 $\alpha$ . It appears that hUII, by accelerating tumor growth and inducing a dense blood vessel network, also exacerbates hypoxo-necrotic areas surrounding gigantic central necrotic areas. Urantide prevents these pro-hypoxic and necrotic mechanisms after a 15-day treatment, but mimics the hUII effects after tumor relapse.

Altogether, our study establish that UII and its receptor UT are implicated in glioma tumorigenesis and play a major role in neo-angiogenesis, promoting MMP-2 and -9 and  $\alpha_V$  integrin expression. Moreover, UT blockade and/or biased signaling can retard GBM growth *in vivo*. High concentrations of UII can promote tortuous neo-vasculature but also induce necrosis, both participating to edema and malignancy. Urantide-like biased ligand represents a lead compound for new therapeutic candidates targeting UT activity in GBM.



## *Résultats*

### **References**

1. Akhtar N, Dickerson EB, Auerbach R (2002) The sponge/Matrigel angiogenesis assay. *Angiogenesis* 5:75-80.
2. Arrieta O, Guevara P, Escobar E, Garcia-Navarrete R, Pineda B, Sotelo J (2005) Blockage of angiotensin II type I receptor decreases the synthesis of growth factors and induces apoptosis in C6 cultured cells and C6 rat glioma. *British journal of cancer* 92:1247-1252.
3. Arrieta O, Pineda-Olvera B, Guevara-Salazar P, Hernandez-Pedro N, Morales-Espinosa D, Ceron-Lizarraga TL, Gonzalez-De la Rosa CH, Rembao D, Segura-Pacheco B, Sotelo J (2008) Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *British journal of cancer* 99:160-166.
4. Berenguer-Daize C, Boudouresque F, Bastide C, Tounsi A, Benyahia Z, Acunzo J, Dussault N, Delfino C, Baeza N, Daniel L, Cayol M, Rossi D, El Battari A, Bertin D, Mabrouk K, Martin PM, Ouafik L (2013) Adrenomedullin blockade suppresses growth of human hormone-independent prostate tumor xenograft in mice. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 19:6138-6150.
5. Brulé C, Perzo N, Joubert JE, Sainsily X, Leduc R, Castel H, Prezeau L (2014) Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 28:5148-5162.
6. Camarda V, Guerrini R, Kostenis E, Rizzi A, Calo G, Hattenberger A, Zucchini M, Salvadori S, Regoli D (2002) A new ligand for the urotensin II receptor. *British journal of pharmacology* 137:311-314.
7. Camarda V, Song W, Marzola E, Spagnol M, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D, Thompson JP, Rowbotham DJ, Behm DJ, Douglas SA, Calo G, Lambert DG (2004) Urantide mimics urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors. *European journal of pharmacology* 498:83-86.
8. Carmeliet P (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* 438:932-936.
9. Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H (2011) The brain tumor microenvironment. *Glia* 59:1169-1180.
10. Chatenet D, Folch B, Feytens D, Letourneau M, Tourwe D, Doucet N, Fournier A (2013) Development and pharmacological characterization of conformationally constrained urotensin II-related peptide agonists. *Journal of medicinal chemistry* 56:9612-9622.
11. Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, Hess P, Mathys B, Morrison K, Muller C, Muller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF, Ziltener P (2004) Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 311:204-212.
12. Dai HY, He T, Li XL, Xu WL, Ge ZM (2011) Urotensin-2 promotes collagen synthesis via ERK1/2-dependent and ERK1/2-independent TGF-beta1 in neonatal cardiac fibroblasts. *Cell biology international* 35:93-98.
13. Desrues L, Lefebvre T, Diallo M, Gandolfo P, Leprince J, Chatenet D, Vaudry H, Tonon MC, Castel H (2008) Effect of GABA A receptor activation on UT-coupled signaling pathways in rat cortical astrocytes. *Peptides* 29:727-734.
14. Desrues L, Lefebvre T, Lecointre C, Schouft MT, Leprince J, Compere V, Morin F, Proust F, Gandolfo P, Tonon MC, Castel H (2012) Down-regulation of GABA(A) receptor via promiscuity with the vasoactive peptide urotensin II receptor. Potential involvement in astrocyte plasticity. *PloS one* 7:e36319.

*Résultats*

15. Diebold I, Petry A, Burger M, Hess J, Gorlach A (2011) NOX4 mediates activation of FoxO3a and matrix metalloproteinase-2 expression by urotensin-II. *Molecular biology of the cell* 22:4424-4434.
16. Doan ND, Nguyen TT, Letourneau M, Turcotte K, Fournier A, Chatenet D (2012) Biochemical and pharmacological characterization of nuclear urotensin-II binding sites in rat heart. *British journal of pharmacology* 166:243-257.
17. Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM (2010) Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current opinion in cell biology* 22:697-706.
18. Eichmann A, Yuan L, Moyon D, Lenoble F, Pardanaud L, Breant C (2005) Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks. *The International journal of developmental biology* 49:259-267.
19. Fan HX, Li HX, Chen D, Gao ZX, Zheng JH (2012) Changes in the expression of MMP2, MMP9, and ColIV in stromal cells in oral squamous tongue cell carcinoma: relationships and prognostic implications. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 31:90.
20. Federico A, Zappavigna S, Romano M, Grieco P, Luce A, Marra M, Gravina AG, Stiuso P, D'Armiento FP, Vitale G, Tuccillo C, Novellino E, Loguercio C, Caraglia M (2014) Urotensin-II receptor is over-expressed in colon cancer cell lines and in colon carcinoma in humans. *European journal of clinical investigation* 44:285-294.
21. Franco R, Zappavigna S, Gigantino V, Luce A, Cantile M, Cerrone M, Facchini G, Perdona S, Pignata S, Di Lorenzo G, Chieffi S, Vitale G, De Sio M, Sgambato A, Botti G, Yousif AM, Novellino E, Grieco P, Caraglia M (2014) Urotensin II receptor determines prognosis of bladder cancer regulating cell motility/invasion. *Journal of experimental & clinical cancer research: CR* 33:48.
22. Glass R, Synowitz M (2014) CNS macrophages and peripheral myeloid cells in brain tumours. *Acta neuropathologica* 128:347-362.
23. Grieco P, Franco R, Bozzuto G, Toccaceli L, Sgambato A, Marra M, Zappavigna S, Migaldi M, Rossi G, Striano S, Marra L, Gallo L, Cittadini A, Botti G, Novellino E, Molinari A, Budillon A, Caraglia M (2011) Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *Journal of cellular biochemistry* 112:341-353.
24. Gritsenko PG, Iliina O, Friedl P (2012) Interstitial guidance of cancer invasion. *The Journal of pathology* 226:185-199.
25. Ha SY, Shin J, Kim JH, Kang MS, Yoo HY, Kim HH, Um SH, Kim SH (2014) Overexpression of integrin  $\alpha$ v correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Journal of clinical pathology* 67:576-581.
26. Hirose T, Takahashi K, Mori N, Nakayama T, Kikuya M, Ohkubo T, Kohzuki M, Totsune K, Imai Y (2009) Increased expression of urotensin II, urotensin II-related peptide and urotensin II receptor mRNAs in the cardiovascular organs of hypertensive rats: comparison with endothelin-1. *Peptides* 30:1124-1129.
27. Jarry M, Diallo M, Lecointre C, Desrues L, Tokay T, Chatenet D, Leprince J, Rossi O, Vaudry H, Tonon MC, Prezeau L, Castel H, Gandolfo P (2010) The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *The Biochemical journal* 428:113-124.
28. Jegou S, Cartier D, Dubessy C, Gonzalez BJ, Chatenet D, Tostivint H, Scalbert E, Leprince J, Vaudry H, Lihmann I (2006) Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* 495:21-36.

*Résultats*

29. Kaafarani I, Fernandez-Sauze S, Berenguer C, Chinot O, Delfino C, Dussert C, Metellus P, Boudouresque F, Mabrouk K, Grisoli F, Figarella-Branger D, Martin PM, Ouafik L (2009) Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 23:3424-3435.
30. Kutcher ME, Herman IM (2009) The pericyte: cellular regulator of microvascular blood flow. *Microvascular research* 77:235-246.
31. Levicar N, Nuttall RK, Lah TT (2003) Proteases in brain tumour progression. *Acta neurochirurgica* 145:825-838.
32. Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Fukuhara M, Ohya Y, Fujii K, Iida M (2003) Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension* 26:839-845.
33. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* 114:97-109.
34. Mammoto T, Jiang A, Jiang E, Panigrahy D, Kieran MW, Mammoto A (2013) Role of collagen matrix in tumor angiogenesis and glioblastoma multiforme progression. *The American journal of pathology* 183:1293-1305.
35. Matsusaka S, Wakabayashi I (2006) Enhancement of vascular smooth muscle cell migration by urotensin II. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 373:381-386.
36. Mimeault M, Batra SK (2011) Complex oncogenic signaling networks regulate brain tumor-initiating cells and their progenies: pivotal roles of wild-type EGFR, EGFRvIII mutant and hedgehog cascades and novel multitargeted therapies. *Brain pathology* 21:479-500.
37. Narayana A, Kunnakkat SD, Medabalmi P, Golfinos J, Parker E, Knopp E, Zagzag D, Eagan P, Gruber D, Gruber ML (2012) Change in pattern of relapse after antiangiogenic therapy in high-grade glioma. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 82:77-82.
38. Nguyen TT, Letourneau M, Chatenet D, Fournier A (2012) Presence of urotensin-II receptors at the cell nucleus: specific tissue distribution and hypoxia-induced modulation. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44:639-647.
39. Nucera S, Biziato D, De Palma M (2011) The interplay between macrophages and angiogenesis in development, tissue injury and regeneration. *The International journal of developmental biology* 55:495-503.
40. Ouafik L, Sauze S, Boudouresque F, Chinot O, Delfino C, Fina F, Vuaroqueaux V, Dussert C, Palmari J, Dufour H, Grisoli F, Casellas P, Brunner N, Martin PM (2002) Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines in vitro and suppresses tumor xenograft growth in vivo. *The American journal of pathology* 160:1279-1292.
41. Park SL, Lee BK, Kim YA, Lee BH, Jung YS (2013) Inhibitory Effect of an Urotensin II Receptor Antagonist on Proinflammatory Activation Induced by Urotensin II in Human Vascular Endothelial Cells. *Biomolecules & therapeutics* 21:277-283.
42. Patacchini R, Santicoli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P, Maggi CA (2003) Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *British journal of pharmacology* 140:1155-1158.
43. Phuphanich S, Carson KA, Grossman SA, Lesser G, Olson J, Mikkelsen T, Desideri S, Fisher JD, New Approaches to Brain Tumor Therapy CNSC (2008) Phase I safety study of escalating doses of atrasentan in adults with recurrent malignant glioma. *Neuro-oncology* 10:617-623.

*Résultats*

44. Portnoy A, Kumar S, Behm DJ, Mahar KM, Noble RB, Throup JP, Russ SF (2013) Effects of Urotensin II Receptor Antagonist, GSK1440115, in Asthma. *Frontiers in pharmacology* 4:54.
45. Prosser HC, Forster ME, Richards AM, Pemberton CJ (2008) Urotensin II and urotensin II-related peptide (URP) in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Peptides* 29:770-777.
46. Ribatti D, Annese T, Longo V (2010) Angiogenesis and melanoma. *Cancers* 2:114-132.
47. Rivera E, Arrieta O, Guevara P, Duarte-Rojo A, Sotelo J (2001) AT1 receptor is present in glioma cells; its blockage reduces the growth of rat glioma. *British journal of cancer* 85:1396-1399.
48. Ron E (2006) Childhood cancer-treatment at a cost. *Journal of the National Cancer Institute* 98:1510-1511.
49. Sato A, Sakurada K, Kumabe T, Sasajima T, Beppu T, Asano K, Ohkuma H, Ogawa A, Mizoi K, Tominaga T, Kitanaka C, Kayama T, Tohoku Brain Tumor Study G (2010) Association of stem cell marker CD133 expression with dissemination of glioblastomas. *Neurosurgical review* 33:175-183; discussion 183-174.
50. Schittenhelm J, Schwab EI, Sperveslage J, Tatagiba M, Meyermann R, Fend F, Goodman SL, Sipos B (2013) Longitudinal expression analysis of alphav integrins in human gliomas reveals upregulation of integrin alphavbeta3 as a negative prognostic factor. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 72:194-210.
51. Segain JP, Rolli-Derkinderen M, Gervois N, Raingeard de la Bletiere D, Loirand G, Pacaud P (2007) Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *Journal of immunology* 179:901-909.
52. Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimaru Y, Ushio Y (2003) Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer research* 63:6962-6970.
53. Sidharta PN, Rave K, Heinemann L, Chiossi E, Krahenbuhl S, Dingemans J (2009) Effect of the urotensin-II receptor antagonist palosuran on secretion of and sensitivity to insulin in patients with Type 2 diabetes mellitus. *British journal of clinical pharmacology* 68:502-510.
54. Singh MK, Bhattacharya D, Chaudhuri S, Acharya S, Kumar P, Santra P, Basu AK, Chaudhuri S (2014) T11TS inhibits glioma angiogenesis by modulation of MMPs, TIMPs, with related integrin alphav and TGF-beta1 expressions. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35:2231-2246.
55. Song N, Ding W, Chu S, Zhao J, Dong X, Di B, Tang C (2012) Urotensin II stimulates vascular endothelial growth factor secretion from adventitial fibroblasts in synergy with angiotensin II. *Circulation journal : official journal of the Japanese Circulation Society* 76:1267-1273.
56. Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, Ribatti D, Nussdorfer GG (2006) Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *International journal of molecular medicine* 18:1107-1112.
57. Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, Kitada C, Miyajima N, Suzuki N, Mori M, Fujino M (2003) Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochemical and biophysical research communications* 310:860-868.

*Résultats*

58. Takano S (2012) Glioblastoma angiogenesis: VEGF resistance solutions and new strategies based on molecular mechanisms of tumor vessel formation. *Brain tumor pathology* 29:73-86.
59. Tian L, Li C, Qi J, Fu P, Yu X, Li X, Cai L (2008) Diabetes-induced upregulation of urotensin II and its receptor plays an important role in TGF-beta1-mediated renal fibrosis and dysfunction. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 295:E1234-1242.
60. van der Horst G, Bos L, van der Mark M, Cheung H, Heckmann B, Clement-Lacroix P, Lorenzon G, Pelger RC, Bevers RF, van der Pluijm G (2014) Targeting of alpha-v integrins reduces malignancy of bladder carcinoma. *PloS one* 9:e108464.
61. Vergura R, Camarda V, Rizzi A, Spagnol M, Guerrini R, Calo G, Salvadori S, Regoli D (2004) Urotensin II stimulates plasma extravasation in mice via UT receptor activation. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 370:347-352.
62. Wen PY, Brandes AA (2009) Treatment of recurrent high-grade gliomas. *Current opinion in neurology* 22:657-664.
63. Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *The New England journal of medicine* 359:492-507.
64. Wu YQ, Song Z, Zhou CH, Xing SH, Pei DS, Zheng JN (2010) Expression of urotensin II and its receptor in human lung adenocarcinoma A549 cells and the effect of urotensin II on lung adenocarcinoma growth in vitro and in vivo. *Oncology reports* 24:1179-1184.
65. Xie Q, Mittal S, Berens ME (2014) Targeting adaptive glioblastoma: an overview of proliferation and invasion. *Neuro-oncology* 16:1575-1584.
66. Xu J, Rodriguez D, Petitclerc E, Kim JJ, Hangai M, Moon YS, Davis GE, Brooks PC (2001) Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *The Journal of cell biology* 154:1069-1079.
67. Xu S, Jiang H, Wu B, Yang J, Chen S (2009) Urotensin II induces migration of endothelial progenitor cells via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *The Tohoku journal of experimental medicine* 219:283-288.
68. Yi K, Yu M, Wu L, Tan X (2012) Effects of urotensin II on functional activity of late endothelial progenitor cells. *Peptides* 33:87-91.
69. Zhang YG, Li J, Li YG, Wei RH (2008) Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta. *Journal of hypertension* 26:1119-1126.
70. Zhao J, Zhang SF, Shi Y, Ren LQ (2013) Effects of urotensin II and its specific receptor antagonist urantide on rat vascular smooth muscle cells. *Bosnian journal of basic medical sciences* 13:78-83.
71. Zhou CH, Wan YY, Chu XH, Song Z, Xing SH, Wu YQ, Yin XX (2012) Urotensin II contributes to the formation of lung adenocarcinoma inflammatory microenvironment through the NF-kappaB pathway in tumor-bearing nude mice. *Oncology letters* 4:1259-1263.
72. Zhou J, Xiang Y, Yoshimura T, Chen K, Gong W, Huang J, Zhou Y, Yao X, Bian X, Wang JM (2014) The role of chemoattractant receptors in shaping the tumor microenvironment. *BioMed research international* 2014:751392.

## Résultats

### Legends to Figures

**Figure 1. *In vitro* effect of urotensinergic ligands on human glioma and endothelial cell migration or proliferation, and on tubulogenesis.** **A**, Microphotographies of UT and UII staining on the glioblastoma cell line U87-MG from human origin. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ . **B**, representative fields (*top panel*) of migrating U87-MG cells quantified from the Boyden chamber assay (*bottom left panel*) and quantification of U87-MG cells number (*bottom right panel*) in the absence (Control) or the presence of FBS (10%) or UII ( $10^{-12}$ - $10^{-8}$  M). **C**, Microphotographies of UT (red) and UII (green) staining on cerebral (HCMEC-D3) immortalized endothelial cells from human origin. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ . **D**, Representative fields (*top panels*) and quantification of migrating HCMEC-D3 cells (*bottom left panel*), quantification of HCMEC-D3 cells number (*bottom right panel*) in the absence (control) or the presence of FBS (10%) or UII ( $10^{-12}$ - $10^{-8}$  M) after 24h treatments. **E**, Microphotographies of UT (red) and UII (green) staining on peripheral endothelial cell line (HUV-EC-C) from human origin. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ . **F**, representative fields and quantification of HUV-EC-C cell number after 24h treatments. A-F, Data are presented as the mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments and statistical significance has been tested by one-way ANOVA with Dunnett *post hoc* test vs control (absence of treatment). \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . \*\*\*, **G**, Microphotographies of the tubulogenesis assay illustrating *in vitro* properties of UT agonists (hUII, URP, hUII<sub>4-11</sub>, hUII<sub>5-11</sub>), biased ligand (urantide) or antagonist (palosuran) on *in vitro* neoangiogenic features of HCMEC-D3 and HUV-EC-C cells. Scale bar: 400  $\mu\text{m}$ . **H**, multiparametric analysis of *in vitro* tubulogenesis induced by urotensinergic ligands. Representative microscopic fields of analyzed structures is reported on top of each column and highlighted with an arrow when necessary. (+), significant stimulatory effect; (-) significant inhibitory effect; #, significant inhibitory effect compared to hUII. Presented analysed experiments were performed from 6 independent experiments. Statistical

## Résultats

significance of treatments *vs* control condition was assessed with one-way ANOVA with Dunnett *post hoc* test. *ns*,  $P > 0.05$ ; \* or \$,  $P < 0.05$ ; \*\* or \$\$,  $P < 0.01$ ; \*\*\* or \$\$\$,  $P < 0.001$ . Statistical significance of co-treatments (hUII + urantide; hUII + palosuran) *vs* hUII alone was conducted with Student *t* test. #,  $P < 0.05$ ; ##,  $P < 0.01$ ; ###,  $P < 0.001$ .

**Figure 2. *In vivo* chemoattractant effects of the urotensinergic ligands towards pro-angiogenic cells by means of the Matrigel plug assay.** **A**, Macrophotographies of resected Matrigel plugs. Liquid Matrigel containing vehicle (PBS) or EGF (500 ng, 200  $\mu$ L), VEGF (500 ng, 200  $\mu$ L), mUII, hUII, URP, hUII<sub>4-11</sub> (50 ng, 200  $\mu$ L, each), urantide or palosuran (50 ng, 200  $\mu$ L, each) was injected subcutaneously injected in the flank of C57/B16 mice, were then removed 3 weeks after implantation and then analyzed by immunohistochemistry. The *in vivo* invasion was detected *via* immunofluorescence of macrophages (F4/80, red), extracellular endothelial cell matrix collagen IV (COLL IV, red) and smooth muscle cells ( $\alpha$ -SMA, green). Scale bar, 40  $\mu$ m. **B**, Quantification of macrophage number and of smooth muscle and endothelial cell structure areas. Data are presented as percentage of control  $\pm$  SEM. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  from at least 4 independent experiments. Statistical significance is given by one-way ANOVA with Dunnett *post hoc* test *vs* control (absence of treatment).

**Figure 3. Effects of the urotensinergic system on glioma development *in vivo*.** **A**, Tumor growth (*left*) and survival (*right*) of *Swiss Nude* mice transplanted with U87-MG glioblastoma. When tumor reached 100 mm<sup>3</sup>, 10  $\mu$ L intratumoral injection of vehicle (saline) or hUII (0.1  $\mu$ g) were performed daily. A Stimulatory effect of hUII on the glioblastoma tumor growth compared with vehicle. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . hUII significantly reduced the median survival of treated mice. Median survival: vehicle (n = 7), 33 days; hUII (n = 7),

## *Résultats*

22 days ( $P = 0.0126$ ). **B**, Representative microphotographies of UT (green) and UII (red) expression in vehicle- (PBS) and hUII-treated U87-MG xenografts. UII and more intensely UT are expressed in tumor parenchyma, in peri-necrotic (N) areas and in vascular-perivascular structures. **C**, Tumor growth (*left*) and survival (*right*) of *Swiss Nude* mice transplanted with U87-MG glioblastoma treated as in A with vehicle, URP or hUII<sub>4-11</sub> (0.1  $\mu$ g, each). Median survival: vehicle (n = 4), 26 days; 22 days; URP (n = 4) 28 days; hUII<sub>4-11</sub> (n = 4) 26 days. No statistical significance in tumor growth and survival has been established between the different conditions. **D**, Top panel, typical gallery of U87-MG xenografts treated during 15 days with vehicle, hUII, palosuran or co-treated with hUII and palosuran (hUII+palosuran) Scale bar: 1 cm. Bottom panel, tumor growth (*right*) and survival (*left*) of *Swiss Nude* mice transplanted with U87-MG and treated as in A with vehicle, hUII (0.1  $\mu$ g), palosuran (1  $\mu$ g) or hUII+palosuran (0.1/1  $\mu$ g respectively). hUII significantly accelerated tumor growth, and the hUII+palosuran treatment showed a significant difference compared with hUII alone. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . Median survival: vehicle (n = 10), 23 days; hUII (n = 10), 16 days ( $P = 0.0005$ ); palosuran (n = 10), 23 days ( $P = 0.2922$ ), hUII+palosuran (n = 9) 23 days ( $P = 0.86$ ). 0.001. **E**, Top panel: typical gallery of U87-MG xenografts treated during 15 days with vehicle, hUII, urantide or co-treated with hUII and urantide (hUII+urantide) Scale bar: 1 cm. Bottom panel, survival (*left*) and tumor growth (*right*) of *Swiss Nude* mice transplanted with U87-MG and treated as in D with vehicle, hUII (0.1  $\mu$ g), urantide (1  $\mu$ g) or hUII+urantide (0.1/1  $\mu$ g respectively). hUII accelerated and urantide delayed tumor growth and the hUII+urantide treatment showed a significant difference compared with hUII alone. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . Median survival: vehicle (n = 10) 23 days; hUII (n = 10), 16 days ( $P = 0.0005$ ); urantide (n = 10), 43 days ( $P = 0.0067$ ), hUII + urantide (n = 10) 27 days ( $P = 0.0645$ ). **F**, Representative microphotographies of UT (green) and UII (red) immunolabeling and tumor distribution in



## *Résultats*

vehicle, hUII, palosuran or urantide-treated U87-MG xenografts, in tumor parenchyma and vascular compartments (hUII-treated cells). **G**, Tumor growth (*left*) and survival (*right*) of *Swiss Nude* mice transplanted with Sc-1 human oligodendroglioma. When tumors reached  $100 \text{ mm}^3$ ,  $10 \mu\text{L}$  intratumoral injection of vehicle (saline) or urantide ( $1 \mu\text{g}$ ) were performed daily. Median survival: vehicle ( $n = 4$ ), 10 days; urantide ( $n = 4$ ), 11 days. No statistical significance in tumor growth and in survival was observed. Bottom, representative microphotographies of UT (green) and UII (red) expression and localization in vehicle or urantide-treated Sc-1 xenografts, in tumor parenchyma and vascular structures. Data presented as mean  $\pm$  SEM. Animals survival was analyzed with Kaplan-Meier method, using the log-rank test for comparison. Statistical significance for tumor growth in A, C, D, E and G was given by using two-way ANOVA with Bonferonni *post hoc* test comparison with vehicle. Cell *nuclei* were stained with DAPI (blue). Scale bar:  $20 \mu\text{m}$ .

**Figure 4. Effects of the urotensinergic system on the intratumoral neo-angiogenesis, metalloprotease activation and integrin expression.** **A**, Representative microscopic fields of UT and UII (red) immunostainings co-localized with endothelial cells immunodetected with an anti-CD31 antibody (green) in U87-MG xenografts (*left panel*). Middle panel, Representative microscopic fields of Collagen IV (Coll IV, red) labeling in the different U87 tumors after 15 days daily intratumoral treatments or when tumors have reached  $1000 \text{ mm}^3$  (*bottom left panel*) end of the experiments), with vehicle (PBS), hUII ( $2.9 \text{ ng/kg}$ ), urantide ( $29 \text{ ng/kg}$ ), palosuran ( $29 \text{ ng/kg}$ ), hUII+palosuran ( $2.9+29 \text{ ng/kg}$ ), hUII+urantide ( $2.9+29 \text{ ng/kg}$ ). Quantification of the intratumoral neoangiogenesis (vascular area, number of branches and vessel diameter) after 15 days treatments (*top right panel*) or after  $1000 \text{ mm}^3$  (*bottom middle and right panels*). Data are presented as percentage of control  $\pm$  SEM. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  vehicle *versus* treatments; ###,  $P < 0.001$ ; hUII *versus* hUII+palosuran or

## *Résultats*

hUII+urantide, from at least 4 different tumors in each group. Statistical significance was given by One-way ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test. *UC*, uncountable. **B**, Microphotographies of MMP-2 (green, *left*) and quantification of staining (*right*) intensity and surface. Statistical significance of staining intensity and area size was given by one-way ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; vehicle *versus* treatments. #,  $P < 0.05$ ; hUII *versus* hUII + palosuran or hUII + urantide. **C**, Microphotographies of MMP-9 (green, *left*) and quantification of staining (*right*) intensity and surface. Statistical significance of staining intensity and area size was given by one-way ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test. \*\*\*,  $P < 0.001$ ; vehicle *versus* treatments. ###,  $P < 0.001$ ; hUII *versus* hUII+palosuran or hUII+urantide. **D**, Left, microphotographies of U87-MG xenografts neo-vessels stained by the antibody directed against the marker of endothelial precursors CD34 (green) and adhesion by anti- $\alpha_V$  integrin antibody (red) after 15 days of vehicle, hUII (0.1  $\mu\text{g}$ ) or urantide (1  $\mu\text{g}$ ) daily administered. Right, Quantification of  $\alpha_V$  staining in tumor xenografts after 15 days of the different treatments in tumor parenchyma and vascular compartment. Statistical significance of staining intensity was given with one-way ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test. No statistical significance has been found. **E**, Left, microphotographies of U87-MG xenografts stained by anti- $\alpha_V$  integrin antibody (green) when cell reached 1000  $\text{mm}^3$  after treatment with vehicle, hUII (0.1  $\mu\text{g}$ ) or urantide (1  $\mu\text{g}$ ) daily administered. Right, Quantification of  $\alpha_V$  staining in tumor xenografts in the corresponding conditions in tumor parenchyma and vascular compartment. Statistical significance of staining intensity was given by one-way ANOVA followed by Dunnett *post hoc* test. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ ; vehicle *versus* treatments. Cell nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar: 20  $\mu\text{m}$ .

Résultats

**Figure 5. Effects of the urotensinergic system on glioblastoma proliferation, hypoxia and necrosis *in vivo*.** **A**, Representative microscopic fields (*top panel*) of U87-MG xenografts immunostained with an antibody directed against the proliferation marker Ki67 (red). Bottom left, quantification of the number of proliferative cells (Ki67<sup>+</sup>) after 15 days after daily intratumoral injections of the urotensinergic ligands and linear regression of xenografts volume vs proliferation index. A significant positive correlation was given by the Pearson coefficient correlation  $r=0.6579$ ,  $P < 0.0001$ ). Bottom right, quantification of the number of proliferative cells (Ki67<sup>+</sup>) when tumors reached 1000 mm<sup>3</sup> (*Middle*) after daily intratumoral injections of the urotensinergic ligands. Statistical significance of vehicle versus hUII, palosuran, urantide or co-treatments can be found at day 15. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . Statistical significance of hUII versus co-treatments can be found at day 15. ####,  $P < 0.001$ . Scale bar: 40  $\mu$ m. **B**, Top, representative microscopic fields of U87-MG xenografts of intratumoral hypoxia revealed by pimonidazole labeling (green) after 15 days of daily intratumoral injections of vehicle, hUII (0.1  $\mu$ g) or urantide (1  $\mu$ g). Bottom, quantification of pimonidazole stained area (*left*) and intensity (*right*) after 15 days of vehicle, hUII (0.1  $\mu$ g) or urantide (1  $\mu$ g). Cell nuclei are stained with DAPI (blue). Scale bar: 40  $\mu$ m. n=4 in each treatment groups. \*\*\*,  $P < 0.001$ . **C**, Top, necrotic areas colored with hematoxylin and eosin (HE) after 15 days of daily intratumoral injections of vehicle, hUII (0.1  $\mu$ g) or urantide (1  $\mu$ g). Bottom, quantification of the necrotic area after 15 days of daily (*left*) or when tumors reached 1000 mm<sup>3</sup> (*right*) after intratumoral injections of vehicle, hUII (0.1  $\mu$ g) or urantide (1  $\mu$ g) (bottom left). Scale bar: 2 mm. n=6 in each treatment groups. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . Statistical significance in A to C experiments was given by one-way ANOVA with Dunnet *post hoc* test comparison with Vehicle or hUII.

## Résultats

### Legends to Supplementary Figures

**Figure S1. Effects of the urotensinergic ligands on weight loss and toxicity in *Nude* mice xenografted with U87-MG cells.** During the *in vivo* tumor growth experiment (Fig. 3), *Nude* mice were treated daily with intra-tumoral injections of hUII (0.29 ng/kg, n = 10), palosuran (29 ng/kg), hUII+palosuran (0.29/29 ng/kg, respectively, n=10), urantide (29 ng/kg, n=10), hUII+urantide (0.29/29 ng/kg, respectively, n=10) or vehicle (PBS, 10  $\mu$ L, n = 10). Mice weight was controlled every two days and no apparent toxicity of the molecule was seen.

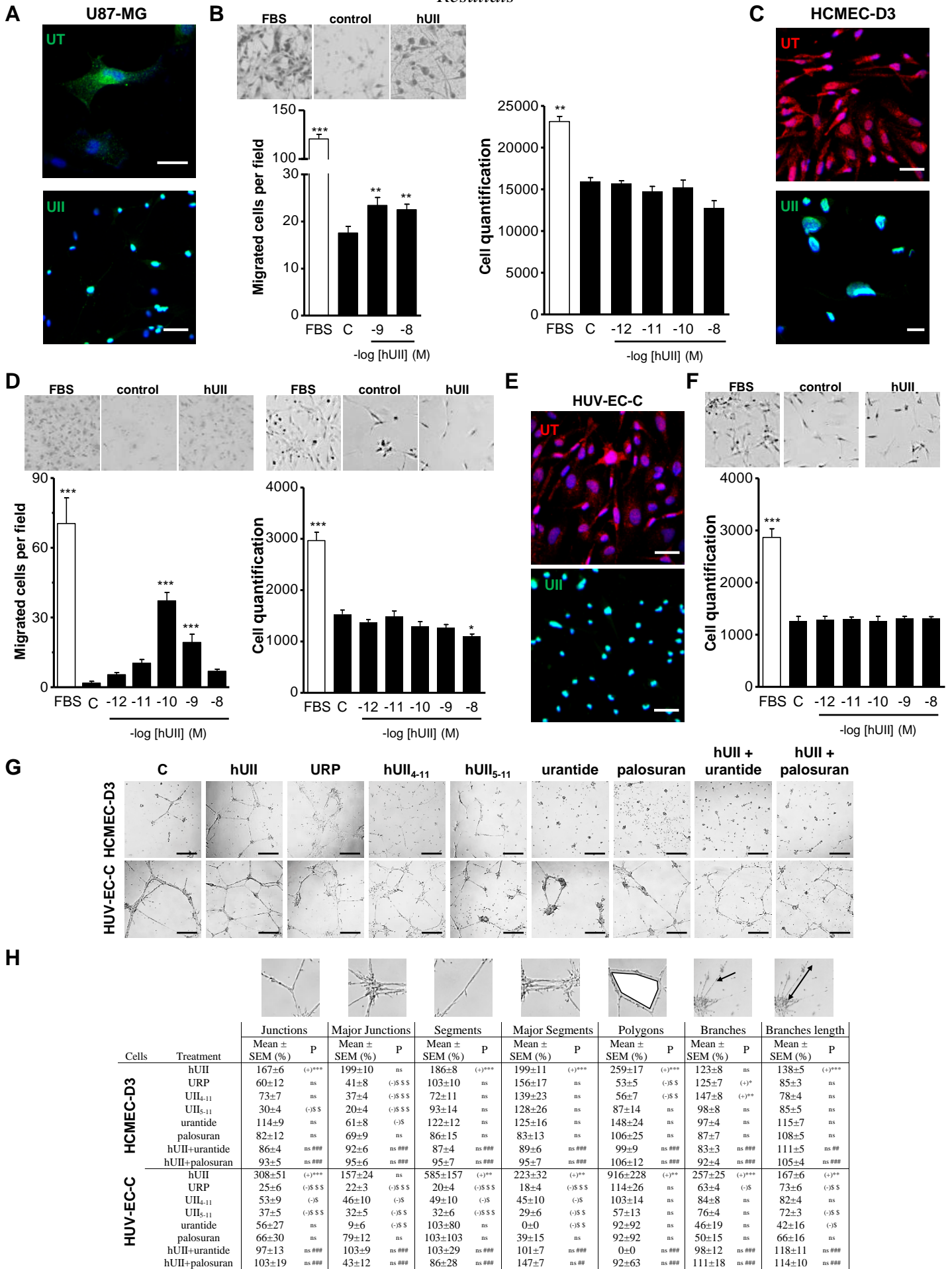
**Figure S2. Effects of hUII and URP on late tumorigenesis.** Tumor growth of *Swiss Nude* mice transplanted with U87-MG glioblastoma treated as in Fig. 3C with vehicle (10  $\mu$ L, n=4), hUII or URP (0.29 ng/kg, n=6, each) when tumor volume reached 500 mm<sup>3</sup>. Statistical significance for tumor growth was given by using two-way ANOVA with Bonferonni *post hoc* test comparison with vehicle. \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ .

**Figure S3. Effects of a high dose of urantide on tumor growth. A,** Tumor growth of *Swiss Nude* mice transplanted with U87-MG glioblastoma treated as in Fig. 3E with vehicle (10  $\mu$ L, n=10), hUII (0.29 ng/kg, n=10) or urantide (290 ng/kg, n=10). High dose of urantide induced a persistent inhibition of tumor growth. Statistical significance for tumor growth was given by using two-way ANOVA with Bonferonni *post hoc* test compared with vehicle. \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . **B,** Late tumor growth of *Swiss Nude* mice transplanted with U87-MG glioblastoma treated with vehicle (10  $\mu$ L, n=7) or urantide ( ↓, 29 ng/kg, ↑, 290 ng/kg, n=10) when tumor volume reached 500 mm<sup>3</sup>. The higher dose of urantide induced inflexion of the tumor growth kinetic for one week duration. Statistical significance for tumor growth was given by using two-way ANOVA with Bonferonni *post hoc* test compared with vehicle.

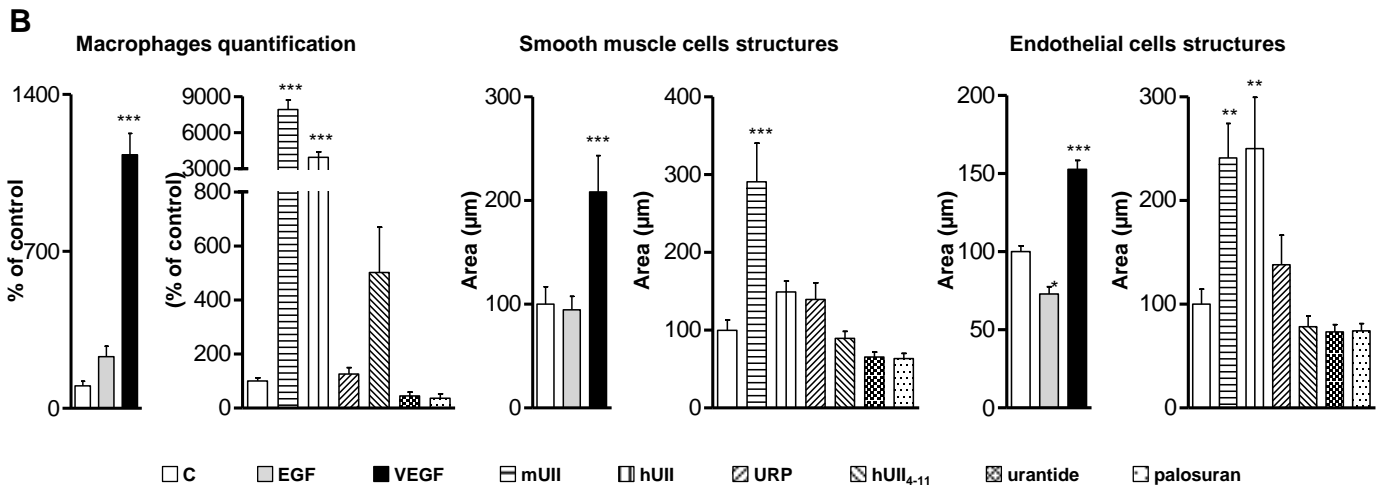
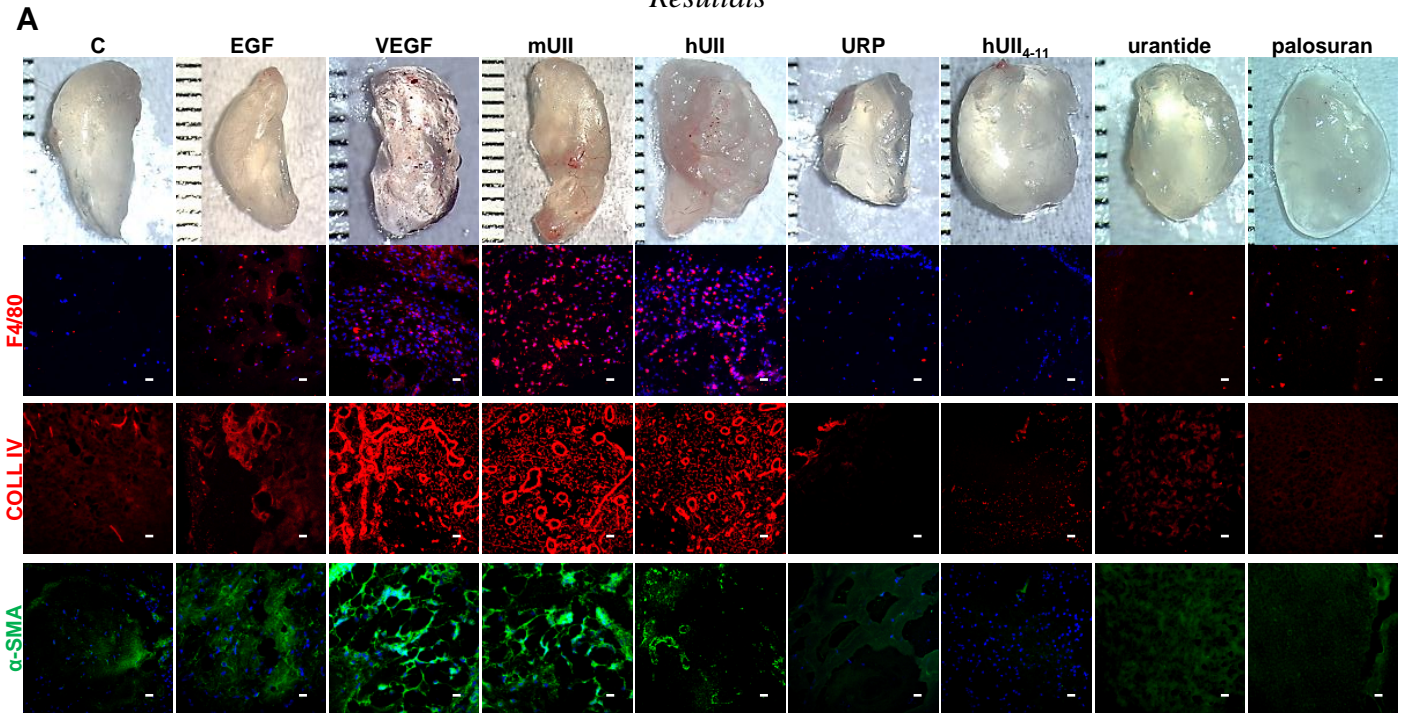
Résultats

UT ligand	Function	Sequences
human UII (hUII)	Natural agonist	H-Glu-Thr-Pro-Asp-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH
murine UII (mUII)		H-pGlu-His-Gly-Ala-Ala-Pro-Glu-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Ile-OH
urotensin II related-peptide (URP)	Partial/inactive synthetic agonist	H-Ala-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH
hUII <sub>4-11</sub>		H-Asp-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH
hUII <sub>5-11</sub>		H-c[Cys-Phe-Trp-Lys-Tyr-Cys]-Val-OH
urantide	Peptide biased ligand	H-Asp-c[Pen-Phe-DTrp-Om-Tyr-Cys]-Val-OH
palosuran	Non peptide antagonist	1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]- 3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt

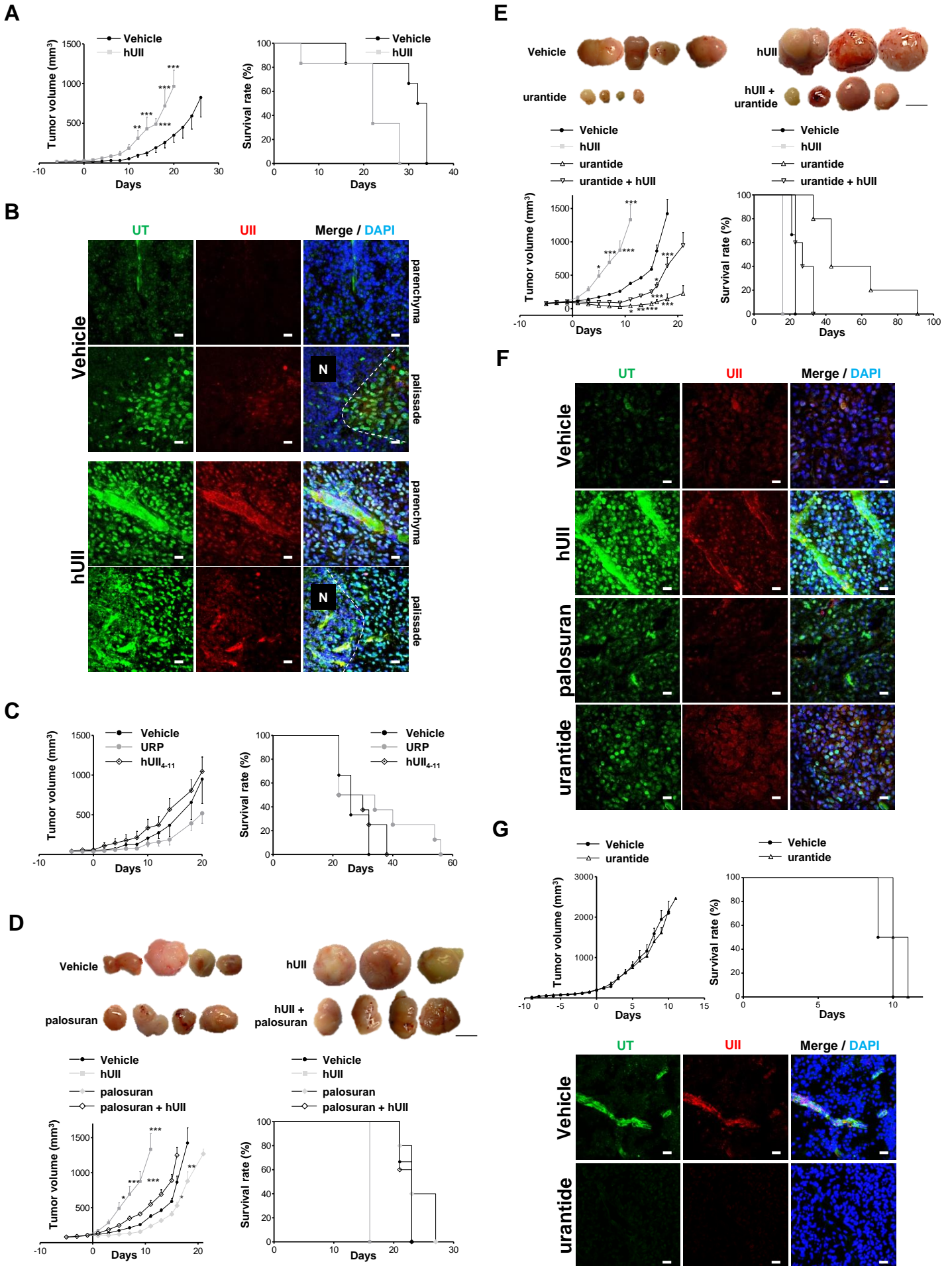
Résultats



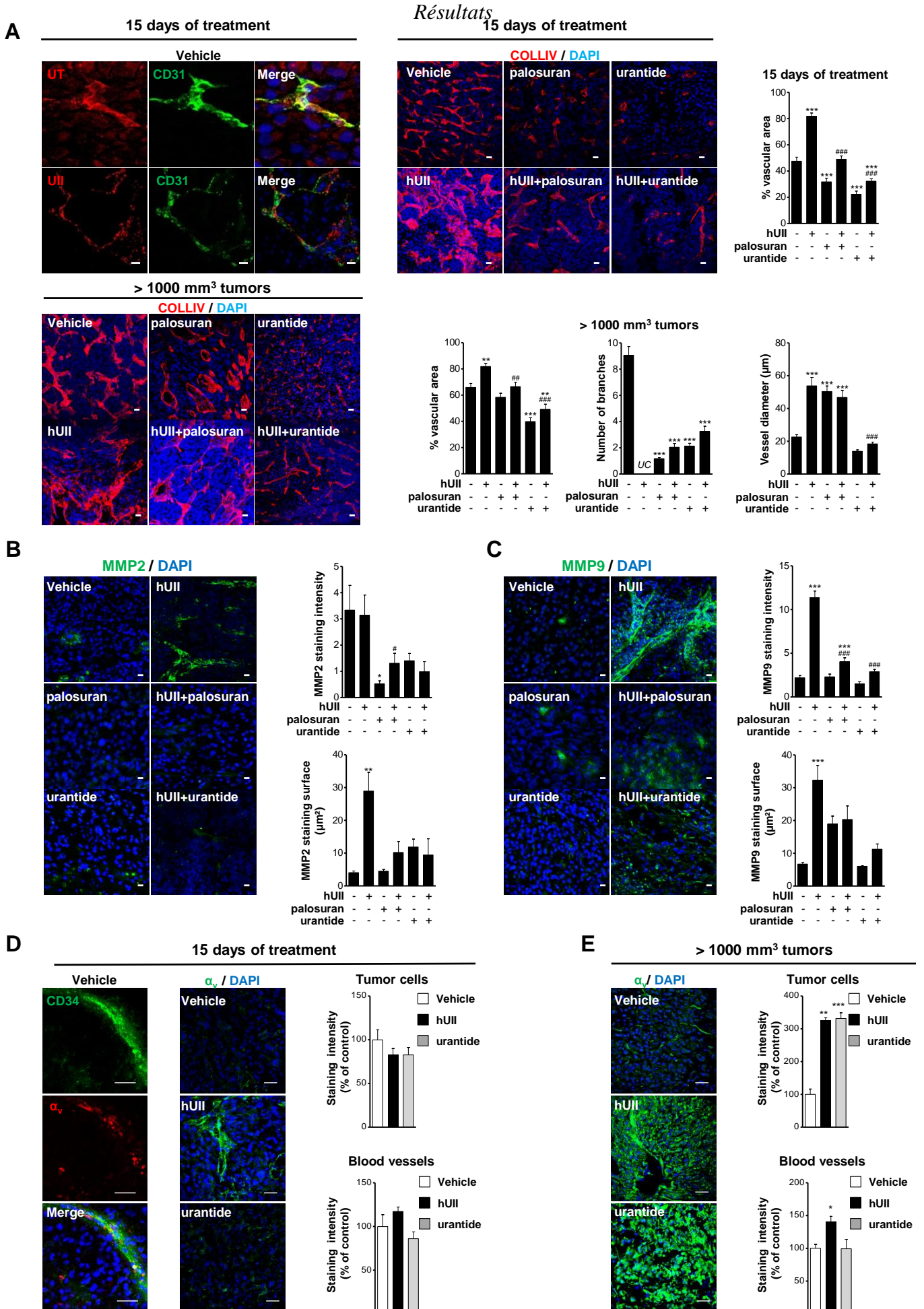
Résultats



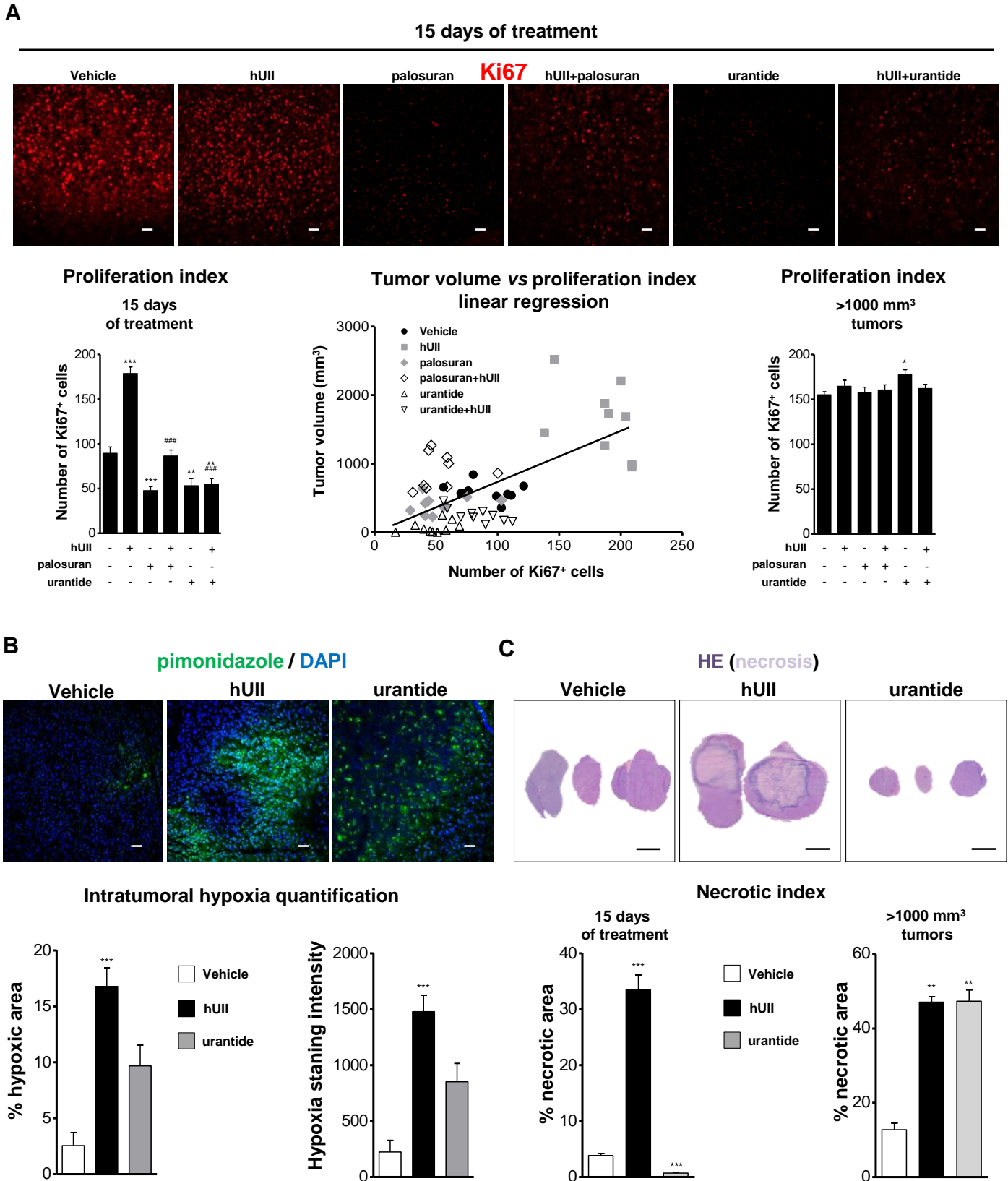
Résultats



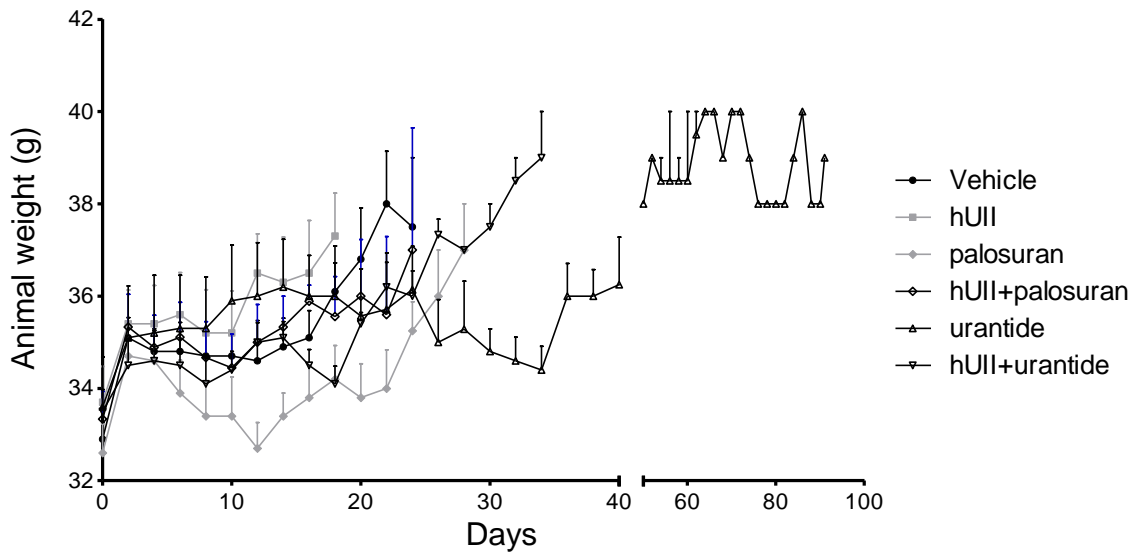




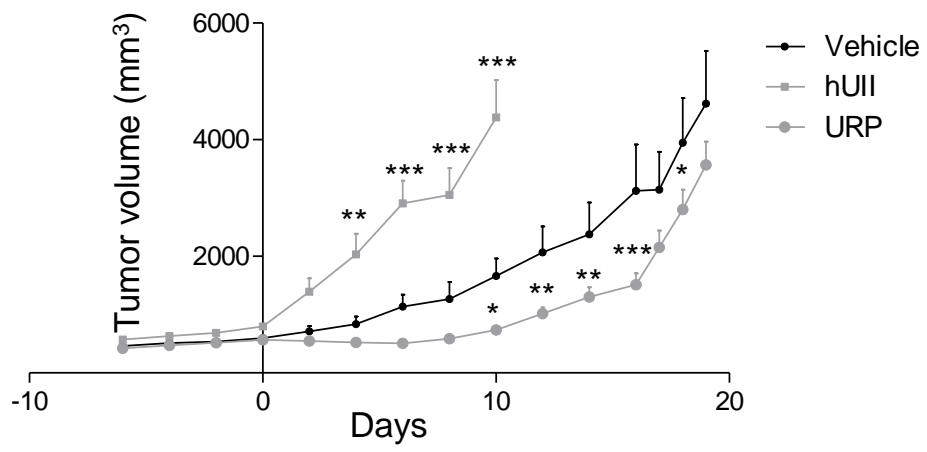
Résultats



Résultats

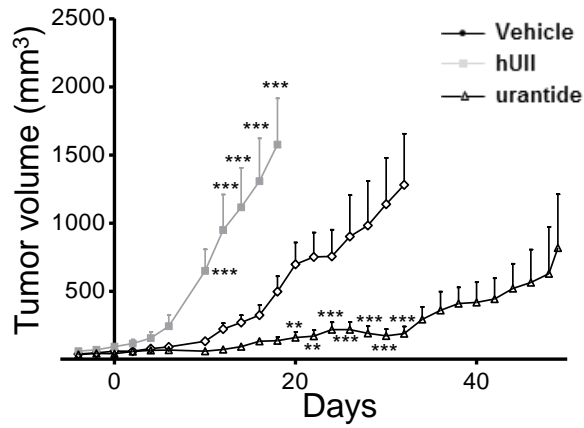


Résultats

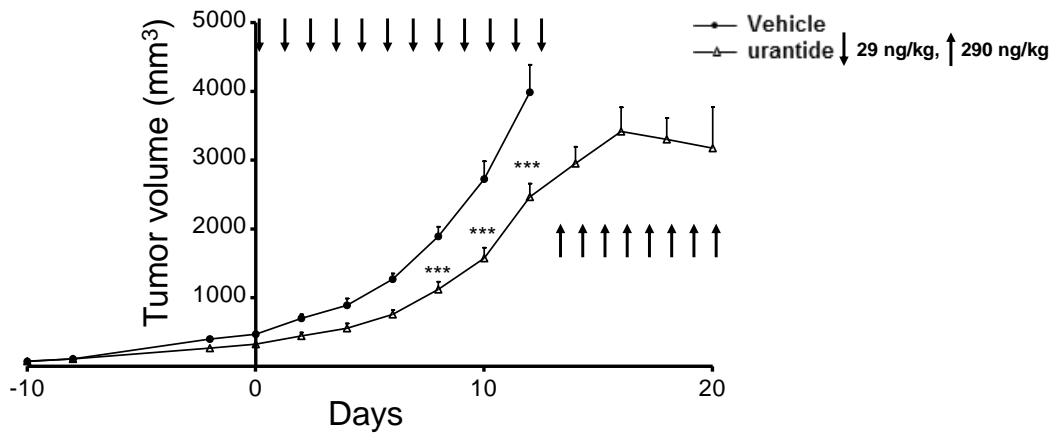


Résultats

A



B



# Discussion



## Discussion

Problème majeur de santé publique, les glioblastomes voient leur incidence augmenter de manière constante depuis ces vingt dernières années. Cette augmentation du nombre de cas est en partie à rattacher à l'amélioration considérable des techniques de détection couplée à une prise en charge précoce de la pathologie, ainsi qu'au vieillissement global des populations (Fisher *et al.*, 2007). A cela s'ajoutent des modifications de certains facteurs environnementaux au sein des pays industrialisés, qui préoccupent la communauté scientifique et médicale. Parmi eux, la multiplication des sources radio-émettrices s'opérant depuis une décennie, est un sujet de polémique régulièrement mis en avant dans la survenue des gliomes (Hardell *et al.*, 2007 ; Ahlbom *et al.*, 2009 ; Little *et al.*, 2012).

Malgré les progrès technologiques, aucune avancée significative n'a permis à ce jour de traiter efficacement les GBM dont la médiane de survie est limitée à 15 mois. Les obstacles aux traitements actuels sont multiples. En premier lieu, le terrain dans lequel se développe ces néoplasmes qui est des plus sensibles et qui complexifie la mise en œuvre des options thérapeutiques. Les opérations de résection tumorale relèvent parfois du défi pour les services de neurochirurgie, qui doivent veiller à ne pas causer de dommages irréparables qui porteraient trop atteinte à la qualité de vie du patient. Ensuite, les chimiothérapies administrées en première ligne, essentiellement basées sur les propriétés cytotoxiques de molécules visant les cellules tumorales proliférantes, sont également des perturbateurs de grandes fonctions physiologiques. Parmi les effets indésirables, sont fréquemment reportées des perturbations sévères du fonctionnement du système digestif, ainsi que des troubles cognitifs et/ou de mémorisation comme le *chemofog*. Le rapport bénéfices/risques de la radiothérapie est quant à lui régulièrement remis en question par l'augmentation des cas de radiorésistance qu'elle peut induire (Mannino et Chalmers, 2011). Enfin, les molécules de la



classe des thérapies ciblées, plus récentes et utilisées en seconde ligne, sont souvent prometteuses dans les modèles pré-cliniques, mais leur efficacité varie selon les profils tumorigéniques (cf. § 2.3.4 du chapitre 1) (Wilding et Bodmer, 2014). Leur utilité peut même être remise en cause, comme ce fut le cas pour le Marimastat, un bloqueur de l'activité des métalloprotéases, qui provoquait chez la grande majorité des patients traités, d'intenses douleurs musculaires et articulaires paralysantes (Groves *et al.*, 2006).

Ce constat, pessimiste au demeurant, mobilise de nombreux laboratoires sur la recherche de nouvelles pistes thérapeutiques exploitables pour l'élaboration de médicaments plus efficaces et susceptibles de garantir une qualité de vie raisonnable. Parmi les « Talon d'Achille » du gliome récemment découverts, on peut citer *i*) l'infiltration parenchymateuse, homologue des métastases périphériques, de cellules tumorales invisibles aux techniques d'imagerie et responsables de la formation de récurrences à distance de la cavité de résection de la tumeur primaire, *ii*) la formation de zones d'hypoxie/nécrose, siège d'une pression de sélection qui s'opère sur les seules cellules tumorales capables de lutter contre un microenvironnement toxique et de devenir de futurs clones chimiorésistants, et *iii*) la capacité du tissu tumoral de détourner la circulation sanguine cérébrale en communiquant avec ses constituants cellulaires, dans l'optique d'assurer la distribution de ressources énergétiques subvenant à une activité métabolique en croissance exponentielle. En raison de leur forte interdépendance, la compréhension des mécanismes et des acteurs moléculaires qui régulent ces trois phénomènes permettra d'élaborer des stratégies thérapeutiques innovantes.

Comme abordé en introduction de ce manuscrit (cf. § 2.4.4), les neuropeptides vasoactifs et leurs récepteurs sont connus pour leur rôle dans les processus tumorigéniques, tels que l'Ang II, l'AM ou l'ET-1. Des résultats spectaculaires ont par exemple été obtenus *in vitro* et *in vivo* en utilisant des bloqueurs des récepteurs de type I de l'Ang II (Rivera *et al.*, 2001 ; Arrieta *et al.*, 2005) ou en immunoneutralisant l'AM circulante (Ouafik *et al.*, 2002 ;

Kaafarani *et al.*, 2009 ; Berenguer-Daizé *et al.*, 2013 ; Nouguerède *et al.*, 2013). Certaines molécules capables de bloquer des systèmes vasoactifs ont même fait l'objet de tests cliniques, notamment des ACEI et des ARB administrés en post-opératoire après résection du GBM, dans le but de diminuer l'œdème dont les conséquences sur le tissu nerveux sont dramatiques (Carpentier *et al.*, 2012). Le blocage sélectif de l'ET-1 par l'Atrasentan a quant à lui été testé en phase 1 d'étude clinique avec des réponses partielles voire des stabilisations durables de la progression de GBM (Phuphanich *et al.*, 2008).

Parmi ces nouveaux candidats thérapeutiques, le système urotensinergique a, depuis quelques années focalisé les activités de recherche de l'équipe « Astrocytes et Niche Vasculaire », dirigée par le Dr Hélène Castel, dans laquelle j'ai préparé mon doctorat. Des premiers résultats obtenus *in vitro* ont démontré que le récepteur UT est exprimé par les astrocytes corticaux de Rat (Castel *et al.*, 2006) et que l'UII interagit avec des sites de haute et très hautes affinités, couplés aux voies  $G_q/PLC/IP_3/Ca^{2+}$  et  $G_{i/o}/PIP$  sensibles à la PTX, et aux canaux calciques de type T (Castel *et al.*, 2006 ; Diallo *et al.*, 2008 ; Jarry *et al.*, 2010). Insensible au paralogue naturel de l'UII, l'URP, le site de très haute affinité relaie les effets de l'UT sur la croissance des astrocytes en culture (Jarry *et al.*, 2010), suggérant que le système urotensinergique pourrait jouer un rôle majeur dans l'activité de la glie réactive retrouvée en condition physiopathologique dans le SNC. D'autres travaux menés par ailleurs ont révélé que l'UII et/ou l'UT sont surexprimés dans diverses catégories de tumeurs solides (cf. Tab. 13), et que l'UII est notamment capable de stimuler la migration/invasion de cellules tumorales prostatiques humaines (Grieco *et al.*, 2011) et la croissance d'adénocarcinomes pulmonaires humains xéno greffés (Wu *et al.*, 2010). En accord avec ces données, les travaux récents du Dr Lecointre, qui a réalisé sa thèse dans l'équipe « Astrocytes et Niche Vasculaire », démontrent que l'UII se comporte comme une véritable chimiokine professionnelle responsable de la

kinésie des cellules d'astrocytomes de grade III et de GBM d'origine humaine (Lecointre *et al.*, *in press*).

Le sujet de thèse de doctorat qui m'a été confié a consisté, en identifiant les mécanismes cellulaires et moléculaires recrutés, à déterminer dans des modèles cellulaires et animaux l'impact d'une modulation du système urotensinergique sur le développement de gliomes. Afin de mener à bien ce projet, mes activités se sont focalisées sur les facteurs qui concourent à l'augmentation de la malignité des GBM, décrits dans la première partie de l'introduction de ce document, *i.e.* la prolifération des cellules tumorales, la néoangiogenèse et l'hypoxie nécrotique.

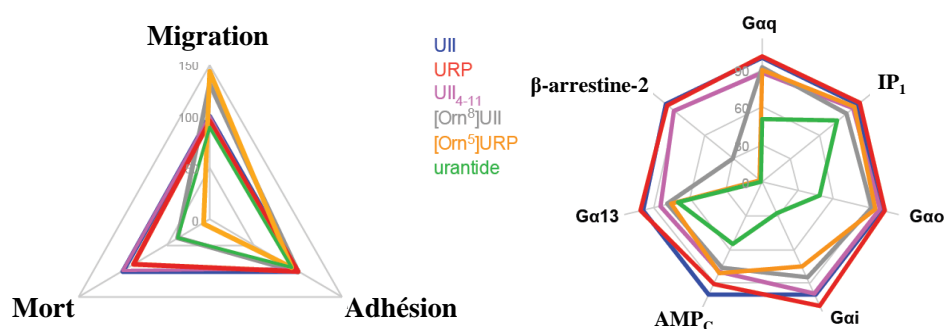
### **1. Etude du rôle du système urotensinergique dans la néoangiogenèse *in vitro* et *in vivo***

Sur des cultures de cellules endothéliales issues de microvaisseaux cérébraux (HCMEC-D3) et de veines ombilicales humaines (HUV-EC-C), nous avons montré la présence du récepteur UT à la membrane plasmique, et de l'UII dans le cytosol. Alors que l'application de concentrations croissantes d'hUII n'a pas d'impact sur la prolifération endothéliale, le peptide stimule la migration cellulaire à des concentrations nanomolaires.

Cultivées sur une matrice extracellulaire synthétique tridimensionnelle, en présence de facteurs de croissance adéquats, les cellules endothéliales s'associent en réseau sous la forme de tubes, par un mécanisme proche de celui décrit dans la littérature pour l'angiogenèse (pour revue, Iruela-Arispe et Beitel, 2013). La complexité de la mise en place de ce réseau découle de plusieurs paramètres quantifiables, notamment le nombre de *i*) branches en croissance, un phénomène qui intervient de manière précoce avant la fusion par intussusception avec une autre branche adjacente créant alors un segment, *ii*) segments considérés « classiques » ou « maîtres » selon qu'ils s'associent respectivement à moins ou plus de 3 autres segments, et reliés par des jonctions, *iii*) jonctions, *i.e.* des nœuds constitués d'agglomérats de cellules

endothéliales plus ou moins massifs, également regroupés sous les termes « classiques » ou « maîtres » sur le critère de la quantité de segments qu'ils contiennent, et enfin *iv*) polygones, structures géométriques dont le nombre témoigne de la densité tubulaire, et donc du pouvoir angiogénique de la molécule d'intérêt. Les résultats que nous avons obtenus avec les lignées endothéliales HCMEC-D3 et HUV-EC-C soumises au protocole de tubulogenèse tel qu'il est décrit p. 122, indiquent qu'en l'absence de facteurs de croissance, l'hUII stimule l'angiogenèse en générant un réseau de microcapillaires significativement plus complexe qu'en condition contrôle. Cet effet est fortement diminué par la co-application d'urantide ou de palosuran, deux antagonistes du récepteur UT de nature peptidique et non peptidique, respectivement. L'application d'urantide seul, bloquant la communication urotensinergique endogène, perturbe partiellement l'association des cellules endothéliales, en réduisant significativement la valeur des paramètres de complexité supérieure (segments et jonctions maîtres). Ces tests ont également été réalisés en traitant les cellules avec des agonistes présumés de l'UT, *i.e.* l'URP ou l'hUII<sub>4-11</sub> et l'hUII<sub>5-11</sub> (des formes tronquées synthétiques de l'hUII conservant la partie cyclique biologiquement active). De manière intéressante, et contrairement à l'hUII, ces trois peptides modulent négativement la tubulogenèse. Cette différence pourrait s'expliquer par une reconnaissance stricte du ligand se fixant sur l'UT, reflet de sa structure tridimensionnelle et donc de sa séquence en aa, comme décrit en introduction (cf. chapitre 2, § 1.1.). Il a ainsi été montré dans plusieurs modèles que l'URP exerce des activités biologiques distinctes de l'UII (Prosser *et al.*, 2008 ; Jarry *et al.*, 2010 ; Doan *et al.*, 2012 ; Chatenet *et al.*, 2013). Les voies de signalisation mises en jeu par chacun des peptides ont été étudiées au sein de l'équipe dans un modèle *in vitro* recombinant exprimant l'UT humain. Les résultats récemment publiés plaident en faveur de l'existence de « ligands biaisés » capables de stimuler spécifiquement les cascades intracellulaires responsables de la migration, l'adhésion, ou de l'apoptose cellulaire (Fig. 20) (Brulé *et al.*,

2014). Il serait par ailleurs réducteur de classer les ligands selon leur simple potentiel agoniste ou antagoniste sur la vasoactivité. Ainsi par exemple l'urantide (présupposé antagoniste) est capable de stimuler la migration de manière presque équivalente à l'hUII, tout en étant plus efficace pour bloquer la mort cellulaire (Fig. 20, diagramme de gauche) grâce à un couplage aux protéines G et la production de seconds messagers différents (Fig. 20, diagramme de droite).



**Figure 20 : Effets cellulaires et voies de signalisation évoquées par les agonistes naturels et les ligands biaisés du récepteur UT humain** (d'après Brulé *et al.*, 2014). Cette représentation sous forme de diagramme illustre le fait qu'il serait simpliste de classer les ligands urotensinergiques en simples agonistes ou antagonistes, chacun d'entre eux étant capable d'activer des mécanismes cellulaires (gauche) et cascades intracellulaires (droite) qui leur sont propres. AMP<sub>c</sub>, adénosine mono phosphate cyclique ; IP<sub>1</sub>, inositol mono phosphate.

Cette première étude sur la néoangiogenèse a été poursuivie *in vivo* à l'aide d'implants gélinifiés enrichis avec des facteurs de croissance, dont les activités pro-angiogéniques sont clairement établies (VEGF, EGF), ou des peptides urotensinergiques de type agoniste (hUII, mUII, URP et hUII<sub>4-11</sub>), ligand biaisé (urantide) ou antagoniste non peptidique (palosuran). Greffés de manière sous-cutanée chez des souris C57/B16, ces implants permettent la diffusion des peptides selon un gradient de concentration chimioattractant, et *in fine* l'invasion de par des cellules sensibles à ce signal. Nous nous sommes focalisés sur la capacité des peptides à recruter des populations de cellules pro-angiogéniques, *i.e.* macrophages, cellules endothéliales et musculaires lisses. De manière similaire à ce qui a été observé avec le VEGF, les implants contenant l'hUII ou la mUII renferment des microvaisseaux en formation (dérivant de la veine fémorale) et des gouttelettes hémorragiques. L'étude

immunohistochimique réalisée à l'aide d'anticorps spécifiques de macrophages murins (F4/80), de cellules musculaires lisses ( $\alpha$ -SMA) ou de la membrane basale des cellules endothéliales (collagène de type IV) a permis de quantifier l'invasion des macrophages et la densité des microcapillaires. Nous avons ainsi observé que les formes murines et humaines de l'UII augmentent significativement le nombre de macrophages envahissants et la croissance de vaisseaux, dont l'agencement et la présence de cellules musculaires lisses bordantes laissent présager qu'ils soient fonctionnels.

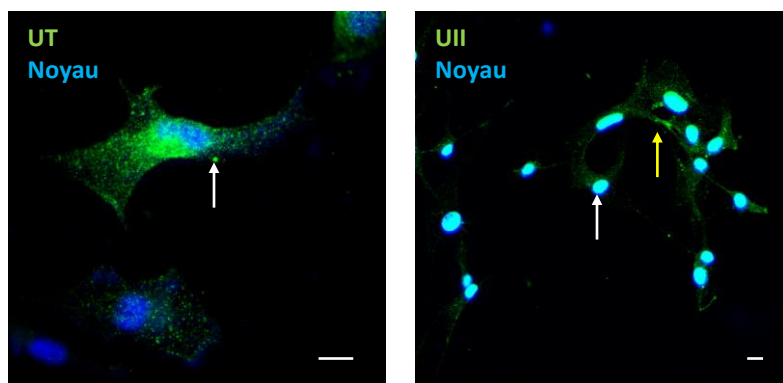
Un nombre croissant de publications relativement récentes plaident en faveur d'un rôle crucial du système urotensinergique dans les processus angiogéniques. Plus précisément, et comme détaillé ci-après, les activités de l'UII observées sur les implants peuvent être reliées à d'autres activités biologiques du peptide comme *i*) le recrutement de progéniteurs endothéliaux (Xu *et al.*, 2009 ; Yi *et al.*, 2012), *ii*) la tubulogenèse (Spinazzi *et al.*, 2006 ; Albertin *et al.*, 2009 ; Guidolin *et al.*, 2010 ; Diebold *et al.*, 2012), *iii*) l'adhésion cellulaire (Cirillo *et al.*, 2008), *iv*) la libération de molécules pro-angiogéniques comme l'ADM, l'ET-1 le VEGF ou l'IL-8 (Shi *et al.*, 2005 ; Albertin *et al.*, 2011 ; Lee *et al.*, 2014) et *v*) la prolifération cellulaire, tout en retardant l'apoptose (Shi *et al.*, 2006). En outre, il est intéressant de noter que l'UII est une puissante chimiokine (Segain *et al.*, 2007 ; Loirand *et al.*, 2008) et un activateur pour les monocytes (Watanabe *et al.*, 2005), qu'elle provoque l'extravasation plasmatique (Gendron *et al.*, 2004) et renforce les adhésions macrophages/cellules endothéliales (Park *et al.*, 2013). Enfin, il a été très récemment démontré que le système urotensinergique régule la libération de la *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) par les cellules musculaires lisses (Zhao *et al.*, 2014), renforçant davantage l'interaction au sein de la triade composée de l'endothélium vasculaire, la couche musculaire lisse et les macrophages pour l'orchestration de l'angiogenèse.

L'ensemble de ces données, additionnées aux connaissances actuelles sur le rôle des macrophages dans la néoangiogenèse normale et pathologique (cf. § 1.1.2, Fig. 4), confortent nos observations *in vitro* et *in vivo*, suggérant fortement que le système urotensinergique joue un rôle central dans le remodelage vasculaire et la néoangiogenèse dans des modèles physiologiques et physiopathologiques.

## **2. Impact de la modulation *in vivo* du système urotensinergique sur les mécanismes tumorigéniques des GBM**

L'utilisation d'animaux immunodéprimés a permis une avancée majeure dans les études précliniques en cancérologie. Grâce à leur capacité à tolérer des greffons humains et leur longévité lorsqu'elles sont maintenues en conditions aseptiques, les différentes souches de souris *Nude* sont régulièrement utilisées pour tester le potentiel thérapeutique de nouveaux composés (Tentler *et al.*, 2012). Ce modèle recrée relativement fidèlement les conditions nécessaires à la formation d'une tumeur (constantes gazeuses, thermiques et énergétiques), le néoplasme généré présentant les caractéristiques de malignité telles que l'index de prolifération élevé, les zones nécroso-hypoxiques et la néoangiogenèse en dérivation du réseau vasculaire de l'hôte.

Dans le cadre de ma thèse, nous avons réalisé des xéno greffes hétérotopiques chez ces souris *Nude* à partir de cellules U87-MG issues d'un GBM humain. Grâce à ce modèle nous nous sommes intéressés à l'impact du système urotensinergique sur les mécanismes de prolifération, hypoxie/nécrose et néoangiogenèse. Au préalable, nous nous sommes assurés de la présence du récepteur UT à la surface des cellules U87-MG (Fig. 21). Nous avons par ailleurs observé que ces cellules en culture synthétisent de l'UII, retrouvée dans le cytosol et/ou le noyau (Fig. 21).



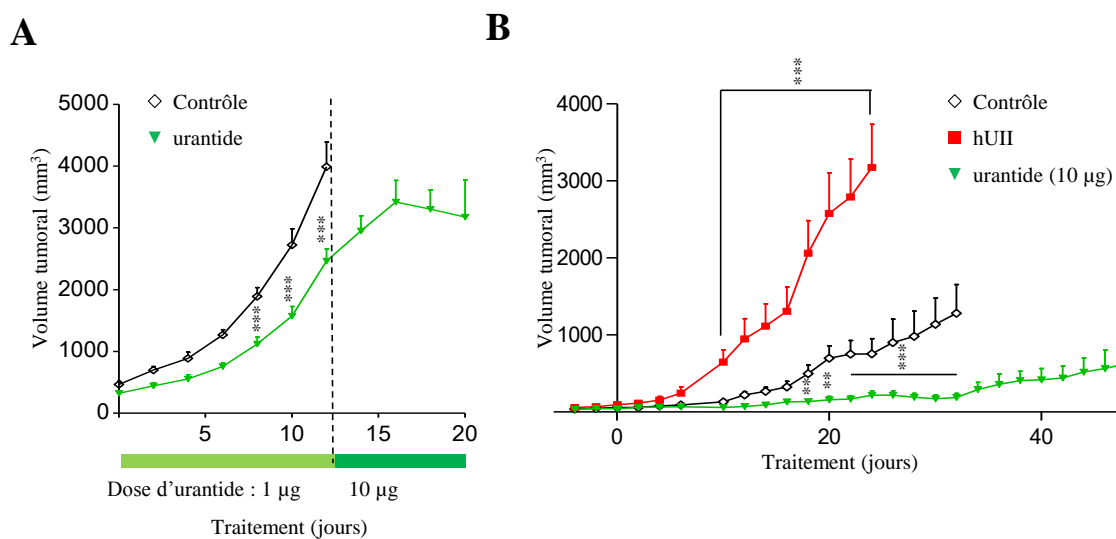
**Figure 21 : Expression et localisation du récepteur UT et de l'UII dans des cellules U87-MG en culture.** L'UT révélé par immunofluorescence (gauche, vert) est localisée sur la membrane plasmique des cellules (flèche blanche), et présente un aspect ponctiforme du marquage comparable à celui classiquement observé pour les RCPG. L'UII (droite, vert) est retrouvée de manière diffuse dans le cytosol (flèche jaune) et co-localisée (flèche blanche) avec un marqueur nucléaire (DAPI, en bleu). Barres d'échelle : 10  $\mu$ m.

Xéno greffées dans des souris immunodéprimées *Nude*, les cellules tumorales U87-MG conservent la capacité d'exprimer l'UII et l'UT, tous deux sont retrouvés dans les tumeurs formées quinze jours après implantation. À ce stade, leur expression est présente dans les composants vasculaires de types endothélial et musculaire lisse. Des injections intratumorales quotidiennes d'hUII (100 ng, 10  $\mu$ L) entraînent une accélération de la croissance tumorale et diminue de façon corolaire la survie des animaux. En revanche, les ligands urotensinergiques courts (URP, hUII<sub>4-11</sub>), administrés aux mêmes doses, ont peu d'impact, et pourraient donc relayer des activités biologiques distinctes de la forme native de l'hUII. Ces résultats sont en accord à la fois avec les données discutées dans la partie 1 (p. 185) et avec plusieurs publications récentes (Prosser *et al.*, 2008 ; Jarry *et al.*, 2010 ; Doan *et al.*, 2012 ; Chatenet *et al.*, 2013). De manière intéressante, le fait que la forme murine de l'UII ne modifie pas significativement le développement des xéno greffes suggère par ailleurs *i*) que l'hUII agirait très majoritairement par l'intermédiaire de l'UT humain présent initialement puis notamment sur les cellules U87-MG, en plus d'être capable d'activer le récepteur UT murin (Deuchar *et al.*, 2006 ; Sue *et al.*, 2009 ; Gao *et al.*, 2010 ; Doan *et al.*, 2012), et *ii*) qu'à l'inverse, la mUII possède une faible affinité pour l'UT humain, hypothèse déjà étayée par des études de liaison qui indiquent que ce récepteur présente une affinité modérée pour les formes murines de l'UII



et/ou se comporterait comme un ligand biaisé (Chatenet *et al.*, 2013). Traités quotidiennement avec du palosuran (injection intratumorale, 1 µg, 10 µL), les animaux voient leur survie moyenne multipliée par 1,6 en comparaison du groupe contrôle. Pour autant, cet antagoniste bloque partiellement les effets de l'hUII lorsque les deux molécules sont co-injectées. Au mêmes doses, l'urantide prolonge jusqu'à six fois la survie des animaux, en ralentissant de manière stable la croissance des xénogreffes, tout en conservant une grande partie de son efficacité lorsqu'il est co-administré avec l'hUII. En accord avec ces données, les index de prolifération cellulaire (marquage du Ki67) des tumeurs des différents groupes de traitement sont en parfaite corrélation avec la cinétique de croissance tumorale.

Afin de mieux cerner le potentiel thérapeutique de l'urantide, cette molécule a été testée sur des tumeurs bien développées, *i.e.* volume supérieur ou égal à 500 mm<sup>3</sup>, au sein desquelles la prolifération cellulaire et l'angiogenèse sont comparables à celles observées dans des néoplasmes humains. En utilisant les mêmes doses, l'urantide conserve sa capacité à retarder la tumorigenèse. A une dose dix fois concentrée (10 µg, 10µL) il est même observé une stabilisation du volume tumoral sur une période de près d'une semaine (Fig. 22A), sans impact notable sur la santé des animaux (poids, apparence générale, activité locomotrice) ou les organes prélevés après euthanasie (poids, aspect) (données non présentées). A cette dose élevée mais ne présentant pas de toxicité, l'urantide injecté au sein de xénogreffes de GBM d'environ 100 mm<sup>3</sup> est capable de retarder la croissance tumorale de manière durable, puisqu'il faut en moyenne 48 jours aux tumeurs pour atteindre un volume de 500 mm<sup>3</sup> contre 31 jours pour une dose dix fois moindre (Fig. 22B).



**Figure 22 : Impact de l'augmentation (x10) des doses d'urantide administrées sur la croissance de cellules U87-MG xéno greffées dans des souris Nude.** **A**, les tumeurs sont injectées tardivement avec de l'urantide (1 µg, 10 µL) dès qu'elles atteignent un volume de 500 mm<sup>3</sup>, puis reçoivent une dose 10 fois concentrée au douzième jour de traitement sur une durée d'une semaine, ce qui provoque rapidement une inflexion de la courbe de croissance. **B**, l'urantide administrée de manière précoce (volume tumoral : 100 mm<sup>3</sup>) à forte dose (10 µg, 10 µL) permet de retarder durablement (+20 jours) la croissance tumorale en maintenant les xéno greffes à un volume inférieur à 500 mm<sup>3</sup> en comparaison d'une dose injectée 10 fois moindre (données non présentées). Analyse statistique par Anova *two-way* suivie d'un *post test* de Bonferonni (hUII et urantide vs contrôle). \*\*, P < 0.01 ; \*\*\*, P < 0.001.

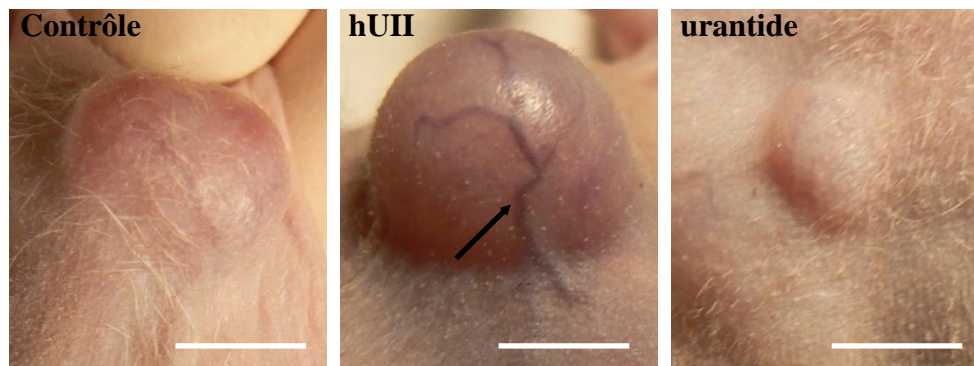
A ce jour, sur l'ensemble des études s'intéressant au système urotensinergique dans les cancers (Tab. 13), seule une d'entre elles démontre l'impact *in vivo* de l'UII sur la croissance tumorale (Wu *et al.*, 2010). Plus précisément, les auteurs montrent que des injections intrapéritonéales d'hUII augmentent significativement les volumes et poids d'adénocarcinomes pulmonaires greffés de manière hétérotopique. Nos résultats confirment qu'une exacerbation de l'activation des récepteurs UT accélère le développement des xéno greffes de GBM et démontrent pour la première fois qu'un blocage de l'UT par des ligand biaisé ou antagoniste ralentit leur croissance. La sélectivité et l'efficacité de ces molécules sur les formes murine et humaine de l'UT sont sujettes à discussion. Le palosuran, un antagoniste non peptidique, possède une forte affinité pour l'UT hominoïde, mais se révèle peu efficace sur l'UT murin ou félin (Behm *et al.*, 2010). Selon Kim et coll. (2010), qui ont réalisé des études de prédiction d'interaction ligand-récepteur en trois dimensions, l'interaction du palosuran sur l'UT murin ne serait pas énergétiquement favorable pour

assurer une liaison stable. En revanche, l'urantide est considéré comme le seul ligand biaisé de référence capable de bloquer efficacement l'UT hominoïde, félin ou murin (Behm *et al.*, 2006). Ainsi, en transposant ces données dans le cadre de la tumorigenèse, il est permis d'envisager que cette molécule serait capable de bloquer simultanément les activités cellulaires relayées par l'ensemble des sous-espèces de récepteurs UT exprimés au sein de la xénogreffe. Ce type de composé pourrait représenter des candidats de choix pour bloquer le développement de néoplasmes, gliomes inclus, dont on sait qu'ils surexpriment l'U<sup>h</sup>II et/ou l'UT (cf. Tab. 13). De façon intéressante, l'injection de palosuran (Sidharta *et al.*, 2006 ; 2009) ou d'urantide (Cheriyana *et al.*, 2009 ; Nitescu *et al.*, 2010) n'entraîne pas d'effets secondaires indésirables, en particulier sur le système cardiovasculaire qui possède une densité globalement élevée de récepteurs UT, permettant d'imaginer une action focalisée sur les cellules tumorales exprimant en plus forte mesure l'UT. Ce dernier critère s'avère d'importance, lorsque l'on sait que certaines molécules à visée thérapeutique ciblant des systèmes vasoactifs peuvent s'accompagner de troubles digestifs et cardiovasculaires, comme ce fut le cas pour des analogues de la somatostatine utilisés en chimiothérapie et/ou imagerie thérapeutique (Janson, 2006, pour revue), ou que des essais précliniques ont dû être interrompus en raison d'absence de bénéfices ou d'effets délétères trop importants, à l'image des molécules développées autour du système du VIP (Kurtaran *et al.*, 1996 ; Tomassetti *et al.*, 2001 ; Vavere et Rossin, 2012, pour revue).

### **3. Le système urotensinergique est impliqué dans la néoangiogenèse intratumorale**

Afin de comprendre les résultats obtenus *in vivo*, nous avons étudié, après exérèse des xénogreffes soumises aux différents traitements, plusieurs paramètres clefs du développement tumoral, *i.e.* la prolifération cellulaire, la néoangiogenèse et l'hypoxie. Au préalable, l'observation macroscopique des xénogreffes a révélé que l'hU<sup>h</sup>II favorise l'angiogenèse, avec

une invasion massive du tissu tumoral par des vaisseaux sanguins en provenance du flanc et de la peau (Fig. 23).



**Figure 23 : Macrophotographies représentatives de la néoangiogenèse péritumorale de xénogreffes hétérotopiques de U87-MG traitées par l'hUII ou l'urantide.** Les animaux du groupe contrôle reçoivent des injections intratumorales quotidiennes d'une solution saline (PBS, 10  $\mu$ L). Administrée de la même manière, l'hUII (0,1  $\mu$ g ; 10  $\mu$ L) favorise le recrutement des vaisseaux sanguins (flèche) de la souris au voisinage de la tumeur. L'urantide diminue de manière significative la taille des xénogreffes, phénomène qui s'accompagne d'une diminution globale de la néoangiogenèse au voisinage des tumeurs (l'apparition de ces vaisseaux est observée après cinq jours de traitement). Barres d'échelle : 1 cm.

De manière surprenante, l'administration d'hUII s'accompagne également d'hémorragies massives au cœur de la tumeur (données non présentées). Au regard des données de la littérature et des résultats obtenus *in vitro* et *in vivo* sur les caractères pro-angiogénique et pro-tumoral de l'hUII, nous nous sommes intéressés à l'angiogenèse des xénogreffes. Exprimé spécifiquement au niveau la membrane basale des cellules endothéliales des vaisseaux en cours de formation (Yurchenco, 2011), le collagène de type IV (ColIV) joue un rôle prépondérant dans la polarisation des cellules endothéliales (Egeblad *et al.*, 2010). L'analyse histologique systématique des xénogreffes traitées pendant quinze jours confirme que l'hUII augmente de façon drastique (+35%) la densité du réseau vasculaire, dont ses constituants apparaissent désorganisés et pro-hémorragiques, indiquant que l'UII déstabilise le contrôle de l'arrangement des cellules endothéliales, donnant ainsi naissance à un réseau de capillaires dense mais paradoxalement d'apparence dilaté, tortueux et visiblement peu fonctionnel. L'absence d'embranchements ou de segments clairement délimités ne permet donc pas une comparaison qualitative avec le réseau endothélial du groupe contrôle. Un phénomène pro-

fibrotique similaire et induit par l'UII a été décrit dans des études fragmentaires portant sur *i*) la néphropathie diabétique responsable d'une régulation positive et progressive du système urotensinergique avec en retour, une accumulation de ColIV *via* la signalisation du TGF- $\beta$ 1 (Tian *et al.*, 2008), *ii*) la fibrose cardiaque concomitante au diabète de type 2, démontrant qu'un blocage du récepteur UT court-circuite cette cascade délétère (Kim *et al.*, 2013) et *iii*) un modèle animal de sclérodermie, une pathologie induisant une accumulation dans la peau et les organes internes de nombreuses protéines de la MEC, incluant le ColIV, dans laquelle l'UII s'avère être un acteur délétère central (Demir *et al.*, 2013). En outre, les études de Tian (2008) et Demir (2013) démontrent que l'Ang II et l'ET-1 participent à l'emballage de ces mécanismes, suggérant l'existence de phénomènes coopératifs entre des systèmes peptidiques vasoactifs. Le ColIV peut subir un clivage catalysé par des métalloprotéases de la famille des gélatinases dans les tumeurs malignes (Fan *et al.*, 2012). Les fragments ainsi générés possèdent des sites de type acide arginylglycylaspartique (RGD), d'interaction avec les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  (Xu *et al.*, 2001), dont l'activation participe aux phénomènes de métastases et d'invasion tumorales (Egeblad *et al.*, 2010). Dans de nombreux néoplasmes, dont le cancer de l'œsophage, les gélatinases (MMP-2 et -9) sont responsables du clivage de ColIV, et leur surexpression est donc directement reliée à la progression de la maladie (Groblewska *et al.*, 2012, pour revue). Surexprimées dans les gliomes malins (Hagemann *et al.*, 2012), les gélatinases voient leur activité associée majoritairement aux phénomènes d'invasion intraparenchymateuses (Wick *et al.*, 2001), mais également à la mécanistique de la néoangiogenèse (Plate *et al.*, 2012). L'analyse des xéno greffes par immunohistochimie montre que l'administration d'hUII s'accompagne d'une augmentation de l'expression de MMP-2 et à *fortiori* de MMP-9, dont la localisation est quasi-exclusivement limitée aux vaisseaux sanguins, eux-mêmes fortement immunoréactifs pour l'UII. Cette dernière donnée suggère que le peptide accélérerait la croissance des vaisseaux notamment par le biais de la

suractivation des MMP, et perturberait la balance angiogénique pour provoquer à plus long terme une désorganisation des vaisseaux. Des effets paradoxalement pro- puis anti-angiogéniques ont déjà été caractérisés dans les gliomes pour d'autres molécules, à l'image du VEGF et du PDGF (Robles Irizarry *et al.*, 2012, pour revue). Dans ces deux cas, la surexpression des récepteurs et de leurs ligands, allant jusqu'à cent fois les niveaux retrouvés dans le cerveau normal, conduisent à une malformation progressive du réseau vasculaire responsable des hyperperfusions, hémorragies et œdèmes intracrâniens chez les patients (Stiver, 2004, pour revue). Enfin, en marge de son implication dans la néoangiogenèse, l'UII participerait à l'établissement d'un microenvironnement pro-inflammatoire en stimulant la libération d'IL-6, de TNF- $\alpha$  et de MMP-9, et pourrait être responsable d'une aggravation rapide de la tumorigénicité (Zhou *et al.*, 2012).

En bloquant le récepteur UT par le palosuran, on constate une diminution significative (-20%) de la densité vasculaire. Du point de vue structurel, le réseau de capillaire est doté d'une architecture peu complexe, les vaisseaux présentant un nombre d'interconnexions significativement bien inférieur au contrôle. Administré dans les mêmes conditions, l'urantide bloque de manière beaucoup plus spectaculaire la néoangiogenèse des gliomes xénogreffés, confirmant son avantage sur le palosuran. Caractérisé par sa très faible densité en capillaires (-30%) et un nombre quasi nul d'interconnexions, le réseau vasculaire est particulièrement diffus et rudimentaire. Co-injecté avec l'hUII, le palosuran normalise la surface occupée par les vaisseaux qui s'approche alors du groupe contrôle, tout en restant très inférieure aux valeurs du groupe hUII ; l'urantide perd une partie de son efficacité mais reste suffisamment puissant pour diminuer significativement l'aire (-20%) et la complexité de l'angiotection. Dans les deux cas, la description morphologique *in vivo* est en accord avec les observations faites dans les expériences de tubulogenèse *in vitro*, présentées dans la première partie de cette discussion, et comparables aux données de la littérature. Il s'agit en particulier des

études de Spinazzi et coll. (2006) qui démontrent *in vitro* et *in vivo* que le palosuran bloque efficacement l'effet pro-angiogénique de l'UII, et de celles de Yi et coll. (2012), qui reportent que l'urantide inhibe de manière similaire l'angiogénèse de cellules endothéliales humaines *in vitro*.

L'inhibition de la néoangiogénèse intratumorale par le palosuran et l'urantide s'accompagne d'une réduction significative de la taille des aires et l'intensité du marquage des MMP-2 et -9, protéinases libérées par les vaisseaux en cours de formation. Au regard de la littérature, la baisse de l'activité des MMP s'accompagnerait d'effets bénéfiques sur le microenvironnement tumoral en limitant l'inflammation et l'invasion cellulaire (Esteve *et al.*, 1998 ; Zhou *et al.*, 2012 ; Annabi *et al.*, 2013). Bien qu'il ne soit pas démontré à ce jour d'inhibition directe des MMP par des antagonistes urotensinergiques, il est intéressant de noter que *i)* le palosuran est capable d'améliorer l'état pro-fibrotique/pro-inflammatoire de la sclérose systémique, *via* la diminution des niveaux d'expression de TGF- $\beta$ 1 et d'ET-1 surexprimés sous le contrôle de l'UII (Demir *et al.*, 2013), et *ii)* l'urantide protège efficacement de l'inflammation hépatique induite par l'UII, en empêchant la libération de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  et l'activation de la voie NF- $\kappa$ B. Au regard de ces données, il est permis d'envisager que ces antagonistes pourraient donc ralentir la croissance des xénogreffes en bloquant la néoangiogénèse et la libération de cytokines tumorigéniques.

Traitées quotidiennement avec du palosuran ou de l'urantide sur des périodes supérieures à quinze jours, les xénogreffes finissent par échapper au ralentissement de la tumorigénèse et atteindre un volume de 2000 mm<sup>3</sup> selon une cinétique propre à la molécule utilisée (médiane de survie du palosuran, 23 jours ; urantide, 43 jours). Une comparaison histologique avec des tumeurs de plus faible volume a été réalisée, notamment sur les critères de l'angiogénèse et de la nécrose intratumorales, ainsi que sur des signes de toxicité apparente des molécules sur le reste des organes (données non présentées). Seul ou co-administré avec de l'hUII, le

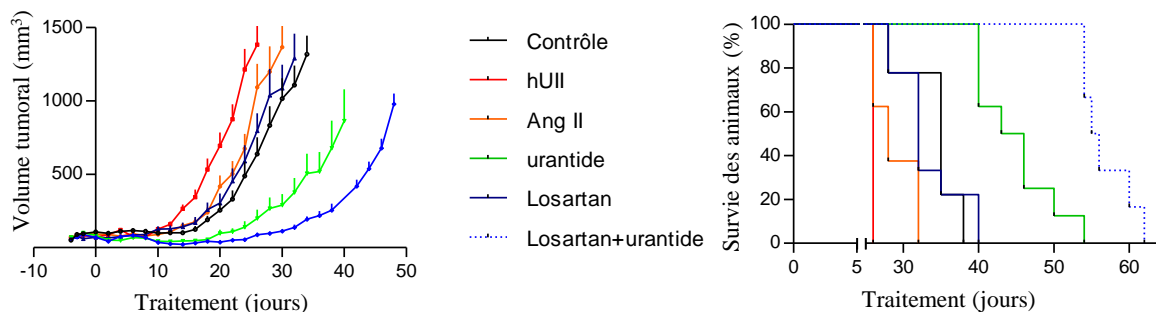
palosuran induit sur le long terme une modification drastique de l'angiotection, avec une forte réduction de la synthèse de ColIV, visualisée par la diminution du nombre de branches avec toutefois une augmentation du diamètre des vaisseaux. Ce dernier paramètre évoque une action vasodilatatrice, décrite *in vivo* dans une étude portant sur l'hémostase rénale de rats cirrhotiques (Trebicka *et al.*, 2008). L'urantide seul ou co-administré avec l'hUII maintient quant à lui durablement une densité vasculaire basse, avec un nombre de branches divisé par quatre, et un faible diamètre des vaisseaux qui indique que cet antagoniste posséderait des propriétés vasoconstrictrices, suggérée par une étude conduite sur des anneaux aortiques (Wang *et al.*, 2007).

L'angiotection des GBM, fragile et peu fonctionnelle par nature, est sous la dépendance forte de concentrations en facteurs pro- et anti-angiogéniques, qui régulent la balance, ou « *switch* » angiogénique (cf. Fig. 3 ; Plate *et al.*, 2012, pour revue). Dans notre étude, l'UII, apparaît comme un puissant facteur angiogénique. Nous montrons pour la première fois que le système urotensinergique est impliqué dans les mécanismes de néoangiogenèse tumorale de GBM humains. Plus précisément, l'UII est capable de faire pencher la balance angiogénique au profit d'une forte densité et d'une organisation aberrante des vaisseaux. Ces effets spectaculaires pourraient être relayés *via* la libération d'autres facteurs pro-angiogéniques, comme cela a été démontré pour *i*) le VEGF libéré par les cellules endothéliales (Albertin *et al.*, 2011 ; Song *et al.*, 2012), *ii*) des peptides vasoactifs aux propriétés angiogéniques avérées, notamment l'ADM (Shi *et al.*, 2005a ; 2005b ; Albertin *et al.*, 2011) et l'ET-1 (Tsai *et al.*, 2009 ; Albertin *et al.*, 2011), et *iii*) les MMP-2 et -9 (Diebold *et al.*, 2011 ; Zhou *et al.*, 2012), surexprimées par les vaisseaux sanguins en croissance pour permettre la création d'un espace propice à la migration/invasion cellulaire des cellules musculaires lisses et/ou endothéliales de type *tip*. Dans la continuité de ce dernier point, un nombre croissant de publications plaide en faveur d'interaction fonctionnelle entre les différents systèmes de peptides vasoactifs. Sans



liens directs apparents, l'UUI et l'Ang II agissent en effet de façon synergique dans la régulation de mécanismes de remodelage vasculaire en augmentant la synthèse de collagène et la production de TGF- $\beta$ , *via* des cascades intracellulaires communes (Dai *et al.*, 2011), et sur l'expression et la libération de VEGF (Song *et al.*, 2012). L'interaction entre les deux systèmes va jusqu'à la régulation transcriptionnelle d'un peptide vasoactif sur son homologue. Plus récemment il a été démontré qu'en plus de leur coopération synergétique, l'activité de ces deux peptides vasoactifs est sous la dépendance de la concentration en O<sub>2</sub> des cellules, l'hypoxie participant pour une part importante à la néoangiogenèse (Chiu *et al.*, 2014). Le blocage de l'UUI endogène par l'utilisation d'antagonistes de l'UT permet de rééquilibrer la balance angiogénique et de normaliser la vascularisation comme c'est le cas du palosuran, voire de bloquer quasi totalement l'expansion des capillaires sanguins, lorsque les tumeurs sont traitées avec l'urantide. Cette notion de normalisation de l'angiotection est d'une importance capitale dans la gestion thérapeutique des gliomes (Goel *et al.*, 2011, pour revue). En effet, il a été démontré que l'usage de thérapies anti-angiogéniques, telles de l'Avastin, concomitante à l'administration de chimiothérapies conventionnelles permettait de limiter la progression des GBM voire parfois de prolonger de plusieurs mois la survie des patients (Hesselink *et al.*, 2014 ; Field *et al.*, 2014, pour revue). En bloquant l'excès de VEGF libéré par le néoplasme, la vascularisation intratumorale est normalisée par rétablissement de la balance angiogénique. Cette modification des vaisseaux sanguins *i*) diminue les risques d'œdèmes cérébraux à tendance hémorragique, *ii*) améliore considérablement la perfusion et diminue le stress hypoxique responsable d'une accélération de la tumorigenèse, et *iii*) rétablit une perméabilité vasculaire en adéquation avec la nécessité de diffuser efficacement les chimiothérapies conventionnelles dans le tissu tumoral (Norden *et al.*, 2008 ; Goel *et al.*, 2011). Au regard de l'absence d'effets indésirables et de l'efficacité du ralentissement de la croissance des GBM (et également dans d'autres tumeurs malignes solides), nous montrons

que le palosuran initialement développé pour soigner le diabète, et l'urantide, potentiel peptide-médicament, s'inscrivant comme des composés susceptibles de renforcer l'action de chimiothérapies conventionnelles, comme démontré pour l'antagoniste non peptidique du récepteur AT-1, le Losartan (Chauhan *et al.*, 2013). Utilisé en co-traitement avec des chimiothérapies conventionnelles, le Losartan provoque en effet une vasodilatation intratumorale, quantifiée *via* le diamètre des vaisseaux sanguins, dans de nombreux néoplasmes humains xéno greffés et permet en définitive une meilleure pénétrance de la chimiothérapie. Dans cette optique, le bénéfice d'un co-traitement Losartan/urantide sur le ralentissement de la tumorigenèse et la survie des animaux a récemment été évalué au laboratoire. Les résultats de cette expérience sont illustrés sur la Fig. 24, et montrent un net avantage du co-traitement, alors même que le Losartan seul n'a pas d'impact visible sur la croissance tumorale.



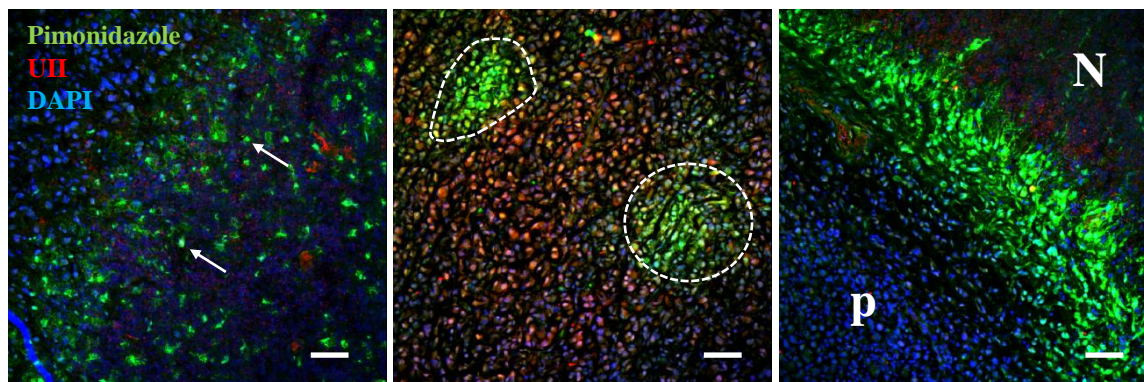
**Figure 24 : Impact d'un traitement combiné sur les systèmes urotensinergiques et angiotensinergiques sur le ralentissement du développement de xéno greffes de cellules U87-MG et la survie des animaux.** Cinétique de la croissance de xéno greffes (gauche) et courbes de Kaplan-Meier (droite) illustrant la survie des animaux traités par injection intratumorale d'hUll (rouge, 0,1 µg, 10 µL), d'Ang II (orange, 0,1 µg, 10 µL), de Losartan (bleu, 1 µg, 10 µL), d'urantide (vert, 1 µg, 10 µL), ou de co-traitements Losartan+urantide (bleu marine, 1 µg, 10 µL ; chacun). Ang II, angiotensine II. n=10 dans chaque groupe.

#### **4. L'accélération de la tumorigenèse par l'hUII s'accompagne d'une augmentation de la malignité**

La néoangiogenèse intratumorale est un facteur influant fortement sur la composition du microenvironnement du néoplasme. En premier lieu, la densité et la qualité du réseau endothélial permet le maintien d'une concentration en O<sub>2</sub> proche de la normoxie (20%) et un apport en nutriments en adéquation avec l'activité métabolique exacerbée des cellules tumorales en prolifération. Le réseau vasculaire normal permet ainsi le développement d'un néoplasme de 1 à 2 mm<sup>3</sup> (Jensen, 2009). A mesure que les cellules tumorales s'éloignent du vaisseau, le microenvironnement s'acidifie et les teneurs en O<sub>2</sub> diminuent. Il est ainsi estimé qu'à une distance de 200 µm d'un capillaire sanguin, une cellule tumorale se retrouve en conditions hypoxiques (Zagzag *et al.*, 2000). Cette première modification du microenvironnement suffit à induire un changement de l'activité cellulaire, par l'activation de la voie intracellulaire HIF (Bai *et al.*, 2011) qui permet la surexpression et la libération d'une grande quantité de facteurs pro-inflammatoires et pro-angiogéniques (Rong *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2012), et modifie encore davantage la nature du microenvironnement tumoral. Les cellules soumises de manière durable à ce stress entrent en apoptose et des plages de nécrose, caractéristiques des gliomes malins et de mauvaise augure pour la survie des patients, se forment au sein de la tumeur (Louis *et al.*, 2007).

Comme abordé dans la partie 3 de cette discussion, la néoangiogenèse intratumorale peut s'avérer paradoxalement peu fonctionnelle en dépit d'une forte densité de vaisseaux et être en définitive responsable d'une hypoxie tissulaire. Nous nous sommes donc intéressés à l'évolution du microenvironnement des xénogreffes par le biais d'une analyse de l'hypoxie et de la nécrose dans le cas d'injections quotidiennes d'hUII ou d'urantide. Notre choix s'est en particulier porté sur ces deux molécules pour leurs effets spectaculaires sur le développement tumoral et leur impact sur la néoangiogenèse. Quantifiée grâce au pimonidazole, un marqueur

chimique non toxique (Cho *et al.*, 2009), la fluorescence relative aux zones hypoxiques est répartie dans *i*) des cellules fortement marquées et qui sont distribuées de manière éparses dans le tissu, *ii*) des zones bien circonscrites de dimensions variables (50 à plus de 200  $\mu\text{m}^2$ ) ou *iii*) de larges bandes dessinant le contour de zones de nécrose, caractérisées par un marquage pycnotique des noyaux au DAPI (Fig. 25).



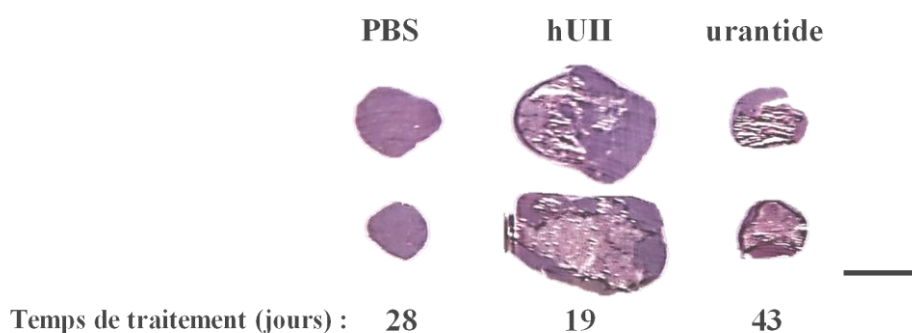
**Figure 25 :** Microphotographies illustratives des zones hypoxiques révélées par le pimonidazole. L'hypoxie (vert) touche des cellules isolées (flèches), des zones bien délimitées (pointillés) ou se retrouve à l'interface du parenchyme tumoral (p) et de la nécrose (N). Dans ce dernier cas, les cellules nécrotiques se distinguent par un marquage nucléaire pycnotique (DAPI, bleu) estompé, moins net et plus petit que dans les cellules tumorales vivantes. L'urotensine II (UII, rouge) est fréquemment surexprimée en bordure des aires hypoxiques. Barres d'échelle : 60  $\mu\text{m}$ .

A l'image des GBM de patients, la nécrose des xénogreffes d'U87-MG ne nécessite pas de marquage immunohistochimique particulier, car elle se caractérise par une prise de coloration éosine/hématoxyline très faible, donnant des zones hypodenses claires systématiquement délimitées par des palissades de cellules bleues, très marquées à l'hématoxyline. Dans les tumeurs traitées quotidiennement pendant 15 jours avec de l'hUII, le marquage est essentiellement localisé aux abords de la nécrose et dans des zones cloisonnées où les noyaux cellulaires ne sont pas systématiquement nécrotiques, avec une immunofluorescence relative significativement plus forte qu'en contrôle. La présence de ces grands territoires très hypoxiques au détriment d'une faible proportion de cellules isolées marquées, suggère un phénomène de stress oxygénique apparaissant de manière précoce. Cette hypothèse est renforcée par la présence de zones gigantesques de nécrose qui représentent, dans certaines xénogreffes, plus de la moitié du tissu cancéreux. A titre de comparaison, l'hypoxie ne couvre

en moyenne que 3% de la surface totale des tumeurs contrôles injectées sur une durée équivalente et les zones de nécrose y sont rares et de petites tailles à ce stade du développement tumoral. En outre, il est intéressant de noter qu'une intense immunofluorescence spécifique de l'UII est systématiquement retrouvée aux abords des zones hypoxiques de grande taille, tous traitements confondus. Ce constat est fréquemment reporté dans plusieurs modèles dans lesquels l'activité du système urotensinergique est intimement liée aux ressources d'O<sub>2</sub> disponibles. En particulier, l'hypoxie provoque *i*) une amélioration de la réponse contractile maximale de l'UII dans les artères pulmonaires (MacLean *et al.*, 2000), *ii*) une surexpression du récepteur UT dont l'activation va se traduire par une hypertrophie vasculaire au niveau cardiaque et pulmonaire (Zhang *et al.*, 2002 ; Gong *et al.*, 2005), *iii*) une augmentation des quantités d'UII libérées qui entraîne une modification de la morphologie de vaisseaux pulmonaires (Sun *et al.*, 2006), *iv*) une hypersensibilisation du système urotensinergique au niveau placentaire, sous le contrôle transcriptionnel de HIF-1 $\alpha$ , aggravant le phénomène de pré-éclampsie (Gould *et al.*, 2010) et *v*) une internalisation de l'UT au niveau nucléaire (Nguyen *et al.*, 2012). En outre, le caractère pro-angiogénique de l'UII décrit dans la publication de Diebold et coll. (2012) serait fortement dépendant de l'hypoxie *via* une protéine-cible de HIF-1 $\alpha$ , la NADPH oxydase de type 2 (NOX2). Cette enzyme est à l'origine de la production de ROS, eux-mêmes capables d'activer le récepteur UT, et l'invalidation de la NOX2 ou l'application d'antioxydants abolissent totalement l'angiogenèse induite par l'UII dans des modèles *in vitro* et *in vivo* (Diebold *et al.*, 2012). Enfin, le concept de systèmes vasoactifs synergiques est une fois encore illustré dans le cadre de l'hypoxie. Une étude de Shyu et coll. (2012) montre que la surexpression de l'UT dans des fibroblastes cardiaques soumis à une atmosphère hypoxique est totalement bloquée par l'addition de Losartan ou d'anticorps dirigés contre le récepteur AT-1. De la même manière, l'UII se comporte comme un médiateur indispensable de l'effet pro-fibrotique de l'Ang II observé en conditions

hypoxiques. Plus récemment, il a été montré que l'hypertrophie des cardiomyocytes hypoxiques provoque une augmentation de l'expression de l'UUI induite en amont par l'Ang II, le blocage de ce peptide abolissant totalement l'expression de l'UUI (Chiu *et al.*, 2014).

Les administrations quotidiennes d'urantide n'ont pas d'effet propre apparent sur l'hypoxie. Il est toutefois observé, dans les tumeurs dont le volume tumoral excède 1000 mm<sup>3</sup> (traitées sur une plus longue période), une forte augmentation de la nécrose, à un niveau équivalent à celui des tumeurs recevant de l'hUUI pendant 15 jours (Fig. 26). Une explication à ce phénomène serait apportée par l'architecture vasculaire, décrite en détail dans la partie 3 de cette discussion. L'inhibition de la néoangiogenèse par l'urantide induirait un appauvrissement du microenvironnement tumoral en ressources énergétiques et en O<sub>2</sub>, ralentissant dans un premier temps la prolifération cellulaire (ce qui retarde la croissance des xénogreffes), puis entraînant dans un second temps la mort du tissu après une période prolongée de stress oxygénique.

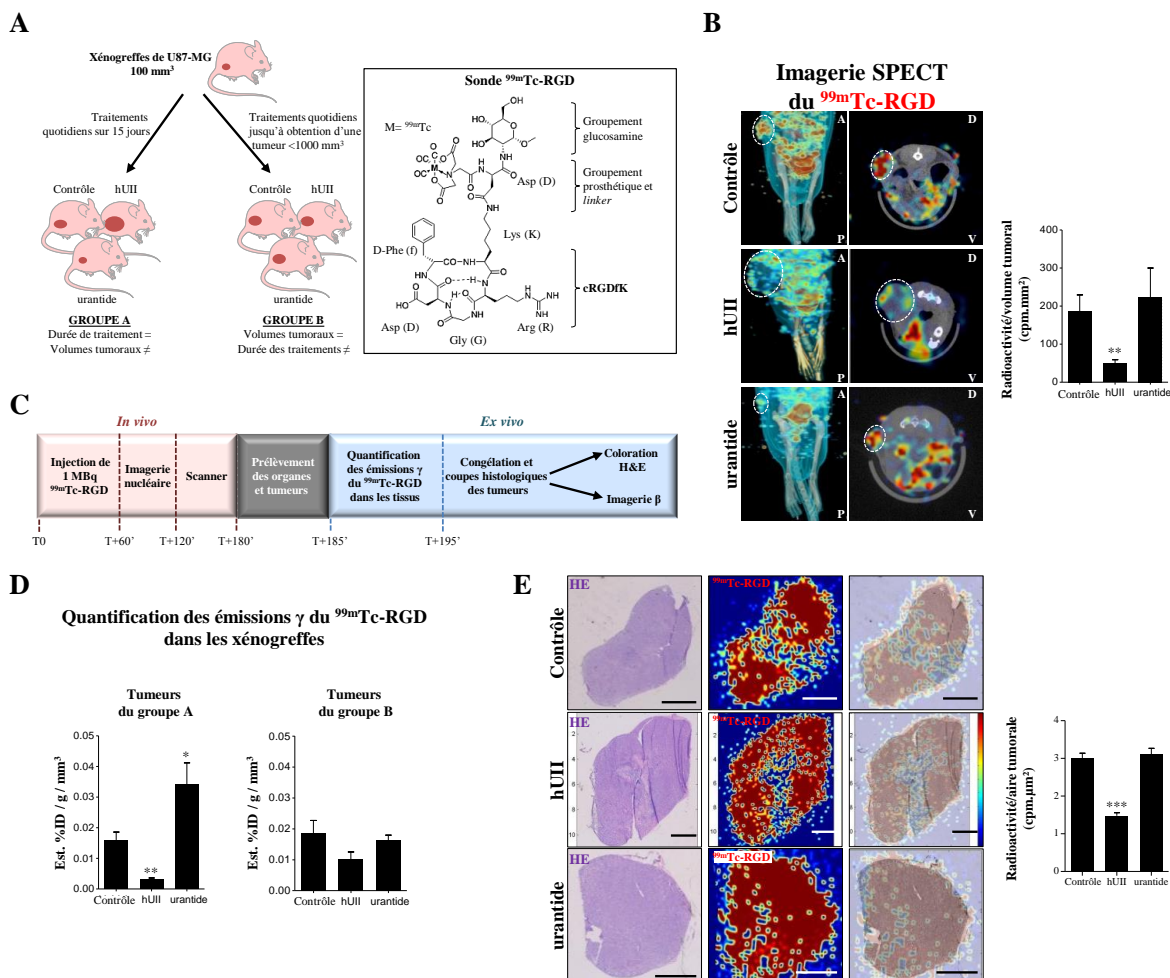


**Figure 26 : Photographies illustratives de la nécrose intratumorale de xénogreffes de volume supérieur à 1000 mm<sup>3</sup>.** Les coupes histologiques ont été colorées à l'éosine/hématoxyline. La durée des traitements nécessaires à l'obtention de xénogreffes de ce volume est indiquée en bas. Les injections quotidiennes de PBS (contrôle, 10 µL), d'hUUI (0,1 µg, 10 µL) ou d'urantide (1 µg, 10 µL) induisent une variation de la proportion de tissu vivant (violet foncé) par rapport à la nécrose (rose clair). Barre d'échelle : 1 cm.

Le facteur temporel joue donc un rôle majeur dans la composition du microenvironnement et les conséquences sur l'organisation histologique des xénogreffes. Une cible moléculaire permettant de suivre le développement tumoral *in vivo* a donc été sélectionnée pour conduire des expériences de suivi en imagerie. L'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  fait partie de la famille des récepteurs

présents à la membrane plasmique recrutés dans les interactions cellule-cellule et cellule-microenvironnement, ces récepteurs endossant le rôle de senseurs moléculaires et étant impliqués dans les phénomènes de motilité cellulaire, d'invasion intracérébrale et d'angiogenèse dans les GBM (Tabatabai *et al.*, 2011). Récemment, l' $\alpha_v\beta_3$  a été identifiée comme un candidat idéal du suivi de la tumorigenèse et de la néoangiogenèse. En effet, l' $\alpha_v\beta_3$  peut être détectée à l'aide d'une sonde radioactive dans des xénogreffes hétérotopiques de cellules U87-MG, et en fonction de l'avancée du développement tumoral son expression change de localisation, *i.e.* de prime abord détectée dans les vaisseaux sanguins en développement dans les tumeurs d'un volume compris entre 200 et 500 mm<sup>3</sup>, l'intégrine est ensuite surexprimée par les cellules tumorales, avec une diminution progressive de la captation nette de la sonde à mesure que la nécrose se développe (Shao *et al.*, 2013).

Grâce à une collaboration avec l'équipe QuantiF du laboratoire LITIS (EA 4108 Rouen), regroupant des radiopharmaciens, médecins nucléaires et ingénieurs en imagerie médicale, il nous a été possible de réaliser des acquisitions de manière régulière sur des animaux vivants à l'aide d'un traceur radioactif dont la structure est semblable au traceur utilisé par Shao (2013) (Fig. 27A). Le RGD, un peptide liant spécifiquement l' $\alpha_v\beta_3$  est couplé au technétium (<sup>99m</sup>Tc), un radioélément détecté en imagerie *single-photon emission computed tomography* (SPECT), quantifié par son émission de rayonnements  $\gamma$  dans les organes prélevés, et localisé de façon précise par imagerie  $\beta$ . Le protocole validé par notre étude est résumé dans la figure 27A. Brièvement, deux cohortes expérimentales de souris porteuses de xénogreffes de U87-MG ont été définies selon les critères d'injections sur une durée déterminée (groupe A) ou d'un volume tumoral intergroupe identique (groupe B). Les animaux sont analysés par SPECT en début de tumorigenèse (volume de 100 mm<sup>3</sup>) et à l'issue de l'expérience définie précédemment.



**Figure 27 : Suivi de la tumorigenèse et de l'apparition progressive de la nécrose intratumorale dans des xéno greffes hétérotopiques de cellules U87-MG. A,** protocole expérimental utilisé dans cette étude (gauche) et structure développée de la sonde acide arginylglycylaspartique technétée (<sup>99m</sup>Tc-RGD) dirigée contre l'intégrine α<sub>v</sub>β<sub>3</sub>. **B,** imagerie *single-photon emission computed tomography* (SPECT) représentative de la captation du <sup>99m</sup>Tc-RGD dans des tumeurs vivantes. Les coupes antéro-postérieures (gauche) et dorso-ventrale (droite) illustrent la répartition du marquage dans les tumeurs (pointillés blancs). L'imagerie et la quantification dans les tumeurs traitées à l'hUII (0,1 µg ; 10 µL) révèlent la présence d'une hypocaptation au centre de la tumeur. **C,** protocole expérimental utilisé à l'issue du suivi de la tumorigenèse. Les rayonnements γ émanant des tumeurs sont quantifiés et comparés aux autres organes, l'imagerie β sur des coupes histologiques permet de localiser précisément la fixation du <sup>99m</sup>Tc-RGD dans les tumeurs. **D,** quantification des émissions γ des tumeurs des groupes A (gauche) et B (droite). **E,** colorations éosine/hématoxyline (gauche), imagerie β (centre) et superposition (droite). Les histogrammes de quantification (droite) ont été obtenus en excluant la zone de nécrose et en normalisant avec le volume tumoral, ils confirment la diminution de la captation par les cellules tumorales des xéno greffes recevant de l'hUII. Barre d'échelle : 2 mm. <sup>99m</sup>Tc, technétium ; A, antéro ; cpm, coups par minute ; D, dorso ; HE, coloration éosine/hématoxyline ; hUII, urotensine II humaine ; P, postérieur ; RGD, acide arginylglycylaspartique ; SPECT, *single-photon emission computed tomography* ; V, ventral.

En accord avec la littérature et nos précédents résultats, l'administration intratumorale quotidienne d'hUII dans les tumeurs du groupe A provoque une accélération de la croissance tumorale, visualisée par une forte captation de la sonde radioactive par le tissu. L'apparition au cours du temps d'une nécrose intratumorale massive est associée à une diminution de la



quantité nette de signal radioactif spécifique d' $\alpha_v\beta_3$ . Cette nécrose se dessine à l'imagerie par une absence de radioactivité dans certaines zones centrales de la tumeur, confirmée par une diminution des rayonnements  $\gamma$  détectés dans la tumeur entière *ex vivo* et la présence de larges aires nécrotiques ne fixant pas la sonde radioactive en imagerie  $\beta$  (Fig. 27 B). Plus petites, les tumeurs recevant l'urantide expriment fortement l' $\alpha_v\beta_3$ . En accord avec les données de la littérature (Shao *et al.*, 2013), la perte d'expression de l' $\alpha_v\beta_3$  par les cellules tumorales situées en dehors des zones de nécrose semble bien être observée dans les groupes de xénogreffes sélectionnées à des volumes tumoraux identiques (groupe B) (Fig. 27 D). D'une manière inattendue, les marquages immunohistochimiques de l'intégrine  $\alpha_v$  réalisés sur ces mêmes tumeurs donnent lieu à une interprétation très différente, avec une surexpression forte dans le tissu tumoral non nécrotique dans les tumeurs ayant reçu de l'hUII ou de l'urantide. Ce dernier point pose la question de la capacité de pénétration de la sonde  $^{99m}\text{Tc}$ -RGD qui doit diffuser par le biais d'un réseau vasculaire malformé et peu fonctionnel (tumeurs recevant de l'hUII) ou sous-dimensionné (tumeurs recevant de l'urantide). En outre, l'expression à des niveaux équivalents induite par deux peptides aux activités a priori opposées, suggèrent finalement que l'urantide serait un ligand biaisé pour l'activation des intégrines, comme démontré récemment dans l'étude de Brulé et coll. (2014).

Encore trop fragmentaires, les données bibliographiques reliant intégrine  $\alpha_v\beta_3$  et UII/UT ne permettent pas de démontrer une interaction fonctionnelle entre ces deux systèmes. Seule une étude portant sur la signalisation de l'UT dans les cellules musculaires lisses fait état d'une phosphorylation de ERK sous la dépendance de la *focal adhesion kinase* (FAK), une intégrine responsable de l'adhésion cellulaire (Tamura *et al.*, 2003). Cependant, en qualité de puissant facteur pro-angiogénique, l'hUII pourrait moduler indirectement l'expression des intégrines, qui sont essentielles à la croissance vasculaire (Tabatabai *et al.*, 2011). De manière intéressante, il a été montré qu'au sein de GBM greffés en intracérébral dans des souris *Nude*,

l' $\alpha_v\beta_3$  se comporte paradoxalement comme un composé pro-angiogénique et pro-mitogénique, tout en stimulant l'attraction de macrophages infiltrants responsables de la destruction du tissu néoplasique sous la forme de zones nécrotiques (Kanamori *et al.*, 2006). Ce phénomène n'est pas sans rappeler les effets de l'UII, molécule pro-angiogénique (Spinazzi *et al.*, 2006 ; Yi *et al.*, 2013) et chimioattractante pour les macrophages (Segain *et al.*, 2007). Nos derniers résultats sont également à rapprocher des observations faites en partie 3 de cette discussion, et les informations données par la littérature, à savoir que *i*) l'UII est capable de stimuler la synthèse de ColIV (Tian *et al.*, 2008), *ii*) le ColIV est clivé par des gélatinases dans les tumeurs malignes (Fan *et al.*, 2012), *iii*) l'UT est un régulateur de l'expression et la libération de ces gélatinases (Diebold *et al.*, 2011 ; Zhou *et al.*, 2012) et *iv*) les fragments peptidiques issus de cette coupure possèdent des sites de type RGD d'interaction avec les intégrines  $\alpha_v\beta_3$  (Xu *et al.*, 2001). Dans le prolongement de ces données bibliographiques, les travaux récents réalisés dans l'équipe par le Dr Lecointre mettent en évidence dans le phosphoprotéome des cellules U87-MG stimulées par l'UII, de protéines, intégrines incluses, dont l'activation est UT-dépendante, qui sont responsables des mécanismes d'adhésion et de migration cellulaires (Lecointre *et al.*, 2014, *in press*). En définitive, cette quantification indirecte de la nécrose par les niveaux d'intégrines s'avère être un outil diagnostique puissant, rapportant l'état de malignité global et capable d'orienter le choix des thérapies ciblées, et notamment vers le cilengitide, un inhibiteur d'intégrines (cf. Fig. 15).



# **Conclusions et Perspectives**

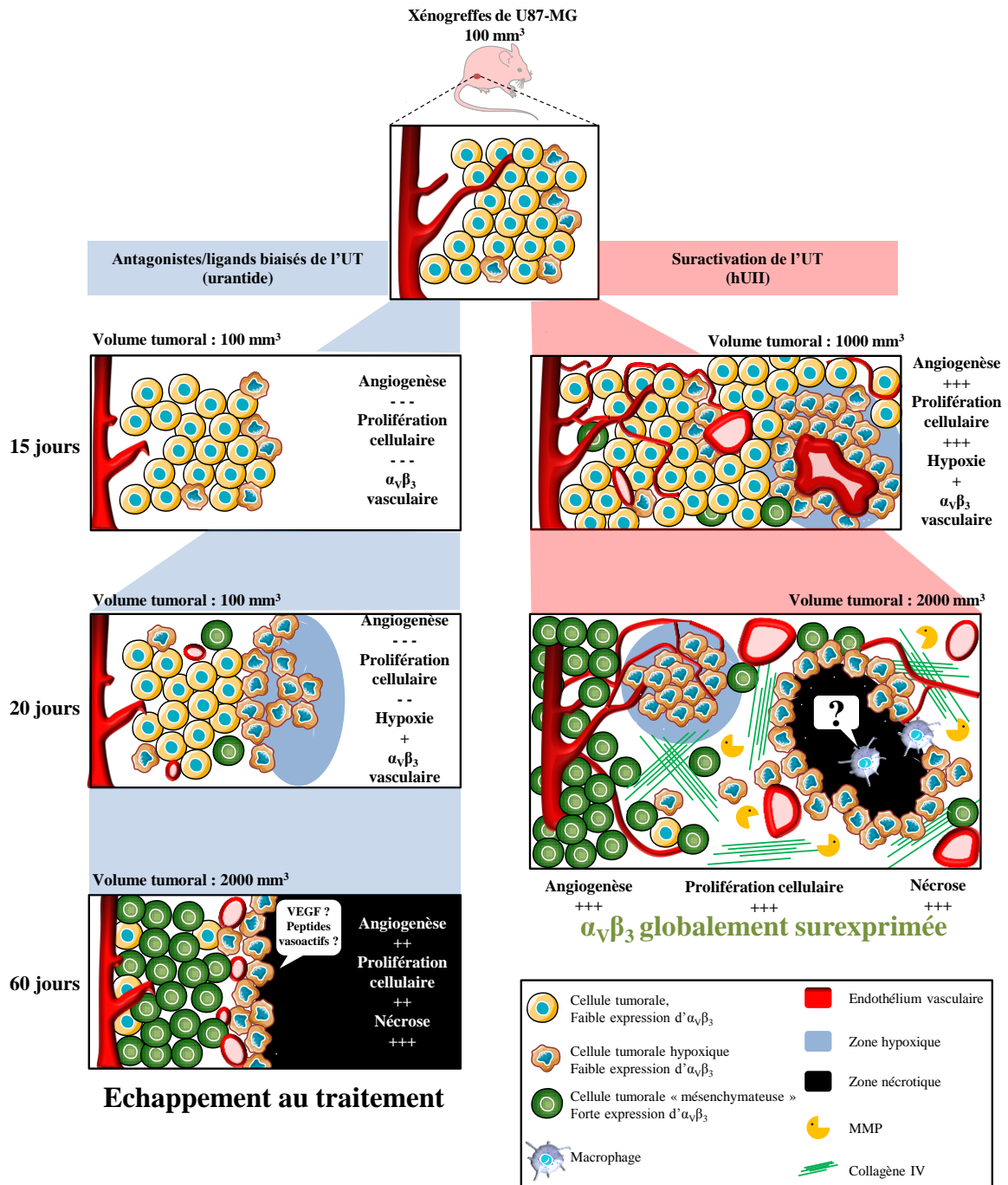


## Conclusion et Perspectives

Nous avons pour la première fois démontré que le système urotensinergique est exprimé de manière fonctionnelle par des cellules issues de GBM humains, et que l'UUI intervient dans des processus clé de la tumorigenèse (Fig. 28). D'une manière particulièrement prometteuse d'un point de vue clinique, l'utilisation d'antagonistes ou de peptides-médicaments biaisés dirigés contre l'UT permettrait d'altérer son activation et de perturber drastiquement la tumorigenèse. De plus, l'existence de relations étroites entre les différents systèmes vasoactifs, et tout particulièrement l'UUI et l'Ang II, laissent entrevoir des traitements combinatoires pour bloquer en amont des voies de signalisation communes aux différents récepteurs associés. A l'image de l'Avastin et de son utilisation dans le traitement des GBM, des thérapies ciblées ont été tenues en échec, paradoxalement par le fait qu'elles ne ciblent qu'un seul et unique récepteur (Narayana *et al.*, 2012). En effet, cet anticorps bloquant le VEGF n'est efficace que contre les tumeurs fortement angiogéniques, et donne lieu à des récurrences pernicieuses, fortement invasives et finalement insensibles, du fait de la surexpression d'autres récepteurs, mimant l'activité du VEGFR et permettant une reprise de la néoangiogenèse. Ainsi, il serait possible d'agir avec une longueur d'avance en court-circuitant les stratégies de résistance du néoplasme par le blocage de plusieurs systèmes vasoactifs synergiques pour assurer une efficacité optimale du traitement.

Les travaux rapportés dans ce manuscrit soulèvent certaines interrogations et/ou perspectives de projets de recherche. Parmi eux, il serait nécessaire d'étudier *i)* les profils d'expression du système urotensinergique dans des échantillons tumoraux humains de malignité croissante, *ii)* l'existence d'un rôle chimioattractant de l'UUI sur le recrutement des macrophages protumoraux, *iii)* la signalisation biaisée de l'UT, l'expression de partenaires

protéiques sous le contrôle de l'UII et la coopérativité moléculaire de systèmes vasoactifs dans la tumorigénèse, iv) l'impact des traitements sur la vasoconstriction/dilatation des vaisseaux, ainsi que la question du passage au travers de la BHE.



**Figure 28 : Proposition de schéma final des connaissances acquises au cours de cette étude, concernant l'implication du système urotensinergique dans la tumorigénèse des gliomes malins.** Dans notre modèle préclinique (xénogreffes hétérotopiques de cellules U87-MG), nous avons démontré que le système urotensinergique intervient dans les processus de néoangiogenèse. Suractivé par des injections régulières d'hUII (droite, rouge) le récepteur UT, présent au niveau tumoral et vasculaire, est responsable d'une accélération de la tumorigénèse corrélée à une forte prolifération endothélio-capillaire, détectable en imagerie clinique par une surexpression globale des intégrines  $\alpha_v\beta_3$ , et la présence de zones hypoxiques. Sur une plus longue période, la

perturbation de la balance angiogénique conduit à l'installation d'une pseudo-fibrose intratumorale, *i.e.* une modification du microenvironnement *via* la production d'une grande quantité de collagène IV d'origine endothéliale, une augmentation de la libération des MMP-2 et -9, des malformations du réseau vasculaire conduisant à des hémorragies et une hypoxie nécrotique intratumorale, ainsi qu'une forte augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha_v$ . Pour cette dernière, une transition brutale de son expression est observée. De prime abord exprimée par les vaisseaux sanguins en croissance, puis rapidement et massivement étendue à la quasi-totalité des cellules tumorales. Cette transition semblable au *switch* épithélio-mésenchymateux observé fréquemment dans les gliomes pourrait être sous le contrôle du récepteur UT. Par ailleurs, l'hypothèse d'une contribution des macrophages dans les processus nécrotiques est à envisager, principalement en raison de leur participation à l'établissement de la nécrose des tumeurs malignes. L'U11 qui intervient dans les phénomènes pro-inflammatoires, se comporte aussi comme une puissante chimiokine sur les cellules spumeuses. Particulièrement prometteuses, les stratégies ciblant l'UT (antagoniste ou ligands biaisés) permettraient de freiner durablement la tumorigenèse en bloquant l'angiogenèse qui provoque l'installation progressive d'une hypoxie à tendance nécrotique, ou en favorisant l'adhésion cellulaire par le biais d'une surexpression des intégrines (limitant ainsi l'infiltration intracérébrale). Malheureusement, le traitement n'est efficace que sur une période d'un mois et un échappement au traitement est quasi-systématiquement observé. La nécessité de développer des stratégies thérapeutiques combinatoires ciblant des systèmes vasoactifs synergiques pourrait pallier ce phénomène de résurgence. MMP-2/-9, métalloprotéase matricielle de type 2/9.

## **1. Caractérisation histologique du rôle du système urotensinergique dans les GBM de patients**

Les connaissances acquises dans la présente étude préclinique trouvent actuellement leur écho dans la réalité clinique de la pathologie des gliomes. Grâce à une collaboration avec les services de neurochirurgie et d'anatomocytopathologie du CHU de Rouen, l'équipe a accès à des fragments histologiques frais ou des coupes incluses en paraffine en provenance de la tumorothèque. Un travail amorcé par le Dr Bennani et actuellement poursuivi par le Dr Guichet (respectivement neurochirurgien et post-doctorant dans l'équipe) vise à caractériser avec précision la localisation histologique de l'UT et de l'U11, de corrélérer leur niveau d'expression au grade de la tumeur et de la comparer à celle d'autres RCPG à vocation chimiokinique. A ce jour, l'expression de l'U11 et de l'UT a été étudiée sur une cinquantaine d'échantillons tumoraux des quatre grades de tumeurs gliales et périphériques, ainsi que sur des fragments de cerveau normal et d'organes tels que les reins, le poumon et le pancréas. En accord avec nos observations faites sur les xénogreffes, l'U11 est essentiellement localisée au niveau du lumen des vaisseaux sanguins tandis que son récepteur est majoritairement exprimé au niveau des cellules endothéliales et péricytaire. Il est intéressant de noter qu'il est



fréquemment observé des inclusions de cellules tumorales au sein des vaisseaux des gliomes, et que ces cellules surexpriment l'UT, suggérant un rôle du système urotensinergique dans la communication des cellules tumorale, endothéliale et péricytaire, ainsi que dans les phénomènes de transdifférenciation épithélio-mésenchymateuse. Il est également relevé des zones de forte immunoréactivité du type UT aux abords des zones de nécrose, voire rigoureusement cantonnées à la palissade hypoxique. En outre, de nombreuses cellules tumorales UT<sup>+</sup> surexpriment également le récepteur du SDF-1 (CXCR4), un récepteur chimiotactique professionnel (Réaux-Le Goazigo *et al.*, 2013) dont on sait que la structure et le fonctionnement se rapprochent énormément de ceux de l'UT (Travaux de Jane-Eileen Joubert, doctorante au sein de l'équipe). Il est donc suggéré, en accord avec les travaux de Lecointre et coll. (2014, *in press*), qu'en fonction de sa concentration locale, l'UII jouerait un rôle double. De faibles concentrations en gradient stimulent la chimioattraction, (comme pour le CXCR4) et permettraient la fuite des cellules tumorales hypoxiques vers les vaisseaux sanguins riches en UII. Des concentrations plus fortes, comme retrouvées aux abords des vaisseaux, stimulent les adhésions cellulaires nécessaires à la néoangiogenèse. Pour favoriser ces adhésions cellulaires, il est proposé que l'activité des intégrines, et notamment l' $\alpha_v\beta_3$ , serait régulée par le système urotensinergique.

## 2. Rôle des macrophages recrutés par l'UII dans la tumorigenèse gliale

Parmi les propriétés accordées à l'UT, la chimioattraction des macrophages telle qu'elle est rapportée dans la littérature (Segain *et al.*, 2007) et dans nos expériences de chimioattraction *in vivo* avec des éponges de Matrigel, n'a à l'heure actuelle pas pu être directement observée dans les expériences portant sur la tumorigenèse. L'absence de chimioattraction dans les xénogreffes peut être partiellement expliquée par le statut immunodéprimé des animaux, même si l'absence de thymus ne touche en théorie que les populations lymphocytaires de type

T. Afin de répondre à cette question, des greffes de cellules gliomales murines (GL261) sont envisagées dans des souris au statut immunitaire normal. De plus, des animaux hétérozygotes et/ou invalidés pour le gène de l'UT, obtenus auprès de l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Strasbourg, France) seront utilisés pour vérifier l'absence de chimioattraction par l'UII des macrophages, des cellules endothéliales et musculaires lisses n'exprimant pas l'UT. Enfin, des greffes orthotopiques, validées au cours de ma thèse, de cellules gliomales transfectées avec la *green fluorescent protein* (GFP) permettront de déterminer si la chimioattraction intratumorale de populations microgliales résidentes ou périphériques peuvent participer à la tumorigenèse.

### **3. La signalisation des systèmes vasoactifs coopératifs.**

Comme démontré par les travaux de Brulé et coll. (2014) l'UII ainsi que certains ligands urotensinergiques « biaisés » ont un effet pro-apoptotique. Cette donnée alimente notre réflexion concernant l'observation d'une nécrose intratumorale massive observée de manière précoce dans les xénogreffes traitées avec de l'hUII. Le peptide permettrait d'exacerber ce phénomène en addition de l'hypoxie relative à une néoangiogenèse peu fonctionnelle. Bien que les expériences *in vitro* conduites à ce jour sur des cellules gliomales, endothéliales ou astrocytaires ne mettent pas en évidence d'effet sur la mort cellulaire, il n'est pas à exclure que le microenvironnement tumoral modifie drastiquement la signalisation de l'UT, par la présence de certains partenaires protéiques tels que des intégrines ou d'autres récepteurs membranaires, et induise une signalisation biaisée conduisant à des effets cellulaires peu ou pas décrits dans la littérature. Cette dernière hypothèse est confortée par les travaux de l'équipe, menés par le Dr Lecointre, qui a identifié par la technique du double-hybride plusieurs partenaires protéiques interagissant physiquement avec l'UT dont notamment des intégrines nécessaires à l'établissement séquentielle de points focaux d'adhésion, au cours du

déplacement des cellules gliomales. Les expériences de MicroSPECT *in vivo* montrent que l'expression de l'intégrine  $\alpha_v\beta_3$  varie significativement en fonction des traitements, il est donc proposé que certains ligands biaisés de l'UT pourraient moduler l'activité d' $\alpha_v\beta_3$ , comme observé dans le cas de l'urantide.

Ce nouvel état des faits de l'existence de ligands et signalisations biaisés permettrait d'envisager le développement de petits peptides, capables de bloquer simultanément la signalisation de plusieurs récepteurs, sur la base d'une activité fusionnelle et/ou synergique. C'est par exemple le cas de l'UII et Ang II, qui partagent des cascades intracellulaires communes et régulent réciproquement leur expression. Identifiés pour leur action centrale dans des processus indispensables à l'expansion du néoplasme, surexprimés dans de nombreuses tumeurs malignes, ces deux systèmes vasoactifs semblent être des cibles de choix pour un « tir groupé » thérapeutique, *via* l'élaboration d'un peptide-médicament capable de les inactiver de manière séquentielle.

#### **4. Back to basics, la vasoactivité des ligands de l'UT et l'impact sur la tumorigénèse**

Initialement caractérisée pour ses propriétés vasoconstrictrices, l'UII en plus de son rôle pro-angiogénique, agirait certainement sur la vasoactivité des vaisseaux tumoraux. L'épaisseur des capillaires, et donc leur état dilaté ou comprimé, influe fondamentalement sur le passage extraluminal de molécules à destination des cellules tumorales (Nomura *et al.*, 1994). Il est par exemple admis que des vaisseaux dilatés améliorent considérablement la diffusion des chimiothérapies conventionnelles dans les tumeurs (Chauhan *et al.*, 2013).

Dans cette optique, une tentative de caractérisation de la vasoactivité des vaisseaux tumoraux de xénogreffes, induite par l'hUII, le palosuran et l'urantide a été entreprise au cours de ma thèse. La mesure *in vivo*, à l'aide d'une imagerie confocale par fibre optique (FOCI) de la vasoconstriction ou dilatation par le diamètre des vaisseaux a été recherchée

dans des xénogreffes traitées pendant 15 jours (hUII, 0,1 µg/10 µL ; urantide et/ou palosuran, 1 µg/10 µL ; injections intratumorales quotidiennes). A l'aide d'une sonde vasculaire fluorescente (dextran-FITC), les tumeurs ont été filmées avant, pendant et après l'administration intraveineuse des différents ligands de l'UT. Malheureusement, les résultats obtenus à ce jour n'ont pas permis une analyse précise. En particulier les tumeurs traitées 15 jours à l'hUII se sont avérées globalement fluorescentes, cette indication suggérant une fuite hémorragique du dextran-FITC dans le parenchyme tumoral par défaut d'angiogenèse fonctionnelle. Un second protocole, *ex vivo* et ne nécessitant pas d'imagerie par fluorescence, est en cours de validation dans l'équipe.

Les inquiétudes portant sur la vasoactivité renvoient à la question du franchissement de la BHE des différents ligands, agonistes ou antagonistes, de l'UT. Aucune étude ne fait état du passage dans le SNC de l'UII administrée par voie intraveineuse, ni même du palosuran pourtant déjà testé dans un protocole clinique de phase 2. Si cette diffusion n'est pas effective, cela soulève la problématique de l'élaboration de « véhicules » pour assurer un traitement efficace des GBM. Dans le cadre d'une collaboration avec le Dr Gubala (Université de Kent, Angleterre), j'ai au cours de ma dernière année de doctorat, validé *in vitro* et *in vivo* différentes constructions de nanoparticules « décorées » à façon, avec des anticorps spécifiques de marqueurs tumoraux (Gubala *et al.*, 2011). Certaines de ces nanoparticules ont déjà fait l'objet d'une validation de leur capacité à franchir la BHE (Tivnan *et al.*, 2012). Parmi les nanoparticules les plus prometteuses, celles contenant de l'urantide et dotées d'une couronne d'anticorps dirigés contre l'EGFR<sub>vIII</sub> s'est révélée particulièrement efficace dans sa capacité à se fixer spécifiquement et durablement dans des xénogreffes de U87-MG, tout en présentant une rétention minimale dans les autres organes. D'une manière particulièrement intéressante, une construction remplaçant les anticorps externes par de l'urantide s'est avérée aussi efficace, démontrant une nouvelle fois que la surexpression du récepteur UT par les

cellules gliomales constitue une cible thérapeutique prometteuse (Freddi *et al.*, en préparation).

**Références**

**bibliographiques**



## Références bibliographiques

### A

- Abdelrahman AM, Pang CC (2002) Involvement of the nitric oxide/L-arginine and sympathetic nervous systems on the vasodepressor action of human urotensin II in anesthetized rats. *Life sciences* **71**:819-825.
- Abdel-Razik AE, Balment RJ, Ashton N (2008) Enhanced renal sensitivity of the spontaneously hypertensive rat to urotensin II. *American journal of physiology. Renal physiology* **295**:F1239-1247.
- Abdel-Razik AE, Forty EJ, Balment RJ, Ashton N (2008) Renal haemodynamic and tubular actions of urotensin II in the rat. *The Journal of endocrinology* **198**:617-624.
- Adebiyi A (2014) RGS2 regulates urotensin II-induced intracellular Ca<sup>2+</sup> elevation and contraction in glomerular mesangial cells. *Journal of cellular physiology* **229**:502-511.
- Affolter JT, Newby DE, Wilkinson IB, Winter MJ, Balment RJ, Webb DJ (2002) No effect on central or peripheral blood pressure of systemic urotensin II infusion in humans. *British journal of clinical pharmacology* **54**:617-621.
- Ahlbom A, Feychting M, Green A, Kheifets L, Savitz DA, Swerdlow AJ, Epidemiology ISCo (2009) Epidemiologic evidence on mobile phones and tumor risk: a review. *Epidemiology* **20**:639-652.
- Ahn SJ, Kim IO (2012) Spinal cord glioblastoma induced by radiation therapy of nasopharyngeal rhabdomyosarcoma with MRI findings: case report. *Korean journal of radiology* **13**:652-657.
- Aita Y, Kasahara T, Isobe K, Kawakami Y, Takekoshi K (2010) Effect of urotensin II on PC12 rat pheochromocytoma cells. *Journal of neuroendocrinology* **22**:83-91.
- Albertin G, Casale V, Ziolkowska A, Spinazzi R, Malendowicz LK, Rossi GP, Nussdorfer GG (2006) Urotensin-II and UII-receptor expression and function in the rat adrenal cortex. *International journal of molecular medicine* **17**:1111-1115.
- Albertin G, Guidolin D, Sorato E, Oselladore B, Tortorella C, Ribatti D (2011) Urotensin-II-stimulated expression of pro-angiogenic factors in human vascular endothelial cells. *Regulatory peptides* **172**:16-22.
- Albertin G, Guidolin D, Sorato E, Spinazzi R, Mascarini A, Oselladore B, Montopoli M, Antonello M, Ribatti D (2009) Pro-angiogenic activity of Urotensin-II on different human vascular endothelial cell populations. *Regulatory peptides* **157**:64-71.



- Alentorn A, Labussiere M, Sanson M, Delattre JY, Hoang-Xuan K, Idhah A (2013) [Genetics and brain gliomas]. *Presse médicale* **42**:806-813.
- Alentorn A, van Thuijl HF, Marie Y, Alshehhi H, Carpentier C, Boisselier B, Laigle-Donadey F, Mokhtari K, Scheinin I, Wesseling P, Ylstra B, Capelle L, Hoang-Xuan K, Sanson M, Delattre JY, Reijneveld JC, Idhah A (2014) Clinical value of chromosome arms 19q and 11p losses in low-grade gliomas. *Neuro-oncology* **16**:400-408.
- Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, Louden CS, Foley JJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ao Z, Disa J, Holmes SD, Stadel JM, Martin JD, Liu WS, Glover GI, Wilson S, McNulty DE, Ellis CE, Elshourbagy NA, Shabon U, Trill JJ, Hay DW, Ohlstein EH, Bergsma DJ, Douglas SA (1999) Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* **401**:282-286.
- Annabi B, Vaillancourt-Jean E, Beliveau R (2013) MT1-MMP expression level status dictates the in vitro action of lupeol on inflammatory biomarkers MMP-9 and COX-2 in medulloblastoma cells. *Inflammopharmacology* **21**:91-99.
- Anselmi E, Vallisa D, Berte R, Vanzo C, Cavanna L (2006) Post-traumatic glioma: report of two cases. *Tumori* **92**:175-177.
- Arbab AS (2012) Activation of alternative pathways of angiogenesis and involvement of stem cells following anti-angiogenesis treatment in glioma. *Histology and histopathology* **27**:549-557.
- Arko L, Katsyv I, Park GE, Luan WP, Park JK (2010) Experimental approaches for the treatment of malignant gliomas. *Pharmacology & therapeutics* **128**:1-36.
- Arnold-Reed DE, Balment RJ (1994) Peptide hormones influence in vitro interrenal secretion of cortisol in the trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and comparative endocrinology* **96**:85-91.
- Arrieta O, Guevara P, Escobar E, Garcia-Navarrete R, Pineda B, Sotelo J (2005) Blockage of angiotensin II type I receptor decreases the synthesis of growth factors and induces apoptosis in C6 cultured cells and C6 rat glioma. *British journal of cancer* **92**:1247-1252.
- Arrieta O, Pineda-Olvera B, Guevara-Salazar P, Hernandez-Pedro N, Morales-Espinosa D, Ceron-Lizarraga TL, Gonzalez-De la Rosa CH, Rembao D, Segura-Pacheco B, Sotelo J (2008) Expression of AT1 and AT2 angiotensin receptors in astrocytomas is associated with poor prognosis. *British journal of cancer* **99**:160-166.
- Asano K, Kubo O, Tajika Y, Huang MC, Takakura K, Ebina K, Suzuki S (1997) Expression and role of cadherins in astrocytic tumors. *Brain tumor pathology* **14**:27-33.

Aury-Landas J, Bougeard G, Castel H, Hernandez-Vargas H, Drouet A, Latouche JB, Schouft MT, Ferec C, Leroux D, Lasset C, Coupier I, Caron O, Herceg Z, Frebourg T, Flaman JM (2013) Germline copy number variation of genes involved in chromatin remodelling in families suggestive of Li-Fraumeni syndrome with brain tumours. *European journal of human genetics* **21**:1369-1376.

## B

Bai RY, Staedtke V, Riggins GJ (2011) Molecular targeting of glioblastoma: Drug discovery and therapies. *Trends in molecular medicine* **17**:301-312.

Baker GJ, Yadav VN, Motsch S, Koschmann C, Calinescu AA, Mineharu Y, Camelo-Piragua SI, Orringer D, Bannykh S, Nichols WS, deCarvalho AC, Mikkelsen T, Castro MG, Lowenstein PR (2014) Mechanisms of glioma formation: iterative perivascular glioma growth and invasion leads to tumor progression, VEGF-independent vascularization, and resistance to antiangiogenic therapy. *Neoplasia* **16**:543-561.

Balakan O, Kalender ME, Suner A, Cengiz B, Oztuzcu S, Bayraktar R, Borazan E, Babacan T, Camci C (2014) The relationship between urotensin II and its receptor and the clinicopathological parameters of breast cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* **20**:1419-1425.

Balat A, Buyukcelik M (2012) Urotensin-II: More Than a Mediator for Kidney. *International journal of nephrology* **2012**:249790.

Balat A, Karakok M, Yilmaz K, Kibar Y (2007) Urotensin-II immunoreactivity in children with chronic glomerulonephritis. *Renal failure* **29**:573-578.

Baldi I, Coureau G, Jaffre A, Gruber A, Ducamp S, Provost D, Lebailly P, Vital A, Loiseau H, Salamon R (2011) Occupational and residential exposure to electromagnetic fields and risk of brain tumors in adults: a case-control study in Gironde, France. *International journal of cancer* **129**:1477-1484.

Baldwin RT, Preston-Martin S (2004) Epidemiology of brain tumors in childhood-a review. *Toxicology and applied pharmacology* **199**:118-131.

Ban Y, Watanabe T, Suguro T, Matsuyama TA, Iso Y, Sakai T, Sato R, Idei T, Nakano Y, Ota H, Miyazaki A, Kato N, Hirano T, Ban Y, Kobayashi Y (2009) Increased plasma urotensin-II and carotid atherosclerosis are associated with vascular dementia. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* **16**:179-187.

Batchelor TT, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Plotkin SR, Gerstner E, Eichler AF, Drappatz J, Hochberg FH, Benner T, Louis DN, Cohen KS, Chea H, Exarhopoulos A, Loeffler JS, Moses MA, Ivy P, Sorensen AG, Wen PY, Jain RK (2010) Phase II study of cediranib, an oral pan-vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor, in patients with recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology* **28**:2817-2823.

- Batuwangala MS, Calo G, Guerrini R, Ng LL, McDonald J, Lambert DG (2009) Desensitisation of native and recombinant human urotensin-II receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **380**:451-457.
- Beadle C, Assanah MC, Monzo P, Vallee R, Rosenfeld SS, Canoll P (2008) The role of myosin II in glioma invasion of the brain. *Molecular biology of the cell* **19**:3357-3368.
- Behm DJ, Aiyar NV, Olzinski AR, McAtee JJ, Hilfiker MA, Dodson JW, Dowdell SE, Wang GZ, Goodman KB, Sehon CA, Harpel MR, Willette RN, Neeb MJ, Leach CA, Douglas SA (2010) GSK1562590, a slowly dissociating urotensin-II receptor antagonist, exhibits prolonged pharmacodynamic activity ex vivo. *British journal of pharmacology* **161**:207-228.
- Behm DJ, Doe CP, Johns DG, Maniscalco K, Stankus GP, Wibberley A, Willette RN, Douglas SA (2004) Urotensin-II: a novel systemic hypertensive factor in the cat. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **369**:274-280.
- Behm DJ, Herold CL, Camarda V, Aiyar NV, Douglas SA (2004) Differential agonistic and antagonistic effects of the urotensin-II ligand SB-710411 at rodent and primate UT receptors. *European journal of pharmacology* **492**:113-116.
- Behm DJ, Herold CL, Ohlstein EH, Knight SD, Dhanak D, Douglas SA (2002) Pharmacological characterization of SB-710411 (Cpa-c[D-Cys-Pal-D-Trp-Lys-Val-Cys]-Cpa-amide), a novel peptidic urotensin-II receptor antagonist. *British journal of pharmacology* **137**:449-458.
- Behm DJ, McAtee JJ, Dodson JW, Neeb MJ, Fries HE, Evans CA, Hernandez RR, Hoffman KD, Harrison SM, Lai JM, Wu C, Aiyar NV, Ohlstein EH, Douglas SA (2008) Palosuran inhibits binding to primate UT receptors in cell membranes but demonstrates differential activity in intact cells and vascular tissues. *British journal of pharmacology* **155**:374-386.
- Behm DJ, Stankus G, Doe CP, Willette RN, Sarau HM, Foley JJ, Schmidt DB, Nuthulaganti P, Fornwald JA, Ames RS, Lambert DG, Calo G, Camarda V, Aiyar NV, Douglas SA (2006) The peptidic urotensin-II receptor ligand GSK248451 possesses less intrinsic activity than the low-efficacy partial agonists SB-710411 and urantide in native mammalian tissues and recombinant cell systems. *British journal of pharmacology* **148**:173-190.
- Bello L, Francolini M, Marthyn P, Zhang J, Carroll RS, Nikas DC, Strasser JF, Villani R, Cheresch DA, Black PM (2001) Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery. *Neurosurgery* **49**:380-389.
- Benvenuti S, Comoglio PM (2007) The MET receptor tyrosine kinase in invasion and metastasis. *Journal of cellular physiology* **213**:316-325.

- Berenguer-Daize C, Boudouresque F, Bastide C, Tounsi A, Benyahia Z, Acunzo J, Dussault N, Delfino C, Baeza N, Daniel L, Cayol M, Rossi D, El Battari A, Bertin D, Mabrouk K, Martin PM, Ouafik L (2013) Adrenomedullin blockade suppresses growth of human hormone-independent prostate tumor xenograft in mice. *Clinical cancer research* **19**:6138-6150.
- Berlin JD (2002) Targeting vascular endothelial growth factor in colorectal cancer. *Oncology* **16**:13-15.
- Bern HA, Lederis K (1969) A reference preparation for the study of active substances in the caudal neurosecretory system of teleosts. *The Journal of endocrinology* **45**:Suppl:xi-xii.
- Bethke L, Webb E, Murray A, Schoemaker M, Johansen C, Christensen HC, Muir K, McKinney P, Hepworth S, Dimitropoulou P, Lophatananon A, Feychting M, Lonn S, Ahlbom A, Malmer B, Henriksson R, Auvinen A, Kiuru A, Salminen T, Swerdlow A, Houlston R (2008) Comprehensive analysis of the role of DNA repair gene polymorphisms on risk of glioma. *Human molecular genetics* **17**:800-805.
- Bhat KP, Balasubramanian V, Vaillant B, Ezhilarasan R, Hummelink K, Hollingsworth F, Wani K, Heathcock L, James JD, Goodman LD, Conroy S, Long L, Lelic N, Wang S, Gumin J, Raj D, Kodama Y, Raghunathan A, Olar A, Joshi K, Pelloski CE, Heimberger A, Kim SH, Cahill DP, Rao G, Den Dunnen WF, Boddeke HW, Phillips HS, Nakano I, Lang FF, Colman H, Sulman EP, Aldape K (2013) Mesenchymal differentiation mediated by NF-kappaB promotes radiation resistance in glioblastoma. *Cancer cell* **24**:331-346.
- Bianca R, Mitidieri E, Fusco F, D'Aiuto E, Grieco P, Novellino E, Imbimbo C, Mirone V, Cirino G, Sorrentino R (2012) Endogenous urotensin II selectively modulates erectile function through eNOS. *PLoS one* **7**:e31019.
- Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Studer R, Mueller C, Binkert C, Nayler O (2003) The expression of urotensin II receptor (U2R) is up-regulated by interferon-gamma. *Journal of receptor and signal transduction research* **23**:289-305.
- Blasiak J, Petrovski G, Vereb Z, Facsko A, Kaarniranta K (2014) Oxidative stress, hypoxia, and autophagy in the neovascular processes of age-related macular degeneration. *BioMed research international* **2014**:768026.
- Blesa JM, Molla SB, Esparcia MF, Ortells JM, Godoy MP, Das AM, Magan BM, Pulla MP, Sanchez JL, Canales JB, Candel VA (2012) Durable complete remission of a brainstem glioma treated with a combination of bevacizumab and cetuximab. *Case reports in oncology* **5**:676-681.
- Bogler O, Huang HJ, Kleihues P, Cavenee WK (1995) The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* **15**:308-327.
- Bohm F, Pernow J (2002) Urotensin II evokes potent vasoconstriction in humans in vivo. *British journal of pharmacology* **135**:25-27.

- Boivin B, Chevalier D, Villeneuve LR, Rousseau E, Allen BG (2003) Functional endothelin receptors are present on nuclei in cardiac ventricular myocytes. *The Journal of biological chemistry* **278**:29153-29163.
- Boivin S, Guilhaudis L, Milazzo I, Oulyadi H, Davoust D, Fournier A (2006) Characterization of urotensin-II receptor structural domains involved in the recognition of U-II, URP, and urantide. *Biochemistry* **45**:5993-6002.
- Boivin S, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Oulyadi H, Fournier A, Davoust D (2008) Solution structure of urotensin-II receptor extracellular loop III and characterization of its interaction with urotensin-II. *Peptides* **29**:700-710.
- Bornhauser BC, Lindholm D (2005) MSAP enhances migration of C6 glioma cells through phosphorylation of the myosin regulatory light chain. *Cellular and molecular life sciences* **62**:1260-1266.
- Bottrill FE, Douglas SA, Hiley CR, White R (2000) Human urotensin-II is an endothelium-dependent vasodilator in rat small arteries. *British journal of pharmacology* **130**:1865-1870.
- Boucard AA, Sauve SS, Guillemette G, Escher E, Leduc R (2003) Photolabelling the rat urotensin II/GPR14 receptor identifies a ligand-binding site in the fourth transmembrane domain. *The Biochemical journal* **370**:829-838.
- Bousette N, Hu F, Ohlstein EH, Dhanak D, Douglas SA, Giaid A (2006) Urotensin-II blockade with SB-611812 attenuates cardiac dysfunction in a rat model of coronary artery ligation. *Journal of molecular and cellular cardiology* **41**:285-295.
- Bousette N, Patel L, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A (2004) Increased expression of urotensin II and its cognate receptor GPR14 in atherosclerotic lesions of the human aorta. *Atherosclerosis* **176**:117-123.
- Bousette N, Pottinger J, Ramli W, Ohlstein EH, Dhanak D, Douglas SA, Giaid A (2006) Urotensin-II receptor blockade with SB-611812 attenuates cardiac remodeling in experimental ischemic heart disease. *Peptides* **27**:2919-2926.
- Bracken CP, Whitelaw ML, Peet DJ (2003) The hypoxia-inducible factors: key transcriptional regulators of hypoxic responses. *Cellular and molecular life sciences* **60**:1376-1393.
- Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, Devi SN, Kaur B, Van Meir EG (2004) Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer research* **64**:920-927.
- Brem S, Cotran R, Folkman J (1972) Tumor angiogenesis: a quantitative method for histologic grading. *Journal of the National Cancer Institute* **48**:347-356.

- Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, Franklin WA (2002) The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasis, and prognosis. *Lung cancer* **36**:115-124.
- Brkovic A, Hattenberger A, Kostenis E, Klabunde T, Flohr S, Kurz M, Bourgault S, Fournier A (2003) Functional and binding characterizations of urotensin II-related peptides in human and rat urotensin II-receptor assay. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **306**:1200-1209.
- Broniscer A, Baker SD, Wetmore C, Pai Panandiker AS, Huang J, Davidoff AM, Onar-Thomas A, Panetta JC, Chin TK, Merchant TE, Baker JN, Kaste SC, Gajjar A, Stewart CF (2013) Phase I trial, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of vandetanib and dasatinib in children with newly diagnosed diffuse intrinsic pontine glioma. *Clinical cancer research* **19**:3050-3058.
- Brosicke N, van Landeghem FK, Scheffler B, Faissner A (2013) Tenascin-C is expressed by human glioma in vivo and shows a strong association with tumor blood vessels. *Cell and tissue research* **354**:409-430.
- Brown MC, Staniszewska I, Lazarovici P, Tuszynski GP, Del Valle L, Marcinkiewicz C (2008) Regulatory effect of nerve growth factor in alpha9beta1 integrin-dependent progression of glioblastoma. *Neuro-oncology* **10**:968-980.
- Brule C, Perzo N, Joubert JE, Sainsily X, Leduc R, Castel H, Prezeau L (2014) Biased signaling regulates the pleiotropic effects of the urotensin II receptor to modulate its cellular behaviors. *FASEB journal* **28**:5148-5162.
- Burim RV, Teixeira SA, Colli BO, Peria FM, Tirapelli LF, Marie SK, Malheiros SM, Oba-Shinjo SM, Gabbai AA, Lotufo PA, Carlotti-Junior CG (2009) ICAM-1 (Lys469Glu) and PECAM-1 (Leu125Val) polymorphisms in diffuse astrocytomas. *Clinical and experimental medicine* **9**:157-163.
- Butowski N, Chang SM, Lamborn KR, Polley MY, Pieper R, Costello JF, Vandenberg S, Parvataneni R, Nicole A, Sneed PK, Clarke J, Hsieh E, Costa BM, Reis RM, Hristova-Kazmierski M, Nicol SJ, Thornton DE, Prados MD (2011) Phase II and pharmacogenomics study of enzastaurin plus temozolomide during and following radiation therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme and gliosarcoma. *Neuro-oncology* **13**:1331-1338.

## C

- Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN (1998) Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *Journal of the National Cancer Institute* **90**:1473-1479.

- Calogero A, Pavoni E, Gramaglia T, D'Amati G, Ragona G, Brancaccio A, Petrucci TC (2006) Altered expression of alpha-dystroglycan subunit in human gliomas. *Cancer biology & therapy* **5**:441-448.
- Camarda V, Guerrini R, Kostenis E, Rizzi A, Calo G, Hattenberger A, Zucchini M, Salvadori S, Regoli D (2002) A new ligand for the urotensin II receptor. *British journal of pharmacology* **137**:311-314.
- Camarda V, Song W, Marzola E, Spagnol M, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D, Thompson JP, Rowbotham DJ, Behm DJ, Douglas SA, Calo G, Lambert DG (2004) Urantide mimics urotensin-II induced calcium release in cells expressing recombinant UT receptors. *European journal of pharmacology* **498**:83-86.
- Camarda V, Spagnol M, Song W, Vergura R, Roth AL, Thompson JP, Rowbotham DJ, Guerrini R, Marzola E, Salvadori S, Cavanni P, Regoli D, Douglas SA, Lambert DG, Calo G (2006) In vitro and in vivo pharmacological characterization of the novel UT receptor ligand [Pen<sup>5</sup>,DTrp<sup>7</sup>,Dab<sup>8</sup>]urotensin II(4-11) (UFP-803). *British journal of pharmacology* **147**:92-100.
- Carmeliet P (2005) Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature* **438**:932-936.
- Carotenuto A, Auriemma L, Merlino F, Yousif AM, Marasco D, Limatola A, Campiglia P, Gomez-Monterrey I, Santicioli P, Meini S, Maggi CA, Novellino E, Grieco P (2014) Lead optimization of P5U and urantide: discovery of novel potent ligands at the urotensin-II receptor. *Journal of medicinal chemistry* **57**:5965-5974.
- Carotenuto A, Grieco P, Campiglia P, Novellino E, Rovero P (2004) Unraveling the active conformation of urotensin II. *Journal of medicinal chemistry* **47**:1652-1661.
- Carpenter DO, Sage C (2008) Setting prudent public health policy for electromagnetic field exposures. *Reviews on environmental health* **23**:91-117.
- Carpentier AF, Ferrari D, Bailon O, Ursu R, Banissi C, Dubessy AL, Belin C, Levy C (2012) Steroid-sparing effects of angiotensin-II inhibitors in glioblastoma patients. *European journal of neurology* **19**:1337-1342.
- Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft MT, Fontaine M, Dubessy C, Lihmann I, Scalbert E, Malagon M, Vaudry H, Tonon MC, Gandolfo P (2006) Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *Journal of neurochemistry* **99**:582-595.
- Chao HH, Sung LC, Chen CH, Liu JC, Chen JJ, Cheng TH (2014) Lycopene inhibits urotensin-II-induced cardiomyocyte hypertrophy in neonatal rat cardiomyocytes. *Evidence-based complementary and alternative medicine* **2014**:724670.
- Chaponis D, Barnes JW, Dellagatta JL, Kesari S, Fast E, Sauvageot C, Panagrahy D, Greene ER, Ramakrishna N, Wen PY, Kung AL, Stiles C, Kieran MW (2011) Lonafarnib (SCH66336) improves the activity of temozolomide and radiation for orthotopic malignant gliomas. *Journal of neuro-oncology* **104**:179-189.

- Charles NA, Holland EC, Gilbertson R, Glass R, Kettenmann H (2011) The brain tumor microenvironment. *Glia* **59**:1169-1180.
- Chartrel N, Conlon JM, Collin F, Braun B, Waugh D, Vallarino M, Lahrichi SL, Rivier JE, Vaudry H (1996) Urotensin II in the central nervous system of the frog *Rana ridibunda*: immunohistochemical localization and biochemical characterization. *The Journal of comparative neurology* **364**:324-339.
- Chatenet D, Dubessy C, Leprince J, Boularan C, Carlier L, Segalas-Milazzo I, Guilhaudis L, Oulyadi H, Davoust D, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Tonon MC, Lihmann I, Pacaud P, Vaudry H (2004) Structure-activity relationships and structural conformation of a novel urotensin II-related peptide. *Peptides* **25**:1819-1830.
- Chatenet D, Folch B, Feytens D, Letourneau M, Tourwe D, Doucet N, Fournier A (2013) Development and pharmacological characterization of conformationally constrained urotensin II-related peptide agonists. *Journal of medicinal chemistry* **56**:9612-9622.
- Chatenet D, Nguyen TT, Letourneau M, Fournier A (2012) Update on the urotensinergic system: new trends in receptor localization, activation, and drug design. *Frontiers in endocrinology* **3**:174.
- Chauhan VP, Martin JD, Liu H, Lacorre DA, Jain SR, Kozin SV, Stylianopoulos T, Mousa AS, Han X, Adstamongkonkul P, Popovic Z, Huang P, Bawendi MG, Boucher Y, Jain RK (2013) Angiotensin inhibition enhances drug delivery and potentiates chemotherapy by decompressing tumour blood vessels. *Nature communications* **4**:2516.
- Chen C, Huang R, MacLean A, Muzikansky A, Mukundan S, Wen PY, Norden AD (2013) Recurrent high-grade glioma treated with bevacizumab: prognostic value of MGMT methylation, EGFR status and pretreatment MRI in determining response and survival. *Journal of neuro-oncology* **115**:267-276.
- Chen X, Fang J, Wang S, Liu H, Du X, Chen J, Li X, Yang Y, Zhang B, Zhang W (2014) A new mosaic pattern in glioma vascularization: exogenous endothelial progenitor cells integrating into the vessels containing tumor-derived endothelial cells. *Oncotarget* **5**:1955-1968.
- Chen Y, Zhao M, Liu X, Yao W, Yang J, Zhang Z, Tang C (2001) Urotensin II receptor in the rat airway smooth muscle and its effect on the rat airway smooth muscle cells proliferation. *Chinese medical sciences journal* **16**:231-235.
- Chen YL, Liu JC, Loh SH, Chen CH, Hong CY, Chen JJ, Cheng TH (2008) Involvement of reactive oxygen species in urotensin II-induced proliferation of cardiac fibroblasts. *European journal of pharmacology* **593**:24-29.
- Chen YL, Loh SH, Chen JJ, Tsai CS (2012) Urotensin II prevents cardiomyocyte apoptosis induced by doxorubicin via Akt and ERK. *European journal of pharmacology* **680**:88-94.



- Chen Z, Xu J, Ye Y, Li Y, Gong H, Zhang G, Wu J, Jia J, Liu M, Chen Y, Yang C, Tang Y, Zhu Y, Ge J, Zou Y (2014) Urotensin II inhibited the proliferation of cardiac side population cells in mice during pressure overload by JNK-LRP6 signalling. *Journal of cellular and molecular medicine* **18**:852-862.
- Chen ZW, Yang Q, Huang Y, Fan L, Li XW, He GW (2010) Human urotensin II in internal mammary and radial arteries of patients undergoing coronary surgery. *Vascular pharmacology* **52**:70-76.
- Cheng Y, Paz K (2008) Tandutinib, an oral, small-molecule inhibitor of FLT3 for the treatment of AML and other cancer indications. *The investigational drugs journal* **11**:46-56.
- Cheriyian J, Burton TJ, Bradley TJ, Wallace SM, Maki-Petaja KM, Mackenzie IS, McEniery CM, Brown J, Wilkinson IB (2009) The effects of urotensin II and urantide on forearm blood flow and systemic haemodynamics in humans. *British journal of clinical pharmacology* **68**:518-523.
- Cheung BM, Leung R, Man YB, Wong LY (2004) Plasma concentration of urotensin II is raised in hypertension. *Journal of hypertension* **22**:1341-1344.
- Chinnaiyan P, Won M, Wen PY, Rojiani AM, Wendland M, Dipetrillo TA, Corn BW, Mehta MP (2013) RTOG 0913: a phase 1 study of daily everolimus (RAD001) in combination with radiation therapy and temozolomide in patients with newly diagnosed glioblastoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **86**:880-884.
- Chinot O, Soulier P, Frenay M (2010) [Chemotherapy and targeted treatments in glioblastomas]. *Neuro-Chirurgie* **56**:491-498.
- Chiu CZ, Wang BW, Shyu KG (2014) Angiotensin II and the JNK pathway mediate urotensin II expression in response to hypoxia in rat cardiomyocytes. *The Journal of endocrinology* **220**:233-246.
- Cho H, Ackerstaff E, Carlin S, Lupu ME, Wang Y, Rizwan A, O'Donoghue J, Ling CC, Humm JL, Zanzonico PB, Koutcher JA (2009) Noninvasive multimodality imaging of the tumor microenvironment: registered dynamic magnetic resonance imaging and positron emission tomography studies of a preclinical tumor model of tumor hypoxia. *Neoplasia* **11**:247-259.
- Christensen JG, Vincent PW, Klohs WD, Fry DW, Leopold WR, Elliott WL (2005) Plasma vascular endothelial growth factor and interleukin-8 as biomarkers of antitumor efficacy of a prototypical erbB family tyrosine kinase inhibitor. *Molecular cancer therapeutics* **4**:938-947.
- Ciriello G, Cerami E, Sander C, Schultz N (2012) Mutual exclusivity analysis identifies oncogenic network modules. *Genome research* **22**:398-406.

- Cirillo P, De Rosa S, Pacileo M, Gargiulo A, Angri V, Fiorentino I, Prevete N, Petrillo G, De Palma R, Leonardi A, De Paulis A, Chiariello M (2008) Human urotensin II induces tissue factor and cellular adhesion molecules expression in human coronary endothelial cells: an emerging role for urotensin II in cardiovascular disease. *Journal of thrombosis and haemostasis* **6**:726-736.
- Clark SD, Nothacker HP, Wang Z, Saito Y, Leslie FM, Civelli O (2001) The urotensin II receptor is expressed in the cholinergic mesopontine tegmentum of the rat. *Brain research* **923**:120-127.
- Clozel M, Binkert C, Birker-Robaczewska M, Boukhadra C, Ding SS, Fischli W, Hess P, Mathys B, Morrison K, Muller C, Muller C, Nayler O, Qiu C, Rey M, Scherz MW, Velker J, Weller T, Xi JF, Ziltener P (2004) Pharmacology of the urotensin-II receptor antagonist palosuran (ACT-058362; 1-[2-(4-benzyl-4-hydroxy-piperidin-1-yl)-ethyl]-3-(2-methyl-quinolin-4-yl)-urea sulfate salt): first demonstration of a pathophysiological role of the urotensin System. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **311**:204-212.
- Clozel M, Hess P, Qiu C, Ding SS, Rey M (2006) The urotensin-II receptor antagonist palosuran improves pancreatic and renal function in diabetic rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **316**:1115-1121.
- Cohen MH, Shen YL, Keegan P, Pazdur R (2009) FDA drug approval summary: bevacizumab (Avastin) as treatment of recurrent glioblastoma multiforme. *The oncologist* **14**:1131-1138.
- Combs SE, Schulz-Ertner D, Roth W, Herold-Mende C, Debus J, Weber KJ (2007) In vitro responsiveness of glioma cell lines to multimodality treatment with radiotherapy, temozolomide, and epidermal growth factor receptor inhibition with cetuximab. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **68**:873-882.
- Conlon JM, O'Harte F, Smith DD, Tonon MC, Vaudry H (1992) Isolation and primary structure of urotensin II from the brain of a tetrapod, the frog *Rana ridibunda*. *Biochemical and biophysical research communications* **188**:578-583.
- Coulouarn Y, Jegou S, Tostivint H, Vaudry H, Lihmann I (1999) Cloning, sequence analysis and tissue distribution of the mouse and rat urotensin II precursors. *FEBS letters* **457**:28-32.
- Cooke VG, LeBleu VS, Keskin D, Khan Z, O'Connell JT, Teng Y, Duncan MB, Xie L, Maeda G, Vong S, Sugimoto H, Rocha RM, Damascena A, Brentani RR, Kalluri R (2012) Pericyte depletion results in hypoxia-associated epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis mediated by met signaling pathway. *Cancer cell* **21**:66-81.
- Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, Conlon JM, Bern HA, Vaudry H (1998) Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:15803-15808.

Cowley E, Thompson JP, Sharpe P, Waugh J, Ali N, Lambert DG (2005) Effects of pre-eclampsia on maternal plasma, cerebrospinal fluid, and umbilical cord urotensin II concentrations: a pilot study. *British journal of anaesthesia* **95**:495-499.

## D

Dai HY, Guo XG, Ge ZM, Li ZH, Yu XJ, Tang MX, Zhang Y (2008) Elevated expression of urotensin II and its receptor in diabetic cardiomyopathy. *Journal of diabetes and its complications* **22**:137-143.

Dai HY, He T, Li XL, Xu WL, Ge ZM (2011) Urotensin-2 promotes collagen synthesis via ERK1/2-dependent and ERK1/2-independent TGF-beta1 in neonatal cardiac fibroblasts. *Cell biology international* **35**:93-98.

Dai HY, Kang WQ, Wang X, Yu XJ, Li ZH, Tang MX, Xu DL, Li CW, Zhang Y, Ge ZM (2007) The involvement of transforming growth factor-beta1 secretion in urotensin II-induced collagen synthesis in neonatal cardiac fibroblasts. *Regulatory peptides* **140**:88-93.

D'Amico AG, Scuderi S, Saccone S, Castorina A, Drago F, D'Agata V (2013) Antiproliferative effects of PACAP and VIP in serum-starved glioma cells. *Journal of molecular neuroscience* **51**:503-513.

de Bouard S, Herlin P, Christensen JG, Lemoisson E, Gauduchon P, Raymond E, Guillamo JS (2007) Antiangiogenic and anti-invasive effects of sunitinib on experimental human glioblastoma. *Neuro-oncology* **9**:412-423.

de Groot JF, Lamborn KR, Chang SM, Gilbert MR, Cloughesy TF, Aldape K, Yao J, Jackson EF, Lieberman F, Robins HI, Mehta MP, Lassman AB, Deangelis LM, Yung WK, Chen A, Prados MD, Wen PY (2011) Phase II study of aflibercept in recurrent malignant glioma: a North American Brain Tumor Consortium study. *Journal of clinical oncology* **29**:2689-2695.

de Lecea L, Bourgin P (2008) Neuropeptide interactions and REM sleep: a role for Urotensin II? *Peptides* **29**:845-851.

de Oliveira MS, Cechim G, Braganhol E, Santos DG, Meurer L, de Castro CG Jr, Brunetto AL, Schwartsmann G, Battastini AM, Lenz G, Roesler R (2009) Anti-proliferative effect of the gastrin-release peptide receptor antagonist RC-3095 plus temozolomide in experimental glioblastoma models. *Journal of neuro-oncology* **93**:191-201.

Debiec R, Christofidou P, Denniff M, Bloomer LD, Bogdanski P, Wojnar L, Musialik K, Charchar FJ, Thompson JR, Waterworth D, Song K, Vollenweider P, Waeber G, Zukowska-Szczechowska E, Samani NJ, Lambert D, Tomaszewski M (2013) Urotensin-II system in genetic control of blood pressure and renal function. *PloS one* **8**:e83137.

- Decaestecker C, Camby I, Gordower L, Dewitte O, Cras P, Martin JJ, Pasteels JL, Van Ham P, Brotschi J, Kiss R, Salmon I (1998) Characterization of astroglial versus oligodendroglial phenotypes in glioblastomas by means of quantitative morphonuclear variables generated by computer-assisted microscopy. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **57**:791-802.
- Del Vecchio CA, Li G, Wong AJ (2012) Targeting EGF receptor variant III: tumor-specific peptide vaccination for malignant gliomas. *Expert review of vaccines* **11**:133-144.
- Demir T, Turkbeyler I, Kaplan DS, Pehlivan Y, Orkmez M, Tutar E, Taysi S, Kisacik B, Onat AM, Bagci C (2013) Effectiveness of palosuran in bleomycin-induced experimental scleroderma. *Inflammation* **36**:75-79.
- d'Emmanuele di Villa Bianca R, Cirino G, Mitidieri E, Coletta C, Grassia G, Roviezzo F, Grieco P, Novellino E, Imbimbo C, Mirone V, Sorrentino R (2010) Urotensin II: a novel target in human corpus cavernosum. *The journal of sexual medicine* **7**:1778-1786.
- Demuth T, Berens ME (2004) Molecular mechanisms of glioma cell migration and invasion. *Journal of neuro-oncology* **70**:217-228.
- Denny BJ, Wheelhouse RT, Stevens MF, Tsang LL, Slack JA (1994) NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* **33**:9045-9051.
- Dermietzel R, Spray DC (1993) Gap junctions in the brain: where, what type, how many and why? *Trends in neurosciences* **16**:186-192.
- Desjardins A, Reardon DA, Peters KB, Threatt S, Coan AD, Herndon JE 2nd, Friedman AH, Friedman HS, Vredenburgh JJ (2011) A phase I trial of the farnesyl transferase inhibitor, SCH 66336, with temozolomide for patients with malignant glioma. *Journal of neuro-oncology* **105**:601-606.
- Desrues L, Lefebvre T, Diallo M, Gandolfo P, Leprince J, Chatenet D, Vaudry H, Tonon MC, Castel H (2008) Effect of GABA A receptor activation on UT-coupled signaling pathways in rat cortical astrocytes. *Peptides* **29**:727-734.
- Desrues L, Lefebvre T, Lecointre C, Schouft MT, Leprince J, Compere V, Morin F, Proust F, Gandolfo P, Tonon MC, Castel H (2012) Down-regulation of GABA(A) receptor via promiscuity with the vasoactive peptide urotensin II receptor. Potential involvement in astrocyte plasticity. *PLoS one* **7**:e36319.
- Deuchar GA, Morecroft I, Dempsie Y, Herold N, Nilsen M, Hicks MN, MacLean MR (2006) The in vivo effects of human urotensin II in the rabbit and rat pulmonary circulation: effects of experimental pulmonary hypertension. *European journal of pharmacology* **537**:135-142.

- Diallo M, Jarry M, Desrues L, Castel H, Chatenet D, Leprince J, Vaudry H, Tonon MC, Gandolfo P (2008) [Orn5]URP acts as a pure antagonist of urotensinergic receptors in rat cortical astrocytes. *Peptides* **29**:813-819.
- Diaz-Miqueli A, Martinez GS (2013) Nimotuzumab as a radiosensitizing agent in the treatment of high grade glioma: challenges and opportunities. *OncoTargets and therapy* **6**:931-942.
- DI Cristofori, Carrabba G, Lanfranchi G, Menghetti C, Rampini P, Caroli M (2013) Continuous tamoxifen and dose-dense temozolomide in recurrent glioblastoma. *Anticancer research* **33**:3383-3389.
- Diebold I, Petry A, Burger M, Hess J, Grolach A (2011) NOX4 mediates activation of FoxO3a and matrix metalloproteinase-2 expression by urotensin-II. *Molecular biology of the cell* **22**:4424-4434.
- Diebold I, Petry A, Sabrane K, Djordjevic T, Hess J, Grolach A (2012) The HIF1 target gene NOX2 promotes angiogenesis through urotensin-II. *Journal of cell science* **125**:956-964.
- Djordjevic T, BelAiba RS, Bonello S, Pfeilschifter J, Hess J, Grolach A (2005) Human urotensin II is a novel activator of NADPH oxidase in human pulmonary artery smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **25**:519-525.
- Doan ND, Nguyen TT, Letourneau M, Turcotte K, Fournier A, Chatenet D (2012) Biochemical and pharmacological characterization of nuclear urotensin-II binding sites in rat heart. *British journal of pharmacology* **166**:243-257.
- Doherty L, Gigas DC, Kesari S, Drappatz J, Kim R, Zimmerman J, Ostrowsky L, Wen PY (2006) Pilot study of the combination of EGFR and mTOR inhibitors in recurrent malignant gliomas. *Neurology* **67**:156-158.
- Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C (2012) CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2005-2009. *Neuro-oncology* 14 Suppl **5**:v1-49.
- Do-Rego JC, Chatenet D, Orta MH, Naudin B, Le Cudennec C, Leprince J, Scalbert E, Vaudry H, Costentin J (2005) Behavioral effects of urotensin-II centrally administered in mice. *Psychopharmacology* **183**:103-117.
- Douglas SA, Ashton DJ, Sauermelch CF, Coatney RW, Ohlstein DH, Ruffolo MR, Ohlstein EH, Aiyar NV, Willette RN (2000) Human urotensin-II is a potent vasoactive peptide: pharmacological characterization in the rat, mouse, dog and primate. *Journal of cardiovascular pharmacology* **36**:S163-166.

- Douglas SA, Behm DJ, Aiyar NV, Naselsky D, Disa J, Brooks DP, Ohlstein EH, Gleason JG, Sarau HM, Foley JJ, Buckley PT, Schmidt DB, Wixted WE, Widdowson K, Riley G, Jin J, Gallagher TF, Schmidt SJ, Ridgers L, Christmann LT, Keenan RM, Knight SD, Dhanak D (2005) Nonpeptidic urotensin-II receptor antagonists I: *in vitro* pharmacological characterization of SB-706375. *British journal of pharmacology* **145**:620-635.
- Douglas SA, Dhanak D, Johns DG (2004) From 'gills to pills': urotensin-II as a regulator of mammalian cardiorenal function. *Trends in pharmacological sciences* **25**:76-85.
- Douglas SA, Naselsky D, Ao Z, Disa J, Herold CL, Lynch F, Aiyar NV (2004) Identification and pharmacological characterization of native, functional human urotensin-II receptors in rhabdomyosarcoma cell lines. *British journal of pharmacology* **142**:921-932.
- Douglas SA, Ohlstein EH (2000) Human urotensin-II, the most potent mammalian vasoconstrictor identified to date, as a therapeutic target for the management of cardiovascular disease. *Trends in cardiovascular medicine* **10**:229-237.
- Douglas SA, Tayara L, Ohlstein EH, Halawa N, Giaid A (2002) Congestive heart failure and expression of myocardial urotensin II. *Lancet* **359**:1990-1997.
- Dschietzig T, Bartsch C, Pregla R, Zurbrugg HR, Armbruster FP, Richter C, Laule M, Romeyke E, Neubert C, Voelter W, Baumann G, Stangl K (2002) Plasma levels and cardiovascular gene expression of urotensin-II in human heart failure. *Regulatory peptides* **110**:33-38.
- Dubessy C, Cartier D, Lectez B, Bucharles C, Chartrel N, Montero-Hadjadje M, Bizet P, Chatenet D, Tostivint H, Scalbert E, Leprince J, Vaudry H, Jegou S, Lihrmann I (2008) Characterization of urotensin II, distribution of urotensin II, urotensin II-related peptide and UT receptor mRNAs in mouse: evidence of urotensin II at the neuromuscular junction. *Journal of neurochemistry* **107**:361-374.
- Duenisch P, Reichart R, Mueller U, Brodhun M, Bjerkvig R, Romeike B, Walter J, Herbold C, Regenbrecht CR, Kalff R, Kuhn SA (2011) Neural cell adhesion molecule isoform 140 declines with rise of WHO grade in human gliomas and serves as indicator for the invasion zone of multiform glioblastomas and brain metastases. *Journal of cancer research and clinical oncology* **137**:399-414.
- Dufes C, Alleaume C, Montoni A, Olivier JC, Muller JM (2003) Effects of the vasoactive intestinal peptide (VIP) and related peptides on glioblastoma cell growth in vitro. *Journal of molecular neuroscience* **21**:91-102.
- Dun SL, Brailoiu GC, Yang J, Chang JK, Dun NJ (2001) Urotensin II-immunoreactivity in the brainstem and spinal cord of the rat. *Neuroscience letters* **305**:9-12.

## E

- Egeblad M, Rasch MG, Weaver VM (2010) Dynamic interplay between the collagen scaffold and tumor evolution. *Current opinion in cell biology* **22**:697-706.
- Egginger JG, Camus A, Calas A (2006) Urotensin-II expression in the mouse spinal cord. *Journal of chemical neuroanatomy* **31**:146-154.
- Egginger JG, Parmentier C, Garrel G, Cohen-Tannoudji J, Camus A, Calas A, Hardin-Pouzet H, Grange-Messent V (2011) Direct evidence for the co-expression of URP and GnRH in a sub-population of rat hypothalamic neurones: anatomical and functional correlation. *PloS one* **6**:e26611.
- Eller JL, Longo SL, Hicklin DJ, Canute GW (2002) Activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme. *Neurosurgery* **51**:1005-1013.
- Elshourbagy NA, Douglas SA, Shabon U, Harrison S, Duddy G, Sechler JL, Ao Z, Maleeff BE, Naselsky D, Disa J, Aiyar NV (2002) Molecular and pharmacological characterization of genes encoding urotensin-II peptides and their cognate G-protein-coupled receptors from the mouse and monkey. *British journal of pharmacology* **136**:9-22.
- Esposito G, Perrino C, Cannavo A, Schiattarella GG, Borgia F, Sannino A, Pironti G, Gargiulo G, Di Serafino L, Franzone A, Scudiero L, Grieco P, Indolfi C, Chiariello M (2011) EGFR trans-activation by urotensin II receptor is mediated by beta-arrestin recruitment and confers cardioprotection in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Basic research in cardiology* **106**:577-589.
- Esteve PO, Tremblay P, Houde M, St-Pierre Y, Mandeville R (1998) In vitro expression of MMP-2 and MMP-9 in glioma cells following exposure to inflammatory mediators. *Biochimica et biophysica acta* **1403**:85-96.

## F

- Fan HX, Li HX, Chen D, Gao ZX, Zheng JH (2012) Changes in the expression of MMP-2, MMP-9, and ColIV in stromal cells in oral squamous tongue cell carcinoma: relationships and prognostic implications. *Journal of experimental & clinical cancer research* **31**:90.
- Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhozhiy S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C (2010) Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* **116**:829-840.

- Faria MH, Neves Filho EH, Alves MK, Burbano RM, de Moraes Filho MO, Rabenhorst SH (2012) TP53 mutations in astrocytic gliomas: an association with histological grade, TP53 codon 72 polymorphism and p53 expression. *Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **120**:882-889.
- Farias CB, Lima RC, Lima LO, Flores DG, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Roesler R (2008) Stimulation of proliferation of U138-MG glioblastoma cells by gastrin-releasing peptide in combination with agents that enhance cAMP signaling. *Oncology* **75**:27-31.
- Favier J, Corvol P (2001) [Physiological angiogenesis]. *Thérapie* **56**:455-463.
- Federico A, Zappavigna S, Romano M, Grieco P, Luce A, Marra M, Gravina AG, Stiuso P, D'Armiento FP, Vitale G, Tuccillo C, Novellino E, Loguercio C, Caraglia M (2014) Urotensin-II receptor is over-expressed in colon cancer cell lines and in colon carcinoma in humans. *European journal of clinical investigation* **44**:285-294.
- Feletou M (2011) In: The Endothelium: Part 1: Multiple Functions of the Endothelial Cells-Focus on Endothelium-Derived Vasoactive Mediators San Rafael (CA).
- Field KM, Jordan JT, Wen PY, Rosenthal MA, Reardon DA (2014) Bevacizumab and glioblastoma: Scientific review, newly reported updates, and ongoing controversies. *Cancer*.
- Figg WD, Kruger EA, Price DK, Kim S, Dahut WD (2002) Inhibition of angiogenesis: treatment options for patients with metastatic prostate cancer. *Investigational new drugs* **20**:183-194.
- Fisher JL, Schwartzbaum JA, Wrensch M, Wiemels JL (2007) Epidemiology of brain tumors. *Neurologic clinics* **25**:867-890, vii.
- Fleck BW (2013) Management of retinopathy of prematurity. *Archives of disease in childhood fetal and neonatal edition* **98**:F454-456.
- Flohr S, Kurz M, Kostenis E, Brkovich A, Fournier A, Klabunde T (2002) Identification of nonpeptidic urotensin II receptor antagonists by virtual screening based on a pharmacophore model derived from structure-activity relationships and nuclear magnetic resonance studies on urotensin II. *Journal of medicinal chemistry* **45**:1799-1805.
- Flores DG, de Farias CB, Leites J, de Oliveira MS, Lima RC, Tamajusuku AS, Di Leone LP, Meurer L, Brunetto AL, Schwartzmann G, Lenz G, Roesler R (2008) Gastrin-releasing peptide receptors regulate proliferation of C6 Glioma cells through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent mechanism. *Current neurovascular research* **5**:99-105.
- Foister S, Taylor LL, Feng JJ, Chen WL, Lin A, Cheng FC, Smith AB 3rd, Hirschmann R (2006) Design and synthesis of potent cystine-free cyclic hexapeptide agonists at the human urotensin receptor. *Organic letters* **8**:1799-1802.



- Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *The New England journal of medicine* **285**:1182-1186.
- Fontes-Sousa AP, Bras-Silva C, Pires AL, Monteiro-Sousa D, Leite-Moreira AF (2007) Urotensin II acutely increases myocardial length and distensibility: potential implications for diastolic function and ventricular remodeling. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **376**:107-115.
- Francescone R, Scully S, Bentley B, Yan W, Taylor SL, Oh D, Moral L, Shao R (2012) Glioblastoma-derived tumor cells induce vasculogenic mimicry through Flk-1 protein activation. *The Journal of biological chemistry* **287**:24821-24831.
- Franco R, Zappavigna S, Gigantino V, Luce A, Cantile M, Cerrone M, Facchini G, Perdona S, Pignata S, Di Lorenzo G, Chieffi S, Vitale G, De Sio M, Sgambato A, Botti G, Yousif AM, Novellino E, Grieco P, Caraglia M (2014) Urotensin II receptor determines prognosis of bladder cancer regulating cell motility/invasion. *Journal of experimental & clinical cancer research* **33**:48.
- Friedman HS, McLendon RE, Kerby T, Dugan M, Bigner SH, Henry AJ, Ashley DM, Krischer J, Lovell S, Rasheed K, Marchev F, Seman AJ, Cokgor I, Rich J, Stewart E, Colvin OM, Provenzale JM, Bigner DD, Haglund MM, Friedman AH, Modrich PL (1998) DNA mismatch repair and O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *Journal of clinical oncology* **16**:3851-3857.
- Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK (2007) Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development* **21**:2683-2710.

## G

- Gabelloni P, Da Pozzo E, Bendinelli S, Costa B, Nuti E, Casalini F, Orlandini E, Da Settimo F, Rossello A, Martini C (2010) Inhibition of metalloproteinases derived from tumours: new insights in the treatment of human glioblastoma. *Neuroscience* **168**:514-522.
- Gaengel K, Niaudet C, Hagikura K, Lavina B, Muhl L, Hofmann JJ, Ebarasi L, Nystrom S, Rymo S, Chen LL, Pang MF, Jin Y, Raschperger E, Roswall P, Schulte D, Benedito R, Larsson J, Hellstrom M, Fuxe J, Uhlen P, Adams R, Jakobsson L, Majumdar A, Vestweber D, Uv A, Betsholtz C (2012) The sphingosine-1-phosphate receptor S1PR1 restricts sprouting angiogenesis by regulating the interplay between VE-cadherin and VEGFR2. *Developmental cell* **23**:587-599.
- Gao S, Oh YB, Park BM, Park WH, Kim SH (2012) Urotensin II protects ischemic reperfusion injury of hearts through ROS and antioxidant pathway. *Peptides* **36**:199-205.

- Gao S, Oh YB, Shah A, Park WH, Chung MJ, Lee YH, Kim SH (2010) Urotensin II receptor antagonist attenuates monocrotaline-induced cardiac hypertrophy in rats. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **299**:H1782-1789.
- Gardiner SM, March JE, Kemp PA, Davenport AP, Bennett T (2001) Depressor and regionally-selective vasodilator effects of human and rat urotensin II in conscious rats. *British journal of pharmacology* **132**:1625-1629.
- Gartlon J, Parker F, Harrison DC, Douglas SA, Ashmeade TE, Riley GJ, Hughes ZA, Taylor SG, Munton RP, Hagan JJ, Hunter JA, Jones DN (2001) Central effects of urotensin-II following ICV administration in rats. *Psychopharmacology* **155**:426-433.
- Gendron G, Simard B, Gobeil F Jr, Sirois P, D'Orleans-Juste P, Regoli D (2004) Human urotensin-II enhances plasma extravasation in specific vascular districts in Wistar rats. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **82**:16-21.
- Georger B, Kieran MW, Grupp S, Perek D, Clancy J, Krygowski M, Ananthakrishnan R, Boni JP, Berkenblit A, Spunt SL (2012) Phase II trial of temsirolimus in children with high-grade glioma, neuroblastoma and rhabdomyosarcoma. *European journal of cancer* **48**:253-262.
- Gerstner ER, Eichler AF, Plotkin SR, Drappatz J, Doyle CL, Xu L, Duda DG, Wen PY, Jain RK, Batchelor TT (2011) Phase I trial with biomarker studies of vatalanib (PTK787) in patients with newly diagnosed glioblastoma treated with enzyme inducing anti-epileptic drugs and standard radiation and temozolomide. *Journal of neuro-oncology* **103**:325-332.
- Gibson A (1987) Complex effects of Gillichthys urotensin II on rat aortic strips. *British journal of pharmacology* **91**:205-212.
- Gibson A, Conyers S, Bern HA (1988) The influence of urotensin II on calcium flux in rat aorta. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **40**:893-895.
- Gilbert MR, Lang FF (2007) Management of patients with low-grade gliomas. *Neurologic clinics* **25**:1073-1088, ix.
- Gingras MC, Roussel E, Bruner JM, Branch CD, Moser RP (1995) Comparison of cell adhesion molecule expression between glioblastoma multiforme and autologous normal brain tissue. *Journal of neuroimmunology* **57**:143-153.
- Giuliani L, Lenzini L, Antonello M, Aldighieri E, Belloni AS, Fassina A, Gomez-Sanchez C, Rossi GP (2009) Expression and functional role of urotensin-II and its receptor in the adrenal cortex and medulla: novel insights for the pathophysiology of primary aldosteronism. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **94**:684-690.
- Goel S, Duda DG, Xu L, Munn LL, Boucher Y, Fukumura D, Jain RK (2011) Normalization of the vasculature for treatment of cancer and other diseases. *Physiological reviews* **91**:1071-1121.

- Gong H, Wang YX, Zhu YZ, Wang WW, Wang MJ, Yao T, Zhu YC (2004) Cellular distribution of GPR14 and the positive inotropic role of urotensin II in the myocardium in adult rat. *Journal of applied physiology* **97**:2228-2235.
- Gong YS, Fan XF, Wu XM, Gao YQ, Hu LG, Huang H, Jia SS (2005) [Dynamic changes of urotensin II receptor in pulmonary artery and arterioles of rats chronically exposed to hypoxia-hypercapnia]. *Chinese journal of applied physiology* **21**:377-381.
- Gonzalez GC, Martinez-Padron M, Lederis K, Lukowiak K (1992) Distribution and coexistence of urotensin I and urotensin II peptides in the cerebral ganglia of *Aplysia californica*. *Peptides* **13**:695-703.
- Gonzalez J, Valls N, Brito R, Rodrigo R (2014) Essential hypertension and oxidative stress: New insights. *World journal of cardiology* **6**:353-366.
- Goodenough DA, Goliger JA, Paul DL (1996) Connexins, connexons, and intercellular communication. *Annual review of biochemistry* **65**:475-502.
- Gould PS, Gu M, Liao J, Ahmad S, Cudmore MJ, Ahmed A, Vatish M (2010) Upregulation of urotensin II receptor in preeclampsia causes in vitro placental release of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in hypoxia. *Hypertension* **56**:172-178.
- Grau EG, Nishioka RS, Bern HA (1982) Effects of somatostatin and urotensin II on tilapia pituitary prolactin release and interactions between somatostatin, osmotic pressure  $Ca^{++}$ , and adenosine 3',5'-monophosphate in prolactin release in vitro. *Endocrinology* **110**:910-915.
- Grieco P, Carotenuto A, Campiglia P, Zampelli E, Patacchini R, Maggi CA, Novellino E, Rovero P (2002) A new, potent urotensin II receptor peptide agonist containing a Pen residue at the disulfide bridge. *Journal of medicinal chemistry* **45**:4391-4394.
- Grieco P, Franco R, Bozzuto G, Toccaceli L, Sgambato A, Marra M, Zappavigna S, Migaldi M, Rossi G, Striano S, Marra L, Gallo L, Cittadini A, Botti G, Novellino E, Molinari A, Budillon A, Caraglia M (2011) Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *Journal of cellular biochemistry* **112**:341-353.
- Gritsenko PG, Ilina O, Friedl P (2012) Interstitial guidance of cancer invasion. *The Journal of pathology* **226**:185-199.
- Groblewska M, Siewko M, Mroczko B, Szmitkowski M (2012) The role of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in the development of esophageal cancer. *Folia histochemica et cytobiologica* **50**:12-19.
- Groves MD, Puduvalli VK, Conrad CA, Gilbert MR, Yung WK, Jaeckle K, Liu V, Hess KR, Aldape KD, Levin VA (2006) Phase II trial of temozolomide plus marimastat for recurrent anaplastic gliomas: a relationship among efficacy, joint toxicity and anticonvulsant status. *Journal of neuro-oncology* **80**:83-90.

- Gruson D, Ginion A, Decroly N, Lause P, Vanoverschelde JL, Ketelslegers JM, Bertrand L, Thissen JP (2010) Urotensin II induction of adult cardiomyocytes hypertrophy involves the Akt/GSK-3beta signaling pathway. *Peptides* **31**:1326-1333.
- Gruson D, Rousseau MF, Ahn SA, van Linden F, Ketelslegers JM (2006) Circulating urotensin II levels in moderate to severe congestive heart failure: its relations with myocardial function and well established neurohormonal markers. *Peptides* **27**:1527-1531.
- Gu Y, Wang H, Qin Y, Zhang Y, Zhao W, Qi L, Zhang Y, Wang C, Guo Z (2013) Network analysis of genomic alteration profiles reveals co-altered functional modules and driver genes for glioblastoma. *Molecular bioSystems* **9**:467-477.
- Gubala V, Lynam CC, Nooney R, Hearty S, McDonnell B, Heydon K, O'Kennedy R, MacCraith BD, Williams DE (2011) Kinetics of immunoassays with particles as labels: effect of antibody coupling using dendrimers as linkers. *The Analyst* **136**:2533-2541.
- Guerrini R, Camarda V, Marzola E, Arduin M, Calo G, Spagnol M, Rizzi A, Salvadori S, Regoli D (2005) Structure-activity relationship study on human urotensin II. *Journal of peptide science* **11**:85-90.
- Guidolin D, Albertin G, Oselladore B, Sorato E, Rebuffat P, Mascarin A, Ribatti D (2010) The pro-angiogenic activity of urotensin-II on human vascular endothelial cells involves ERK1/2 and PI3K signaling pathways. *Regulatory peptides* **162**:26-32.
- Guillamo JS (2011) [Anti-angiogenic strategies in glioblastoma]. *Revue neurologique* **167**:662-667.

## H

- Hagemann C, Anacker J, Ernestus RI, Vince GH (2012) A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World journal of clinical oncology* **3**:67-79.
- Hara A, Saegusa M, Mikami T, Okayasu I (2001) Loss of DCC expression in astrocytomas: relation to p53 abnormalities, cell kinetics, and survival. *Journal of clinical pathology* **54**:860-865.
- Hardell L, Carlberg M, Soderqvist F, Mild KH, Morgan LL (2007) Long-term use of cellular phones and brain tumours: increased risk associated with use for > or =10 years. *Occupational and environmental medicine* **64**:626-632.
- Hassan GS, Chouiali F, Saito T, Hu F, Douglas SA, Ao Z, Willette RN, Ohlstein EH, Giaid A (2003) Effect of human urotensin-II infusion on hemodynamics and cardiac function. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **81**:125-128.

- Hassan GS, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A (2005) Expression of urotensin-II in human coronary atherosclerosis. *Peptides* **26**:2464-2472.
- He J, Mokhtari K, Sanson M, Marie Y, Kujas M, Huguet S, Leuraud P, Capelle L, Delattre JY, Poirier J, Hoang-Xuan K (2001) Glioblastomas with an oligodendroglial component: a pathological and molecular study. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **60**:863-871.
- Heimberger AB, Kong LY, Abou-Ghazal M, Reina-Ortiz C, Yang DS, Wei J, Qiao W, Schmittling RJ, Archer GE, Sampson JH, Hiraoka N, Priebe W, Fuller GN, Sawaya R (2009) The role of tregs in human glioma patients and their inhibition with a novel STAT-3 inhibitor. *Clinical neurosurgery* **56**:98-106.
- Heller J, Schepke M, Neef M, Woitas R, Rabe C, Sauerbruch T (2002) Increased urotensin II plasma levels in patients with cirrhosis and portal hypertension. *Journal of hepatology* **37**:767-772.
- Helmlinger G, Yuan F, Dellian M, Jain RK (1997) Interstitial pH and pO<sub>2</sub> gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nature medicine* **3**:177-182.
- Herbert SP, Cheung JY, Stainier DY (2012) Determination of endothelial stalk versus tip cell potential during angiogenesis by H2.0-like homeobox-1. *Current biology* **22**:1789-1794.
- Heringlake M, Kox T, Uzun O, Will B, Bahlmann L, Klaus S, Eleftheriadis S, Armbruster FP, Franz N, Kraatz E (2004) The relationship between urotensin II plasma immunoreactivity and left ventricular filling pressures in coronary artery disease. *Regulatory peptides* **121**:129-136.
- Hesselink JR, Barkovich MJ, Seibert TM, Farid N, Muller KA, Murphy KT, Kesari S (2014) Bevacizumab: radiation combination produces restricted diffusion on brain MRI. *CNS oncology* **3**:329-335.
- Hikosaka T, Tsuruda T, Nagata S, Kuwasako K, Tsuchiya K, Hoshiko S, Inatsu H, Chijiwa K, Kitamura K (2011) Adrenomedullin production is increased in colorectal adenocarcinomas; its relation to matrix metalloproteinase-9. *Peptides* **32**:1825-1831.
- Hilton DA, Penney M, Pobereskin L, Sanders H, Love S (2004) Histological indicators of prognosis in glioblastomas: retinoblastoma protein expression and oligodendroglial differentiation indicate improved survival. *Histopathology* **44**:555-560.
- Hirose T, Takahashi K, Mori N, Nakayama T, Kikuya M, Ohkubo T, Kohzuki M, Totsune K, Imai Y (2009) Increased expression of urotensin II, urotensin II-related peptide and urotensin II receptor mRNAs in the cardiovascular organs of hypertensive rats: comparison with endothelin-1. *Peptides* **30**:1124-1129.

- Hirose Y, Berger MS, Pieper RO (2001) p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer research* **61**:1957-1963.
- Hoang-Xuan K, Idbaih A, Mokhtari K, Sanson M (2005) [Towards a molecular classification of gliomas]. *Bulletin du cancer* **92**:310-316.
- Holash J, Maisonpierre PC, Compton D, Boland P, Alexander CR, Zagzag D, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (1999) Vessel cooption, regression, and growth in tumors mediated by angiopoietins and VEGF. *Science* **284**:1994-1998.
- Holleran BJ, Domazet I, Beaulieu ME, Yan LP, Guillemette G, Lavigne P, Escher E, Leduc R (2009) Identification of transmembrane domain 6 & 7 residues that contribute to the binding pocket of the urotensin II receptor. *Biochemical pharmacology* **77**:1374-1382.
- Hopkins BD, Fine B, Steinbach N, Dendy M, Rapp Z, Shaw J, Pappas K, Yu JS, Hodakoski C, Mense S, Klein J, Pegno S, Sulis ML, Goldstein H, Amendolara B, Lei L, Maurer M, Bruce J, Canoll P, Hibshoosh H, Parsons R (2013) A secreted PTEN phosphatase that enters cells to alter signaling and survival. *Science* **341**:399-402.
- Huang HS, Nagane M, Klingbeil CK, Lin H, Nishikawa R, Ji XD, Huang CM, Gill GN, Wiley HS, Cavenee WK (1997) The enhanced tumorigenic activity of a mutant epidermal growth factor receptor common in human cancers is mediated by threshold levels of constitutive tyrosine phosphorylation and unattenuated signaling. *The Journal of biological chemistry* **272**:2927-2935.
- Huitron-Resendiz S, Kristensen MP, Sanchez-Alavez M, Clark SD, Grupke SL, Tyler C, Suzuki C, Nothacker HP, Civelli O, Criado JR, Henriksen SJ, Leonard CS, de Lecea L (2005) Urotensin II modulates rapid eye movement sleep through activation of brainstem cholinergic neurons. *The Journal of neuroscience* **25**:5465-5474.
- Hursitoglu M, Tukek T, Cikrikcioglu MA, Kara O, Kazancioglu R, Ozkan O, Cakirca M, Akdogan F, Gundogan E, Aydin S, Beycan I, Gursu M, Dogan S, Erek A (2012) Urotensin II levels in patients with chronic kidney disease and kidney transplants. *Upsala journal of medical sciences* **117**:22-27.

## I

- Iglewski M, Grant SR (2010) Urotensin II-induced signaling involved in proliferation of vascular smooth muscle cells. *Vascular health and risk management* **6**:723-734.
- Iruela-Arispe ML, Beitel GJ (2013) Tubulogenesis. *Development* **140**:2851-2855.
- Ishihata A, Ogaki T, Aita T, Katano Y (2005) Role of prostaglandins in urotensin II-induced vasodilatation in the coronary arteries of aged rats. *European journal of pharmacology* **523**:119-126.

- Ishii N, Sawamura Y, Tada M, Daub DM, Janzer RC, Meagher-Villemure M, de Tribolet N, Van Meir EG (1998) Absence of p53 gene mutations in a tumor panel representative of pilocytic astrocytoma diversity using a p53 functional assay. *International journal of cancer* **76**:797-800.
- Itoh H, Lederis K (1987) Relationship of urotensin I induced vasodilatory action in rat thoracic aorta to Ca<sup>2+</sup> regulation. *Canadian journal of physiology and pharmacology* **65**:298-302.
- Iwamoto FM, Lamborn KR, Robins HI, Mehta MP, Chang SM, Butowski NA, Deangelis LM, Abrey LE, Zhang WT, Prados MD, Fine HA (2010) Phase II trial of pazopanib (GW786034), an oral multi-targeted angiogenesis inhibitor, for adults with recurrent glioblastoma (North American Brain Tumor Consortium Study 06-02). *Neuro-oncology* **12**:855-861.
- Izumoto S, Ohnishi T, Arita N, Hiraga S, Taki T, Hayakawa T (1996) Gene expression of neural cell adhesion molecule L1 in malignant gliomas and biological significance of L1 in glioma invasion. *Cancer research* **56**:1440-1444.

## J

- Jager RD, Mieler WF, Miller JW (2008) Age-related macular degeneration. *The New England journal of medicine* **358**:2606-2617.
- Jani PP, Narayan H, Ng LL (2013) The differential extraction and immunoluminometric assay of Urotensin II and Urotensin-related peptide in heart failure. *Peptides* **40**:72-76.
- Janson ET (2006) Treatment of neuroendocrine tumors with somatostatin analogs. *Pituitary* **9**:249-256.
- Jarry M, Diallo M, Lecointre C, Desrues L, Tokay T, Chatenet D, Leprince J, Rossi O, Vaudry H, Tonon MC, Prezeau L, Castel H, Gandolfo P (2010) The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *The Biochemical journal* **428**:113-124.
- Jeansson M, Gawlik A, Anderson G, Li C, Kerjaschki D, Henkelman M, Quaggin SE (2011) Angiopoietin-1 is essential in mouse vasculature during development and in response to injury. *The Journal of clinical investigation* **121**:2278-2289.
- Jegou S, Cartier D, Dubessy C, Gonzalez BJ, Chatenet D, Tostivint H, Scalbert E, Leprince J, Vaudry H, Lihmann I (2006) Localization of the urotensin II receptor in the rat central nervous system. *The Journal of comparative neurology* **495**:21-36.
- Jensen RL (2009) Brain tumor hypoxia: tumorigenesis, angiogenesis, imaging, pseudoprogression, and as a therapeutic target. *Journal of neuro-oncology* **92**:317-335.

- Joh D, Park BJ, Lim YJ (2011) Radiation-induced glioblastoma multiforme in a remitted acute lymphocytic leukemia patient. *Journal of Korean Neurosurgical Society* **50**:235-239.
- Johns DG, Ao Z, Naselsky D, Herold CL, Maniscalco K, Sarov-Blat L, Steplewski K, Aiyar N, Douglas SA (2004) Urotensin-II-mediated cardiomyocyte hypertrophy: effect of receptor antagonism and role of inflammatory mediators. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **370**:238-250.
- Joshi AD, Loilome W, Siu IM, Tyler B, Gallia GL, Riggins GJ (2012) Evaluation of tyrosine kinase inhibitor combinations for glioblastoma therapy. *PloS one* **7**:e44372.
- Joyal D, Huynh T, Aiyar N, Guida B, Douglas S, Giaid A (2006) Urotensin-II levels in acute coronary syndromes. *International journal of cardiology* **108**:31-35.
- Jung Y, Joo KM, Seong DH, Choi YL, Kong DS, Kim Y, Kim MH, Jin J, Suh YL, Seol HJ, Shin CS, Lee JI, Kim JH, Song SY, Nam DH (2012) Identification of prognostic biomarkers for glioblastomas using protein expression profiling. *International journal of oncology* **40**:1122-1132.

## K

- Kaafarani I, Fernandez-Sauze S, Berenguer C, Chinot O, Delfino C, Dussert C, Metellus P, Boudouresque F, Mabrouk K, Grisoli F, Figarella-Branger D, Martin PM, Ouafik L (2009) Targeting adrenomedullin receptors with systemic delivery of neutralizing antibodies inhibits tumor angiogenesis and suppresses growth of human tumor xenografts in mice. *FASEB journal* **23**:3424-3435.
- Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Meropol NJ, Novotny WF, Lieberman G, Griffing S, Bergsland E (2003) Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology* **21**:60-65.
- Kalamarz-Kubiak H, Ashkenazi IM, Kleszczynska A, Rosenfeld H (2014) Urotensin II inhibits arginine vasotocin and stimulates isotocin release from nerve endings in the pituitary of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Journal of experimental zoology Part A, Ecological genetics and physiology* **321**:467-471.
- Kanamori M, Kawaguchi T, Berger MS, Pieper RO (2006) Intracranial microenvironment reveals independent opposing functions of host alphaVbeta3 expression on glioma growth and angiogenesis. *The Journal of biological chemistry* **281**:37256-37264.
- Kanashiro CA, Schally AV, Cai RZ, Halmos G (2005) Antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide decrease the expression of angiogenic and anti-apoptotic factors in human glioblastoma. *Anti-cancer drugs* **16**:159-165.



- Kanashiro CA, Schally AV, Nagy A, Halmos G (2005) Inhibition of experimental U-118MG glioblastoma by targeted cytotoxic analogs of bombesin and somatostatin is associated with a suppression of angiogenic and antiapoptotic mechanisms. *International journal of oncology* **27**:169-174.
- Karran P, Macpherson P, Ceccotti S, Dogliotti E, Griffin S, Bignami M (1993) O6-methylguanine residues elicit DNA repair synthesis by human cell extracts. *The Journal of biological chemistry* **268**:15878-15886.
- Katano Y, Ishihata A, Aita T, Ogaki T, Horie T (2000) Vasodilator effect of urotensin II, one of the most potent vasoconstricting factors, on rat coronary arteries. *European journal of pharmacology* **402**:R5-7.
- Kaur B, Khwaja FW, Severson EA, Matheny SL, Brat DJ, Van Meir EG (2005) Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis. *Neuro-oncology* **7**:134-153.
- Kelsall CJ, Balment RJ (1998) Native urotensins influence cortisol secretion and plasma cortisol concentration in the euryhaline flounder, *platichthys flesus*. *General and comparative endocrinology* **112**:210-219.
- Kemp W, Krum H, Colman J, Bailey M, Yandle T, Richards M, Roberts S (2007) Urotensin II: a novel vasoactive mediator linked to chronic liver disease and portal hypertension. *Liver international* **27**:1232-1239.
- Killela PJ, Pirozzi CJ, Reitman ZJ, Jones S, Rasheed BA, Lipp E, Friedman H, Friedman AH, He Y, McLendon RE, Bigner DD, Yan H (2014) The genetic landscape of anaplastic astrocytoma. *Oncotarget* **5**:1452-1457.
- Kim J, Oh WJ, Gaiano N, Yoshida Y, Gu C (2011a) Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling regulates VEGF function in developmental angiogenesis via a feedback mechanism. *Genes & development* **25**:1399-1411.
- Kim H, Catana C, Ratai EM, Andronesi OC, Jennings DL, Batchelor TT, Jain RK, Sorensen AG (2011b) Serial magnetic resonance spectroscopy reveals a direct metabolic effect of cediranib in glioblastoma. *Cancer research* **71**:3745-3752.
- Kim J, Sohn E, Kim CS, Lee YM, Jo K, Kim JS (2013) Effect of KIOM-79 on Diabetes-Induced Myocardial Fibrosis in Zucker Diabetic Fatty Rats. *Evidence-based complementary and alternative medicine* **2013**:547653.
- Kim SK, Li Y, Park C, Abrol R, Goddard WA 3rd (2010) Prediction of the three-dimensional structure for the rat urotensin II receptor, and comparison of the antagonist binding sites and binding selectivity between human and rat receptors from atomistic simulations. *ChemMedChem* **5**:1594-1608.

- Kinney WA, Almond Jr HR, Qi J, Smith CE, Santulli RJ, de Garavilla L, Andrade-Gordon P, Cho DS, Everson AM, Feinstein MA, Leung PA, Maryanoff BE (2002) Structure-function analysis of urotensin II and its use in the construction of a ligand-receptor working model. *Angewandte Chemie* **41**:2940-2944.
- Kleihues P, Ohgaki H (1999) Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncology* **1**:44-51.
- Koch AW, Mathivet T, Larrivee B, Tong RK, Kowalski J, Pibouin-Fragner L, Bouvree K, Stawicki S, Nicholes K, Rathore N, Scales SJ, Luis E, del Toro R, Freitas C, Breant C, Michaud A, Corvol P, Thomas JL, Wu Y, Peale F, Watts RJ, Tessier-Lavigne M, Bagri A, Eichmann A (2011) Robo4 maintains vessel integrity and inhibits angiogenesis by interacting with UNC5B. *Developmental cell* **20**:33-46.
- Koh MY, Powis G (2012) Passing the baton: the HIF switch. *Trends in biochemical sciences* **37**:364-372.
- Kompa AR, Thomas WG, See F, Tzanidis A, Hannan RD, Krum H (2004) Cardiovascular role of urotensin II: effect of chronic infusion in the rat. *Peptides* **25**:1783-1788.
- Kreisl TN, Kotliarova S, Butman JA, Albert PS, Kim L, Musib L, Thornton D, Fine HA (2010) A phase I/II trial of enzastaurin in patients with recurrent high-grade gliomas. *Neuro-oncology* **12**:181-189.
- Kreisl TN, McNeill KA, Sul J, Iwamoto FM, Shih J, Fine HA (2012) A phase I/II trial of vandetanib for patients with recurrent malignant glioma. *Neuro-oncology* **14**:1519-1526.
- Kreisl TN, Smith P, Sul J, Salgado C, Iwamoto FM, Shih JH, Fine HA (2013) Continuous daily sunitinib for recurrent glioblastoma. *Journal of neuro-oncology* **111**:41-48.
- Kristof AS, You Z, Han YS, Giaid A (2010) Protein expression of urotensin II, urotensin-related peptide and their receptor in the lungs of patients with lymphangioleiomyomatosis. *Peptides* **31**:1511-1516.
- Krueger DA, Care MM, Agricola K, Tudor C, Mays M, Franz DN (2013) Everolimus long-term safety and efficacy in subependymal giant cell astrocytoma. *Neurology* **80**:574-580.
- Krum H, Kemp W (2007) Therapeutic potential of blockade of the urotensin II system in systemic hypertension. *Current hypertension reports* **9**:53-58.
- Ku BM, Lee YK, Ryu J, Jeong JY, Choi J, Eun KM, Shin HY, Kim DG, Hwang EM, Yoo JC, Park JY, Roh GS, Kim HJ, Cho GJ, Choi WS, Paek SH, Kang SS (2011) CHI3L1 (YKL-40) is expressed in human gliomas and regulates the invasion, growth and survival of glioma cells. *International journal of cancer* **128**:1316-1326.

- Kuppner MC, Van Meir E, Gauthier T, Hamou MF, de Tribolet N (1992) Differential expression of the CD44 molecule in human brain tumours. *International journal of cancer* **50**:572-577.
- Kuroda J, Kuratsu J, Yasunaga M, Koga Y, Kenmotsu H, Sugino T, Matsumura Y (2010) Antitumor effect of NK012, a 7-ethyl-10-hydroxycamptothecin-incorporating polymeric micelle, on U87MG orthotopic glioblastoma in mice compared with irinotecan hydrochloride in combination with bevacizumab. *Clinical cancer research* **16**:521-529.
- Kurtaran A, Leimer M, Kaserer K, Yang Q, Angelberger P, Niederle B, Virgolini I (1996) Combined use of <sup>111</sup>In-DTPA-D-Phe-1-octreotide (OCT) and <sup>123</sup>I-vasoactive intestinal peptide (VIP) in the localization diagnosis of medullary thyroid carcinoma (MTC). *Nuclear medicine and biology* **23**:503-507.

## L

- Labarrere P, Chatenet D, Leprince J, Marionneau C, Loirand G, Tonon MC, Dubessy C, Scalbert E, Pfeiffer B, Renard P, Calas B, Pacaud P, Vaudry H (2003) Structure-activity relationships of human urotensin II and related analogues on rat aortic ring contraction. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* **18**:77-88.
- Lagorio S, Roosli M (2014) Mobile phone use and risk of intracranial tumors: a consistency analysis. *Bioelectromagnetics* **35**:79-90.
- Lai A, Tran A, Nghiemphu PL, Pope WB, Solis OE, Selch M, Filka E, Yong WH, Mischel PS, Liau LM, Phuphanich S, Black K, Peak S, Green RM, Spier CE, Kolevska T, Polikoff J, Fehrenbacher L, Elashoff R, Cloughesy T (2011) Phase II study of bevacizumab plus temozolomide during and after radiation therapy for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme. *Journal of clinical oncology* **29**:142-148.
- Lamprecht A, Benoit JP (2006) Etoposide nanocarriers suppress glioma cell growth by intracellular drug delivery and simultaneous P-glycoprotein inhibition. *Journal of controlled release* **112**:208-213.
- Lancien F, Leprince J, Mimassi N, Mabin D, Vaudry H, Le Mevel JC (2004) Central effects of native urotensin II on motor activity, ventilatory movements, and heart rate in the trout *Oncorhynchus mykiss*. *Brain research* **1023**:167-174.
- Langham RG, Kelly DJ (2013) Urotensin II and the kidney. *Current opinion in nephrology and hypertension* **22**:107-112.
- Langham RG, Kelly DJ, Gow RM, Zhang Y, Dowling JK, Thomson NM, Gilbert RE (2004) Increased expression of urotensin II and urotensin II receptor in human diabetic nephropathy. *American journal of kidney diseases* **44**:826-831.

- Lapp H, Boerrigter G, Costello-Boerrigter LC, Jaekel K, Scheffold T, Krakau I, Schramm M, Guelker H, Stasch JP (2004) Elevated plasma human urotensin-II-like immunoreactivity in ischemic cardiomyopathy. *International journal of cardiology* **94**:93-97.
- Lassen U, Sorensen M, Gazieli TB, Hasselbalch B, Poulsen HS (2013) Phase II study of bevacizumab and temsirolimus combination therapy for recurrent glioblastoma multiforme. *Anticancer research* **33**:1657-1660.
- Lecointre C, Desrues L, Joubert JE, Perzo N, Guichet PO, Le Joncour V, Brulé C, Chabbert M, Leduc R, Prézeau L, Laquerrière A, Proust F, Gandolfo P, Morin F and Castel H (2014) Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: Prototypic chemotaxic mechanism in glioma. *Oncogene, in press*.
- Le Jeune N, Dubois F, Bin V, Perek N (2006) Evaluation of imatinib mesylate effects on glioblastoma aggressiveness with SPECT radiotracer <sup>99m</sup>Tc-(v)-DMSA. *European journal of cancer* **42**:1004-1013.
- Le Mevel JC, Olson KR, Conklin D, Waugh D, Smith DD, Vaudry H, Conlon JM (1996) Cardiovascular actions of trout urotensin II in the conscious trout, *Oncorhynchus mykiss*. *The American journal of physiology* **271**:R1335-1343.
- Leavesley DI, Ferguson GD, Wayner EA, Cheresh DA (1992) Requirement of the integrin beta 3 subunit for carcinoma cell spreading or migration on vitronectin and fibrinogen. *The Journal of cell biology* **117**:1101-1107.
- Lee CY, Tsai YT, Loh SH, Liu JC, Chen TH, Chao HH, Cheng TH, Chen JJ (2014) Urotensin II induces interleukin 8 expression in human umbilical vein endothelial cells. *PloS one* **9**:e90278.
- Lee DK, Lanca AJ, Cheng R, Nguyen T, Ji XD, Gobeil F Jr, Chemtob S, George SR, O'Dowd BF (2004) Agonist-independent nuclear localization of the Apelin, angiotensin AT1, and bradykinin B2 receptors. *The Journal of biological chemistry* **279**:7901-7908.
- Lee WJ, Colt JS, Heineman EF, McComb R, Weisenburger DD, Lijinsky W, Ward MH (2005) Agricultural pesticide use and risk of glioma in Nebraska, United States. *Occupational and environmental medicine* **62**:786-792.
- Lehky TJ, Iwamoto FM, Kreisl TN, Floeter MK, Fine HA (2011) Neuromuscular junction toxicity with tandutinib induces a myasthenic-like syndrome. *Neurology* **76**:236-241.
- Lehmann F, Currier EA, Olsson R, Hacksell U, Luthman K (2005) Isochromanone-based urotensin-II receptor agonists. *Bioorganic & medicinal chemistry* **13**:3057-3068.
- Lehmann F, Lake L, Currier EA, Olsson R, Hacksell U, Luthman K (2007) Design, parallel synthesis and SAR of novel urotensin II receptor agonists. *European journal of medicinal chemistry* **42**:276-285.

- Lehner U, Velic A, Schroter R, Schlatter E, Sindic A (2007) Ligands and signaling of the G-protein-coupled receptor GPR14, expressed in human kidney cells. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* **20**:181-192.
- Leonard AD, Thompson JP, Hutchinson EL, Young SP, McDonald J, Swanevelder J, Lambert DG (2009) Urotensin II receptor expression in human right atrium and aorta: effects of ischaemic heart disease. *British journal of anaesthesia* **102**:477-484.
- Lescot E, Sopkova-de Oliveira Santos J, Colloc'h N, Rodrigo J, Milazzo-Segalas I, Bureau R, Rault S (2008) Three-dimensional model of the human urotensin-II receptor: docking of human urotensin-II and nonpeptide antagonists in the binding site and comparison with an antagonist pharmacophore model. *Proteins* **73**:173-184.
- Lescot E, Sopkova-de Oliveira Santos J, Dubessy C, Oulyadi H, Lesnard A, Vaudry H, Bureau R, Rault S (2007) Definition of new pharmacophores for nonpeptide antagonists of human urotensin-II. Comparison with the 3D-structure of human urotensin-II and URP. *Journal of chemical information and modeling* **47**:602-612.
- Li H, Chen J, He M, Hui XH, Cai BW, Li Y (2007b) [Expression of CD147 and MMP-2 in human gliomas and its correlations with prognosis]. *Journal of Sichuan University Medical science edition* **38**:396-399.
- Li JL, Sainson RC, Shi W, Leek R, Harrington LS, Preusser M, Biswas S, Turley H, Heikamp E, Hainfellner JA, Harris AL (2007a) Delta-like 4 Notch ligand regulates tumor angiogenesis, improves tumor vascular function, and promotes tumor growth in vivo. *Cancer research* **67**:11244-11253.
- Ligon KL, Huillard E, Mehta S, Kesari S, Liu H, Alberta JA, Bachoo RM, Kane M, Louis DN, Depinho RA, Anderson DJ, Stiles CD, Rowitch DH (2007) Olig2-regulated lineage-restricted pathway controls replication competence in neural stem cells and malignant glioma. *Neuron* **53**:503-517.
- Lima FR, Kahn SA, Soletti RC, Biasoli D, Alves T, da Fonseca AC, Garcia C, Romao L, Brito J, Holanda-Afonso R, Faria J, Borges H, Moura-Neto V (2012) Glioblastoma: therapeutic challenges, what lies ahead. *Biochimica et biophysica acta* **1826**:338-349.
- Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Abe I, Iida M (2003a) Central cardiovascular action of urotensin II in conscious rats. *Journal of hypertension* **21**:159-165.
- Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Fukuhara M, Ohya Y, Fujii K, Iida M (2003b) Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension research* **26**:839-845.
- Lindahl P, Hellstrom M, Kalen M, Betsholtz C (1998) Endothelial-perivascular cell signaling in vascular development: lessons from knockout mice. *Current opinion in lipidology* **9**:407-411.

- Liotta LA, Lee CW, Morakis DJ (1980) New method for preparing large surfaces of intact human basement membrane for tumor invasion studies. *Cancer letters* **11**:141-152.
- Little MP, Rajaraman P, Curtis RE, Devesa SS, Inskip PD, Check DP, Linet MS (2012) Mobile phone use and glioma risk: comparison of epidemiological study results with incidence trends in the United States. *British medical journal* **344**:e1147.
- Liu D, Chen J, Wang J, Zhang Z, Ma X, Jia J, Wang Y (2010) Increased expression of urotensin II and GPR14 in patients with cirrhosis and portal hypertension. *International journal of molecular medicine* **25**:845-851.
- Liu JC, Chen CH, Chen JJ, Cheng TH (2009) Urotensin II induces rat cardiomyocyte hypertrophy via the transient oxidization of Src homology 2-containing tyrosine phosphatase and transactivation of epidermal growth factor receptor. *Molecular pharmacology* **76**:1186-1195.
- Liu Q, Pong SS, Zeng Z, Zhang Q, Howard AD, Williams DL Jr, Davidoff M, Wang R, Austin CP, McDonald TP, Bai C, George SR, Evans JF, Caskey CT (1999) Identification of urotensin II as the endogenous ligand for the orphan G-protein-coupled receptor GPR14. *Biochemical and biophysical research communications* **266**:174-178.
- Liu XM, Zhang QP, Mu YG, Zhang XH, Sai K, Pang JC, Ng HK, Chen ZP (2011a) Clinical significance of vasculogenic mimicry in human gliomas. *Journal of neuro-oncology* **105**:173-179.
- Liu Z, Li Y, Zhao W, Ma Y, Yang X (2011b) Demonstration of vasculogenic mimicry in astrocytomas and effects of Endostar on U251 cells. *Pathology, research and practice* **207**:645-651.
- Loirand G, Rolli-Derkinderen M, Pacaud P (2008) Urotensin II and atherosclerosis. *Peptides* **29**:778-782.
- Lopez-Lazaro M (2006) Hypoxia-inducible factor 1 as a possible target for cancer chemoprevention. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research* **15**:2332-2335.
- Louis DN, Holland EC, Cairncross JG (2001) Glioma classification: a molecular reappraisal. *The American journal of pathology* **159**:779-786.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica* **114**:97-109.
- Lu Y, Zou CJ, Huang DW, Tang CS (2002) Cardiovascular effects of urotensin II in different brain areas. *Peptides* **23**:1631-1635.

- Lueth M, Wronski L, Giese A, Kirschner-Schwabe R, Pietsch T, von Deimling A, Henze G, Kurtz A, Driever PH (2009) Somatic mitochondrial mutations in pilocytic astrocytoma. *Cancer genetics and cytogenetics* **192**:30-35.
- Lun X, Alain T, Zemp FJ, Zhou H, Rahman MM, Hamilton MG, McFadden G, Bell J, Senger DL, Forsyth PA (2010a) Myxoma virus virotherapy for glioma in immunocompetent animal models: optimizing administration routes and synergy with rapamycin. *Cancer research* **70**:598-608.
- Lun X, Chan J, Zhou H, Sun B, Kelly JJ, Stechishin OO, Bell JC, Parato K, Hu K, Vaillant D, Wang J, Liu TC, Breitbach C, Kirn D, Senger DL, Forsyth PA (2010b) Efficacy and safety/toxicity study of recombinant vaccinia virus JX-594 in two immunocompetent animal models of glioma. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **18**:1927-1936.
- Lustig R, Mikkelsen T, Lesser G, Grossman S, Ye X, Desideri S, Fisher J, Wright J, New Approaches to Brain Tumor Therapy CNSC (2008) Phase II preradiation R115777 (tipifarnib) in newly diagnosed GBM with residual enhancing disease. *Neuro-oncology* **10**:1004-1009.

## M

- Mabjeesh NJ, Amir S (2007) Hypoxia-inducible factor (HIF) in human tumorigenesis. *Histology and histopathology* **22**:559-572.
- MacDonald TJ, Vezina G, Stewart CF, Turner D, Pierson CR, Chen L, Pollack IF, Gajjar A, Kieran MW (2013) Phase II study of cilengitide in the treatment of refractory or relapsed high-grade gliomas in children: a report from the Children's Oncology Group. *Neuro-oncology* **15**:1438-1444.
- MacLean MR, Alexander D, Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Morecroft I, Pollard K (2000) Contractile responses to human urotensin-II in rat and human pulmonary arteries: effect of endothelial factors and chronic hypoxia in the rat. *British journal of pharmacology* **130**:201-204.
- Madden JR, Addo-Yobo SO, Donson AM, Liu AK, McNatt SA, Kleinschmidt-Demasters BK, Fenton LZ, Foreman NK, Smith AA (2010) Radiation-induced glioblastoma multiforme in children treated for medulloblastoma with characteristics of both medulloblastoma and glioblastoma multiforme. *Journal of pediatric hematology/oncology* **32**:e272-278.
- Magnavita N, Placentino RA, Mei D, Ferraro D, Di Trapani G (2003) Occupational head injury and subsequent glioma. *Neurological sciences* **24**:31-33.
- Maguire JJ, Kuc RE, Davenport AP (2000) Orphan-receptor ligand human urotensin II: receptor localization in human tissues and comparison of vasoconstrictor responses with endothelin-1. *British journal of pharmacology* **131**:441-446.

- Maguire JJ, Kuc RE, Kleinz MJ, Davenport AP (2008) Immunocytochemical localization of the urotensin-II receptor, UT, to rat and human tissues: relevance to function. *Peptides* **29**:735-742.
- Maguire JJ, Kuc RE, Wiley KE, Kleinz MJ, Davenport AP (2004) Cellular distribution of immunoreactive urotensin-II in human tissues with evidence of increased expression in atherosclerosis and a greater constrictor response of small compared to large coronary arteries. *Peptides* **25**:1767-1774.
- Mallamaci F, Cutrupi S, Pizzini P, Tripepi G, Zoccali C (2005) Urotensin II in end-stage renal disease: an inverse correlate of sympathetic function and cardiac natriuretic peptides. *Journal of nephrology* **18**:727-732.
- Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ (1999) Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *The American journal of pathology* **155**:739-752.
- Mannino M, Chalmers AJ (2011) Radioresistance of glioma stem cells: intrinsic characteristic or property of the 'microenvironment-stem cell unit'? *Molecular oncology* **5**:374-386.
- Marchese A, Heiber M, Nguyen T, Heng HH, Saldivia VR, Cheng R, Murphy PM, Tsui LC, Shi X, Gregor P, George SR, O'Dowd BF, Docherty JM (1995) Cloning and chromosomal mapping of three novel genes, GPR9, GPR10, and GPR14, encoding receptors related to interleukin 8, neuropeptide Y, and somatostatin receptors. *Genomics* **29**:335-344.
- Marco J, Egido EM, Hernandez R, Silvestre RA (2008) Evidence for endogenous urotensin-II as an inhibitor of insulin secretion. Study in the perfused rat pancreas. *Peptides* **29**:852-858.
- Matsumoto Y, Abe M, Watanabe T, Adachi Y, Yano T, Takahashi H, Sugo T, Mori M, Kitada C, Kurokawa T, Fujino M (2004) Intracerebroventricular administration of urotensin II promotes angiogenic-like behaviors in rodents. *Neuroscience letters* **358**:99-102.
- Matsusaka S, Wakabayashi I (2006) Enhancement of vascular smooth muscle cell migration by urotensin II. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **373**:381-386.
- Matsushita M, Shichiri M, Fukai N, Ozawa N, Yoshimoto T, Takasu N, Hirata Y (2003) Urotensin II is an autocrine/paracrine growth factor for the porcine renal epithelial cell line, LLCPK1. *Endocrinology* **144**:1825-1831.
- Matsushita M, Shichiri M, Imai T, Iwashina M, Tanaka H, Takasu N, Hirata Y (2001) Co-expression of urotensin II and its receptor (GPR14) in human cardiovascular and renal tissues. *Journal of hypertension* **19**:2185-2190.
- McDonough WS, Johansson A, Joffe H, Giese A, Berens ME (1999) Gap junction intercellular communication in gliomas is inversely related to cell motility. *International journal of developmental neuroscience* **17**:601-611.



- McKinley BP, Michalek AM, Fenstermaker RA, Plunkett RJ (2000) The impact of age and sex on the incidence of glial tumors in New York state from 1976 to 1995. *Journal of neurosurgery* **93**:932-939.
- Mori M, Sugo T, Abe M, Shimomura Y, Kurihara M, Kitada C, Kikuchi K, Shintani Y, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M (1999) Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochemical and biophysical research communications* **265**:123-129.
- Mori N, Hirose T, Nakayama T, Ito O, Kanazawa M, Imai Y, Kohzuki M, Takahashi K, Totsune K (2009) Increased expression of urotensin II-related peptide and its receptor in kidney with hypertension or renal failure. *Peptides* **30**:400-408.
- Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Totsune K, Arai Y, Suzuki T, Sasano H, Ito S, Takahashi K (2008) Immunolocalization of urotensin II and its receptor in human adrenal tumors and attached non-neoplastic adrenal tissues. *Peptides* **29**:873-880.
- Morris PG, Abrey LE (2010) Novel targeted agents for platelet-derived growth factor receptor and c-KIT in malignant gliomas. *Targeted oncology* **5**:193-200.
- Mosenkis A, Kallem RR, Danoff TM, Aiyar N, Bazeley J, Townsend RR (2011) Renal impairment, hypertension and plasma urotensin II. *Nephrology, dialysis, transplantation* **26**:609-614.
- Motomura K, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, Sure U, Wrede K, Nakazato Y, Tanaka Y, Nonoguchi N, Pierscianek D, Kim YH, Mariani L, Vital A, Perry A, Ohgaki H (2013) PDGFRA gain in low-grade diffuse gliomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **72**:61-66.
- Mounier N, Vignot S, Spano JP (2006) [Update on clinical activity of CCI779 (temsirolimus), mTOR inhibitor]. *Bulletin du cancer* **93**:1139-1143.
- Moyal EC, Laprie A, Delannes M, Poublanc M, Catalaa I, Dalenc F, Berchery D, Sabatier J, Bousquet P, De Porre P, Alaux B, Toulas C (2007) Phase I trial of tipifarnib (R115777) concurrent with radiotherapy in patients with glioblastoma multiforme. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **68**:1396-1401.
- Mukherjee D, Sarmiento JM, Ly D, Nuno MA, Patil CG (2013) Everolimus for astrocytomas in tuberous sclerosis. *Lancet* **381**:1274-1275.
- Murakami M (2012) Signaling required for blood vessel maintenance: molecular basis and pathological manifestations. *International journal of vascular medicine* **2012**:293641.

## N

- Nagano O, Saya H (2004) Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer science* **95**:930-935.

- Nagpal S, Harsh G, Recht L (2011) Bevacizumab improves quality of life in patients with recurrent glioblastoma. *Chemotherapy research and practice* **2011**:602812.
- Nakayama T, Hirose T, Totsune K, Mori N, Maruyama Y, Maejima T, Minagawa K, Morimoto R, Asayama K, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Kohzuki M, Takahashi K, Imai Y (2008) Increased gene expression of urotensin II-related peptide in the hearts of rats with congestive heart failure. *Peptides* **29**:801-808.
- Narayana A, Kunnakkat SD, Medabalmi P, Golfinos J, Parker E, Knopp E, Zagzag D, Eagan P, Gruber D, Gruber ML (2012) Change in pattern of relapse after antiangiogenic therapy in high-grade glioma. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **82**:77-82.
- Newlands ES, Stevens MF, Wedge SR, Wheelhouse RT, Brock C (1997) Temozolomide: a review of its discovery, chemical properties, pre-clinical development and clinical trials. *Cancer treatment reviews* **23**:35-61.
- Ng LL, Loke I, O'Brien RJ, Squire IB, Davies JE (2002) Plasma urotensin in human systolic heart failure. *Circulation* **106**:2877-2880.
- Nghiempfu PL, Lai A, Green RM, Reardon DA, Cloughesy T (2012) A dose escalation trial for the combination of erlotinib and sirolimus for recurrent malignant gliomas. *Journal of neuro-oncology* **110**:245-250.
- Nghiempfu PL, Wen PY, Lamborn KR, Drappatz J, Robins HI, Fink K, Malkin MG, Lieberman FS, DeAngelis LM, Torres-Trejo A, Chang SM, Abrey L, Fine HA, Demopoulos A, Lassman AB, Kesari S, Mehta MP, Prados MD, Cloughesy TF, North American Brain Tumor C (2011) A phase I trial of tipifarnib with radiation therapy, with and without temozolomide, for patients with newly diagnosed glioblastoma. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **81**:1422-1427.
- Nguyen TT, Letourneau M, Chatenet D, Fournier A (2012) Presence of urotensin-II receptors at the cell nucleus: specific tissue distribution and hypoxia-induced modulation. *The international journal of biochemistry & cell biology* **44**:639-647.
- Nitescu N, Grimberg E, Guron G (2010) Urotensin-II receptor antagonism does not improve renal haemodynamics or function in rats with endotoxin-induced acute kidney injury. *Clinical and experimental pharmacology & physiology* **37**:1170-1175.
- Nobata S, Donald JA, Balment RJ, Takei Y (2011) Potent cardiovascular effects of homologous urotensin II (UII)-related peptide and UII in unanesthetized eels after peripheral and central injections. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* **300**:R437-446.
- Noble M, Dietrich J (2004) The complex identity of brain tumors: emerging concerns regarding origin, diversity and plasticity. *Trends in neurosciences* **27**:148-154.

- Noel G, Schott R, Froelich S, Gaub MP, Boyer P, Fischer-Lokou D, Dufour P, Kehrli P, Maitrot D (2012) Retrospective comparison of chemoradiotherapy followed by adjuvant chemotherapy, with or without prior gliadel implantation (carmustine) after initial surgery in patients with newly diagnosed high-grade gliomas. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **82**:749-755.
- Nomura T, Inamura T, Black KL (1994) Intracarotid infusion of bradykinin selectively increases blood-tumor permeability in 9L and C6 brain tumors. *Brain research* **659**:62-66.
- Norden AD, Drappatz J, Wen PY (2008) Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. *The Lancet Neurology* **7**:1152-1160.
- Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O'Dowd B, Duckles SP, Civelli O (1999) Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nature cell biology* **1**:383-385.
- Nouguerede E, Berenguer C, Garcia S, Bennani B, Delfino C, Nanni I, Dahan L, Gasmi M, Seitz JF, Martin PM, Ouafik L (2013) Expression of adrenomedullin in human colorectal tumors and its role in cell growth and invasion in vitro and in xenograft growth in vivo. *Cancer medicine* **2**:196-207.

## O

- Ohgaki H, Kleihues P (2005) Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta neuropathologica* **109**:93-108.
- Ohgaki H, Kleihues P (2005) Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **64**:479-489.
- Ohgaki H, Kleihues P (2009) Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer science* **100**:2235-2241.
- Oikonomou E, Buchfelder M, Adams EF (2008) Cholecystokinin (CCK) and CCK receptor expression by human gliomas: Evidence for an autocrine/paracrine stimulatory loop. *Neuropeptides* **42**:255-265.
- Okada H, Tsuzuki T, Shindoh H, Nishigaki A, Yasuda K, Kanzaki H (2014) Regulation of decidualization and angiogenesis in the human endometrium: mini review. *The journal of obstetrics and gynaecology research* **40**:1180-1187.
- Okamoto I, Kawano Y, Tsuiki H, Sasaki J, Nakao M, Matsumoto M, Suga M, Ando M, Nakajima M, Saya H (1999) CD44 cleavage induced by a membrane-associated metalloprotease plays a critical role in tumor cell migration. *Oncogene* **18**:1435-1446.

- Okumus S, Igci YZ, Taskin T, Oztuzcu S, Gurler B, Eslik Z, Gogebakan B, Coskun E, Erbagci I, Demiryurek S, Cengiz B, Demiryurek AT (2012) Association between Thr21Met and Ser89Asn polymorphisms of the urotensin-II (UTS2) gene, diabetes mellitus, and diabetic retinopathy. *Current eye research* **37**:921-929.
- Oliver L, Olivier C, Marhuenda FB, Campone M, Vallette FM (2009) Hypoxia and the malignant glioma microenvironment: regulation and implications for therapy. *Current molecular pharmacology* **2**:263-284.
- Olsson M, Lindahl T (1980) Repair of alkylated DNA in Escherichia coli. Methyl group transfer from O6-methylguanine to a protein cysteine residue. *The Journal of biological chemistry* **255**:10569-10571.
- Omuro AM (2008) Exploring multi-targeting strategies for the treatment of gliomas. *Current opinion in investigational drugs* **9**:1287-1295.
- Onan D, Pipolo L, Yang E, Hannan RD, Thomas WG (2004) Urotensin II promotes hypertrophy of cardiac myocytes via mitogen-activated protein kinases. *Molecular endocrinology* **18**:2344-2354.
- Onat AM, Pehlivan Y, Turkbeyler IH, Demir T, Kaplan DS, Ceribasi AO, Orkmez M, Tutar E, Taysi S, Sayarlioglu M, Kisacik B (2013) Urotensin inhibition with palosuran could be a promising alternative in pulmonary arterial hypertension. *Inflammation* **36**:405-412.
- Onat AM, Turkbeyler IH, Pehlivan Y, Demir T, Kaplan DS, Taysi S, Ceribasi AO, Tutar E, Kisacik B (2012) The efficiency of a urotensin II antagonist in an experimental lung fibrosis model. *Inflammation* **35**:1138-1143.
- Ong KL, Wong LY, Man YB, Leung RY, Song YQ, Lam KS, Cheung BM (2006) Haplotypes in the urotensin II gene and urotensin II receptor gene are associated with insulin resistance and impaired glucose tolerance. *Peptides* **27**:1659-1667.
- Onishi M, Ichikawa T, Kurozumi K, Date I (2011) Angiogenesis and invasion in glioma. *Brain tumor pathology* **28**:13-24.
- Ono T, Kawaguchi Y, Kudo M, Kushikata T, Hashiba E, Yoshida H, Kudo T, Furukawa K, Douglas SA, Guerrini R, Calo G, Hirota K (2008) Urotensin II evokes neurotransmitter release from rat cerebrocortical slices. *Neuroscience letters* **440**:275-279.
- O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N (2006) mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. *Cancer research* **66**:1500-1508.

Ouafik L, Sauze S, Boudouresque F, Chinot O, Delfino C, Fina F, Vuaroqueaux V, Dussert C, Palmari J, Dufour H, Grisoli F, Casellas P, Brunner N, Martin PM (2002) Neutralization of adrenomedullin inhibits the growth of human glioblastoma cell lines in vitro and suppresses tumor xenograft growth in vivo. *The American journal of pathology* **160**:1279-1292.

## P

Pakala R (2008) Role of urotensin II in atherosclerotic cardiovascular diseases. *Cardiovascular revascularization medicine : including molecular interventions* **9**:166-178.

Panner A, Parsa AT, Pieper RO (2006) Use of APO2L/TRAIL with mTOR inhibitors in the treatment of glioblastoma multiforme. *Expert review of anticancer therapy* **6**:1313-1322.

Papadopoulos P, Bousette N, Al-Ramli W, You Z, Behm DJ, Ohlstein EH, Harrison SM, Douglas SA, Giaid A (2009) Targeted overexpression of the human urotensin receptor transgene in smooth muscle cells: effect of UT antagonism in ApoE knockout mice fed with Western diet. *Atherosclerosis* **204**:395-404.

Papadopoulos P, Bousette N, Giaid A (2008) Urotensin-II and cardiovascular remodeling. *Peptides* **29**:764-769.

Park SL, Lee BK, Kim YA, Lee BH, Jung YS (2013) Inhibitory Effect of an Urotensin II Receptor Antagonist on Proinflammatory Activation Induced by Urotensin II in Human Vascular Endothelial Cells. *Biomolecules & therapeutics* **21**:277-283.

Parmentier C, Hameury E, Dubessy C, Quan FB, Habert D, Calas A, Vaudry H, Lihrmann I, Tostivint H (2011) Occurrence of two distinct urotensin II-related peptides in zebrafish provides new insight into the evolutionary history of the urotensin II gene family. *Endocrinology* **152**:2330-2341.

Parmentier C, Hameury E, Lihrmann I, Taxi J, Hardin-Pouzet H, Vaudry H, Calas A, Tostivint H (2008) Comparative distribution of the mRNAs encoding urotensin I and urotensin II in zebrafish. *Peptides* **29**:820-829.

Patacchini R, Santicioli P, Giuliani S, Grieco P, Novellino E, Rovero P, Maggi CA (2003) Urantide: an ultrapotent urotensin II antagonist peptide in the rat aorta. *British journal of pharmacology* **140**:1155-1158.

Patel S, DiBiase S, Meisenberg B, Flannery T, Patel A, Dhople A, Cheston S, Amin P (2012) Phase I clinical trial assessing temozolomide and tamoxifen with concomitant radiotherapy for treatment of high-grade glioma. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **82**:739-742.

- Paulus W, Baur I, Schuppan D, Roggendorf W (1993) Characterization of integrin receptors in normal and neoplastic human brain. *The American journal of pathology* **143**:154-163.
- Pawar R, Kemp W, Roberts S, Krum H, Yandle T, Hardikar W (2011) Urotensin II levels are an important marker for the severity of portal hypertension in children. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition* **53**:88-92.
- Pearson D, Shively JE, Clark BR, Geschwind, II, Barkley M, Nishioka RS, Bern HA (1980) Urotensin II: a somatostatin-like peptide in the caudal neurosecretory system of fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **77**:5021-5024.
- Peereboom DM, Supko JG, Carson KA, Batchelor T, Phuphanich S, Lesser G, Mikkelsen T, Fisher J, Desideri S, He X, Grossman SA, New Approaches to Brain Tumor Therapy C (2010) A phase I/II trial and pharmacokinetic study of ixabepilone in adult patients with recurrent high-grade gliomas. *Journal of neuro-oncology* **100**:261-268.
- Pehlivan Y, Dokuyucu R, Demir T, Kaplan DS, Koc I, Orkmez M, Turkbeyler IH, Ceribasi AO, Tutar E, Taysi S, Kisacik B, Onat AM (2014) Palosuran treatment effective as bosentan in the treatment model of pulmonary arterial hypertension. *Inflammation* **37**:1280-1288.
- Pelletier G, Lihmann I, Vaudry H (2002) Role of androgens in the regulation of urotensin II precursor mRNA expression in the rat brainstem and spinal cord. *Neuroscience* **115**:525-532.
- Perkins TD, Bansal S, Barlow DJ (1990) Molecular modelling and design of analogues of the peptide hormone urotensin II. *Biochemical Society transactions* **18**:918-919.
- Philippon J (2004) [Brain tumors in the elderly]. *Psychologie & neuropsychiatrie du vieillissement* **2**:29-33.
- Phng LK, Gerhardt H (2009) Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Developmental cell* **16**:196-208.
- Phuphanich S, Carson KA, Grossman SA, Lesser G, Olson J, Mikkelsen T, Desideri S, Fisher JD, New Approaches to Brain Tumor Therapy CNSC (2008) Phase I safety study of escalating doses of atrasentan in adults with recurrent malignant glioma. *Neuro-oncology* **10**:617-623.
- Plate KH, Scholz A, Dumont DJ (2012) Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta neuropathologica* **124**:763-775.
- Platten M, Wick W, Wild-Bode C, Aulwurm S, Dichgans J, Weller M (2000) Transforming growth factors beta(1) (TGF-beta(1)) and TGF-beta(2) promote glioma cell migration via Up-regulation of alpha(V)beta(3) integrin expression. *Biochemical and biophysical research communications* **268**:607-611.

- Plunkett RJ, Lis A, Barone TA, Fronckowiak MD, Greenberg SJ (1999) Hormonal effects on glioblastoma multiforme in the nude rat model. *Journal of neurosurgery* **90**:1072-1077.
- Porras-Gonzalez C, Urena J, Egea-Guerrero JJ, Gordillo-Escobar E, Murillo-Cabezas F, Gonzalez-Montelongo Mdel C, Munoz-Sanchez MA (2014) Contractile responses to rat urotensin II in resting and depolarized basilar arteries. *Journal of physiology and biochemistry* **70**:193-199.
- Pozsgai E, Schally AV, Halmos G, Rick F, Bellyei S (2010) The inhibitory effect of a novel cytotoxic somatostatin analogue AN-162 on experimental glioblastoma. *Hormone and metabolic research* **42**:781-786.
- Previtali S, Quattrini A, Nemni R, Truci G, Ducati A, Wrabetz L, Canal N (1996) Alpha6 beta4 and alpha6 beta1 integrins in astrocytomas and other CNS tumors. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **55**:456-465.
- Price A, Shi Q, Morris D, Wilcox ME, Brasher PM, Rewcastle NB, Shalinsky D, Zou H, Appelt K, Johnston RN, Yong VW, Edwards D, Forsyth P (1999) Marked inhibition of tumor growth in a malignant glioma tumor model by a novel synthetic matrix metalloproteinase inhibitor AG3340. *Clinical cancer research* **5**:845-854.
- Prosser HC, Forster ME, Richards AM, Pemberton CJ (2008) Urotensin II and urotensin II-related peptide (URP) in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Peptides* **29**:770-777.
- Prosser HC, Leprince J, Vaudry H, Richards AM, Forster ME, Pemberton CJ (2006) Cardiovascular effects of native and non-native urotensin II and urotensin II-related peptide on rat and salmon hearts. *Peptides* **27**:3261-3268.
- Proulx CD, Holleran BJ, Boucard AA, Escher E, Guillemette G, Leduc R (2008) Mutational analysis of the conserved Asp2.50 and ERY motif reveals signaling bias of the urotensin II receptor. *Molecular pharmacology* **74**:552-561.
- Provost D, Cantagrel A, Lebailly P, Jaffre A, Loyant V, Loiseau H, Vital A, Brochard P, Baldi I (2007) Brain tumours and exposure to pesticides: a case-control study in southwestern France. *Occupational and environmental medicine* **64**:509-514.

## Q

- Qi J, Du J, Tang X, Li J, Wei B, Tang C (2004) The upregulation of endothelial nitric oxide synthase and urotensin-II is associated with pulmonary hypertension and vascular diseases in rats produced by aortocaval shunting. *Heart and vessels* **19**:81-88.
- Qi JS, Schulingkamp R, Parry TJ, Colburn R, Stone D, Haertlein B, Minor LK, Andrade-Gordon P, Damiano BP (2007) Urotensin-II induces ear flushing in rats. *British journal of pharmacology* **150**:415-423.

Qualman SJ, Bowen J, Erdman SH (2003) Molecular basis of the brain tumor-polyposis (Turcot) syndrome. *Pediatric and developmental pathology* **6**:574-576.

Quan FB, Bougerol M, Rigour F, Kenigfest NB, Tostivint H (2012) Characterization of the true ortholog of the urotensin II-related peptide (URP) gene in teleosts. *General and comparative endocrinology* **177**:205-212.

## R

Radhakrishnan K, Mokri B, Parisi JE, O'Fallon WM, Sunku J, Kurland LT (1995) The trends in incidence of primary brain tumors in the population of Rochester, Minnesota. *Annals of neurology* **37**:67-73.

Raizer JJ, Abrey LE, Lassman AB, Chang SM, Lamborn KR, Kuhn JG, Yung WK, Gilbert MR, Aldape KA, Wen PY, Fine HA, Mehta M, Deangelis LM, Lieberman F, Cloughesy TF, Robins HI, Dancey J, Prados MD, North American Brain Tumor C (2010) A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. *Neuro-oncology* **12**:95-103.

Raizer JJ, Abrey LE, Lassman AB, Chang SM, Lamborn KR, Kuhn JG, Yung WK, Gilbert MR, Aldape KD, Wen PY, Fine HA, Mehta M, Deangelis LM, Lieberman F, Cloughesy TF, Robins HI, Dancey J, Prados MD, North American Brain Tumor C (2010) A phase I trial of erlotinib in patients with nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy, and recurrent malignant gliomas and meningiomas. *Neuro-oncology* **12**:87-94.

Rajaraman P, Wang SS, Rothman N, Brown MM, Black PM, Fine HA, Loeffler JS, Selker RG, Shapiro WR, Chanock SJ, Inskip PD (2007) Polymorphisms in apoptosis and cell cycle control genes and risk of brain tumors in adults. *Cancer Research* **16**:1655-1661.

Rakowski E, Hassan GS, Dhanak D, Ohlstein EH, Douglas SA, Giaid A (2005) A role for urotensin II in restenosis following balloon angioplasty: use of a selective UT receptor blocker. *Journal of molecular and cellular cardiology* **39**:785-791.

Ravani P, Tripepi G, Pecchini P, Mallamaci F, Malberti F, Zoccali C (2008) Urotensin II is an inverse predictor of death and fatal cardiovascular events in chronic kidney disease. *Kidney international* **73**:95-101.

Raza SM, Fuller GN, Rhee CH, Huang S, Hess K, Zhang W, Sawaya R (2004) Identification of necrosis-associated genes in glioblastoma by cDNA microarray analysis. *Clinical cancer research* **10**:212-221.

Raza SM, Lang FF, Aggarwal BB, Fuller GN, Wildrick DM, Sawaya R (2002) Necrosis and glioblastoma: a friend or a foe? A review and a hypothesis. *Neurosurgery* **51**:2-12.



- Reardon DA, Dresemann G, Taillibert S, Campone M, van den Bent M, Clement P, Blomquist E, Gordower L, Schultz H, Raizer J, Hau P, Easaw J, Gil M, Tonn J, Gijtenbeek A, Schlegel U, Bergstrom P, Green S, Weir A, Nikolova Z (2009b) Multicentre phase II studies evaluating imatinib plus hydroxyurea in patients with progressive glioblastoma. *British journal of cancer* **101**:1995-2004.
- Reardon DA, Egorin MJ, Desjardins A, Vredenburgh JJ, Beumer JH, Lagattuta TF, Gururangan S, Herndon JE 2nd, Salvado AJ, Friedman HS (2009a) Phase I pharmacokinetic study of the vascular endothelial growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor vatalanib (PTK787) plus imatinib and hydroxyurea for malignant glioma. *Cancer* **115**:2188-2198.
- Reardon DA, Fink KL, Mikkelsen T, Cloughesy TF, O'Neill A, Plotkin S, Glantz M, Ravin P, Raizer JJ, Rich KM, Schiff D, Shapiro WR, Burdette-Radoux S, Dropcho EJ, Wittmer SM, Nippgen J, Picard M, Nabors LB (2008) Randomized phase II study of cilengitide, an integrin-targeting arginine-glycine-aspartic acid peptide, in recurrent glioblastoma multiforme. *Journal of clinical oncology* **26**:5610-5617.
- Reardon DA, Groves MD, Wen PY, Nabors L, Mikkelsen T, Rosenfeld S, Raizer J, Barriuso J, McLendon RE, Suttle AB, Ma B, Curtis CM, Dar MM, de Bono J (2013) A phase I/II trial of pazopanib in combination with lapatinib in adult patients with relapsed malignant glioma. *Clinical cancer research* **19**:900-908.
- Reardon DA, Herndon JE 2nd, Peters K, Desjardins A, Coan A, Lou E, Sumrall A, Turner S, Sathornsumetee S, Rich JN, Boulton S, Lipp ES, Friedman HS, Vredenburgh JJ (2012) Outcome after bevacizumab clinical trial therapy among recurrent grade III malignant glioma patients. *Journal of neuro-oncology* **107**:213-221.
- Reardon DA, Quinn JA, Vredenburgh JJ, Gururangan S, Friedman AH, Desjardins A, Sathornsumetee S, Herndon JE 2nd, Dowell JM, McLendon RE, Provenzale JM, Sampson JH, Smith RP, Swaisland AJ, Ochs JS, Lyons P, Tourt-Uhlig S, Bigner DD, Friedman HS, Rich JN (2006) Phase 1 trial of gefitinib plus sirolimus in adults with recurrent malignant glioma. *Clinical cancer research* **12**:860-868.
- Reardon DA, Vredenburgh JJ, Coan A, Desjardins A, Peters KB, Gururangan S, Sathornsumetee S, Rich JN, Herndon JE 2nd, Friedman HS (2011) Phase I study of sunitinib and irinotecan for patients with recurrent malignant glioma. *Journal of neuro-oncology* **105**:621-627.
- Reaux-Le Goazigo A, Van Steenwinckel J, Rostene W, Melik Parsadaniantz S (2013) Current status of chemokines in the adult CNS. *Progress in neurobiology* **104**:67-92.
- Repacholi MH (2001) Health risks from the use of mobile phones. *Toxicology letters* **120**:323-331.
- Ricci-Vitiani L, Pallini R, Biffoni M, Todaro M, Invernici G, Cenci T, Maira G, Parati EA, Stassi G, Larocca LM, De Maria R (2010) Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* **468**:824-828.

- Rich JN, Reardon DA, Peery T, Dowell JM, Quinn JA, Penne KL, Wikstrand CJ, Van Duyn LB, Dancey JE, McLendon RE, Kao JC, Stenzel TT, Ahmed Rasheed BK, Tourt-Uhlig SE, Herndon JE 2nd, Vredenburgh JJ, Sampson JH, Friedman AH, Bigner DD, Friedman HS (2004) Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology* **22**:133-142.
- Richards AM, Nicholls MG, Lainchbury JG, Fisher S, Yandle TG (2002) Plasma urotensin II in heart failure. *Lancet* **360**:545-546.
- Riemenschneider MJ, Jeuken JW, Wesseling P, Reifenberger G (2010) Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta neuropathologica* **120**:567-584.
- Rivas RJ, Nishioka RS, Bern HA (1986) In vitro effects of somatostatin and urotensin II on prolactin and growth hormone secretion in tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *General and comparative endocrinology* **63**:245-251.
- Rivera E, Arrieta O, Guevara P, Duarte-Rojo A, Sotelo J (2001) AT1 receptor is present in glioma cells; its blockage reduces the growth of rat glioma. *British journal of cancer* **85**:1396-1399.
- Robles Irizarry L, Hambarzumyan D, Nakano I, Gladson CL, Ahluwalia MS (2012) Therapeutic targeting of VEGF in the treatment of glioblastoma. *Expert opinion on therapeutic targets* **16**:973-984.
- Rodriguez FJ, Orr BA, Ligon KL, Eberhart CG (2012) Neoplastic cells are a rare component in human glioblastoma microvasculature. *Oncotarget* **3**:98-106.
- Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne MC, Passirani C, Montero-Menei C, Menei P (2011) The potential of combinations of drug-loaded nanoparticle systems and adult stem cells for glioma therapy. *Biomaterials* **32**:2106-2116.
- Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne MC, Passirani C, Sindji L, Schiller P, Montero-Menei C, Menei P (2010) Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors. *Biomaterials* **31**:8393-8401.
- Rolle K, Nowak S, Wyszko E, Nowak M, Zukiel R, Piestrzeniewicz R, Gawronska I, Barciszewska MZ, Barciszewski J (2010) Promising human brain tumors therapy with interference RNA intervention (iRNAi). *Cancer biology & therapy* **9**:396-406.
- Romanova EV, Sasaki K, Alexeeva V, Vilim FS, Jing J, Richmond TA, Weiss KR, Sweedler JV (2012) Urotensin II in invertebrates: from structure to function in *Aplysia californica*. *PloS one* **7**:e48764.
- Ron E, Modan B, Boice JD, Jr., Alfandary E, Stovall M, Chetrit A, Katz L (1988) Tumors of the brain and nervous system after radiotherapy in childhood. *The New England journal of medicine* **319**:1033-1039.

- Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ (2006) 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **65**:529-539.
- Rooprai HK, Rucklidge GJ, Panou C, Pilkington GJ (2000) The effects of exogenous growth factors on matrix metalloproteinase secretion by human brain tumour cells. *British journal of cancer* **82**:52-55.
- Ross B, McKendy K, Giaid A (2010) Role of urotensin II in health and disease. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* **298**:R1156-1172.
- Rossowski WJ, Cheng BL, Taylor JE, Datta R, Coy DH (2002) Human urotensin II-induced aorta ring contractions are mediated by protein kinase C, tyrosine kinases and Rho-kinase: inhibition by somatostatin receptor antagonists. *European journal of pharmacology* **438**:159-170.
- Rousseau P, Habrand JL, Sarrazin D, Kalifa C, Terrier-Lacombe MJ, Rekecewicz C, Rey A (1994) Treatment of intracranial ependymomas of children: review of a 15-year experience. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **28**:381-386.
- Ruch RJ (1994) The role of gap junctional intercellular communication in neoplasia. *Annals of clinical and laboratory science* **24**:216-231.
- Ruder AM, Waters MA, Butler MA, Carreon T, Calvert GM, Davis-King KE, Schulte PA, Sanderson WT, Ward EM, Connally LB, Heineman EF, Mandel JS, Morton RF, Reding DJ, Rosenman KD, Talaska G, Brain Cancer Collaborative Study G (2004) Gliomas and farm pesticide exposure in men: the upper midwest health study. *Archives of environmental health* **59**:650-657.
- Russell FD, Meyers D, Galbraith AJ, Bett N, Toth I, Kearns P, Molenaar P (2003) Elevated plasma levels of human urotensin-II immunoreactivity in congestive heart failure. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **285**:H1576-1581.
- Russell FD, Molenaar P (2004) Investigation of signaling pathways that mediate the inotropic effect of urotensin-II in human heart. *Cardiovascular research* **63**:673-681.
- Russell FD, Molenaar P, O'Brien DM (2001) Cardiostimulant effects of urotensin-II in human heart in vitro. *British journal of pharmacology* **132**:5-9.

## S

- Sadamori N, Shibata S, Mine M, Miyazaki H, Miyake H, Kurihara M, Tomonaga M, Sekine I, Okumura Y (1996) Incidence of intracranial meningiomas in Nagasaki atomic-bomb survivors. *International journal of cancer* **67**:318-322.

- Saetrum Opgaard O, Nothacker H, Ehlert FJ, Krause DN (2000) Human urotensin II mediates vasoconstriction via an increase in inositol phosphates. *European journal of pharmacology* **406**:265-271.
- Saez ME, Smani T, Ramirez-Lorca R, Diaz I, Serrano-Rios M, Ruiz A, Ordonez A (2011) Association analysis of urotensin II gene (UTS2) and flanking regions with biochemical parameters related to insulin resistance. *PLoS one* **6**:e19327.
- Saharinen P, Eklund L, Pulkki K, Bono P, Alitalo K (2011) VEGF and angiopoietin signaling in tumor angiogenesis and metastasis. *Trends in molecular medicine* **17**:347-362.
- Sainsily X, Cabana J, Holleran BJ, Escher E, Lavigne P, Leduc R (2014) Identification of transmembrane domain 1 & 2 residues that contribute to the formation of the ligand-binding pocket of the urotensin-II receptor. *Biochemical pharmacology* **92**:280-288.
- Salcman M (1980) Glioblastoma multiforme. *The American journal of the medical sciences* **279**:84-94.
- Salcman M (1980) Survival in glioblastoma: historical perspective. *Neurosurgery* **7**:435-439.
- Salhia B, Rutten F, Nakada M, Beaudry C, Berens M, Kwan A, Rutka JT (2005) Inhibition of Rho-kinase affects astrocytoma morphology, motility, and invasion through activation of Rac1. *Cancer research* **65**:8792-8800.
- Salvati M, Caroli E, Rocchi G, Frati A, Brogna C, Orlando ER (2004) Post-traumatic glioma. Report of four cases and review of the literature. *Tumori* **90**:416-419.
- Salvucci O, Tosato G (2012) Essential roles of EphB receptors and EphrinB ligands in endothelial cell function and angiogenesis. *Advances in cancer research* **114**:21-57.
- Sauzeau V, Le Mellionec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P, Loirand G (2001) Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circulation research* **88**:1102-1104.
- Scatena R (2000) Prinomastat, a hydroxamate-based matrix metalloproteinase inhibitor. A novel pharmacological approach for tissue remodelling-related diseases. *Expert opinion on investigational drugs* **9**:2159-2165.
- Schulte A, Liffers K, Kathagen A, Riethdorf S, Zapf S, Merlo A, Kolbe K, Westphal M, Lamszus K (2013) Erlotinib resistance in EGFR-amplified glioblastoma cells is associated with upregulation of EGFRvIII and PI3Kp110delta. *Neuro-oncology* **15**:1289-1301.
- Scott BJ, Quant EC, McNamara MB, Ryg PA, Batchelor TT, Wen PY (2010) Bevacizumab salvage therapy following progression in high-grade glioma patients treated with VEGF receptor tyrosine kinase inhibitors. *Neuro-oncology* **12**:603-607.

- Segain JP, Rolli-Derkinderen M, Gervois N, Raingeard de la Bletiere D, Loirand G, Pacaud P (2007) Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *Journal of immunology* **179**:901-909.
- Segarra M, Ohnuki H, Maric D, Salvucci O, Hou X, Kumar A, Li X, Tosato G (2012) Semaphorin 6A regulates angiogenesis by modulating VEGF signaling. *Blood* **120**:4104-4115.
- Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nature reviews Cancer* **3**:721-732.
- Shao G, Zhou Y, Wang F, Liu S (2013) Monitoring glioma growth and tumor necrosis with the U-SPECT-II/CT scanner by targeting integrin alphavbeta3. *Molecular imaging* **12**:39-48.
- Sharma A, Walters J, Gozes Y, Fridkin M, Brenneman D, Gozes I, Moody TW (2001) A vasoactive intestinal peptide antagonist inhibits the growth of glioblastoma cells. *Journal of molecular neuroscience* **17**:331-339.
- Shenouda A, Douglas SA, Ohlstein EH, Giaid A (2002) Localization of urotensin-II immunoreactivity in normal human kidneys and renal carcinoma. *The journal of histochemistry and cytochemistry* **50**:885-889.
- Shi L, Ding W, Li D, Wang Z, Jiang H, Zhang J, Tang C (2006) Proliferation and anti-apoptotic effects of human urotensin II on human endothelial cells. *Atherosclerosis* **188**:260-264.
- Shi XD, Li ZL, Wu HC, Lu YH, Wang TH, Fu Q, Xu CS, Tang CS (2005) [Effect of urotensin II on secretion of adrenomedullin from human vascular endothelial cells]. *Chinese journal of cardiovascular diseases* **33**:836-839.
- Shi XD, Li ZL, Wu HC, Wang TH, Fu Q, Yan QN, Tang CS (2005) [Mechanism of urotensin II-stimulated adrenomedullin secretion in human vascular endothelial cells]. *Academic journal of the first medical college of PLA* **25**:791-793.
- Shi Y, Cao YX, Lu N, Yao T, Zhu YC (2008) Hemodynamic-independent anti-natriuretic effect of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Peptides* **29**:783-794.
- Shintani T, Hayakawa N, Hoshi M, Sumida M, Kurisu K, Oki S, Kodama Y, Kajikawa H, Inai K, Kamada N (1999) High incidence of meningioma among Hiroshima atomic bomb survivors. *Journal of radiation research* **40**:49-57.
- Shiraishi Y, Watanabe T, Suguro T, Nagashima M, Kato R, Hongo S, Itabe H, Miyazaki A, Hirano T, Adachi M (2008) Chronic urotensin II infusion enhances macrophage foam cell formation and atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Journal of hypertension* **26**:1955-1965.
- Shyu KG, Wang BW, Chen WJ, Kuan P, Lin CM (2012) Angiotensin II mediates urotensin II expression by hypoxia in cultured cardiac fibroblast. *European journal of clinical investigation* **42**:17-26.

- Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P (2006) Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *European journal of cancer* **42**:717-727.
- Sidharta PN, Rave K, Heinemann L, Chiossi E, Krahenbuhl S, Dingemans J (2009) Effect of the urotensin-II receptor antagonist palosuran on secretion of and sensitivity to insulin in patients with Type 2 diabetes mellitus. *British journal of clinical pharmacology* **68**:502-510.
- Sidharta PN, Wagner FD, Bohnemeier H, Jungnik A, Halabi A, Krahenbuhl S, Chadha-Boreham H, Dingemans J (2006) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of the urotensin II receptor antagonist palosuran in macroalbuminuric, diabetic patients. *Clinical pharmacology and therapeutics* **80**:246-256.
- Silvestre RA, Egidio EM, Hernandez R, Leprince J, Chatenet D, Tollemer H, Chartrel N, Vaudry H, Marco J (2004) Urotensin-II is present in pancreatic extracts and inhibits insulin release in the perfused rat pancreas. *European journal of endocrinology* **151**:803-809.
- Silvestre RA, Egidio EM, Hernandez R, Marco J (2009) Characterization of the insulinostatic effect of urotensin II: a study in the perfused rat pancreas. *Regulatory peptides* **153**:37-42.
- Silvestre RA, Rodriguez-Gallardo J, Egidio EM, Marco J (2001) Inhibition of insulin release by urotensin II--a study on the perfused rat pancreas. *Hormone and metabolic research* **33**:379-381.
- Solomon MT, Selva JC, Figueredo J, Vaquer J, Toledo C, Quintanal N, Salva S, Dominguez R, Alert J, Marinello JJ, Catala M, Griego MG, Martell JA, Luaces PL, Ballesteros J, de-Castro N, Bach F, Crombet T (2013) Radiotherapy plus nimotuzumab or placebo in the treatment of high grade glioma patients: results from a randomized, double blind trial. *BMC cancer* **13**:299.
- Song H, Li Y, Lee J, Schwartz AL, Bu G (2009) Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 promotes cancer cell migration and invasion by inducing the expression of matrix metalloproteinases 2 and 9. *Cancer research* **69**:879-886.
- Song N, Ding W, Chu S, Zhao J, Dong X, Di B, Tang C (2012) Urotensin II stimulates vascular endothelial growth factor secretion from adventitial fibroblasts in synergy with angiotensin II. *Circulation journal* **76**:1267-1273.
- Song W, Abdel-Razik AE, Lu W, Ao Z, Johns DG, Douglas SA, Balment RJ, Ashton N (2006) Urotensin II and renal function in the rat. *Kidney international* **69**:1360-1368.
- Song W, McDonald J, Camarda V, Calo G, Guerrini R, Marzola E, Thompson JP, Rowbotham DJ, Lambert DG (2006) Cell and tissue responses of a range of Urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **373**:148-157.

- Soni H, Adebisi A (2013) Pressor and renal regional hemodynamic effects of urotensin II in neonatal pigs. *The Journal of endocrinology* **217**:317-326.
- Soroceanu L, Manning TJ Jr, Sontheimer H (2001) Reduced expression of connexin-43 and functional gap junction coupling in human gliomas. *Glia* **33**:107-117.
- Spinazzi R, Albertin G, Nico B, Guidolin D, Di Liddo R, Rossi GP, Ribatti D, Nussdorfer GG (2006) Urotensin-II and its receptor (UT-R) are expressed in rat brain endothelial cells, and urotensin-II via UT-R stimulates angiogenesis in vivo and in vitro. *International journal of molecular medicine* **18**:1107-1112.
- Stevens MF, Hickman JA, Langdon SP, Chubb D, Vickers L, Stone R, Baig G, Goddard C, Gibson NW, Slack JA, Newton C, Lunt E, Fizames C, Lavelle F (1987) Antitumor activity and pharmacokinetics in mice of 8-carbamoyl-3-methyl-imidazo[5,1-d]-1,2,3,5-tetrazin-4(3H)-one (CCRG 81045; M & B 39831), a novel drug with potential as an alternative to dacarbazine. *Cancer research* **47**:5846-5852.
- Stewart LA (2002) Chemotherapy in adult high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis of individual patient data from 12 randomised trials. *Lancet* **359**:1011-1018.
- Stirrat A, Gallagher M, Douglas SA, Ohlstein EH, Berry C, Kirk A, Richardson M, MacLean MR (2001) Potent vasodilator responses to human urotensin-II in human pulmonary and abdominal resistance arteries. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **280**:H925-928.
- Stiver SI (2004) Angiogenesis and its role in the behavior of astrocytic brain tumors. *Frontiers in bioscience* **9**:3105-3123.
- Stupp R, Hegi ME, Neyns B, Goldbrunner R, Schlegel U, Clement PM, Grabenbauer GG, Ochsenbein AF, Simon M, Dietrich PY, Pietsch T, Hicking C, Tonn JC, Diserens AC, Pica A, Hermisson M, Krueger S, Picard M, Weller M (2010) Phase I/IIa study of cilengitide and temozolomide with concomitant radiotherapy followed by cilengitide and temozolomide maintenance therapy in patients with newly diagnosed glioblastoma. *Journal of clinical oncology* **28**:2712-2718.
- Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor Working Group, National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group (2005) Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* **352**:987-996.
- Sue YM, Chen CH, Hsu YH, Hou CC, Cheng CY, Chen YC, Lin SL, Chen TW, Chen TH (2009) Urotensin II induces transactivation of the epidermal growth factor receptor via transient oxidation of SHP-2 in the rat renal tubular cell line NRK-52E. *Growth factors* **27**:155-162.

- Sugo T, Mori M (2008) Another ligand fishing for G protein-coupled receptor 14. Discovery of urotensin II-related peptide in the rat brain. *Peptides* **29**:809-812.
- Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, Kitada C, Miyajima N, Suzuki N, Mori M, Fujino M (2003) Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochemical and biophysical research communications* **310**:860-868.
- Suguro T, Watanabe T, Ban Y, Kodate S, Misaki A, Hirano T, Miyazaki A, Adachi M (2007) Increased human urotensin II levels are correlated with carotid atherosclerosis in essential hypertension. *American journal of hypertension* **20**:211-217.
- Suguro T, Watanabe T, Kodate S, Xu G, Hirano T, Adachi M, Miyazaki A (2008) Increased plasma urotensin-II levels are associated with diabetic retinopathy and carotid atherosclerosis in Type 2 diabetes. *Clinical science* **115**:327-334.
- Sun DJ, Yang JP, Sun YH (2006) [The expression and significance of urotensin II, nitric oxide, and C-type natriuretic peptide in hypoxia-induced pulmonary hypertension in rats]. *Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases* **29**:185-188.
- Suzuki S, Wenyi Z, Hirai M, Hinokio Y, Suzuki C, Yamada T, Yoshizumi S, Suzuki M, Tanizawa Y, Matsutani A, Oka Y (2004) Genetic variations at urotensin II and urotensin II receptor genes and risk of type 2 diabetes mellitus in Japanese. *Peptides* **25**:1803-1808.

## T

- Tabatabai G, Tonn JC, Stupp R, Weller M (2011) The role of integrins in glioma biology and anti-glioma therapies. *Current pharmaceutical design* **17**:2402-2410.
- Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Noshiro T, Hayashi Y, Shibahara S (2003) Expression of urotensin II and its receptor in adrenal tumors and stimulation of proliferation of cultured tumor cells by urotensin II. *Peptides* **24**:301-306.
- Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Shibahara S (2001) Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells. *Peptides* **22**:1175-1179.
- Takei H, Yogeswaren ST, Wong KK, Mehta V, Chintagumpala M, Dauser RC, Lau CC, Adesina AM (2008) Expression of oligodendroglial differentiation markers in pilocytic astrocytomas identifies two clinical subsets and shows a significant correlation with proliferation index and progression free survival. *Journal of neuro-oncology* **86**:183-190.
- Tal M, Ammar DA, Karpuj M, Krizhanovsky V, Naim M, Thompson DA (1995) A novel putative neuropeptide receptor expressed in neural tissue, including sensory epithelia. *Biochemical and biophysical research communications* **209**:752-759.



- Tamura K, Okazaki M, Tamura M, Isozumi K, Tasaki H, Nakashima Y (2003) Urotensin II-induced activation of extracellular signal-regulated kinase in cultured vascular smooth muscle cells: involvement of cell adhesion-mediated integrin signaling. *Life sciences* **72**:1049-1060.
- Tasaki K, Hori M, Ozaki H, Karaki H, Wakabayashi I (2004) Mechanism of human urotensin II-induced contraction in rat aorta. *Journal of pharmacological sciences* **94**:376-383.
- Tate MC, Aghi MK (2009) Biology of angiogenesis and invasion in glioma. *Neurotherapeutics* **6**:447-457.
- Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Eckhardt SG (2012) Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nature reviews Clinical oncology* **9**:338-350.
- Testori J, Schweighofer B, Helfrich I, Sturtzel C, Lipnik K, Gesierich S, Nasarre P, Hofer-Warbinek R, Bilban M, Augustin HG, Hofer E (2011) The VEGF-regulated transcription factor HLX controls the expression of guidance cues and negatively regulates sprouting of endothelial cells. *Blood* **117**:2735-2744.
- Thompson JP, Watt P, Sanghavi S, Strupish JW, Lambert DG (2003) A comparison of cerebrospinal fluid and plasma urotensin II concentrations in normotensive and hypertensive patients undergoing urological surgery during spinal anesthesia: a pilot study. *Anesthesia and analgesia* **97**:1501-1503.
- Tian L, Li C, Qi J, Fu P, Yu X, Li X, Cai L (2008) Diabetes-induced upregulation of urotensin II and its receptor plays an important role in TGF-beta1-mediated renal fibrosis and dysfunction. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* **295**:E1234-1242.
- Tivnan A, Orr WS, Gubala V, Nooney R, Williams DE, McDonagh C, Prenter S, Harvey H, Domingo-Fernandez R, Bray IM, Piskareva O, Ng CY, Lode HN, Davidoff AM, Stallings RL (2012) Inhibition of neuroblastoma tumor growth by targeted delivery of microRNA-34a using anti-disialoganglioside GD2 coated nanoparticles. *PloS one* **7**:e38129.
- Todaro L, Christiansen S, Varela M, Campodonico P, Pallotta MG, Lastiri J, Sacerdote de Lustig E, Bal de Kier Joffe E, Puricelli L (2007) Alteration of serum and tumoral neural cell adhesion molecule (NCAM) isoforms in patients with brain tumors. *Journal of neuro-oncology* **83**:135-144.
- Tolcher AW, Gerson SL, Denis L, Geyer C, Hammond LA, Patnaik A, Goetz AD, Schwartz G, Edwards T, Reyderman L, Statkevich P, Cutler DL, Rowinsky EK (2003) Marked inactivation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity with protracted temozolomide schedules. *British journal of cancer* **88**:1004-1011.
- Tomassetti P, Migliori M, Lalli S, Campana D, Tomassetti V, Corinaldesi R (2001) Epidemiology, clinical features and diagnosis of gastroenteropancreatic endocrine tumours. *Annals of oncology* **12** Suppl **2**:S95-99.

- Tostivint H, Lihrmann I, Vaudry H (2006) [Urotensin II and somatostatin: two old cousins get together again]. *Medecine sciences* **22**:476-478.
- Tostivint H, Ocampo Daza D, Bergqvist CA, Quan FB, Bougerol M, Lihrmann I, Larhammar D (2014) Molecular evolution of GPCRs: Somatostatin/urotensin II receptors. *Journal of molecular endocrinology* **52**:T61-86.
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Ito S, Murakami O (2003) Increased plasma urotensin II levels in patients with diabetes mellitus. *Clinical science* **104**:1-5.
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Murakami O, Ito S, Kikuya M, Ohkubo T, Hashimoto J, Imai Y (2004) Elevated plasma levels of immunoreactive urotensin II and its increased urinary excretion in patients with Type 2 diabetes mellitus: association with progress of diabetic nephropathy. *Peptides* **25**:1809-1814.
- Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, Kimura Y, Sasano H, Murakami O (2001) Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet* **358**:810-811.
- Trebicka J, Leifeld L, Hennenberg M, Biecker E, Eckhardt A, Fischer N, Probsting AS, Clemens C, Lammert F, Sauerbruch T, Heller J (2008) Hemodynamic effects of urotensin II and its specific receptor antagonist palosuran in cirrhotic rats. *Hepatology* **47**:1264-1276.
- Tsai CS, Loh SH, Liu JC, Lin JW, Chen YL, Chen CH, Cheng TH (2009) Urotensin II-induced endothelin-1 expression and cell proliferation via epidermal growth factor receptor transactivation in rat aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis* **206**:86-94.
- Tsuzuki T, Izumoto S, Ohnishi T, Hiraga S, Arita N, Hayakawa T (1998) Neural cell adhesion molecule L1 in gliomas: correlation with TGF-beta and p53. *Journal of clinical pathology* **51**:13-17.
- Tzanidis A, Hannan RD, Thomas WG, Onan D, Autelitano DJ, See F, Kelly DJ, Gilbert RE, Krum H (2003) Direct actions of urotensin II on the heart: implications for cardiac fibrosis and hypertrophy. *Circulation research* **93**:246-253.

## U

- Uhm JH, Ballman KV, Wu W, Giannini C, Krauss JC, Buckner JC, James CD, Scheithauer BW, Behrens RJ, Flynn PJ, Schaefer PL, Dakhill SR, Jaeckle KA (2011) Phase II evaluation of gefitinib in patients with newly diagnosed Grade 4 astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074. *International journal of radiation oncology, biology, physics* **80**:347-353.
- Uhrbom L, Kastemar M, Johansson FK, Westermarck B, Holland EC (2005) Cell type-specific tumor suppression by Ink4a and Arf in Kras-induced mouse gliomagenesis. *Cancer research* **65**:2065-2069.

Ulas T, Tursun I, Dal MS, Demir ME, Kaya Z (2013) A forgotten vasoconstrictive peptide in the pathogenesis of contrast induced nephropathy: urotensin-II. *International journal of cardiology* **166**:258.

Ulasov I, Thaci B, Sarvaiya P, Yi R, Guo D, Auffinger B, Pytel P, Zhang L, Kim CK, Borovjagin A, Dey M, Han Y, Baryshnikov AY, Lesniak MS (2013) Inhibition of MMP14 potentiates the therapeutic effect of temozolomide and radiation in gliomas. *Cancer medicine* **2**:457-467.

Utsuki S, Sato Y, Oka H, Tsuchiya B, Suzuki S, Fujii K (2002) Relationship between the expression of E-, N-cadherins and beta-catenin and tumor grade in astrocytomas. *Journal of neuro-oncology* **57**:187-192.

## V

Vartanian A, Singh SK, Agnihotri S, Jalali S, Burrell K, Aldape KD, Zadeh G (2014) GBM's multifaceted landscape: highlighting regional and microenvironmental heterogeneity. *Neuro-oncology* **16**:1167-1175.

Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989) Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer research* **49**:6449-6465.

Vavere AL, Rossin R (2012) Molecular imaging of cancer with radiolabeled peptides and PET. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry* **12**:462-475.

Verdegem D, Moens S, Stapor P, Carmeliet P (2014) Endothelial cell metabolism: parallels and divergences with cancer cell metabolism. *Cancer & metabolism* **2**:19.

Vergura R, Camarda V, Rizzi A, Spagnol M, Guerrini R, Calo G, Salvadori S, Regoli D (2004) Urotensin II stimulates plasma extravasation in mice via UT receptor activation. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* **370**:347-352.

Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP, Alexe G, Lawrence M, O'Kelly M, Tamayo P, Weir BA, Gabriel S, Winckler W, Gupta S, Jakkula L, Feiler HS, Hodgson JG, James CD, Sarkaria JN, Brennan C, Kahn A, Spellman PT, Wilson RK, Speed TP, Gray JW, Meyerson M, Getz G, Perou CM, Hayes DN, Cancer Genome Atlas Research N (2010) Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell* **17**:98-110.

Virchow R (1858) Cellular pathology. As based upon physiological and pathological histology. Lecture XVI--Atheromatous affection of arteries. 1858. *Nutrition reviews* **47**:23-25.

Vogt L, Chiurchiu C, Chadha-Boreham H, Danaietash P, Dingemans J, Hadjadj S, Krum H, Navis G, Neuhart E, Parvanova AI, Ruggenenti P, Woittiez AJ, Zimlichman R, Remuzzi G, de Zeeuw D, Group PS (2010) Effect of the urotensin receptor antagonist palosuran in hypertensive patients with type 2 diabetic nephropathy. *Hypertension* **55**:1206-1209.

## W

Wang H, Dong K, Xue X, Feng P, Wang X (2011) Elevated expression of urotensin II and its receptor in diethylnitrosamine-mediated precancerous lesions in rat liver. *Peptides* **32**:382-387.

Wang H, Wang H, Shen W, Huang H, Hu L, Ramdas L, Zhou YH, Liao WS, Fuller GN, Zhang W (2003) Insulin-like growth factor binding protein 2 enhances glioblastoma invasion by activating invasion-enhancing genes. *Cancer research* **63**:4315-4321.

Wang HX, Zeng XJ, Liu Y, Wang J, Lu LQ, Hao G, Zhang LK, Tang CS (2009) Elevated expression of urotensin II and its receptor in skeletal muscle of diabetic mouse. *Regulatory peptides* **154**:85-90.

Wang Y, Guan S, Zhao G, Shi P, Wang J (2014) [Expressions of aquaporin-4, matrix metallo-proteinase-2 and matrix metallo-proteinase-14 in peritumor edematous zone of glioma and clinical implications]. *Journal of the chinese medical association* **94**:2290-2292.

Wang Y, Nakayama M, Pitulescu ME, Schmidt TS, Bochenek ML, Sakakibara A, Adams S, Davy A, Deutsch U, Luthi U, Barberis A, Benjamin LE, Makinen T, Nobes CD, Adams RH (2010) Ephrin-B2 controls VEGF-induced angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature* **465**:483-486.

Wang YX, Ding YJ, Zhu YZ, Shi Y, Yao T, Zhu YC (2007) Role of PKC in the novel synergistic action of urotensin II and angiotensin II and in urotensin II-induced vasoconstriction. *American journal of physiology heart and circulatory physiology* **292**:H348-359.

Watanabe A, Mabuchi T, Satoh E, Furuya K, Zhang L, Maeda S, Naganuma H (2006) Expression of syndecans, a heparan sulfate proteoglycan, in malignant gliomas: participation of nuclear factor-kappaB in upregulation of syndecan-1 expression. *Journal of neuro-oncology* **77**:25-32.

Watanabe T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR (2001) Synergistic effect of urotensin II with serotonin on vascular smooth muscle cell proliferation. *Journal of hypertension* **19**:2191-2196.

Watanabe T, Suguro T, Kanome T, Sakamoto Y, Kodate S, Hagiwara T, Hongo S, Hirano T, Adachi M, Miyazaki A (2005) Human urotensin II accelerates foam cell formation in human monocyte-derived macrophages. *Hypertension* **46**:738-744.

- Watson AM, Lambert GW, Smith KJ, May CN (2003) Urotensin II acts centrally to increase epinephrine and ACTH release and cause potent inotropic and chronotropic actions. *Hypertension* **42**:373-379.
- Waugh D, Youson J, Mims SD, Sower S, Conlon JM (1995) Urotensin II from the river lamprey (*Lampetra fluviatilis*), the sea lamprey (*Petromyzon marinus*), and the paddlefish (*Polyodon spathula*). *General and comparative endocrinology* **99**:323-332.
- Welti J, Loges S, Dimmeler S, Carmeliet P (2013) Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *The Journal of clinical investigation* **123**:3190-3200.
- Wen PY, Kesari S (2008) Malignant gliomas in adults. *The New England journal of medicine* **359**:492-507.
- Werner A, Modan B, Davidoff D (1968) Doses to brain, skull and thyroid, following x-ray therapy for Tinea capitis. *Physics in medicine and biology* **13**:247-258.
- Wick W, Platten M, Weller M (2001) Glioma cell invasion: regulation of metalloproteinase activity by TGF-beta. *Journal of neuro-oncology* **53**:177-185.
- Wiencke JK, Aldape K, McMillan A, Wiemels J, Moghadassi M, Miike R, Kelsey KT, Patoka J, Long J, Wrensch M (2005) Molecular features of adult glioma associated with patient race/ethnicity, age, and a polymorphism in O6-methylguanine-DNA-methyltransferase. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention* **14**:1774-1783.
- Wilding JL, Bodmer WF (2014) Cancer cell lines for drug discovery and development. *Cancer research* **74**:2377-2384.
- Wooten EC, Fults D, Duggirala R, Williams K, Kyritsis AP, Bondy ML, Levin VA, O'Connell P (1999) A study of loss of heterozygosity at 70 loci in anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme with implications for tumor evolution. *Neuro-oncology* **1**:169-176.
- Wright JL, Merchant RE (1997) Effects of an intratumoral injection of human recombinant tumor necrosis factor-alpha on cerebrovascular permeability and leukocytic infiltration in a rat glioma model. *Acta neuropathologica* **93**:78-86.
- Wu YQ, Song Z, Zhou CH, Xing SH, Pei DS, Zheng JN (2010) Expression of urotensin II and its receptor in human lung adenocarcinoma A549 cells and the effect of urotensin II on lung adenocarcinoma growth in vitro and in vivo. *Oncology reports* **24**:1179-1184.

## X

- Xu J, Rodriguez D, Petitclerc E, Kim JJ, Hangai M, Moon YS, Davis GE, Brooks PC (2001) Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *The Journal of cell biology* **154**:1069-1079.

Xu S, Jiang H, Wu B, Yang J, Chen S (2009) Urotensin II induces migration of endothelial progenitor cells via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *The Tohoku journal of experimental medicine* **219**:283-288.

Xu S, Wen H, Jiang H (2012) Urotensin II promotes the proliferation of endothelial progenitor cells through p38 and p44/42 MAPK activation. *Molecular medicine reports* **6**:197-200.

## Y

Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD (2009) IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine* **360**:765-773.

Yang L, Lin C, Wang L, Guo H, Wang X (2012) Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications. *Experimental cell research* **318**:2417-2426.

Yang M, Adla S, Temburni MK, Patel VP, Lagow EL, Brady OA, Tian J, Boulos MI, Galileo DS (2009) Stimulation of glioma cell motility by expression, proteolysis, and release of the L1 neural cell recognition molecule. *Cancer cell international* **9**:27.

Yang Y, Sun M, Wang L, Jiao B (2013) HIFs, angiogenesis, and cancer. *Journal of cellular biochemistry* **114**:967-974.

Yano K, Hicks JW, Vaudry H, Conlon JM (1995) Cardiovascular actions of frog urotensin II in the frog, *Rana catesbeiana*. *General and comparative endocrinology* **97**:103-110.

Yi K, Yu M, Wu L, Tan X (2012) Effects of urotensin II on functional activity of late endothelial progenitor cells. *Peptides* **33**:87-91.

Yongjun Y, Shuyun H, Lei C, Xiangrong C, Zhilin Y, Yiquan K (2013) Atorvastatin suppresses glioma invasion and migration by reducing microglial MT1-MMP expression. *Journal of neuroimmunology* **260**:1-8.

You WK, McDonald DM (2008) The hepatocyte growth factor/c-Met signaling pathway as a therapeutic target to inhibit angiogenesis. *BMB reports* **41**:833-839.

Yue WY, Chen ZP (2005) Does vasculogenic mimicry exist in astrocytoma? *The journal of histochemistry and cytochemistry* **53**:997-1002.

Yulis CR, Lederis K (1986) Extraurophyseal distribution of urotensin II immunoreactive neuronal perikarya and their processes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**:7079-7083.

Yung WK, Albright RE, Olson J, Fredericks R, Fink K, Prados MD, Brada M, Spence A, Hohl RJ, Shapiro W, Glantz M, Greenberg H, Selker RG, Vick NA, Rampling R, Friedman H, Phillips P, Bruner J, Yue N, Osoba D, Zaknoen S, Levin VA (2000) A phase II study of temozolomide vs. procarbazine in patients with glioblastoma multiforme at first relapse. *British journal of cancer* **83**:588-593.

Yurchenco PD (2011) Basement membranes: cell scaffoldings and signaling platforms. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**.

Yust-Katz S, Liu D, Yuan Y, Liu V, Kang S, Groves M, Puduvalli V, Levin V, Conrad C, Colman H, Hsu S, Yung WK, Gilbert MR (2013) Phase 1/1b study of lonafarnib and temozolomide in patients with recurrent or temozolomide refractory glioblastoma. *Cancer* **119**:2747-2753.

## Z

Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW (2006) Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Laboratory investigation* **86**:1221-1232.

Zagzag D, Zhong H, Scalzitti JM, Laughner E, Simons JW, Semenza GL (2000) Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in brain tumors: association with angiogenesis, invasion, and progression. *Cancer* **88**:2606-2618.

Zeng ZP, Liu GQ, Li HZ, Fan XR, Liu DM, Tong AL, Zheng X, Liu C (2006) The effects of urotensin-II on proliferation of pheochromocytoma cells and mRNA expression of urotensin-II and its receptor in pheochromocytoma tissues. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1073**:284-289.

Zetter BR (1998) Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual review of medicine* **49**:407-424.

Zhang AY, Chen YF, Zhang DX, Yi FX, Qi J, Andrade-Gordon P, de Garavilla L, Li PL, Zou AP (2003) Urotensin II is a nitric oxide-dependent vasodilator and natriuretic peptide in the rat kidney. *American journal of physiology. Renal physiology* **285**:F792-798.

Zhang J, Yang J, Liu Y (2008a) Role of Bcl-xL induction in HGF-mediated renal epithelial cell survival after oxidant stress. *International journal of clinical and experimental pathology* **1**:242-253.

Zhang WX, Liang YF, Wang XM, Nie Y, Chong L, Lin L, Chen C, Li CC (2012) Urotensin upregulates transforming growth factor-beta1 expression of asthma airway through ERK-dependent pathway. *Molecular and cellular biochemistry* **364**:291-298.

Zhang Y, Bao S, Kuang Z, Ma Y, Hu Y, Mao Y (2014) Urotensin II promotes monocyte chemoattractant protein-1 expression in aortic adventitial fibroblasts of rat. *Chinese medical journal* **127**:1907-1912.

- Zhang Y, Li J, Cao J, Chen J, Yang J, Zhang Z, Du J, Tang C (2002) Effect of chronic hypoxia on contents of urotensin II and its functional receptors in rat myocardium. *Heart and vessels* **16**:64-68.
- Zhang YG, Kuang ZJ, Mao YY, Wei RH, Bao SL, Wu LB, Li YG, Tang CS (2011) Osteopontin is involved in urotensin II-induced migration of rat aortic adventitial fibroblasts. *Peptides* **32**:2452-2458.
- Zhang YG, Li J, Li YG, Wei RH (2008b) Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta. *Journal of hypertension* **26**:1119-1126.
- Zhang YG, Li YG, Liu BG, Wei RH, Wang DM, Tan XR, Bu DF, Pang YZ, Tang CS (2007) Urotensin II accelerates cardiac fibrosis and hypertrophy of rats induced by isoproterenol. *Acta pharmacologica Sinica* **28**:36-43.
- Zhao D, Alizadeh D, Zhang L, Liu W, Farrukh O, Manuel E, Diamond DJ, Badie B (2011) Carbon nanotubes enhance CpG uptake and potentiate antiglioma immunity. *Clinical cancer research* **17**:771-782.
- Zhao J, Xie LD, Song CJ, Mao XX, Yu HR, Yu QX, Ren LQ, Shi Y, Xie YQ, Li Y, Liu SS, Yang XH (2014) Urotensin II improves atherosclerosis by controlling C-reactive protein, monocyte chemoattractant protein-1 and transforming growth factor-beta expression in rats. *Experimental and therapeutic medicine* **7**:1647-1652.
- Zhao Y, Dong J, Huang Q, Lou M, Wang A, Lan Q (2010) Endothelial cell transdifferentiation of human glioma stem progenitor cells in vitro. *Brain research bulletin* **82**:308-312.
- Zhou CH, Wan YY, Chu XH, Song Z, Xing SH, Wu YQ, Yin XX (2012) Urotensin II contributes to the formation of lung adenocarcinoma inflammatory microenvironment through the NF-kappaB pathway in tumor-bearing nude mice. *Oncology letters* **4**:1259-1263.
- Zhou HY, Pon YL, Wong AS (2008) HGF/MET signaling in ovarian cancer. *Current molecular medicine* **8**:469-480.
- Zhu YZ, Wang ZJ, Zhu YC, Zhang L, Oakley RM, Chung CW, Lim KW, Lee HS, Ozoux ML, Linz W, Bohm M, Kostenis E (2004) Urotensin II causes fatal circulatory collapse in anesthetized monkeys in vivo: a "vasoconstrictor" with a unique hemodynamic profile. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* **286**:H830-836.
- Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW, Nayler O (2002) Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *Journal of receptor and signal transduction research* **22**:155-168.



Zoccali C, Mallamaci F, Tripepi G, Cutrupi S, Pizzini P, Malatino L (2006) Urotensin II is an inverse predictor of incident cardiovascular events in end-stage renal disease. *Kidney international* **69**:1253-1258.

# **Publications annexes**



## Publications annexes

**1. Neuroprotective effects of PACAP against ethanol-induced toxicity in the developing rat cerebellum.**

Botia B, Jolivel V, Burel D, Le Joncour V, Roy V, Naassila M, Bénard M, Fournier A, Vaudry H and Vaudry D (2011). *Neurotox Res.* 19(3):423-34.

**2. Synthesis and biological evaluation of a novel (99m)Tc labeled 2-nitroimidazole derivative as a potential agent for imaging tumor hypoxia.**

Joyard Y, Le Joncour V, Castel H, Diouf CB, Bischoff L, Papamicaël C, Levacher V, Vera P and Bohn P (2013). *Bioorg Med Chem Lett.* 23(13):3704-8.

**3. Synthesis, biological evaluation, and in vivo imaging of the first camptothecin-fluorescein conjugate.**

Chevalier A, Dubois M, Le Joncour V, Dautrey S, Lecointre C, Romieu A, Renard PY, Castel H and Sabot C (2013). *Bioconjug Chem.* 24(7):1119-33.

**4. Impact of meriolins, a new class of cyclin-dependent kinase inhibitors, on malignant glioma proliferation and neo-angiogenesis.**

Jarry M, Lecointre C, Malleval C, Desrues L, Schouft MT, Lejoncour V, Liger F, Lyvinec G, Joseph B, Loaëc N, Meijer L, Honnorat J, Gandolfo P and Castel H (2014). *Neuro Oncol.* 16(11):1484-98.

**5. Evaluation of the impact of the cancer therapy everolimus on the central nervous system in mice.**

Dubois M, Le Joncour V, Tonon MC, Anouar Y, Proust F, Morin F, Gandolfo P, Joly F, Hilber P and Castel H (2014). *PLoS One.* 9(12):e113533.

**6. Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: Prototypic chemotaxic mechanism in glioma.**

Lecointre C, Desrues L, Joubert JE, Perzo N, Guichet PO, Le Joncour V, Brulé C, Chabbert M, Leduc R, Prézeau L, Laquerrière A, Proust F, Gandolfo P, Morin F and Castel H (2014). *Oncogene*, in press.



# Neuroprotective Effects of PACAP Against Ethanol-Induced Toxicity in the Developing Rat Cerebellum

Béatrice Botia · Valérie Jolivel · Delphine Burel · Vadim Le Joncour · Vincent Roy · Mickael Naassila · Magalie Bénard · Alain Fournier · Hubert Vaudry · David Vaudry

Received: 14 December 2009 / Revised: 25 February 2010 / Accepted: 27 March 2010 / Published online: 27 April 2010  
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

**Abstract** The developing rat cerebellum is particularly sensitive to alcohol at the end of the first postnatal week, a period of intense neurogenesis. The neuropeptide Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) has previously been shown to prevent the death of cultured neurons in vitro. We have thus investigated the capacity of PACAP to counteract ethanol toxicity in 8-day-old rats. Behavioral studies revealed that PACAP reduces the deleterious action of alcohol in the negative geotaxis test. Administration of ethanol induced a transient increase of the expression of pro-apoptotic genes including *c-jun* or *caspase-3*, which could be partially blocked by PACAP. Alcohol inhibited the expression of the  $\alpha 6$  *GABA<sub>A</sub>* subunit while PACAP increased *neuroD2* mRNA level, two markers of neuronal differentiation. Although gene regulations occurred rapidly, a third injection of ethanol was required to strongly reduce the number of granule cells in

the internal granule cell layer, an effect which was totally blocked by PACAP. The action of PACAP was mimicked by D-JNKi1 and Z-VAD-FMK, indicating the involvement of the jun and caspase-3 pathways in alcohol toxicity. The present data demonstrate that PACAP can counteract in vivo the deleterious effect of ethanol. The beneficial action of PACAP on locomotor activity precedes its activity on cell survival, indicating that PACAP can block the detrimental action of ethanol on cell differentiation.

**Keywords** PACAP · Ethanol · Cerebellum · Cell death · Differentiation

## Abbreviations

EGL External granule cell layer  
FAS Fetal alcohol syndrome

B. Botia · V. Jolivel · D. Burel · V. Le Joncour · H. Vaudry · D. Vaudry (✉)  
INSERM U982, DC2N, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France  
e-mail: david.vaudry@univ-rouen.fr

B. Botia · V. Jolivel · D. Burel · V. Le Joncour · V. Roy · H. Vaudry · D. Vaudry  
IFRMP23, European Institute for Peptide Research, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

B. Botia · V. Jolivel · D. Burel · V. Le Joncour · A. Fournier · H. Vaudry · D. Vaudry  
International Associated Laboratory Samuel De Champlain, Mont-Saint-Aignan, France

B. Botia · V. Jolivel · D. Burel · V. Le Joncour · A. Fournier · H. Vaudry · D. Vaudry  
International Associated Laboratory Samuel De Champlain, Pointe-Claire, QC, Canada

V. Roy  
UPRES PSY-NCA, EA4306, Laboratoire de Psychologie et Neurosciences de la Cognition et de l'Affectivité, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

M. Naassila  
GRAP, INSERM ERI24, Neurophysiology Laboratory, University of Picardie Jules Verne, 80000 Amiens, France

M. Bénard · H. Vaudry · D. Vaudry  
Platform for Cell Imaging of Normandy, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

A. Fournier  
INRS-Institut Armand Frappier, Institut National de la Recherche Scientifique, Laval, QC, Canada

IGL	Internal granule cell layer
LTD	Long-term depression
ML	Molecular cell layer
NeuN	Neuronal nuclei marker
PACAP	Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide
PAC <sub>1</sub>	PACAP-specific receptor
PCR	Polymerase chain reaction

## Introduction

Alcohol exposure of the human fetus during pregnancy is responsible for permanent disorders referred to as fetal alcohol syndrome (FAS; Jones et al. 1973). FAS is characterized by physical malformations, behavioral deficits, and mental retardation (Floyd et al. 2005). Epidemiological studies indicate that FAS is a major public health concern and represents the leading known cause of non-genetic mental diseases (Cornelius et al. 1999). Examination of the brain of infants affected by FAS revealed an irreversible neuronal loss in many structures of the central nervous system (Floyd et al. 2005). Some brain areas, which have been associated with the behavioral deficits, notably the hippocampus, cortex and cerebellum, are very sensitive to alcohol toxicity (Guerri 2002). The cerebellar cortex of new-born rat is a well-suited model to investigate the effects of neurotoxic or neuroprotective molecules inasmuch as it exhibits a rather simple structure with four well-defined layers and its development is mainly postnatal (Komuro and Rakic 1998). Ethanol-induced cell death in the cerebellum has been thoroughly characterized both in vitro and in vivo. In particular, alcohol administration to 7-day-old rats leads to a 25% reduction of the cerebellum weight (Ikonomidou et al. 2000). The cerebellar cortex of new-born rats exposed to alcohol during the gestation and/or lactation period exhibits a significant reduction in the number of neurons in the internal granule cell layer (IGL) at postnatal day 12 (Han et al. 2005). Acute exposure to ethanol during the first postnatal week modulates mRNA transcripts encoding immediate early genes such as *c-fos* (Ryabinin et al. 1995; Poggi et al. 2003) and *c-jun* (Acquaah-Mensah et al. 2001; Poggi et al. 2003) in various brain regions including the hippocampus, the cerebral cortex, and the cerebellum. Moreover, ethanol-induced cerebellar granule cell death includes the regulation of proteins known to be involved in the mitochondrial apoptotic pathway, i.e., bcl-2 (Ge et al. 2004), bax (Young et al. 2003; Ge et al. 2004), and caspase-3 (Ramachandran et al. 2003; Han et al. 2005).

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) is a 38-amino acid peptide which belongs to the

vasoactive intestinal polypeptide family (Miyata et al. 1989; Vaudry et al. 2009). PACAP and its receptors are widely expressed in the organism, and in particular in the cerebellar cortex of new-born rats between postnatal day 4 and 20, a period of intense neurogenesis (Nielsen et al. 1998; Basille et al. 2006). During development of the cerebellum, PACAP is expressed by Purkinje cells (Nielsen et al. 1998), and high concentrations of PACAP-specific receptors (PAC<sub>1</sub>) are found in the external granule cell layer (EGL; Basille et al. 2006). In vivo studies have shown that injection of PACAP, in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum of 8-day-old rats, increases the number of neurons in the EGL and IGL (Vaudry et al. 1999). In vitro experiments revealed that PACAP promotes differentiation and survival of cerebellar granule neurons (Gonzalez et al. 1997; Villalba et al. 1997). In particular, PACAP has been shown to prevent ethanol-induced cell death of neurons in primary culture (Gonzalez et al. 1997). The neuroprotective effect of PACAP requires a concomitant activation of both the adenylate cyclase and phospholipase C pathways which act in balance to inhibit caspase-3 activity (Vaudry et al. 2000). In cerebellar granule cells, PACAP-induced caspase-3 inhibition has been shown to involve *c-fos* and *bcl-2* induction and to prevent cytochrome c release from the mitochondria (Falluel-Morel et al. 2004). However, whether PACAP is also able to counteract the deleterious action of ethanol in vivo has not yet been examined. In this study, we have thus investigated the capacity of PACAP to block the neurotoxic effect of ethanol in vivo and we have elucidated some of the mechanisms involved.

## Materials and Methods

### Chemicals and Reagents

The 38-amino acid form of PACAP was synthesized by solid phase methodology as previously described (Bourgault et al. 2008). D-JNKi1 was purchased from Biomol International (Exeter, England), and Z-VAD-FMK was from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France).

### Animals

Wistar rats were obtained from Charles River Laboratories (L'Arbresle, France) and kept in a temperature-controlled environment ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) under an established photoperiod (lights on 07:00–19:00 h) with free access to food and tap water. Experiments were conducted according to the recommendations of the European Union normative for care and use of experimental animals and approved by

the regional committee of ethics for animal experimentation. About 200 animals were used for this study.

Eight-day-old rats were lightly anesthetised by isoflurane inhalation before PACAP and ethanol administration. PACAP (1 µg diluted into 10 µl 9‰ NaCl) was injected free hand at the surface of the cerebellum in the subarachnoid space as previously described (Vaudry et al. 1999). Immediately after, ethanol (2.5 g/kg diluted in 400 µl 9‰ NaCl) was injected intraperitoneally. Sham animals received 9‰ NaCl injections instead of PACAP and/or ethanol. Injections of ethanol with or without PACAP were repeated 2 h later and, in some experiments, a third injection was performed to maintain ethanol toxicity over a longer period. After different times of treatment, animals were killed by decapitation and cerebella were removed, frozen in isopentane (−30°C) and cut in the frontal plane into 10-µm thick serial sections. Cerebellar tissue slices were used to conduct caspase-3 activity measurements, RT-PCR quantifications, and morphometric analysis.

#### Measurement of Plasma Ethanol Concentrations

After injection of ethanol in the absence or presence of PACAP, 100 µl blood samples were collected after rat decapitation over a 48-h period, and ethanol concentrations were measured in 10 µl of plasma using an Analox AM1 analyzer (Analox Instrument Ltd., London, UK).

#### Behavioral Studies

The surface righting reflex test was used to evaluate muscular development and vestibular functions. For this test, rats were placed on a flat surface in a supine position, maintained for 1 s and released. The time required to regain all 4 paws in contact with the testing plane surface was measured with a stopwatch. Each animal underwent consecutive trials for this test both before and 48 h after the first injection of ethanol in the absence or presence of PACAP.

The grasping reflex test was used to determine the resistance and muscular strength of developing pups. For this test, rats were placed along the axis of a horizontal wire-mesh tray which allows grasping. On the experimenter's command, the tray started to turn around the middle of its axis (360° per min) and the angle of rotation obtained when the rat fell down was recorded. Each animal underwent two consecutive trials for this test both before and 48 h after the first injection of ethanol in the absence or presence of PACAP.

The negative geotaxis test was used to measure the ability of rats to orient and move directionally against gravity. For this test, rats were placed on a 20° inclined surface in a head-down position, and the time taken to complete a 90° rotation was measured with a stopwatch. The maximum time allowed for rotation was 180 s. Each animal underwent two consecutive trials for this test both before and 48 h after the first injection of ethanol in the absence or presence of PACAP.

For each test, we calculate the mean corresponding to 12 animals with the same treatment and represented it on a histogram.

#### Real-time PCR

Total RNAs were extracted by incubating cerebellar tissue slices in Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and further purified using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Contaminating genomic DNA was eliminated by treatment with DNase I (Qiagen), and cDNA were synthesized from 2 µg of RNA using the ImProm II Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI, USA). RT-PCR was performed on cDNA samples in the presence of a 1 × Mastermix (Applied Biosystems, Courtabœuf, France) containing preset concentrations of dNTPs, MgCl<sub>2</sub> and the SYBR Green reporter dye along with specific primers at a concentration of 300 nM (Table 1), using the ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied

**Table 1** Sequences of the primers used for real-time polymerase chain reaction

Genes	Forward primer	Reverse primer	Final concentration (nM)
<i>bax</i>	5'-TGCAGAGGATGATTGCTGATGT-3'	5'-CAGCTGCCACACGGAAGAA-3'	300
<i>bcl-2</i>	5'-GGCTGGGATGCCTTTGTG-3'	5'-CAGCCAGGAGAAATCAAACAGA-3'	300
<i>c-fos</i>	5'-GCCAAGTGCCGGAATCG-3'	5'-AGTTGATCTGTCTCCGCTTGGA-3'	300
<i>c-jun</i>	5'-CCCATCGACATGGAGTCTCA-3'	5'-GGTTCCTCATGCGCTTCCT-3'	300
<i>caspase-3</i>	5'-CTGACTGGAAAGCCGAAACTCT-3'	5'-AATACCGCAGTCCAGCTCTGTAC-3'	300
<i>α6 GABA<sub>A</sub></i>	5'-CTGGAAGCGGAGATTGTTGTG-3'	5'-AGATGGAACGATGGGCAAAG-3'	300
<i>gapdh</i>	5'-CAGCCTCGTCTCATAGACAAG-3'	5'-CAATGTCCACTTTGTCAACAAG-3'	300
<i>neuroD2</i>	5'-AAGCTGTCCAAGATCGAAACG-3'	5'-AGTCTGCACGTAGGACACCAGA-3'	300

*gapdh* Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *bax* bcl<sub>2</sub>-associated protein, *bcl-2* b-cell leukemia-lymphoma 2, *caspase-3* cysteinyl-aspartate-cleaving protease-3, *α6 GABA<sub>A</sub>* α-6 subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor



Biosystems). The cDNA-generated signals for target genes were internally corrected with that of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*gapdh*) cDNA signal for variations in amounts of input mRNA. Gene expression level was then compared to a corresponding control sample group, and the regulation was determined with the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method according to Applied Biosystems instructions. The validity of the internal control genes was verified using four genes of reference, as described previously (Vandesompele et al. 2002).

#### Laser Microdissection Combined with RT-PCR

Animals were killed by decapitation and cerebella were removed, frozen in isopentane ( $-30^{\circ}\text{C}$ ) and then cut in the frontal plane into 40- $\mu\text{m}$  thick serial sections. Cerebellar tissue slices were stained 3 min with hematoxylin and eosin solution and washed with graded concentrations of ethanol (50–100%). For each condition, 0.4  $\text{mm}^2$  of tissues were cut with a laser microdissector (Palm, Zeiss, Munich, Germany) and expelled into an Eppendorf microtube containing RLT lysis buffer (Qiagen) supplemented with 1% of  $\beta$ -mercaptoethanol. Total cellular RNAs were extracted by incubating cerebellar samples with RNeasy Micro kit (Qiagen), and cDNAs were synthesized using Quantitect RT kit (Qiagen). cDNA quality was checked on a bioanalyzer with the RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies, Massy, France), and RT-PCR experiments were performed as described above.

#### Caspase-3 Activity

Proteins were extracted from cerebellar tissue slices, quantified with a modified Bradford assay for standardization, and incubated with the Apo-ONE Caspase-3/7 assay reagents (Promega). Fluorescence intensity was measured using a microplate reader over a 2-h period at an excitation wavelength of 485 nm and an emission wavelength of 530 nm (FlexStation II, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA).

#### Morphometric Analysis

Cerebellar tissue slices (10- $\mu\text{m}$  thick) were fixed in a 4% paraformaldehyde solution and stained with cresyl violet (6 g/l). The thickness of the cerebellar cortical layers was measured in the simplex lobule with a Nikon Eclipse E600 microscope (Melville, NY, USA) equipped with a computer-assisted image analyzer (Mercator, Explora Nova, La Rochelle, France). Quantification was systematically conducted at the level of the caudal extremity of the colliculi and the rostral extremity of lobule 1.

#### Measurement of Cell Density

Cerebellar tissue slices were fixed in a 4% paraformaldehyde solution and stained with cresyl violet (6 g/l). The cell density in the cerebellar cortical layers was measured at the level of the simplex lobule using the ImageJ 1.42 l software (MacBiophotonics ImageJ, NIH, Bethesda, MD, USA).

#### Immunohistochemical Procedure

Cerebellar tissue slices (10- $\mu\text{m}$  thick) were fixed in a 4% paraformaldehyde solution and incubated at  $4^{\circ}\text{C}$  overnight with a monoclonal antibody directed against anti-neuronal nuclei (NeuN) developed in mouse (Euromedex, Mulsheim, France) diluted 1:50 in PBS supplemented with 1% BSA and 0.3% Triton X-100. The sections were rinsed in PBS for 30 min and incubated at room temperature with Alexa Fluor 488-conjugated donkey anti-mouse (DAM-488) diluted 1:200. The slices were then rinsed with PBS, mounted with PBS-glycerol (1:1, v/v), and coverslipped before analysis with an SP2 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems, Rueil-Malmaison, France).

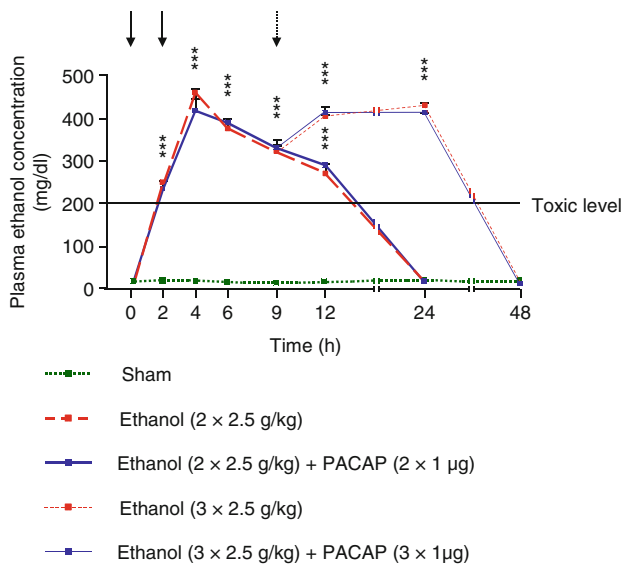
#### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed using the computer software PRISM (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). All data are expressed as mean ( $\pm$ SEM) of at least three independent experiments. The Kruskal–Wallis test, followed by a post-hoc Dunn's test, was used for comparison of more than two independent groups with  $n < 30$ . A  $P$ -value  $< 0.05$  was considered statistically significant.

## Results

#### Effects of Ethanol and PACAP on Plasma Alcohol Levels

Intraperitoneal (ip) injection of ethanol (2.5 g/kg) to 8-day-old rats was associated with the occurrence of high plasma concentrations of alcohol, which remained above the toxic level ( $>200$  mg/dl) for at least 12 h (Fig. 1). The maximum concentration was observed 2 h after the second injection (453 mg/dl;  $P < 0.001$ ), and the presence of ethanol in plasma vanished after 24 h. A third ip injection of ethanol, 9 h after the first administration, maintained plasma alcohol concentration above the toxic concentration for more than 24 h. Concomitant injection of PACAP



**Fig. 1** Evolution of plasma alcohol concentrations following intraperitoneal ethanol injection, in the absence or presence of PACAP. Eight-day-old rats received an injection of PACAP (1 µg in 10 µl) in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum, immediately followed by an intraperitoneal injection of ethanol (2.5 g/kg in 400 µl). Treatments were repeated 2 h after the first administration and, in some experiments, a third injection of PACAP and ethanol was performed 9 h after the first administration. Plasma ethanol levels were measured at defined time points over a 48-h period. Each value represents the mean (±SEM) from at least three animals. \*\*\*  $P < 0.001$  versus control

(1 µg) in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum did not modify plasma alcohol levels (Fig. 1).

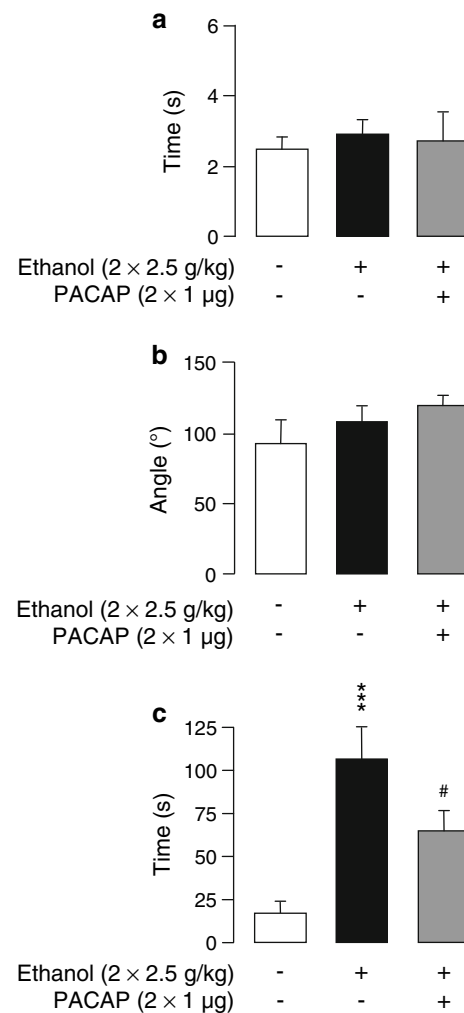
**Effects of Ethanol and PACAP on Pup Behavioral Activity**

Behavioral studies were conducted 48 h after the first injection of ethanol in control and PACAP-treated animals, when animals were no longer under the direct influence of alcohol. Ethanol administration, either alone or in combination with PACAP, did not affect the righting and grasping reflexes (Fig. 2a, b). In contrast, in the negative geotaxis test, pups injected with saline solution turned 90° from a head-down position within less than 20 s, whereas animals treated with ethanol (2 × 2.5 g/kg) required 103 s to perform the same task ( $P < 0.001$ ). Treatment with PACAP (2 × 1 µg) significantly reduced the deleterious effect of alcohol (Fig. 2c; −35%;  $P < 0.05$ ).

These results strongly suggest that ethanol and PACAP administration had no effect on pups’ physical capacities but altered the cerebellum function.

**Effects of Ethanol and PACAP on the Apoptotic Cascade in vivo**

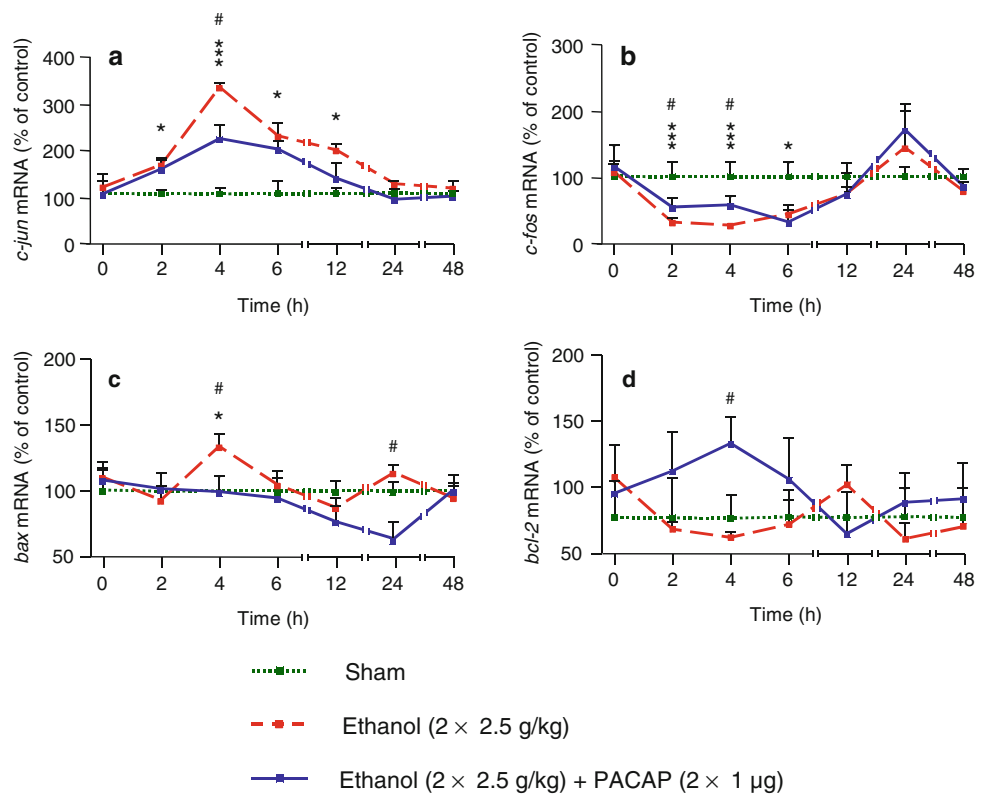
The effects of ethanol and PACAP on the expression of genes known to regulate cell survival were analyzed by



**Fig. 2** Effect of ethanol administration, in the absence or presence of PACAP, on pup locomotor activity. Eight-day-old rats received an injection of PACAP (1 µg in 10 µl) in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum, immediately followed by an intraperitoneal injection of ethanol (2.5 g/kg in 400 µl). Treatments were repeated 2 h after the first administration and, 48 h post-injections, behavioral studies were conducted in order to evaluate the righting reflex (a), grasping reflex (b), and negative geotaxis (c). Each value represents the mean (±SEM) from at least 12 animals. \*\*\*  $P < 0.001$  versus control, and #  $P < 0.05$  versus ethanol-treated rats

RT-PCR over a 48-h period. Alcohol administration (2 × 2.5 g/kg) induced a robust and sustained increase in *c-jun* mRNA expression that reached a maximum after 4 h and lasted for more than 12 h (Fig. 3a; +223%;  $P < 0.001$ ). Administration of PACAP reduced by 38% *c-jun* mRNA induction observed 4 h after the first ethanol injection (Fig. 3a;  $P < 0.05$ ). Ethanol also induced a rapid and marked inhibition of *c-fos* mRNA levels that lasted for 6 h (Fig. 3b;  $P < 0.001$ ), and this effect was partially blocked by PACAP treatment (Fig. 3b;  $P < 0.05$ ). In order to determine more precisely in which layers of the cerebellar cortex ethanol and PACAP modified gene expression,

**Fig. 3** Time-course of the effect of ethanol administration, in the absence or presence of PACAP, on apoptotic gene markers in vivo. Eight-day-old rats received an injection of PACAP (1  $\mu$ g in 10  $\mu$ l) in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum, immediately followed by an intraperitoneal injection of ethanol (2.5 g/kg in 400  $\mu$ l). Treatments were repeated 2 h after the first administration, and *c-jun* (a), *c-fos* (b), *bax* (c) and *bcl-2* (d) mRNA levels were quantified at defined time points over a 48-h period by real-time PCR. Each value represents the mean ( $\pm$ SEM) from at least six animals. \*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$  versus control and #  $P < 0.05$  versus ethanol-treated rats



RT-PCR analysis was conducted after laser microdissection of individual layers. Variations of *c-jun* expression were only observed in the molecular layer (ML) and IGL whereas *c-fos* mRNA levels were affected in all cerebellar cortical layers. Ethanol also provoked a transient increase in *bax* mRNA expression 4 h after the first injection (Fig. 3c; +36%;  $P < 0.05$ ) that was totally abolished by PACAP treatment (Fig. 3c;  $P < 0.05$ ). Moreover, after 24 h of treatment, PACAP significantly repressed *bax* expression (Fig. 3c;  $P < 0.05$ ). Administration of alcohol had no effect on *bcl-2* gene expression while PACAP significantly increased *bcl-2* mRNA levels after 4 h of treatment (Fig. 3d; +40%;  $P < 0.05$ ). It has also been noted that in the absence of ethanol treatment, PACAP could increase *bcl-2* mRNA levels but had no effect on the expression of other genes such as *c-jun* (data not shown).

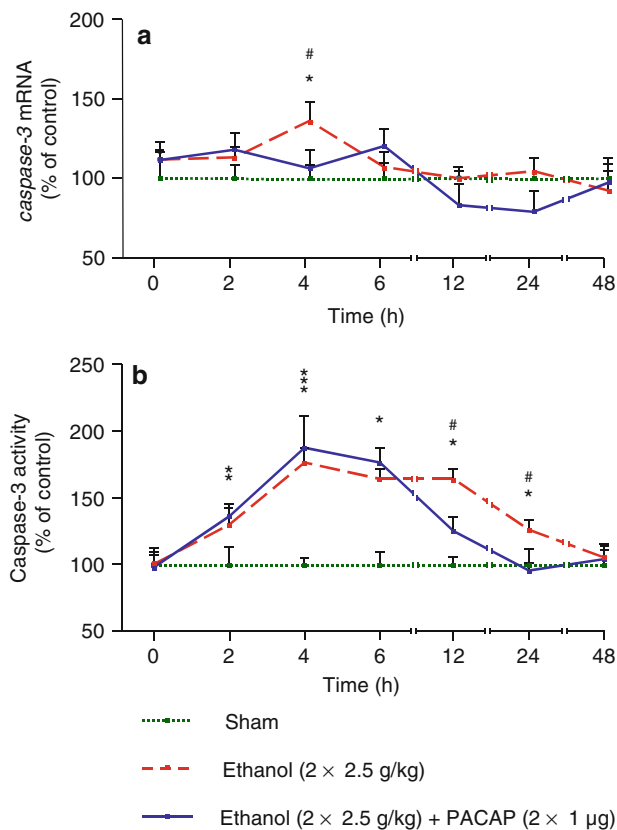
As *c-jun*, *c-fos*, *bax*, and *bcl-2* are known to control the mitochondrial apoptotic pathway which regulates caspase activity, the effects of ethanol and PACAP on caspase-3 were also investigated. Administration of ethanol (2  $\times$  2.5 g/kg) to 8-day-old rats induced a moderate increase of *caspase-3* mRNA levels 4 h after the first injection (Fig. 4a; +48%;  $P < 0.05$ ), and this effect was abrogated by PACAP treatment (Fig. 4a; -48%;  $P < 0.05$ ). Moreover, alcohol induced an increase in caspase-3 activity which lasted for 24 h with a maximum induction 4 h after the first injection (Fig. 4b; +76%;  $P < 0.001$ ). Administration of PACAP (2  $\times$  1  $\mu$ g)

significantly reduced the effect of ethanol on caspase-3 activity after 12 and 24 h (Fig. 4b; -40 and -30%, respectively;  $P < 0.05$ ).

#### Effects of Ethanol and PACAP on the Morphology of the Cerebellar Cortex

Exposure of pups to ethanol (2  $\times$  2.5 g/kg) in the absence or presence of PACAP (2  $\times$  1  $\mu$ g) did not cause any apparent alteration of the morphology of the cerebellar cortex (Fig. 5a). Quantification of the thickness of cerebellar cortical layers at the level of the simplex lobule did not reveal any differences between sham-, ethanol-, and ethanol plus PACAP-treated animals (Fig. 5b). Neither ethanol nor PACAP treatment altered cell density in the EGL and ML (Fig. 5c). In contrast, alcohol injection slightly decreased the number of cells in the IGL (Fig. 5c;  $P < 0.05$ ), but PACAP treatment did not prevent ethanol-induced cell loss (Fig. 5c).

The effects of ethanol and PACAP on genes involved in neuronal differentiation were also investigated 48 h after the first treatment by RT-PCR. Injection of ethanol (2  $\times$  2.5 g/kg) reduced the expression level of the gene encoding the  $\alpha$ -6 subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor ( $\alpha$ 6 GABA<sub>A</sub>) while PACAP did not affect  $\alpha$ 6 GABA<sub>A</sub> mRNA (Fig. 6a). Conversely, ethanol had no effect on *NeuroD2* expression while PACAP increased *NeuroD2* mRNA level by 30% in alcohol-injected pups (Fig. 6b).



**Fig. 4** Time-course of the effect of ethanol administration, in the absence or presence of PACAP, on caspase-3 gene expression and activity. Eight-day-old rats received an injection of PACAP (1  $\mu$ g in 10  $\mu$ l) in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum, immediately followed by an intraperitoneal injection of ethanol (2.5 g/kg in 400  $\mu$ l). Treatments were repeated 2 h after the first administration, and *caspase-3* gene expression (a) and activity (b) were quantified at defined time points over a 48-h period. Each value represents the mean ( $\pm$ SEM) from at least four animals. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  versus control, and #  $P < 0.05$  versus ethanol-treated rats

A third injection of alcohol and PACAP, 9 h after the first administration, yielded evident modifications of the cerebellar cortex morphology with maximum alterations observed after 3 days, which were partially abolished by PACAP (3  $\times$  1  $\mu$ g; Fig. 7a). Quantification of the thickness of the cerebellar cortical layers at the level of the simplex lobule revealed that ethanol induced a 28% reduction of the thickness of the EGL (Fig. 7b;  $P < 0.01$ ), a 25% reduction of the thickness of the ML (Fig. 7b; NS) and a 40% reduction of the thickness of the IGL (Fig. 7b;  $P < 0.01$ ). Administration of PACAP had no effect on the thickness of the EGL and ML but totally prevented the deleterious effect of ethanol in the IGL (Fig. 7b; +67%;  $P < 0.001$ ). Measurement of cell density revealed that ethanol exposure actually induced a significant decrease in the number of cells in the EGL (Fig. 7c;  $P < 0.01$ ) and that PACAP partially reduced this effect (Fig. 7c; +30%;

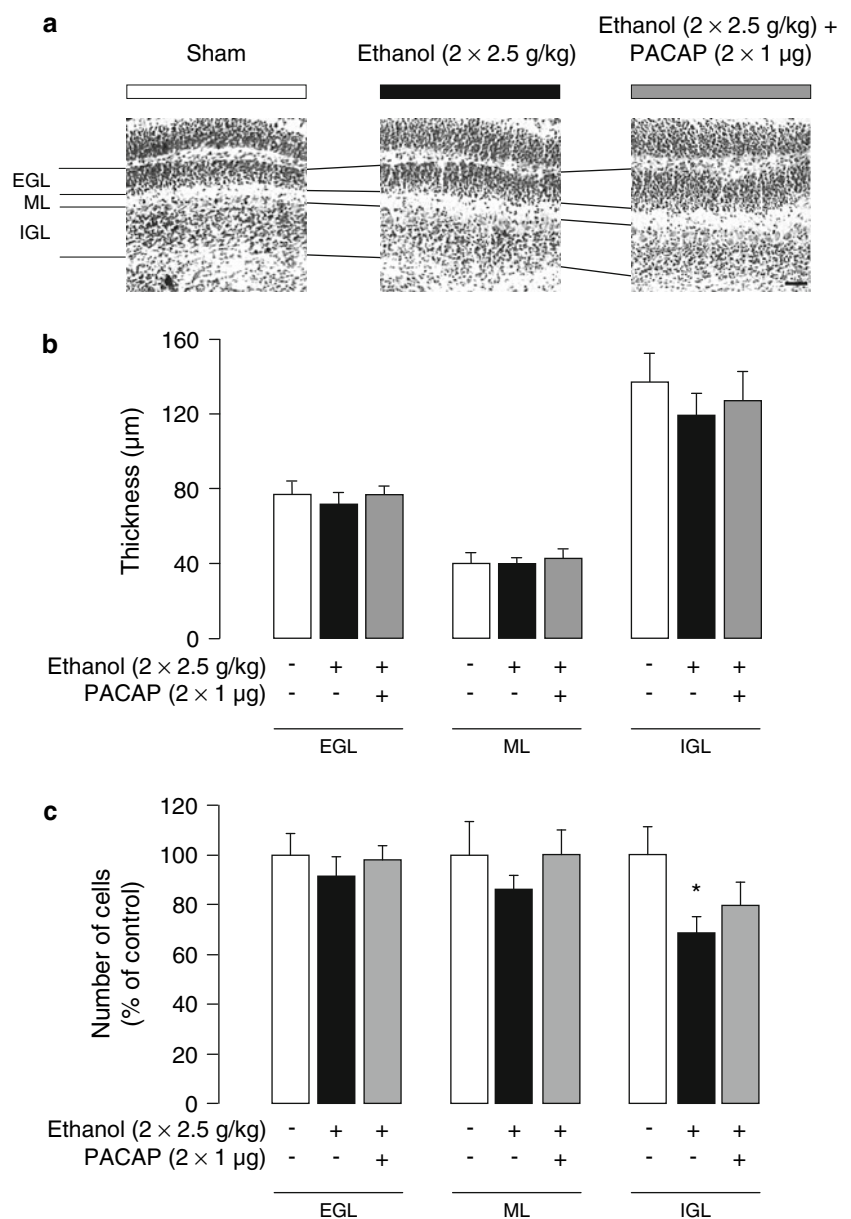
$P < 0.05$ ). In the IGL, PACAP totally blocked the decrease of the number of cells induced by alcohol (Fig. 7c; +110%;  $P < 0.001$ ). While ethanol did not affect cell density in the ML, PACAP treatment markedly increased the number of cells in this layer (Fig. 7c; +72%;  $P < 0.05$ ). Furthermore, labeling of cerebellar slices with antibodies directed against NeuN, a specific neuronal nuclei marker, revealed that ethanol decreased the number of NeuN-positive cells in the IGL and that PACAP blocked this effect (Fig. 8). Interestingly, the effect of PACAP on ethanol-reduced IGL thickness was mimicked by injection in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum of either a c-jun N-terminal kinase (JNK) inhibitor (Fig. 9; D-JNKi1, 3  $\times$  0.2 mg/kg; +42%;  $P < 0.01$ ) or a caspase-3 inhibitor (Fig. 9; Z-VAD-FMK, 3  $\times$  0.2 mg/kg, +23%;  $P < 0.01$ ).

## Discussion

In vitro studies have established that PACAP prevents the toxic action of alcohol on cerebellar granule neuron survival (Gonzalez et al. 1997; Bhave and Hoffman 2004), but the neuroprotective effect of PACAP had not yet been investigated in vivo. Following ip injection of ethanol (2  $\times$  2.5 g/kg, spaced 2 h apart), plasma alcohol levels remained above 200 mg/dl for at least 12 h. The maximum plasma concentration was observed after 4 h, and ethanol became undetectable after 24 h. According to previous studies, plasma alcohol concentration higher than 200 mg/dl for at least 4 h is sufficient to induce apoptotic neurodegeneration (Ikonomidou et al. 2000). The present report provides the first evidence that PACAP blocks the deleterious effects of alcohol on cerebellar development.

The cerebellum is involved in the control of motor coordination, equilibrium, posture, and spatial orientation (Petrosini et al. 1998; Molinari and Leggio 2007). In order to determine whether ethanol and PACAP administrations were associated with behavioral deficiencies, we analyzed the motor development of animals 48 h after the first injection when pups were no longer under the direct influence of alcohol exposure. The negative geotaxis test revealed that ethanol-treated rats required significantly more time to perform the same task than sham animals, and that PACAP treatment significantly reduced the deleterious effect of alcohol. As PACAP did not modify plasma alcohol levels, these data suggest that administration of the peptide during the first postnatal weeks could counteract the toxic action of alcohol and improve cerebellum function. The implication of PACAP in coordination, posture, and spatial orientation has already been suggested since PACAP- and PAC<sub>1</sub>-knockout mice exhibit alterations in locomotor activity (Masuo et al. 1995; Hashimoto et al. 2001).

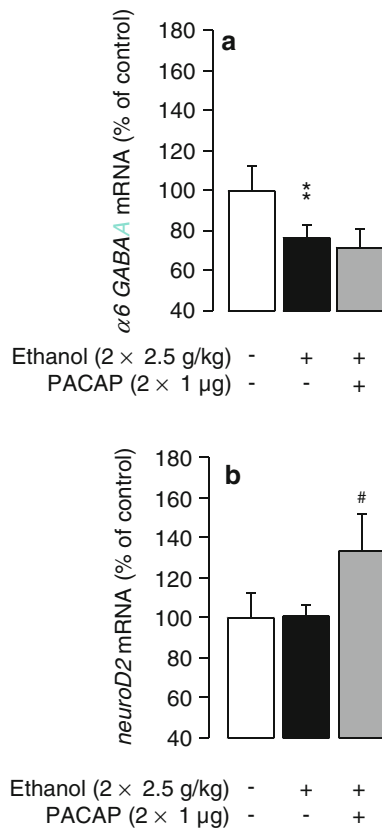
**Fig. 5** Effect of ethanol administration, in the absence or presence of PACAP, on cerebellar cortical morphology at the level of the simplex lobule of the rat cerebellum. Eight-day-old rats received an injection of PACAP (1  $\mu\text{g}$  in 10  $\mu\text{l}$ ) in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum, immediately followed by an intraperitoneal injection of ethanol (2.5 g/kg in 400  $\mu\text{l}$ ). Treatments were repeated 2 h after the first administration, and brains were collected 48 h after the first injection. Tissue slices were stained with cresyl violet. **a** Microphotographs illustrating the thickness of the external granule cell layer (EGL), molecular layer (ML), and internal granule cell layer (IGL) at the level of the simplex lobule. **b** Quantification of the thickness of the EGL, ML, and IGL. **c** Quantification of cell number in the EGL, ML, and IGL. Each value represents the mean ( $\pm$ SEM) from at least four animals. \*  $P < 0.05$  versus control. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$



It is well established that, in vitro, ethanol and PACAP exert antagonistic actions on cerebellar granule cell survival through regulation of the mitochondrial apoptotic pathway (Vaudry et al. 2002). We have thus investigated the possible effects of ethanol, in the absence or presence of PACAP, on genes known to be involved in the mitochondrial apoptotic cascade. Two days after alcohol or PACAP injections, no differences were observed in *c-fos*, *c-jun*, *bax*, and *bcl-2* mRNA levels. Nevertheless, a time-course study revealed that the expression of these genes could be modified with a maximum regulation detected 4 h after the first injection, which corresponds to the peak of plasma alcohol levels. The expression of anti-apoptotic genes was either reduced (*c-fos*) or not affected (*bcl-2*) by ethanol but increased in the presence of PACAP. Reciprocally, the expression of the

pro-apoptotic genes (*c-jun* and *bax*) was significantly increased by alcohol administration, and this effect was attenuated by PACAP. These data indicate that, in the developing cerebellum, ethanol and PACAP act in an opposite manner on the mitochondrial apoptotic pathway, and provide information as to how PACAP can prevent the toxic action of alcohol in vivo.

It has been previously reported that PACAP can counteract ethanol-induced caspase-3 activity (Vaudry et al. 2002; Young et al. 2003) in cultured cerebellar granule cells, but no study has been conducted so far to investigate this issue in vivo. Here, we show that PACAP significantly reduces the effect of ethanol on caspase-3 activity after 12 and 24 h of treatment, indicating that the mechanisms described in vitro also occur in vivo. Ethanol and PACAP



**Fig. 6** Effect of ethanol administration, in the absence or presence of PACAP, on neuronal differentiation in vivo. Eight-day-old rats received an injection of PACAP (1 μg in 10 μl) in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum, immediately followed by an intraperitoneal injection of ethanol (2.5 g/kg in 400 μl). Treatments were repeated 2 h after the first administration. The mRNA encoding the α6 subunit of the GABA<sub>A</sub> receptor (**a**) and NeuroD2 (**b**) were quantified by real-time PCR 48 h after the first injection. Each value represents the mean (±SEM) from at least six animals. \*\*  $P < 0.01$  versus control and #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$  versus ethanol-treated rats

not only affected caspase activity but also regulated caspase-3 expression levels. Induction of the caspase-3 transcript has already been observed in the cerebellum of new-born rats treated with a neurotoxic molecule (Chao et al. 2007). While caspase-3 is activated by proteolytic cleavage, the present data suggest that both transcriptional and posttranslational regulations contribute to the control of neuronal cell death. It is interesting to note that, in *bax*-knockout animals, the induction of caspase-3 activity by alcohol is blocked, confirming the key role of the mitochondrial apoptotic pathway in the control of ethanol toxicity (Young et al. 2003).

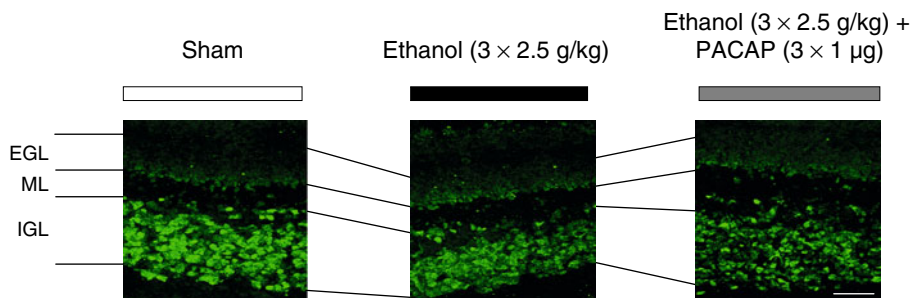
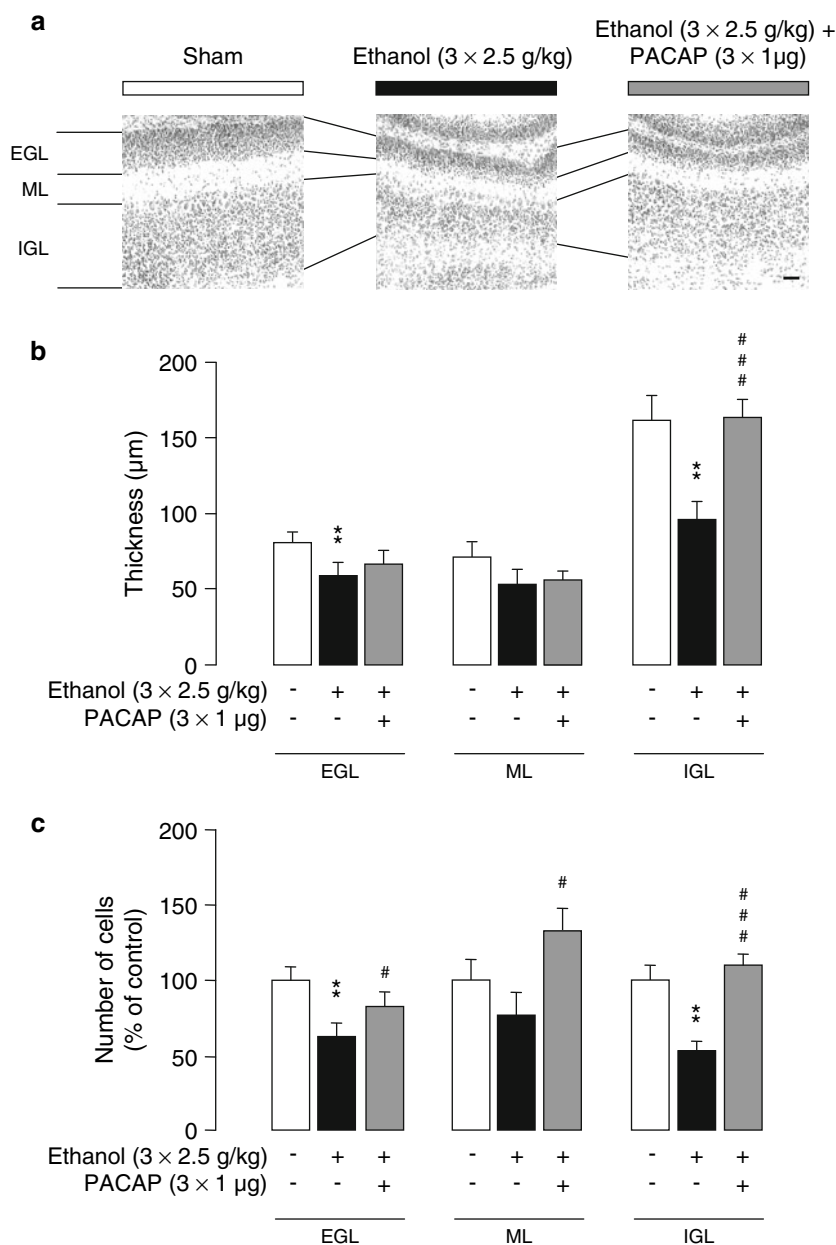
After 2 days of treatment, ethanol exposure induced a slight decrease in the number of granule cells in the IGL which could not be counteracted by PACAP. Based on these observations, we hypothesized that the ability of PACAP to improve rat performances in the negative geotaxis results from subtler modifications of neuronal

differentiation (neuritogenesis and/or synaptic plasticity) rather than changes in the number of cerebellar granule cells. Indeed, alcohol is known to exert a deleterious action on long-term depression (LTD) at the level of parallel fibers (Belmeguenai et al. 2008), whereas PACAP has been described to promote LTD in the rat hippocampus (Kondo et al. 1997). These data may explain how PACAP reduces ethanol-altered locomotor activity in pups without inducing any apparent modifications of cerebellar cortical morphology (Kondo et al. 1997; Belmeguenai et al. 2008). The hypothesis that ethanol and PACAP exert opposite effects on neuronal differentiation is supported by the observation that alcohol treatment reduced α6 GABA<sub>A</sub> gene expression while PACAP increased *neuroD2* mRNA levels; two genes which code for proteins are detected in post-mitotic cerebellar neurons. Interestingly, the α6 GABA<sub>A</sub> sub-unit is detected in the IGL of mature neurons (Zheng et al., 1993; Varecka et al. 1994), whereas the NeuroD2 protein plays a key role in the neuritogenesis program (Schwab et al. 1998; Miyata et al. 1999). These data suggest that PACAP and alcohol control cerebellar neurons differentiation by acting at different levels of the differentiation program which should now be further investigated.

In order to maintain plasma alcohol levels above the toxic threshold for more than 12 h, animals received a third administration of ethanol in the absence or presence of PACAP 9 h after the first injection, which induced a sustained alcoholization for at least 24 h. In these conditions, the cerebellar cortical morphology was significantly altered, in particular in the IGL. Interestingly, the deleterious effect of ethanol on granule cell number was attenuated by PACAP treatment in the EGL and totally blocked in the IGL, suggesting that alcohol and PACAP modulate in an opposite manner cell proliferation and/or survival. In addition, PACAP increased the number of cells in the ML. In ethanol-treated animals, the increase of the number of granule neurons by PACAP was much more important than in animals receiving PACAP only (Vaudry et al. 1999). This effect may result from an augmentation of the number of post-mitotic neurons in the EGL, leading to an increase in the number of precursors migrating toward the ML. The reduction of the number of NeuN-positive cells in the IGL of ethanol-treated animals and its partial blockage by PACAP confirmed the opposite modulation of neuronal differentiation and survival by alcohol and PACAP.

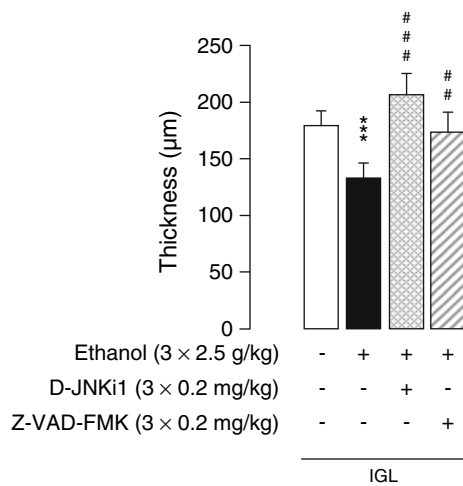
The effect of PACAP on ethanol toxicity in the IGL was mimicked by inhibitors of JNK and caspase-3, indicating that activation of these pathways is involved in the proapoptotic action of ethanol. These observations also support the view that PACAP may exert its neuroprotective effect by inhibiting JNK and caspase-3 expression and/or activity. Other studies have already demonstrated a neuroprotective effect of D-JNKi1 and Z-VAD-FMK in

**Fig. 7** Effect of PACAP on ethanol-induced alteration of the morphology of 11-day-old rat cerebellum. Eight-day-old rats received an injection of PACAP (1  $\mu\text{g}$  in 10  $\mu\text{l}$ ) in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum, immediately followed by an intraperitoneal injection of ethanol (2.5 g/kg in 400  $\mu\text{l}$ ). Treatments were repeated 2 and 9 h after the first administration, and brains were collected 72 h after the first injection. Tissue slices were stained with cresyl violet. **a** Microphotographs illustrating the thickness of the external granule cell layer (EGL), molecular layer (ML), and internal granule cell layer (IGL) at the level of the simplex lobule. **b** Quantification of the thickness of the EGL, ML, and IGL. **c** Quantification of cell number in the EGL, ML, and IGL. Each value represents the mean ( $\pm$ SEM) from at least four animals. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  versus control and ##  $P < 0.05$ , ###  $P < 0.001$  versus ethanol-treated rats. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$



**Fig. 8** Microphotographs illustrating the immunolabeling of NeuN (neuronal nuclei) in 11-day-old rat cerebellum. Eight-day-old rats received an injection of PACAP (1  $\mu\text{g}$  in 10  $\mu\text{l}$ ) in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum, immediately followed by an

intraperitoneal injection of ethanol (2.5 g/kg in 400  $\mu\text{l}$ ). Treatments were repeated 2 and 9 h after the first administration, and brains were collected 72 h after the first injection. Microphotographs were taken at the level of the simplex lobule. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$



**Fig. 9** Effects of the JNK inhibitor (D-JNKi1) and the caspase-3 inhibitor (Z-VAD-FMK) on ethanol-reduced IGL thickness at the level of the simplex lobule in 11-day-old rat cerebellum. Eight-day-old rats received an injection of D-JNKi1 (0.2 mg/kg in 10 µl) or Z-VAD-FMK (0.2 mg/kg in 10 µl) in the subarachnoid space at the surface of the cerebellum, immediately followed by an intraperitoneal injection of ethanol (2.5 g/kg in 400 µl). Treatments were repeated 2 and 9 h after the first administration, and brains were collected 72 h after the first injection. Each value represents the mean ( $\pm$ SEM) from at least four animals. \*\*\*  $P < 0.001$  versus control and #  $P < 0.01$ , ###  $P < 0.001$  versus ethanol-treated animals

reducing the infarct volume and improving functional recovery in various models of cerebral ischemia (Endres et al. 1998; Esneault et al. 2008). However, PACAP has the advantage to exert its neuroprotective action at different levels of the apoptotic cascade which usually act in balance. Furthermore, the present results indicate that PACAP does not only inhibit ethanol-induced neuronal cell death but can also promote the differentiation process which seems to be a key element for the functional recovery of the animals after ethanol intoxication.

Altogether, our data demonstrate the ability of PACAP to counteract the neurotoxic action of ethanol in the developing rat cerebellum, and provide insight into the molecular and cellular mechanisms which control the differentiation and survival of cerebellar granule neurons in vivo. PACAP and its receptors are widely expressed in the central nervous system, and the transduction pathways involved in the cerebellum should be similar to those activated in other brain structures, suggesting that the neuroprotective action of PACAP described herein may be extrapolated to different developmental injuries induced, for example, by exposure to methyl mercury, lead, or cyanide. Since PACAP can cross the blood–brain barrier through a peptide transport system called PTS-6 (Banks et al. 1993; Chandorkar et al. 1999), studies should be conducted to investigate whether PACAP can still exert a neuroprotective action when injected intravenously to

new-born pups. Nevertheless, as most natural peptides, PACAP is prone to rapid enzymatic degradation in blood (Zhu et al. 2003), and thus recently developed PACAP analogs with similar biological activity but higher stability represent valuable tools for further investigations (Bourgault et al. 2008).

**Acknowledgments** This study was supported by INSERM (U413), the European Institute for Peptide Research (IFRMP23), the Institut de Recherches Scientifiques sur les Boissons (IREB), the Interreg 4A FEDER project AdMiN, an ANR Jeune Chercheuse-Jeune Chercheur, the LARC-Neurosciences network, and the Région Haute-Normandie. This study was conducted with the technical support of the Platform for Cell Imaging of Haute-Normandie (PRIMACEN). B.B. was the recipient of a doctoral fellowship from the Société Française d'Alcoolologie and the Fondation pour la Recherche Médicale. H.V. is Affiliated Professor at the Institut National de la Recherche Scientifique—Institut Armand Frappier.

## References

- Acquaah-Mensah GK, Leslie SW, Kehrer JP (2001) Acute exposure of cerebellar granule neurons to ethanol suppresses stress-activated protein kinase-1 and concomitantly induces AP-1. *Toxicol Appl Pharmacol* 175:10–18
- Banks WA, Kastin AJ, Komaki G, Arimura A (1993) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) can cross the vascular component of the blood-testis barrier in the mouse. *J Androl* 14:170–173
- Basille M, Falluel-Morel A, Vaudry D, Aubert N, Fournier A, Freger P, Gallo-Payet N, Vaudry H, Gonzalez B (2006) Ontogeny of PACAP receptors in the human cerebellum: perspectives of therapeutic applications. *Regul Pept* 137:27–33
- Belmeguenai A, Botta P, Weber JT, Carta M, De Ruyter M, De Zeeuw CI, Valenzuela CF, Hansel C (2008) Alcohol impairs long-term depression at the cerebellar parallel fiber-Purkinje cell synapse. *J Neurophysiol* 100:3167–3174
- Bhave SV, Hoffman PL (2004) Phosphatidylinositol 3'-OH kinase and protein kinase A pathways mediate the anti-apoptotic effect of pituitary adenylyl cyclase-activating polypeptide in cultured cerebellar granule neurons: modulation by ethanol. *J Neurochem* 88:359–369
- Bourgault S, Vaudry D, Botia B, Couvineau A, Laburthe M, Vaudry H, Fournier A (2008) Novel stable PACAP analogs with potent activity towards the PAC1 receptor. *Peptides* 29:919–932
- Chandorkar GA, Ampasavate C, Stobaugh JF, Audus KL (1999) Peptide transport and metabolism across the placenta. *Adv Drug Deliv Rev* 38:59–67
- Chao SL, Moss JM, Harry GJ (2007) Lead-induced alterations of apoptosis and neurotrophic factor mRNA in the developing rat cortex, hippocampus, and cerebellum. *J Biochem Mol Toxicol* 21:265–272
- Cornelius MD, Goldshmidt L, Taylor PM, Day NL (1999) Prenatal alcohol use among teenagers: effects on neonatal outcomes. *Alcohol Clin Exp Res* 23:1238–1244
- Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA (1998) Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* 18:238–247
- Esneault E, Castagne V, Moser P, Bonny C, Bernaudin M (2008) D-JNKi, a peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase, promotes



- functional recovery after transient focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience* 152:308–320
- Falluel-Morel A, Aubert N, Vaudry D, Basille M, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2004) Opposite regulation of the mitochondrial apoptotic pathway by C2-ceramide and PACAP through a MAP-kinase-dependent mechanism in cerebellar granule cells. *J Neurochem* 91:1231–1243
- Floyd RL, O'Connor MJ, Sokol RJ, Bertrand J, Cordero JF (2005) Recognition and prevention of fetal alcohol syndrome. *Obstet Gynecol* 106:1059–1064
- Ge Y, Belcher SM, Pierce DR, Light KE (2004) Altered expression of Bcl2, Bad and Bax mRNA occurs in the rat cerebellum within hours after ethanol exposure on postnatal day 4 but not on postnatal day 9. *Mol Brain Res* 129:124–134
- Gonzalez BJ, Basille M, Vaudry D, Fournier A, Vaudry H (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide promotes cell survival and neurite outgrowth in rat cerebellar neuroblasts. *Neuroscience* 78:419–430
- Guerri C (2002) Mechanisms involved in central nervous system dysfunctions induced by prenatal ethanol exposure. *Neurotox Res* 4:327–335
- Han JY, Joo Y, Kim YS, Lee YK, Kim HJ, Cho GJ, Choi WS, Kang SS (2005) Ethanol induces cell death by activating caspase-3 in the rat cerebral cortex. *Mol Cells* 20:189–195
- Hashimoto H, Shintani N, Tanaka K, Mori W, Hirose M, Matsuda T, Sakaue M, Miyazaki J, Niwa H, Tashiro F, Yamamoto K, Koga K, Tomimoto S, Kunugi A, Suetake S, Baba A (2001) Altered psychomotor behaviors in mice lacking pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13355–13360
- Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovskva V, Horster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287:1056–1060
- Jones KL, Smith DW, Ulleland CN, Streissguth P (1973) Pattern of malformation in offspring of chronic alcoholic mothers. *Lancet* 1:1267–1271
- Komuro H, Rakic P (1998) Distinct modes of neuronal migration in different domains of developing cerebellar cortex. *J Neurosci* 18:1478–1490
- Kondo T, Tominaga T, Ichikawa M, Iijima T (1997) Differential alteration of hippocampal synaptic strength induced by pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 (PACAP-38). *Neurosci Lett* 221:189–192
- Masuo Y, Noguchi J, Morita S, Matsumoto Y (1995) Effects of intracerebroventricular administration of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) on the motor activity and reserpine-induced hypothermia in murines. *Brain Res* 700:219–226
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567–574
- Miyata T, Maeda T, Lee JE (1999) NeuroD is required for differentiation of the granule cells in the cerebellum and hippocampus. *Genes Dev* 13:1647–1652
- Molinari M, Leggio MG (2007) Cerebellar information processing and visuospatial functions. *Cerebellum* 6:214–220
- Nielsen HS, Hannibal J, Fahrenkrug J (1998) Expression of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) in the postnatal and adult rat cerebellar cortex. *Neuroreport* 9:2639–2642
- Petrosini L, Leggio MG, Molinari M (1998) The cerebellum in the spatial problem solving: a co-star or a guest star? *Prog Neurobiol* 56:191–210
- Poggi SH, Goodwin K, Hill JM, Brennehan DE, Tendi E, Schinelli S, Abebe D, Spong CY (2003) The role of activity-dependent neuroprotective protein in a mouse model of fetal alcohol syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 189:790–793
- Ramachandran V, Watts LT, Maffi SK, Chen J, Schenker S, Henderson G (2003) Ethanol-induced oxidative stress precedes mitochondrially mediated apoptotic death of cultured fetal cortical neurons. *J Neurosci Res* 74:577–588
- Ryabinin AE, Melia KR, Cole M, Bloom FE, Wilson MC (1995) Alcohol selectively attenuates stress-induced c-fos expression in rat hippocampus. *J Neurosci* 15:721–730
- Schwab MH, Druffel-Augustin S, Jung M, Klugmann M, Bartholomae A, Rossner MJ, Nave KA (1998) Neuronal basic helix-loop-helix proteins (NEX, neuroD, NDRF): spatiotemporal expression and targeted disruption of the NEX gene in transgenic mice. *J Neurosci* 18:1408–1418
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3: RESEARCH 0034
- Varecka L, Wu CH, Rotter A, Frosthalm A (1994) GABAA/benzodiazepine receptor alpha 6 subunit mRNA in granule cells of the cerebellar cortex and cochlear nuclei: expression in developing and mutant mice. *J Comp Neurol* 339:341–352
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Fournier A, Vaudry H (1999) Neurotrophic activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on rat cerebellar cortex during development. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9415–9420
- Vaudry D, Gonzalez BJ, Basille M, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H (2000) The neuroprotective effect of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide on cerebellar granule cells is mediated through inhibition of the CED3-related cysteine protease caspase-3/ CPP32. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13390–13395
- Vaudry D, Rousselle C, Basille M, Falluel-Morel A, Pamantung TF, Fontaine M, Fournier A, Vaudry H, Gonzalez BJ (2002) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide protects rat cerebellar granule neurons against ethanol-induced apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6398–6403
- Vaudry D, Falluel-Morel A, Bourgault S, Basille M, Burel D, Wurtz O, Fournier A, Chow BK, Hashimoto H, Galas L, Vaudry H (2009) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* 61:283–357
- Villalba M, Bockaert J, Journot L (1997) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP-38) protects cerebellar granule neurons from apoptosis by activating the mitogen-activated protein kinase (MAP kinase) pathway. *J Neurosci* 17:83–90
- Young C, Klocke BJ, Tenkova T, Choi J, Labruyere J, Qin YQ, Holtzman DM, Roth KA, Olney JW (2003) Ethanol-induced neuronal apoptosis in vivo requires BAX in the developing mouse brain. *Cell Death Differ* 10:1148–1155
- Zheng T, Santi MR, Bovolenta P, Marlier LN, Grayson DR (1993) Developmental expression of the alpha 6 GABAA receptor subunit mRNA occurs only after cerebellar granule cell migration. *Dev Brain Res* 75:91–103
- Zhu L, Tamvakopoulos C, Xie D, Dragovic J, Shen X, Fenyk-Melody JE, Schmidt K, Bagchi A, Griffin PR, Thornberry NA, Sinha Roy R (2003) The role of dipeptidyl peptidase IV in the cleavage of glucagon family peptides: in vivo metabolism of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-(1–38). *J Biol Chem* 278:22418–22423

## Synthesis, Biological Evaluation, and *in Vivo* Imaging of the first Camptothecin–Fluorescein Conjugate

Arnaud Chevalier,<sup>†</sup> Martine Dubois,<sup>‡,§</sup> Vadim Le Joncour,<sup>‡,§</sup> Sébastien Dautrey,<sup>†</sup> Céline Lecointre,<sup>‡,§</sup> Anthony Romieu,<sup>†</sup> Pierre-Yves Renard,<sup>†</sup> Hélène Castel,<sup>\*,‡,§</sup> and Cyrille Sabot<sup>\*,†</sup>

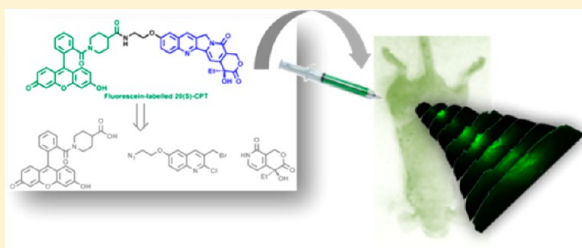
<sup>†</sup>Normandie University, COBRA, UMR 6014 and FR 3038; University of Rouen; INSA of Rouen; CNRS, 1 rue Tesnière 76821 Mont-Saint-Aignan, Cedex, France

<sup>‡</sup>Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation (DC2N), Astrocyte and Vascular Niche, Institute of Research and Biomedical Innovation (IRIB), PRES Normandy University, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan Cedex, France

<sup>§</sup>North-West Cancéropole (CNO), 59008 Lille Cedex, France

### S Supporting Information

**ABSTRACT:** The first synthesis and photophysical properties of a fluorescently labeled camptothecin derivative, namely, camptothecin-FI (CPT-FI), an antitumoral agent that targets topoisomerase I, are reported. The preparation of this fluorescent conjugate is based on a highly convergent and flexible approach which enables the rapid chemical modification of the AB ring system of this fragile pentacyclic alkaloid, aimed at introducing an anchoring point to graft the fluorophore. The selection of a fluorescein analogue as the reporter group has enabled us to get the first green-emitting CPT conjugate exhibiting valuable spectral properties and retaining biological properties of native CPT. Indeed, in biological models, i.e., glioma cell lines U87 and/or T98, the kinetics of cell endocytosis, as well as the efficacy of CPT-FI were compared to those of CPT. CPT-FI fluorescence was measured in the cytosolic compartment of T98 glioma cells from 5 min treatment and remained detectable until 48 h. As CPT, CPT-FI drastically inhibited glioma growth and cell cycle but exhibited a reduced affinity as compared to the native CPT. *In vivo* and *ex vivo* imaging studies of CPT-FI intratumorally injected into a model of NIH-3T3 murine tumor xenografts in nude mice, showed accumulation around the injected site area, which is very promising to target tumors and follow biodistribution *in vivo*.



### ■ INTRODUCTION

Since its first discovery in 1966,<sup>1</sup> the pentacyclic alkaloid 20(S)-camptothecin has emerged as an important lead compound in the field of anticancer drug development. CPT acts by stabilizing the DNA-topoisomerase I binary complex and enhancing apoptosis through blocking the advancement of replication forks.<sup>2</sup> Also, CPT and its numerous derivatives developed over the years display various antitumor activities in a wide range of cancers, such as ovarian and lung (topotecan), colon (irinotecan), or brain (gimatecan and belotecan).<sup>3–5</sup> Despite significant progress, residual secondary effects are still observed, such as, for example, hematological toxicity, headache, fever, and fatigue, associated with the CPT-based chemotherapy. Fluorescent labeling of biomolecules or bioactive compounds is a common way to gain insights into either unwanted organism–drug interactions or pharmacological mechanisms.<sup>6–8</sup> However, despite the number of questions concerning the pharmacokinetic, real access, and penetration in the tumor and the number of side effects of usual chemotherapy (as well as new targeted therapies), strategies for fluorescently labeling of cancer therapeutic drugs have scarcely been developed until now. Thus, we propose here the first strategy to develop original

imaging tools, adapted to *in vivo* imaging of the small animal, but also to study mechanisms of action of molecules at the cellular level within tumors (role in apoptosis, proliferation, and vascularization) and in healthy tissues.

Despite the overwhelming number of CPT analogues reported in the literature over the past decade, none of them have already been directly modified<sup>9</sup> with a fluorescent reporter group.<sup>10–12</sup> This can be mainly explained to the absence of a suitable bioconjugatable reactive handle within this pentacyclic alkaloid structure whose derivatization would not drastically affect its biological activity.<sup>13</sup> In addition, the facile hydrolysis of its lactone moiety represents a challenging bioconjugation issue especially for considering further functionalization of this fragile molecular scaffold. Although most CPT derivatives exhibit a natural and strong blue fluorescence, their absorption and emission spectra (e.g., shape, intensity, and wavelength) are highly dependent on the analogue considered and the stability of their crucial E-ring lactone. Indeed, under physiological

**Received:** September 21, 2012

**Revised:** June 7, 2013

**Published:** June 10, 2013

conditions, the lactone ring of CPT is rapidly hydrolyzed into the usually less fluorescent and physiologically active carboxylate form.<sup>14–16</sup> Even if the intrinsic fluorescence properties of CPT could be compatible with *in vitro* bioassays,<sup>17</sup> more challenging bioanalytical applications focusing on the tracking of biological events (following administration of this bioactive compound) *in cellulo* or *in vivo* could not be easily implemented due to the blue light absorption and scattering by the biological matrix and the background signal from cellular autofluorescence.<sup>18</sup> Thus, it is essential to dispose of a reliable fluorescent chemical reporter conveniently link to the bioactive alkaloid, to efficiently track the biological processes, whatever the analogues considered and the proportion of its lactone form in biological media. Consequently, in this present work, we wish to provide a general framework to access a fluorescently labeled CPT in order to validate the possibility of fluorescently modified chemotherapy (or targeted therapy) without losing valuable and characteristic biological antitumoral properties, determined *in vitro* and *in vivo* in animal models.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**General.** All solvents were dried following standard procedures (dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>): distillation over P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN): distillation over CaH<sub>2</sub>, THF: distillation over Na<sup>o</sup>/benzophenone). *N,N*-Dimethylformamide (DMF) was purchased from Fisher Scientific and stored over 3 Å molecular sieve. 1,2-Dimethoxyethane (DME) was dried by storage over 3 Å molecular sieve. *N,N*-Diisopropylethylamine (DIEA) was distilled over CaH<sub>2</sub>. Column chromatography purifications were performed on Geduran 60 silica gel (40–63 μm) from Merck. TLC were carried out on Merck DC Kieselgel 60 F-254 aluminum sheets. Compounds were visualized by one or more of the following methods: (1) illumination with a short wavelength UV lamp (i.e., λ = 254 nm), (2) spray with a 0.2% (w/v) ninhydrin solution in absolute ethanol, and (3) spray with a 3.5% (w/v) phosphomolybdic acid solution in absolute ethanol. The HPLC-gradient grade acetonitrile (CH<sub>3</sub>CN) and methanol (CH<sub>3</sub>OH) were obtained from VWR. Phosphate buffered saline (PBS, 100 mM phosphate + 150 mM NaCl, pH 7.5) and aq mobile phases for HPLC were prepared using deionized water purified with a Milli-Q system (purified to 18.2 MΩ.cm).

**Instruments and methods:** Melting points were recorded on a LEICA VMHB Kofler system at atmospheric pressure. Optical rotations were measured by using a Perkin-Elmer 341 polarimeter. Infrared (IR) spectra were recorded with a universal ATR sampling accessory on a Perkin-Elmer FT-IR Spectrum 100 spectrometer. The elemental analyses were carried out with a Flash 2000 Organic Elemental Analyzer (Thermo Scientific). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR spectra (C13APT or C13CPD experiments) and recorded either on a Bruker AC 200 or on a Bruker DPX 300 spectrometer working at 200 and 300 MHz, respectively. Chemical shifts are expressed in parts per million (ppm) from the residual nondeuterated solvent signal CDCl<sub>3</sub> (δ<sub>H</sub> = 7.26, δ<sub>C</sub> = 77.00) or DMSO-*d*<sub>6</sub> (δ<sub>H</sub> = 2.50, δ<sub>C</sub> = 39.43).<sup>19</sup> *J* values are in hertz (Hz). Analytical HPLC was performed on a Thermo Scientific Surveyor Plus instrument equipped with a PDA detector. Semipreparative HPLC was performed on a Thermo Scientific SPECTRASYSTEM liquid chromatography system (P4000) equipped with a UV-visible 2000 detector. Low-resolution mass spectra were obtained with a Finnigan LCQ Advantage MAX (ion trap) apparatus equipped with an electrospray (ESI) source. High-resolution mass spectra were

recorded on a LCT Premier XE benchtop orthogonal acceleration time-of-flight (oa-TOF) mass spectrometer (Waters Micromass) equipped with an ESI source and in the positive mode. The absorption spectra were recorded on a Varian Cary 50 scan spectrophotometer by using a rectangular quartz cell (Varian, standard cell, Open Top, 10 × 10 mm, 3.5 mL). The emission/excitation spectra were recorded with a Varian Cary Eclipse spectrophotometer after excitation/emission at the suitable wavelength (excitation and emission filters: auto; excitation and excitation and emission slit: 5 nm) with a semimicro quartz fluorescence cell (Hellma, 104F-QS, 10 × 4 mm, 1400 μL). All fluorescence spectra were corrected. The following equation was used to determine the relative fluorescence quantum yield:<sup>20</sup>

$$\Phi F(X) = (A_S/A_X)(F_X/F_S)(n_X/n_S)^2 \Phi F(S)$$

where *A* is the absorbance at the excitation wavelength. (in the range 0.01–0.1 A.U.), *F* is the area under the corrected emission curve, *n* is the refractive index of the solvents (at 25 °C) used in measurements, and the subscripts S and X represent standard and unknown, respectively. The following standards were used: 7-hydroxycoumarin in PBS (ΦF = 76%) and fluorescein in aq. 0.1 M NaOH (ΦF = 90%).

**RP-HPLC separations:** The following system was used for the analytical experiments: column Thermo Hypersil GOLD C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6 × 150 mm) with CH<sub>3</sub>CN and aq. 0.1% trifluoroacetic acid (aq. TFA 0.1%, pH 2.0) as eluents [100% TFA (1 min), then linear gradient from 0% to 80% (45 min) of CH<sub>3</sub>CN]. UV detection at 254 nm. The following chromatographic system was used for the purification step: column Varian Kromasil C<sub>18</sub> (10 μm, 21.2 × 250 mm) with CH<sub>3</sub>CN and aq. TFA 0.1% as eluents with the following gradient [100% TFA (5 min), then linear gradient from 20% to 100% (49 min) of CH<sub>3</sub>CN] at a flow rate of 20.0 mL/min. Double UV-vis detection was achieved at 368 and 456 nm.

**Pyridone (3).** This compound was prepared in 96% e.e. according to the Fang modification<sup>21</sup> of Comins' strategy. The e.e. was determined using HPLC equipped with an analytical column Chiralcel ODH as chiral stationary phase: eluent system: heptane/isopropanol 9/1; flow: 1 mL/min; UV detection: 254 nm; retention times: *t*<sub>R1</sub> = 17.94 min (area 1 = 1.95) and *t*<sub>R2</sub> = 22.86 min (area 2 = 98.05).

**2-Chloro-6-hydroxyquinolin-3-carbaldehyde (5).** To a stirred solution of 2-chloro-6-methoxyquinolin-3-carbaldehyde (500 mg, 2.26 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (15 mL) cooled at –78 °C was added BBr<sub>3</sub> (0.75 mL, 7.91 mmol, 3.5 equiv) dropwise. After stirring for 30 min at –78 °C, the mixture was warmed to rt and stirred for further 2 h. Thereafter, the reaction mixture was cooled to 0 °C and quenched by adding ice and cold deionized water. The resulting mixture was extracted with ethyl acetate (2 × 50 mL). The combined organic layers were washed with brine, dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and concentrated under reduced pressure. The resulting residue was triturated with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> to afford a yellow solid (380 mg, 1.83 mmol, yield 82%). Mp 210 °C (decomposition). IR 3278, 1693, 1579, 1500, 1219 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 10.50 (s, 1H, OH), 10.35 (s, 1H), 8.79 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.52 (dd, *J* = 2.4, 9.0 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 189.4, 156.7, 145.3, 143.6, 139.3, 129.2, 127.7, 126.0, 125.9, 110.2. HPLC *t*<sub>R</sub> = 16.1 min, purity >96%. MS(ESI+): *m/z* (%): 208 (100) [M + H]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>10</sub>H<sub>6</sub>ClNO<sub>2</sub>: 208.

**6-(2-Azidoethoxy)-2-chloro-quinolin-3-carbaldehyde (6).** To a stirred solution of 5 (100 mg, 0.48 mmol) in dried DMF

(1.5 mL), under atmosphere of argon, at rt was added anhydrous solid  $K_2CO_3$  (333 mg, 2.4 mmol, 5 equiv). The reaction mixture turned red immediately. After 5 min stirring at room temperature, the 2-azidoethyl tosylate<sup>27</sup> (126 mg, 0.60 mmol, 1.25 equiv) was added to the solution. The reaction mixture was heated at 50 °C for 12 h. The mixture was cooled to room temperature, solubilized in a minimum of water/DMSO (1:1), and directly filtered over silica gel (EtOAc/cyclohexane 1:1) to afford the 2-azidoethyl ether **6** (143 mg, 0.52 mmol, 63%) as a yellow solid. Mp: 124–126 °C. IR 2928, 2118, 1690, 1577, 1497, 1236  $cm^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  10.33 (s, 1H), 8.74 (s, 1H), 7.91 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.65 (d, *J* = 2.6, 1H), 7.57 (dd, *J* = 2.6, 9.0, 1H), 4.30 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H), 3.76 (t, *J* = 4.6 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  189.3, 156.7, 146.5, 144.5, 139.5, 129.2, 127.4, 126.2, 125.9, 108.5, 67.2, 49.2. HPLC: *t*<sub>R</sub> = 24.9 min, purity >92%. MS(ESI+): *m/z* (%): 277 (100) [*M* + *H*]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>12</sub>H<sub>10</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 277. Elemental analysis (%) calcd: C, 52.09; H, 3.28; N, 20.25; found: C, 52.18; H, 3.27; N, 20.24.

**(6-(2-Azidoethoxy)-2-chloroquinolin-3-yl)methanol (7)**. To a stirred solution of **6** (164 mg, 0.59 mmol) in 4 mL of CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1:1) at 0 °C was added solid NaBH<sub>4</sub> (22 mg, 0.59 mmol, 1 equiv). The reaction mixture was warmed to rt and stirred for 3 h. Then the solution was quenched with a solution of sat. aq. NH<sub>4</sub>Cl (20 mL) and extracted with EtOAc (3 × 40 mL). The combined organic layers were washed with brine (20 mL), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, and filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was dissolved in a minimum of DMSO and purified by chromatography over silica gel (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> then cyclohexane/EtOAc 1:1) to afford the alcohol **7** (123 mg, 0.44 mmol, 74%) as a yellow solid. Mp: 150–152 °C. IR 3383, 2928, 2107, 1621, 1497, 1221  $cm^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  8.31 (s, 1H), 7.83 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.48 (s, 1H), 7.37 (d, *J* = 9.0, 1H), 5.72 (s, 1H), 4.66 (s, 2H), 4.29 (s, 2H), 3.74 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  156.3, 145.8, 141.8, 134.6, 134.0, 129.0, 128.2, 122.1, 106.8, 67.0, 59.8, 49.4. HPLC: *t*<sub>R</sub> = 20.9 min, purity >93%. MS(ESI+): *m/z* (%): 279.13 (100) [*M* + *H*]<sup>+</sup>, calcd for C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>: 279. Elemental analysis (%) calcd: C, 51.72; H, 3.98; N, 20.10; found: C, 51.55; H, 4.07; N, 19.70.

**6-(2-Azidoethoxy)-3-(bromomethyl)-2-chloroquinoline (2)**. To a stirred solution of **7** (121 mg, 0.44 mmol) in dry CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4 mL) cooled at 0 °C was added PBr<sub>3</sub> (45  $\mu$ L, 0.47 mmol, 1.1 equiv). The reaction was stirred for 12 h at rt. Next, the solution was cooled to 0 °C and quenched by sequential addition of CH<sub>3</sub>OH (200  $\mu$ L) and sat. aq. NaHCO<sub>3</sub> (20 mL), extracted with dichloromethane (3 × 30 mL). The combined organic layers were washed with brine (10 mL), dried over anhydrous MgSO<sub>4</sub>, filtered, and the solvent was removed under reduced pressure. The resulting residue was purified by chromatography over silica gel (cyclohexane/EtOAc 9:1) to afford **2** (97 mg, 0.28 mmol, 65% yield) as a white solid. IR 2931, 2107, 1621, 1494, 1234, 829  $cm^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.08 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 9.0, 1H), 7.39 (dd, *J* = 2.1, 9.0 Hz, 1H), 7.03 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 4.67 (s, 2H), 4.23 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H), 3.67 (t, *J* = 4.8 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  156.9, 147.5, 143.4, 137.9, 129.8, 129.7, 128.0, 123.5, 105.8, 67.2, 49.8, 29.8. HPLC: *t*<sub>R</sub> = 29.7 min, purity >98%. HRMS (ESI+): Calc. for C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>BrClN<sub>4</sub>O: 342.9784; found: 342.9784.

**(S)-7-(6-(2-Azidoethoxy)-2-chloroquinolin-3-methyl)-4-ethyl-4-hydroxy-1,7-dihydro-4H-pyranol[3,4-c]pyridine-3,8-dione (8)**. To a stirred solution of **3** (54 mg, 0.26 mmol) in dry DME (4 mL) at 0 °C was added anhydrous *t*BuOK

(32 mg, 0.28 mmol, 1.1 equiv). The resulting mixture was stirred at 0 °C for 15 min and at rt for further 15 min. A solution of the benzyl bromide **2** (97 mg, 0.28 mmol, 1.1 equiv) in dry DME (2 mL) was added to the previous solution, and the resulting reaction mixture was stirred for 12 h at rt and 1 h under reflux (for a complete conversion). Thereafter, the mixture was cooled to rt and concentrated. The residue was filtered over a silica gel pad (cyclohexane/EtOAc 1:1 then EtOAc) to afford **8** (73 mg, 0.15 mmol, 60%) as a white solid; Mp: 82–84 °C. IR 3371, 2940, 2109, 1743, 1657, 1599, 1228  $cm^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.98 (s, 1H), 7.89 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H), 7.62 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.40 (dd, *J* = 9.3; 2.4, 1H), 7.05 (d, *J* = 2.4, 1H), 6.58 (d, *J* = 7.2, 1H), 5.57 (d, *J* = 16.2, 1H), 5.45 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 5.24 (d, *J* = 15.3 Hz, 1H), 5.16 (d, *J* = 16.2 Hz, 1H), 4.22 (t, *J* = 4.8, 2H), 3.78 (s, 1H), 3.66 (t, *J* = 5.1 Hz, 2H), 1.83–1.76 (m, 2H), 0.97 (t, *J* = 7.2 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (75.5 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.6, 158.7, 156.9, 149.0, 146.9, 143.3, 138.2, 138.0, 129.7, 127.9, 127.1, 123.8, 119.1, 105.9, 103.2, 72.1, 67.2, 66.3, 50.4, 49.8, 31.3, 7.6. HPLC: *t*<sub>R</sub> = 23.3 min, purity >86%. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> +27° (c 2.7, CHCl<sub>3</sub>). HRMS (ESI+): Calc. for C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>5</sub>: 470.1231; found: 470.1237.

**(S)-7-(6-(2-*tert*-Butyl ethoxycarbamate)-2-chloroquinolin-3-methyl)-4-ethyl-4-hydroxy-1,7-dihydro-4H-pyranol[3,4-c]pyridine-3,8-dione (9)**. The azide derivative **8** (26 mg, 0.05 mmol) was dissolved in a mixture of EtOAc-CH<sub>3</sub>OH (2:1, v/v, 3 mL). Di-*tert*-butyl dicarbonate (24 mg, 0.11 mmol, 2 equiv) and Lindlar catalyst (7 mg, 5% by wt) were sequentially added. The reaction flask was purged and flushed with Ar gas then with H<sub>2</sub> gas. The resulting reaction mixture was stirred at rt under an H<sub>2</sub> atmosphere for 12 h. Thereafter, the reaction mixture was filtered through a Celite 545 pad, the filter cake was washed with EtOAc (5 mL), and the combined filtrates were concentrated under reduced pressure. The resulting residue was filtered on silica gel pad by using a step gradient of EtOAc (20–80%) in cyclohexane as the mobile phase affording **9** as a white solid (28 mg, 0.05 mmol, yield 93%); Mp: 88–90 °C. IR 3347, 2977, 1746, 1703, 1658, 1497, 1164  $cm^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.95 (s, 1H), 7.86 (d, *J* = 9.2 Hz, 1H), 7.61 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 7.34 (dd, *J* = 2.4, 9.2 Hz, 1H), 7.02 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H), 6.59 (d, *J* = 7.2 Hz, 1H), 5.58 (d, *J* = 16.1 Hz, 1H), 5.42 (d, *J* = 15.2 Hz, 1H), 5.24 (d, *J* = 15.6 Hz, 1H), 5.15 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H), 5.07–5.02 (m, 1H), 4.09 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 3.79 (s, 1H), 3.56 (t, *J* = 5.2 Hz, 2H), 1.86–1.75 (m, 2H), 1.43 (s, 9H), 0.97 (t, *J* = 7.4 Hz, 3H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.6, 158.7, 157.3, 155.7, 149.1, 146.7, 143.2, 138.1, 138.0, 129.6, 128.0, 127.1, 123.7, 119.2, 105.9, 103.2, 79.6, 72.1, 67.5, 66.3, 50.3, 39.8, 31.4, 28.3, 7.6. HPLC: *t*<sub>R</sub> = 24.7 min, purity >96%. [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup> +27° (c 2, CHCl<sub>3</sub>). HRMS (ESI+): Calc. for C<sub>27</sub>H<sub>31</sub>ClN<sub>5</sub>O<sub>7</sub>: 544.1851; found: 544.1857.

**10-(2-*tert*-Butyl ethoxycarbamate)-(S)-camptothecin (10)**. In an oven-dried reaction glass tube, a solution of **9** (18 mg, 0.03 mmol) in dry CH<sub>3</sub>CN (1 mL) and KOAc (8 mg, 0.08 mmol, 2.5 equiv) was mixed. Ar gas was bubbled through the reaction mixture for 15 min. Then, (PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Pd(OAc)<sub>2</sub> (4.9 mg, 0.006 mmol, 0.2 equiv) was added and Ar gas was bubbled again through the reaction mixture for further 15 min. The flask was sealed and the reaction mixture was stirred at 100 °C for 18 h. Thereafter, the mixture was allowed to cool at rt and then directly filtered over a silica gel pad by using a step gradient of EtOAc (50–100%) in cyclohexane as the mobile phase to afford the desired fused pentacyclic alkaloid derivative **10** as a yellow light solid (12 mg, 0.02 mmol, yield 71%). IR 3345, 2977, 1755, 1656, 1502, 1238  $cm^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.19 (s, 1H),

8.04 (d,  $J = 9.3$ , 1H), 7.61 (s, 1H), 7.36 (dd,  $J = 2.1, 9.3$  Hz, 1H), 7.06 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 5.71 (d,  $J = 16.2$  Hz, 1H), 5.29–5.20 (m, 4H), 4.22 (s, 1H), 4.16 (t,  $J = 4.8$  Hz, 2H), 3.66–3.62 (m, 2H), 1.94–1.83 (m, 2H), 1.47 (s, 9H), 1.01 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.8, 157.6, 157.5, 155.9, 150.1, 149.9, 146.3, 144.7, 131.0, 129.5, 129.2, 129.0, 123.3, 118.0, 106.0, 97.4, 79.7, 72.7, 67.5, 66.1, 50.0, 39.9, 31.4, 28.3, 7.8. HPLC:  $t_{\text{R}} = 23.5$  min, purity >93%. HRMS (ESI+): Calc. for  $\text{C}_{27}\text{H}_{31}\text{ClN}_3\text{O}_7$ : 508.2084; found: 508.2090.

**Fluorescein-Isonipectic Acid Derivative (4).** This fluorophore carboxylic acid was prepared according to a procedure recently reported by us.<sup>22</sup>

**Fluorescein-Labeled Camptothecin (1).** (a) *Removal of the Boc Group.* To a solution of **10** (12 mg, 0.02 mmol) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (1 mL) cooled at 0 °C was added TFA (0.4 mL, 2.4 mmol, 118 equiv) dropwise and the resulting mixture was stirred at rt for 2 h. Thereafter, the reaction mixture was concentrated, and the residue was triturated with precooled  $\text{Et}_2\text{O}$  to afford the corresponding TFA salt of amino-camptothecin derivative **11**. MS (ESI+):  $m/z$  (%): 408 (100)  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , calcd for  $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_5$ : 408.

(b) *Amide Coupling Reaction.* The TFA salt was dissolved in dry DMF (0.6 mL) and the mixture was cooled to 0 °C. Fluorescein carboxylic acid **4** (12.2 mg, 0.03 mmol, 1.2 equiv), DIEA (20  $\mu\text{L}$ , 0.16 mmol, 7 equiv), HOBT monohydrate (3.6 mg, 0.03 mmol, 1.2 equiv), and DCC (6 mg, 0.03 mmol, 1.2 equiv) were sequentially added. The resulting reaction mixture was stirred at rt for 12 h and then evaporated almost to dryness. The resulting residue was purified by semipreparative RP-HPLC ( $t_{\text{R}} = 26.91$ – $29.76$  min). The product-containing fractions were lyophilized to afford the desired fluorescent bioconjugate **1** as an orange amorphous powder (7.7 mg, 0.01 mmol, overall yield 40% for the two steps). IR 3353, 2940, 1748, 1594, 1453, 1173  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (300 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  8.50 (s, 1H), 8.10–8.04 (m, 2H), 7.70–7.68 (m, 2H), 7.62–7.60 (m, 1H), 7.52–7.46 (m, 3H), 7.27 (s, 1H), 7.14–7.11 (m, 2H), 6.78–6.76 (m, 3H), 5.41 (s, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.16–4.12 (m, 2H), 4.05–4.02 (m, 1H), 3.52–3.44 (m, 1H), 3.50–3.45 (m, 2H), 2.36–2.26 (m, 2H), 1.86–1.84 (m, 2H), 1.60–1.56 (m, 2H), 1.22–1.15 (m, 3H), 0.88 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (75.5 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  173.9, 172.4, 166.3, 157.2, 156.7, 156.6, 150.1, 149.9, 145.6, 143.9, 135.8, 131.6, 130.5, 130.4, 130.2, 130.1, 129.9, 129.6, 129.3, 129.3, 127.1, 123.0, 120.8, 118.3, 115.2, 106.9, 102.8, 96.0, 72.3, 66.8, 65.2, 50.1, 45.6, 41.0, 37.9, 30.2, 28.4, 27.9, 8.5, 7.7. HPLC:  $t_{\text{R}} = 21.2$  min, purity >95%. HRMS (ESI+): Calc. for  $\text{C}_{48}\text{H}_{41}\text{N}_4\text{O}_{10}$ : 833.2823; found: 833.2844.

**Compounds, Cell Lines, and Culture Conditions.** NIH3T3 mouse fibroblasts cells (obtained from America Type Culture Collection) were cultured in high glucose DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FBS), 2 mM L-glutamine, and 100 U/mL penicillin/streptomycin at 37 °C in a humidified 5%  $\text{CO}_2$  incubator. Human cell lines from glioblastoma U87 and T98 were obtained from the American Type Culture Collection. The T98 cells were maintained in HAM-F12 and U87 cells were maintained in DMEM (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) containing 10% FBS and 1% sodium pyruvate at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . Culture media were replaced every three days.

**Topoisomerase I Relaxation Assay.** Topo I inhibitory activity of CPT-FI versus CPT was assayed by supercoiled DNA relaxation assay. Supercoiled DNA (TopoGEN, FL, USA) was incubated at 37 °C for 30 min with purified human Topo I

(TopoGEN, FL, USA) which was premixed with increasing concentrations CPT-FI (50–200  $\mu\text{M}$ ) or CPT (as control, 50  $\mu\text{M}$  to 1 mM), then terminated with proteinase K/SDS stop buffer, and loaded on to 2% agarose gel. The standard reaction system contained: 0.25  $\mu\text{g}$  DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0.1% bovine serum albumin, 0.1 mM spermidine, and 1 U Topo I extracted from T98 cell lines. The samples were electrophoresed in a horizontal 2% agarose gel in TAE (tris base, acetic acid and EDTA) buffer at 1.5 V/cm during 2 h at room temperature. DMSO concentrations in each reaction were maintained at 1% by the addition of serially diluted drug stocks so as not to produce solvent mediated inhibition of Topo I activity. The gels were only poststained with ethidium bromide, destained in water, and photographed under UV illumination.

**Cell Growth Assay.** T98 cells were plated in quadruplicates in 12-well plates (Costar,  $15 \times 10^3$  cells/well for 24 h before treatment in HAM-F12 (for T98 cells) and DMEM (for U87 cells), supplemented with 10% FBS. Cells were then incubated in the absence or presence of graded concentrations of CPT (TCI, Zwijndrecht, Belgium) or CPT-FI (0.05 to 5  $\mu\text{M}$ ) for 24, 48, and 72 h, respectively. Controls were determined by using a DMSO or FI concentration corresponding to the dilution of CPT used for 5  $\mu\text{M}$  concentration tested. After treatment, cells were harvested, rinsed by PBS, detached by accutase (Millipore, Molsheim, France), and cellular density was measured by direct cell counting in tampon Z-tri-Pak (Beckman, Lognes, France) with an electronic cell counter (Z2, Coulter Beckmann).

**Cell Cycle Analysis.** T98 cell lines were plated in 75  $\text{cm}^2$  flasks (Techno plastic products AG, Trasadingen, Switzerland). When cells reached 80% confluence, they were incubated in the absence or presence of CPT and CPT-FI (50 nM and 0.5  $\mu\text{M}$ ) for 24 or 48 h. Cells treated with DMSO corresponding to CPT concentrations were used as control. Cell cycle analysis was done by DNA staining with propidium iodide by flow cytometry. Briefly, after treatment, cells were trypsinized, harvested in PBS, and fixed in ice cold 70% ethanol for 2 h. Staining was done with 0.6 mg/mL RNase (30 min, RT, Sigma-Aldrich) and 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  propidium iodide (30 min, RT, Sigma-Aldrich). Cell cycle status was quantified by FacsCalibur flow cytometer (BD Biosciences) using CellQuest analysis software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) using an excitation laser set at 480 nm and a detection wavelength of 670 nm (FL3), to avoid detection of FI excitation.

**Imaging of Camptothecin-FI Incorporation in Living Cells.** Glioblastoma T98 cell line cultured in 35-mm glass bottom microwell dishes (MatTek, Ashland, USA) containing growth medium, and maintained in a live cell chamber at a fixed temperature of 37 °C. T98 cellular uptake of CPT and CPT-FI **1** (5  $\mu\text{M}$ ) was monitored using a confocal laser-scanning microscope TSC SPS by video time-lapse microscopy at the gain and offset (Leica, Heidelberg, Germany) equipped with a AOBs system and a white laser (excitation flexibility).

The cellular uptake of CPT and CPT-FI was also examined by flow cytometry. T98 cells were plated in 75  $\text{cm}^2$  culture flasks containing the growth medium 24 h before treatments with CPT and CPT-FI during 5, 15, and 30 min or 24 and 48 h treatments with CPT and CPT-FI (0.5  $\mu\text{M}$  each). The quantitative fluorescence was observed with a FacsCalibur flow cytometer (BD Biosciences) using CellQuest analysis software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) using an excitation laser set at 480 nm and a detection wavelength of 515 nm, to allow detection of FI excitation.

**Heterotopic Tumoral Growth Study.** Swiss nude mice (Charles River Laboratory, L'Arbresle, France) were kept in a temperature-controlled room ( $21 \pm 1$  °C), under an established photoperiod (lights on 07.00–19.00 h) with free access to food and tap water. The work described in this article was carried out in accordance with the Directive 2010/63/EU of the European parliament and of the council of 22nd September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, published in the Official Journal of the European Union L276/33 (20.10.2010) and authorized by the French Ethical Committee. These experiments were conducted under the supervision of authorized investigators (H. Castel; authorization no. 76.98 from the Ministry of Food, Agriculture and Fisheries).

For intratumoral experiments, the tumorigenic NIH3T3 cell lines were used to monitor the direct intratumoral penetration of the CPT-FI. Thus, a cohort of 6- to 7-week-old male Swiss Nude mice (Charles River Laboratory, L'Arbresle, France) was sedated by isoflurane inhalation (Aerane, Baxter) and implanted subcutaneously (s.c.) into right flanks with  $1 \times 10^6$  NIH3T3 cells/100  $\mu$ L PBS. A stock solution of CPT-FI in DMSO ( $10^{-2}$  M) was prepared and stored at  $-20$  °C. Aliquots of CPT-FI at 40 mg/kg, were freshly prepared in DMSO/NaCl 0.9%, for each day injection. When tumors reached a volume of 700 mm<sup>3</sup>, 10  $\mu$ L of CPT-FI or vehicle at the corresponding concentration were injected in the tumor. Tumor sizes were measured every two days by the use of a caliper (Bioblock, 0.01 mm precision, Fisher Scientific SAS, Illkirsh, France) and volume was calculated as  $V = (1/2)ab^2$  ( $a$ , length of the apparent tumoral mass;  $b$ , width of the apparent tumoral mass). Mouse weight was also controlled every two days. Animals were sacrificed when tumors reached the maximal ethical volume of 2000 mm<sup>3</sup>. Tumors were immediately collected, frozen in isopentane, and maintained at  $-80$  °C until immunohistochemistry experiments.

For intravenous administration of FITC or CPT-FI, and tumor distribution, a cohort of 6- to 7-week-old male Swiss Nude mice (Charles River Laboratory, L'Arbresle, France) was sedated by isoflurane inhalation (Aerane, Baxter) and implanted subcutaneously (s.c.) into right flanks with  $1 \times 10^6$  glioblastoma cell line U87 cells/100  $\mu$ L PBS. A stock solution of FITC or CPT-FI in DMSO ( $10^{-2}$  M) was prepared and stored at  $-20$  °C. Aliquots of CPT-FI were freshly prepared in DMSO/NaCl 0.9% for each injection. When tumors reached a volume of 300 mm<sup>3</sup>, 100  $\mu$ L of FITC (66 mg/kg; 0.5  $\mu$ mol) or CPT-FI (66 mg/kg) was injected *via* the tail vein. Animals were sacrificed 4 or 8 h after bolus administration of the fluorescent molecules. Tumors were immediately collected, frozen in isopentane, and maintained at  $-80$  °C until immunohistochemical analysis.

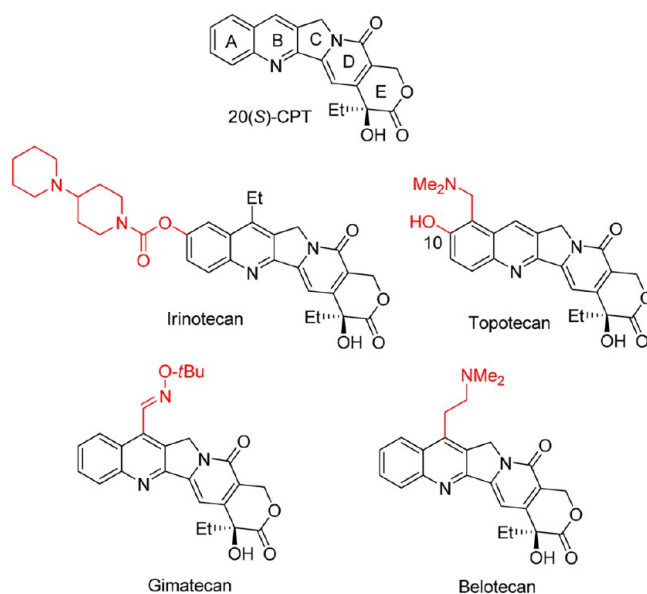
**Immunohistochemical Staining.** NIH3T3 Tumor sections (60  $\mu$ m thick) or U87 tumor sections (60  $\mu$ m thick) resulting from intravenous exposure to FITC or CPT-FI, were cut in a Cryostat (Cryostat CM1950, Leica microsystemes, Nanterre, France), mounted on gelatin-coated slides and maintained at  $-20$  °C until experiment. Briefly, slides were first rinsed in PBS, fixed in a paraformaldehyde (PFA) solution (4%, 20 min, RT), and washed three times in PBS. Sections were permeabilized and preincubated in a PBS, BSA 0.1%, NDS, 1:50, Triton X100 0.3%. Slides were then incubated with 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, 1/1000<sup>o</sup>, 10 min, RT, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), washed again, and mounted in Mowiol 4–88 (Calbiochem, Meudon, France). U87 tumors were co-immunostained with an anti-Collagen IV antibody (Santa Cruz Biotechnology, Le Perray-en-Yvelines, France), in order to visualize hyperplastic

tumor vessels. Slices were then examined using a confocal conventional microscope (Leica TCS SP2 AOBS, Nanterre, France) and a macroconfocal microscope (Leica TCS LSI). Analyses from the confocal acquisitions were achieved by using the ImageJ 1.44. software.

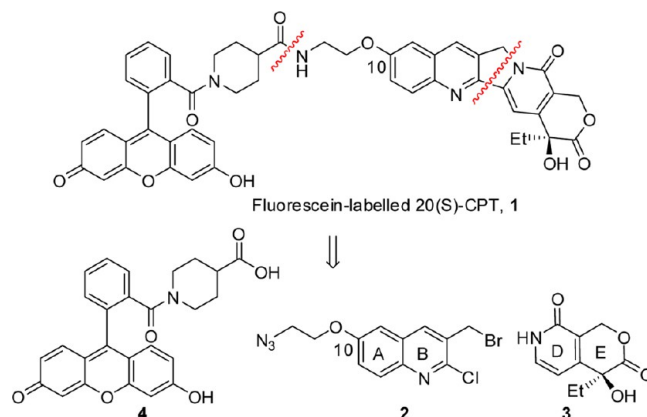
**Statistical Analysis.** All statistical analyses were conducted using the GraphPad Prism 4.00 software (GraphPad Software). Among the growth tumoral cell experiments, nonparametric statistical tests were used, i.e., Kruskal–Wallis ANOVA and Mann–Whitney tests for dual comparisons.  $P < 0.05$  was considered as significant.

## RESULTS AND DISCUSSION

To illustrate the proof-of-concept of possible fluorescent modifications of chemotherapy for investigation of biodistribu-



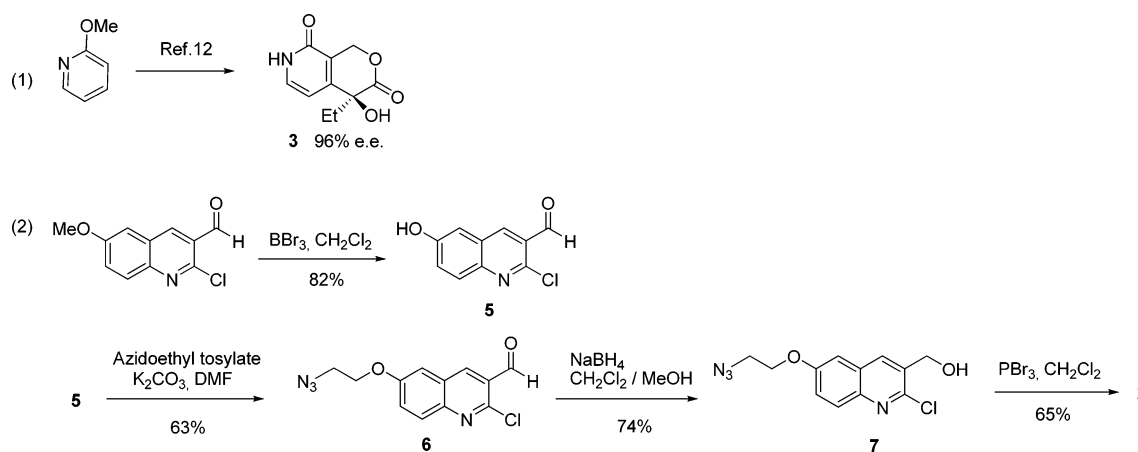
**Figure 1.** Camptothecin and its derivatives.



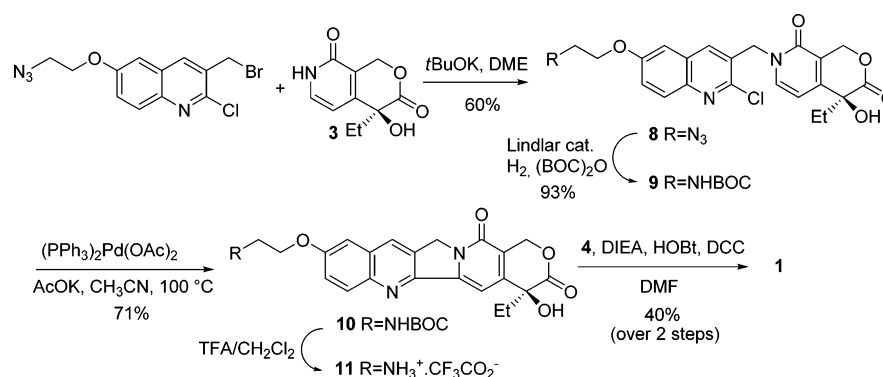
**Figure 2.** Fluorescein-labelled CPT 1: retrosynthetic analysis.

tion and pharmacokinetic, the most classical camptothecinoid, 20(*S*)-camptothecin, was selected as bioactive model compound, along with the well-established fluorescein as the green emitting fluorescent label.<sup>23</sup> Although near-infrared probes are ordinarily used for *in vivo* imaging, green fluorescence dyes have been preferred and widely used to image tumors and superficial tissues

## Scheme 1. Synthesis of AB and CD Ring Systems 2 and 3



## Scheme 2. Synthesis of the Fluorescein-Labeled CPT 1



## Scheme 3

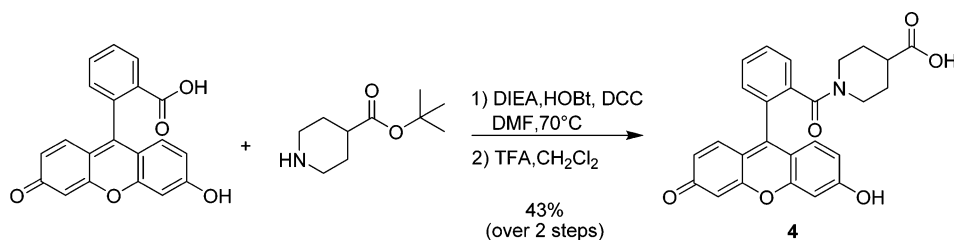


Table 1. Photophysical Properties of Fluorescent Conjugate 1 and of Its Components 11 and 4 in PBS at 25 °C

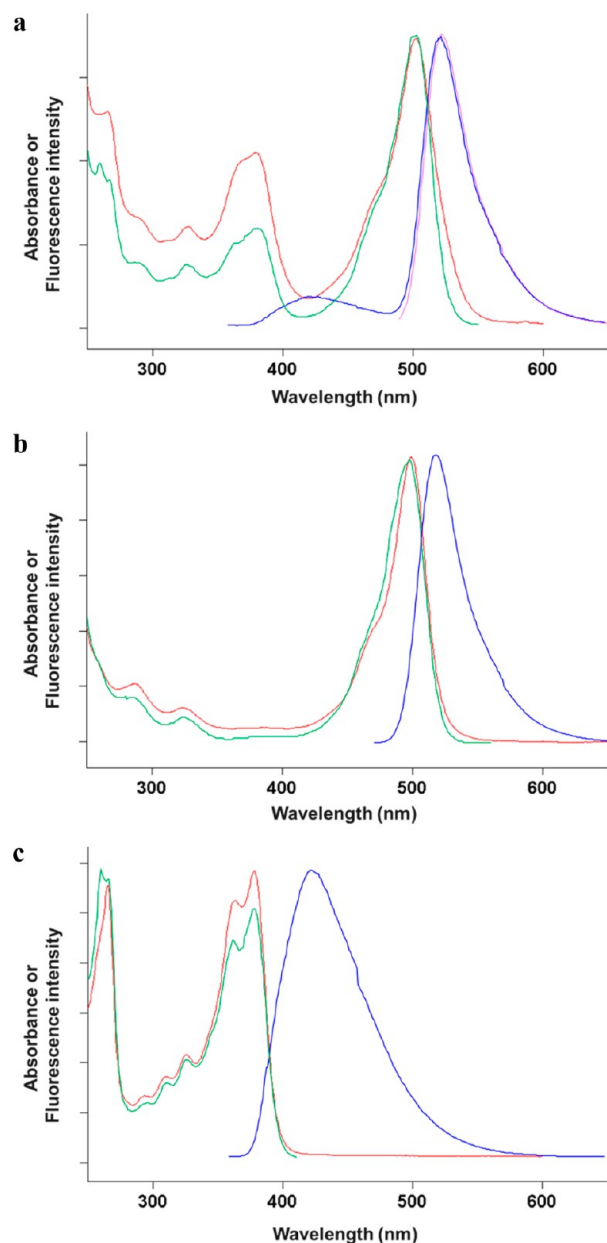
Cmpd	$\lambda_{\text{abs, max}}$ (nm)	$\epsilon$ ( $\text{dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )	$\lambda_{\text{em, max}}$ (nm)	$\Phi_{\text{F}}$ (%)
CPT-FI 1	265, 378, 502	21550, 17500, 28835	424, 524	37% <sup>a</sup>
4	499	47700	522	79% <sup>a</sup>
11	265, 363, 378	29250, 27640, 30740	424	61% <sup>b</sup>

<sup>a</sup>For  $\lambda_{\text{abs, max}} = 502$  and  $499$  nm, respectively; and determined by using fluorescein ( $\Phi_{\text{F}} = 90\%$  in aq. 0.1 M NaOH) as standard (excitation at 460 nm). <sup>b</sup>For  $\lambda_{\text{abs, max}} = 363$  nm; and determined by using 7-hydroxycoumarin ( $\Phi_{\text{F}} = 76\%$  in PBS) as standard (excitation at 350 nm).

on small animals such as mice, mainly because of the short penetration distance of green light in tissue.<sup>24</sup>

To be viable and rapidly extended to a wide range of CPT analogues used as cancer therapy in patients, a late stage modular synthetic approach to the fluorescent conjugate was investigated. Also, it is noteworthy that most of the biologically active

analogues are AB and/or E ring modified CPT. Consequently, the synthetic route chosen for the construction of the fluorescent conjugate involves the sequential and late stage assembly of three distinct molecular units: the AB ring system 2 with DE pyridinone-based heterocycle system 3 (described by Comins)<sup>25</sup> and finally the subsequent peptide-type coupling reaction between the pentacyclic alkaloid formed and the fluorophore 4 (Figure 2). The use of an unusual fluorescein derivative bearing a tertiary amide of isonipecotic acid at the 2'-position instead of the current carboxyl group was preferred to provide steric protection and so to improve the photostability of the fluorescein core.<sup>26</sup> Furthermore, this is the most common way to avoid the undesired cyclization equilibrium leading to the formation of the colorless and nonfluorescent spiro lactone (especially at pH < 6). This fluorescein derivative exhibits valuable fluorescence properties in the green spectral region and was attached at the C10 position of the A-ring of the bioactive compound to retain the biological activity. Indeed, substitution on rings C, D, and E is usually not well tolerated,<sup>13</sup> and introduction of an electron-rich



**Figure 3.** Normalized absorption (red), emission [(blue)  $\lambda_{\text{ex}}$  350 nm and (magenta)  $\lambda_{\text{ex}}$  480 nm for **1**, (blue)  $\lambda_{\text{ex}}$  350 nm for **11** and 460 nm for **4**] spectra, and excitation [(green),  $\lambda_{\text{em}}$  425 nm for **1**, 570 nm for **4**, and 560 nm for **11**] of (a) camptothecin–fluorescein conjugate CPT-FI **1** in PBS at 25 °C; (b) fluorescein-isonipecotic acid derivative **4**; (c) aminated CPT derivative **11**.

function at C10 position does not alter the biological activity of CPT, as illustrated by the C10 phenol substitution found in the topotecan structure (Figure 1).

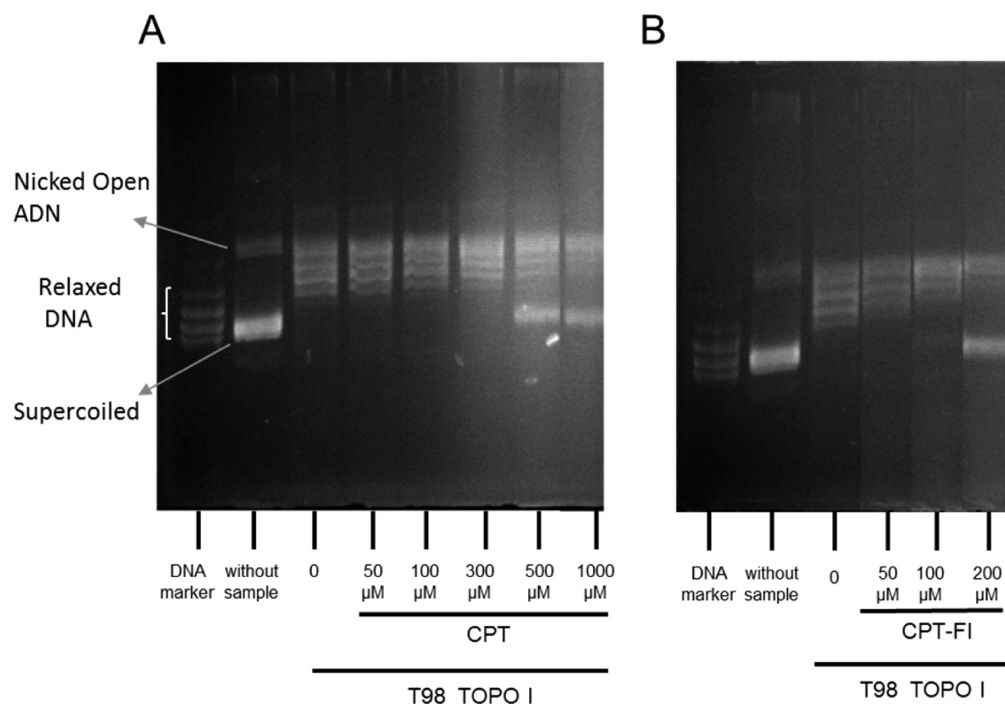
The DE ring fragment **3** was prepared from 2-methoxypyridine according to the Fang modification of Comins' strategy in 96% e.e. (Scheme 1, part 1).<sup>21</sup> The AB building block **2** was synthesized in four steps from commercially available 2-chloro-6-methoxy-3-quinolinecarboxaldehyde (Scheme 1, part 2). First, deprotection of the aromatic methyl ether was achieved with  $\text{BBr}_3$  in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  to afford **5** in 82% yield. Next, the resulting phenol derivative was reacted with 2-azidoethyl tosylate<sup>27</sup> in a standard  $\text{S}_{\text{N}}2$  reaction to give the corresponding ether **6**. It is noteworthy that the azido group has proven to be a particularly

useful amine precursor due to its good stability under both acidic and basic conditions required for the next steps of the synthesis. The aldehyde **6** was readily reduced with  $\text{NaBH}_4$  in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ –MeOH leading to the corresponding alcohol **7** in a good 74% yield. Final treatment of the primary alcohol with phosphorus tribromide in dry  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  afforded the AB fragment **2** with 65% yield.

The two fragments **2** and **3** were joined as described, on treatment with *t*-BuOK in 1,2-dimethoxyethane (DME) to provide the tetracycle **8** (Scheme 2). However, the Heck ring-closure strategy failed to form the C ring system, whatever the reaction conditions tested, probably due to the presence of the azido functionality. However, the use of Lindlar catalyst along with  $(\text{Boc})_2\text{O}$  directly and chemoselectively reduced azido **8** into the corresponding *N*-Boc-protected amine **9** in almost quantitative yield (93%), without dehalogenation of the aromatic chloride.<sup>28</sup> Gratifyingly, the Heck reaction proceeded to afford the corresponding pentacyclic alkaloid **10** in a good 71% yield. Next, the Boc group was removed with trifluoroacetic acid (TFA) in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  to furnish the corresponding primary amine **11**. The amine-reactive labeling reagent **4** derived from fluorescein was prepared using an optimized (two-step) procedure inspired by the work of Gao et al. (Scheme 3).<sup>26</sup> Amidification of fluorescein with *tert*-butyl isonipecotate was readily achieved by treatment with DCC-HOBt in dry DMF. Thereafter, the *tert*-butyl ester was removed by TFA in  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Due to the high polarity of the resulting carboxylic acid derivative, a purification by semipreparative RP-HPLC was found more convenient than standard chromatography over silica gel. Thus, fluorescein **4** was obtained with a good 43% overall yield. Compared to the synthetic protocol reported by Gao et al.,<sup>26</sup> which involves the chromatographic isolation of the *N*-hydroxysuccinimidyl ester (NHS ester) of fluorescein prior to its aminolysis with an alkyl isonipecotate derivative, our synthetic alternative significantly improved the yield and shortened the overall duration of the synthetic process.<sup>22</sup> Finally, this fluorescent carboxylic acid was coupled to the primary amino group of **11** under standard peptide-coupling conditions. In our case, DCC-HOBt in the presence of DIEA was preferred to a phosphonium or an uronium salt (such as BOP or TSTU) because these latter coupling reagents are prone to react with the phenol group of fluorescein to give undesired side-products leading to a dramatic drop in the isolated yield for the targeted fluorescent compound. The formation of the CPT-fluorescein conjugate **1** (CPT-FI) was carefully checked by analytical RP-HPLC to avoid overcoupling reaction between the product **1** and the unreacted fluorescein **4**. Upon completion of the conjugation reaction, the crude mixture was directly purified by semipreparative RP-HPLC to isolate pure compound **1** in a satisfying 40% yield over 2 steps. Its structure was confirmed by various spectroscopic data and its high purity was checked by RP-HPLC (see Supporting Information). Analysis of **1** using ESI mass spectrometry indicated the covalent attachment of the fluorescein label and confirmed the integrity of the pentacyclic scaffold of CPT. Thus, the first synthesis of CPT-FI was achieved in 11 steps and 1.4% overall yield from commercial 2-methoxypyridine and 15.8% from the known pyridinone **3**.

With the fluorescent probe **1** in hand, its complete photophysical properties were determined, along with those of **4** and **11** (Table 1 and Figure 3), under simulated physiological conditions (i.e., phosphate buffered saline (PBS), pH 7.5), to ensure that the spectral properties of the fluorescein core were kept upon its conjugation to the CPT alkaloid scaffold. As





**Figure 4.** Effect of CPT-FI on the catalytic activity of topoisomerase I extracted from T98 glioblastoma cell nuclei. Supercoiled plasmid DNA was incubated in the presence of 1  $\mu$ L nuclear cell lysate from T98 either alone (lanes 3, 0  $\mu$ M) or with increasing concentrations of camptotecin (CPT, A) at 50 (lane 4), 100 (lane 5), 300 (lane 6), 500 (lane 7), and 1000  $\mu$ M (lane 8) (A) or CPT-FITC (CPT-FI, B) at 50 (lane 4), 100 (lane 5), and 200  $\mu$ M (lane 6). Lane 1, relaxed DNA marker; lane 2, supercoiled plasmid DNA with nicked open DNA.

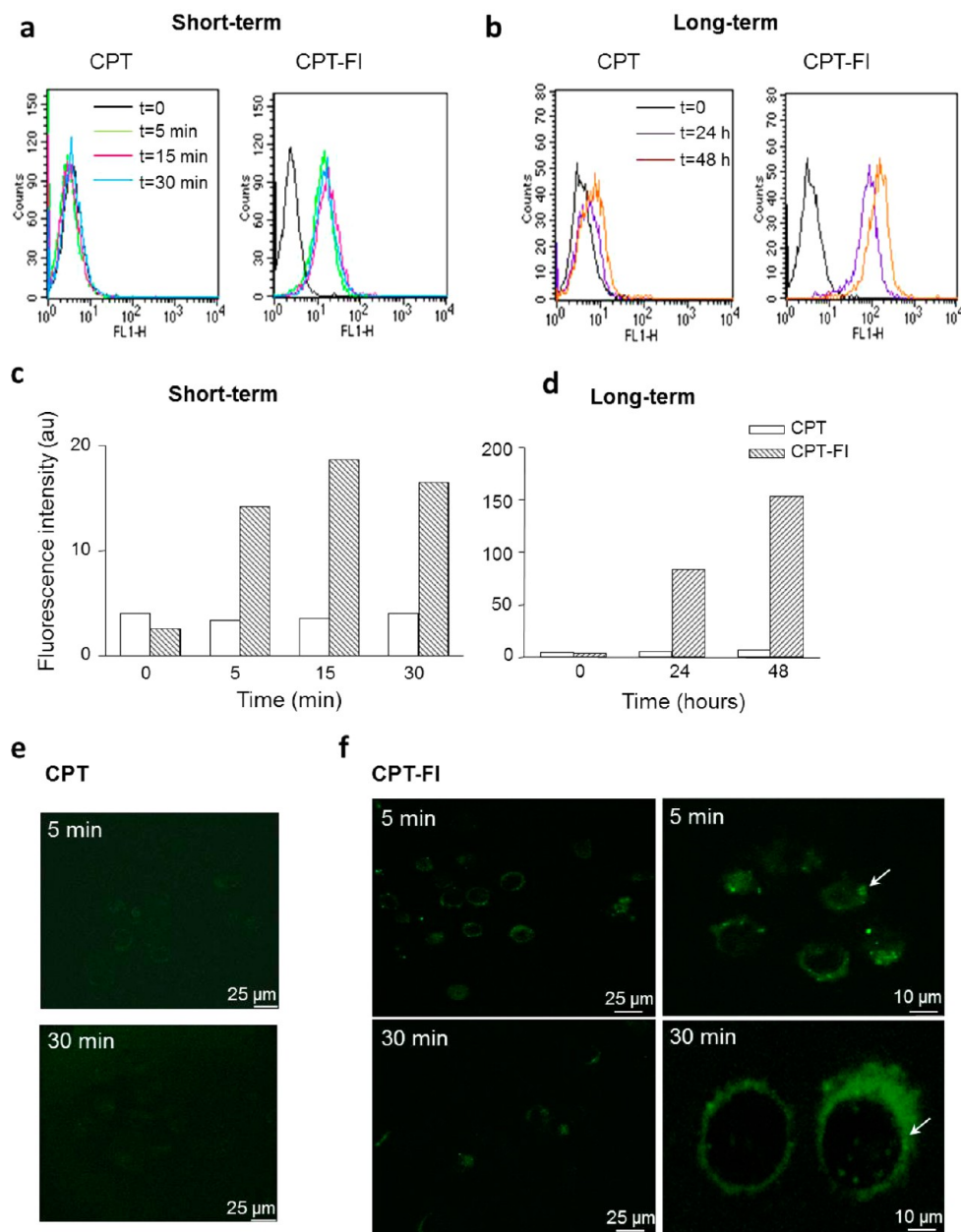
expected, the UV–vis absorption spectrum of the conjugate **1** was the sum of CPT derivative **11** and fluorescein **4** (Figure 3a), which suggests very weak or no electronic interaction (e.g., ground-state dimer) between these two fluorophores in the ground state. Although the fluorescein derivative **1** displays a smaller fluorescence quantum yield of 37% compared to the parent free xanthene dye **4**, satisfyingly, its emission and excitation spectra of **1** are in good agreement with those recorded for **4** or those generally reported for fluorescein derivatives such as **4** (Figure 3b). Consequently, as anticipated and experimentally validated, the fluorescein part of the chromophoric pair **1** could be selectively excited at 480 nm demonstrating attractive spectral features suitable for further biological imaging applications (Figure 3a). Finally, for informative purpose, the ability of the CPT part of the probe to transfer energy to the fluorescein moiety was also investigated. Indeed, as illustrated in Figure 3a, upon excitation at 350 nm (absorption maximum of CPT core), CPT-FI exhibits a strong green emission band centered at 524 nm and a weak blue emission band at 424 nm, indicating energy transfer between these two FRET partners with efficiency up to 91% (see Supporting Information for details about the energy transfer efficiency (E. T. E.) calculation).

Next, biological properties of the conjugate **1** were investigated and compared with the CPT of interest, 20(S)-camptothecin. In order to verify whether CPT-FI exhibited a similar CPT-inhibitory activity on Topoisomerase I (TOPO I) activity, we first extracted nuclear proteins from T98 cells and then evaluated the respective roles of CPT and CPT-FI on TOPO I activity. Then, we showed that T98 nucleus lysates converted a majority of supercoiled DNA into relaxed DNA as observed in lanes 2 and 3 (Figure 4A and B). Increasing concentrations of CPT (50–1000  $\mu$ M) and CPT-FI (50–200  $\mu$ M) prevented the supercoiled DNA from being converted into relaxed DNA (Figure 4A and B),

CPT-FI being more efficient than CPT in reproducible experiments. Thus, we demonstrate that CPT-FI exhibit a very potent inhibitory control of TOPO I from T98 suggesting that the linker modification of CPT to cross FITC would have even favor CPT affinity for TOPO I.

The prolonged exposure of proliferating and/or tumoral cells to topoisomerase inhibitors as CPT-derivatives results from DNA alteration and apoptotic events.<sup>29–31</sup> Accurate evaluation of the impact of CPT-FI as efficient anti-neoplastic compound, passed first through measurement of drug distribution using *in vitro* model systems, as a more practical method of determining how efficiently a drug penetrate cells. Thus, we first compared the kinetics of incorporation of CPT and CPT-FI in cultured human glioblastoma cell line T98. CPT-FI (0.5  $\mu$ M) was shown to be rapidly internalized (*short-term*, Figure 5a) in T98 cells after 5 min treatment, and appeared persistently cell-captured from 24 to 48 h (*long-term*, Figure 5b), yielding a 10-fold increase in intracellular intensity value from 5 min to 48 h treatment (Figure 5c). We then performed time-lapse confocal microscopy of CPT-FI (5  $\mu$ M) incorporation into living T98 cells. When extracellularly applied, the fluorescence was detected after 5 min of exposure, as revealed by punctuate fluorescent dots detected around cell nuclei (Figure 5f). As expected, upon excitation laser set at 480 nm, the autofluorescence of CPT could not be detected either at 5 or 30 min postincubation as shown in Figure 5e (see Supporting Information). Retention in tumor cells can be due to binding at the site of lethal activity (usually DNA), although basic drugs can be sequestered in acidic organelles such as perinuclear endosomes.

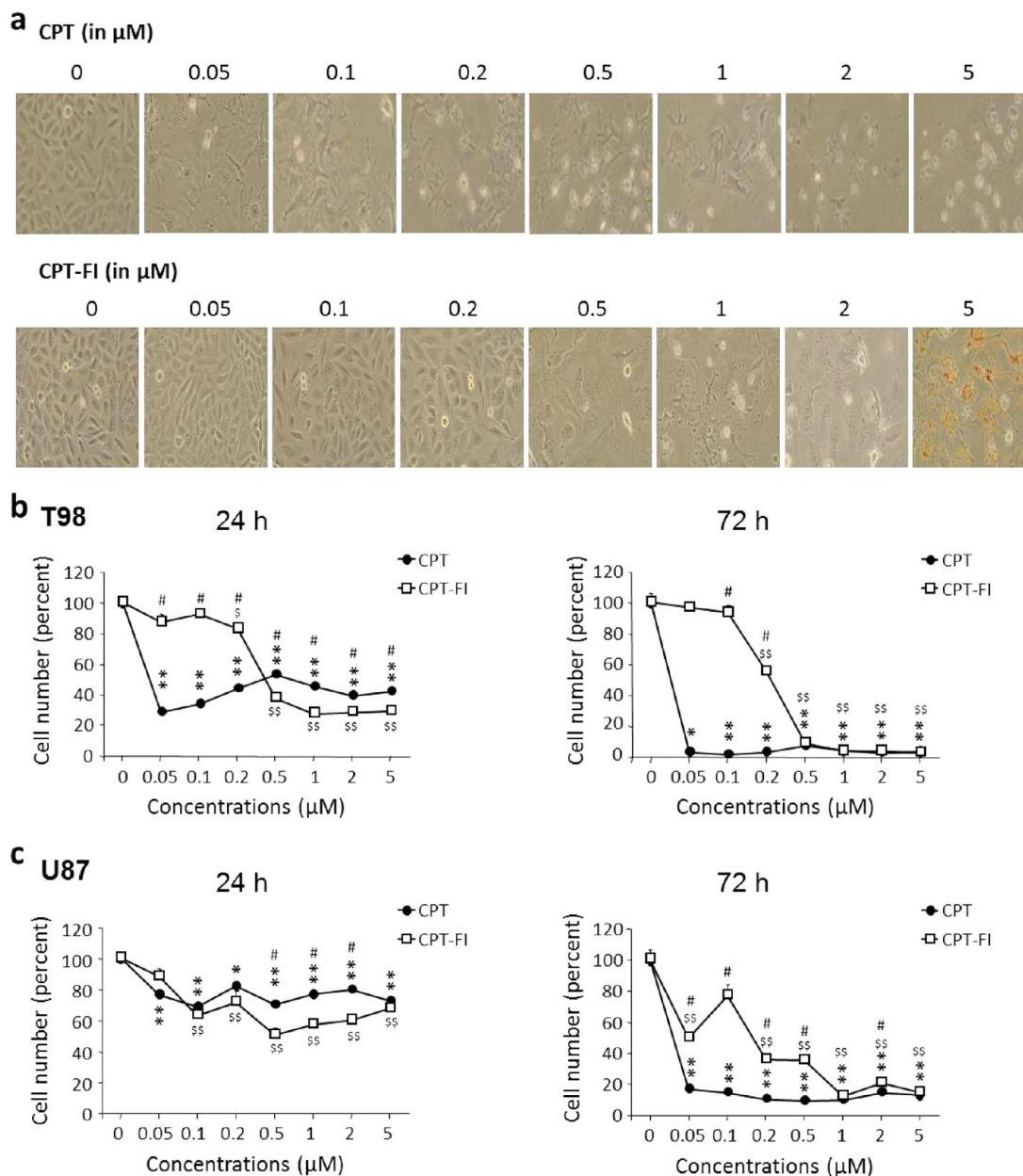
We thus hypothesize that specific labeling of CPT with FI may increase fluorescence intensity and/or facilitate detection with microscopic available equipments facilitating the detection by optical imaging.



**Figure 5.** Fluorescent detection of CPT-FI incorporation in glioma cells. (a and b) Flow cytometric analysis of the CPT ( $0.5 \mu\text{M}$ ) autofluorescence and CPT-FI ( $0.5 \mu\text{M}$ ) fluorescence within the cytosolic compartment of the glioma cell line T98 at short-term (a) and long-term (b). Fluorescent cells were detected at the laser wavelength of 480 nm in permeabilized conditions. The black lines depict results from control autofluorescence in the absence of CPT, and color lines indicate fluorescence at 5 (green), 15 (red), and 30 min (blue) of treatment (a) or 24 (orange) and 48 h (violet) of treatment (b). (c) Histograms of the mean fluorescence intensities in the cytosol obtained from two representative experiments shown in (a) (short-term) and (b) (long-term) in T98 glioma cells. (d) Confocal autofluorescence control images of CPT ( $5 \mu\text{M}$ )-incorporated T98 cells after 5 and 30 min incubation. (e) Confocal fluorescence images of the CPT-FI ( $5 \mu\text{M}$ ) after 5 and 30 min incubation at low (left) and higher (right) magnification. White arrows indicate drug accumulation around cell nuclei, and green dots are clearly visible in the nucleus.

Then, we compared the impact of CPT and CPT-FI analogues on growth of the glioblastoma U87 and T98 human cell lines from 24 to 72 h of treatment. Both cell lines were exposed to increasing concentrations yielding dose-dependent proliferation rate inhibition starting from the 24 h treatment. Phase contrast microphotographs of nontreated T98 glioblastoma cell lines, showed an adherent monolayer of polygonal cells (Figure 6a). In the presence of CPT, and in a lesser extent, CPT-FI, there was a morphological response characterized by cytoplasm retraction and rounding up of the cell body, compared to untreated cells (0) (Figure 6a). These effects were accompanied by a modified

glioma cell morphology and integrity, suggestive of a drastic impact of the two CPT analogues on human glioma growth and apoptosis. Moreover, the strong CPT-FI staining observed at  $5 \mu\text{M}$  could be assigned to their aggregation (c.f. Supporting Information for comparative solubility studies between CPT-FI and CPT). As shown in Figure 5b, the dose-response curves indicate that CPT efficiently decreased cell growth from the  $0.05 \mu\text{M}$  concentration. Likewise, CPT-FI showed significant cytotoxic effects on the two cell lines in time- and dose-dependent manners (Figure 6b and c).

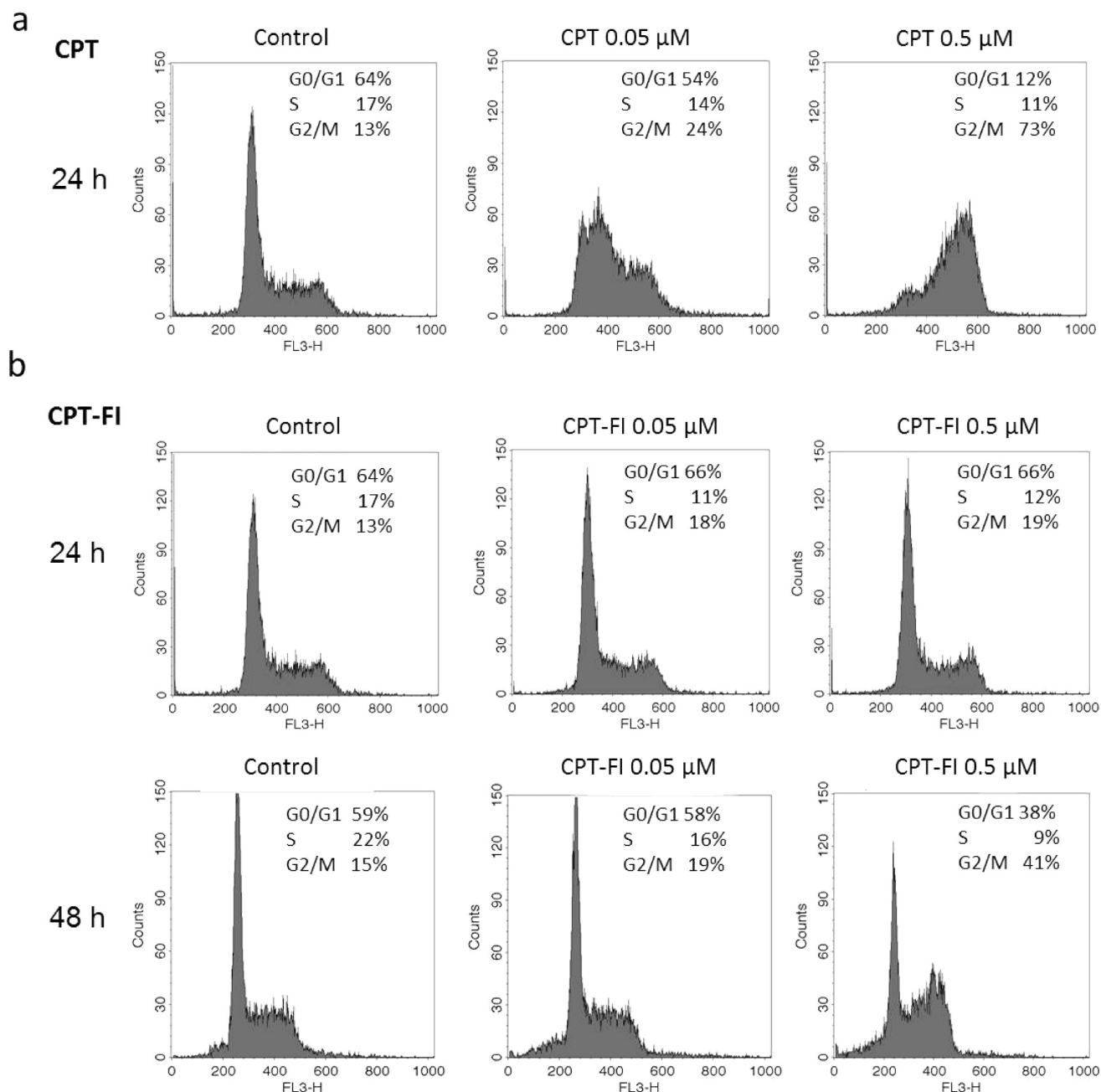


**Figure 6.** Antiproliferative effect of CPT and CPT-FI on human glioma cells *in vitro*. (a) phase contrast photomicrographs of human glioblastoma cells U87 in the absence ( $0 \mu\text{M}$ ) or the presence of CPT (top) and CPT-FI (down) from  $0.05$  to  $5 \mu\text{M}$  each during  $24 \text{ h}$ . (b and c) T98 (b) or U87 (c) cells were incubated for  $24$  and  $72 \text{ h}$  with graded concentrations of CPT or CPT-FI ( $0.05$  to  $5 \mu\text{M}$ ) and counted using a Coulter counter. The active and potent camptothecin derivatives induce growth inhibition and morphologic changes. Data are mean of a representative experiment in quadruplicate. Statistical significance \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; CPT groups versus vehicle group (culture medium), \$,  $P < 0.05$ ; \$\$,  $P < 0.01$ ; CPT-FI groups versus vehicle group (culture medium) were determined by Kruskal–Wallis test followed by Mann–Whitney tests *post hoc* test. Statistical significance #,  $P < 0.05$ ; CPT versus CPT-FI groups was determined by Mann–Whitney tests.

CPT and CPT-FI showed cytotoxicity, causing antiproliferating activity in glioma cell lines in a dose- and time-dependent manner. CPT-FI exhibited more than a 10-fold decrease of the CPT efficiency in T98 and retained equivalent activity in U87. These observations show a real interest in use of the CPT-FI for body distribution and understanding of exposed noncancerous organs.

In order to verify whether morphological changes and cell growth inhibition observed after CPT-FI may be associated to topoisomerase and DNA duplication arrest, cell cycle was investigated in T98 in the absence or the presence of both CPT and its derivatives (Figure 7). The cell cycle distribution of the

T98 glioblastoma cell line was examined *via* flow cytometry, in the absence or the presence of CPT ( $0.05$  and  $0.5 \mu\text{M}$ ) after  $24 \text{ h}$  treatment, or CPT-FI ( $0.05$  and  $0.5 \mu\text{M}$ ) after  $24$  and  $48 \text{ h}$  treatment. At  $24 \text{ h}$ , CPT induced a dose-dependent increase of the G2/M phase from  $13\%$  (control) to  $24\%$  ( $0.05 \mu\text{M}$ ) and  $73\%$  ( $0.5 \mu\text{M}$ ), accompanied by a decrease of cell populations in the S phase of the cell cycle, from  $17\%$  to  $11\%$  (Figure 7a). In contrast, CPT-FI failed to markedly alter cell cycle after  $24 \text{ h}$ , but evoked a CPT-like G2/M cell accumulation after  $48 \text{ h}$  treatment (Control,  $15\%$ ;  $0.05 \mu\text{M}$ ,  $19\%$ ;  $0.5 \mu\text{M}$ ,  $43\%$ ) (Figure 7b). CPT-FI exhibits inferior cytotoxic effect than CPT partly due to its lower solubility in physiological pH. Indeed CPT-FI markedly

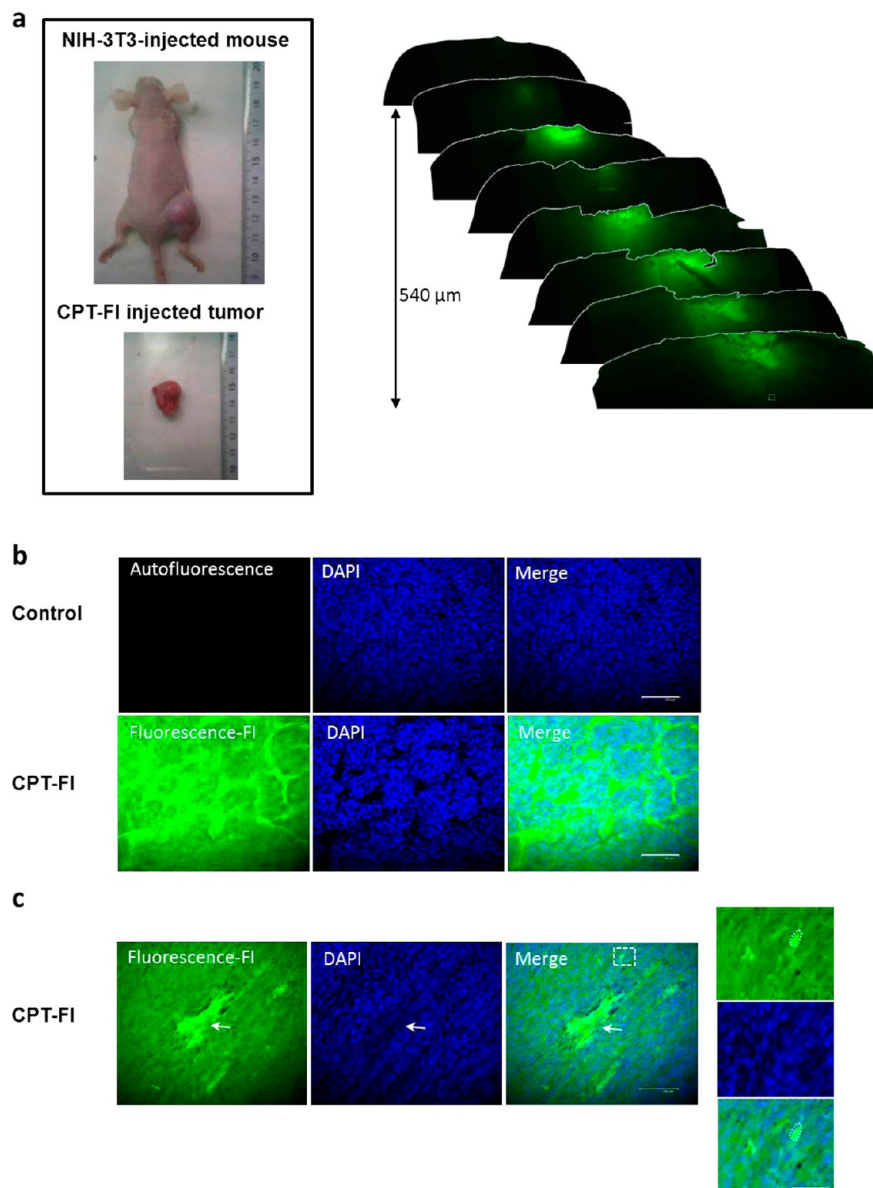


**Figure 7.** Flow cytometry analysis of glioma cell cycle alteration induced by CPT and CPT-FI in T98. Cells were harvested at 24 h and/or 48 h treatment and analyzed for DNA content by propidium iodide staining in FL3 to avoid contamination by the FI fluorescence. The percentage of T98 cells in the different phases of cell cycle are indicated in each histogram. (a) Cell cycle analysis in the absence or presence of CPT 0.05 and 0.5  $\mu\text{M}$  at 24 h. (b) Cell cycle analysis in the absence or presence of CPT-FI 0.05 and 0.5  $\mu\text{M}$  at 24 and 48 h. Glioma cells showed robust G2 phase arrest after 24 h CPT and 48 h CPT-FI (0.5  $\mu\text{M}$  each). Data refer to one of three performed experiments.

precipitates at 5  $\mu\text{M}$  (40%) while this phenomenon was observed from 10  $\mu\text{M}$  with CPT (c.f. Supporting Information). This observation suggests that we compare the effects of 5  $\mu\text{M}$  CPT with those of 3  $\mu\text{M}$  CPT-FI on cell cycle and toxicity. Besides, it has been reported that substituents at position 10 of the quinoline part of the CPT derivatives may interact with the receptor site with the drug binding site of topoisomerase I cleavage complexes.<sup>32,13</sup> While small substituents at the 10 position of the A ring generally increase efficacy in DNA topoisomerase I inhibition, the presence of bulkier groups should lead to more diminished inhibitory activity. Interestingly, the modification of CPT presented here to bear a bulky fluorescein

derivative, displays a better affinity toward topoisomerase I than the native CPT. However, we observed *in cellulo* activity of CPT-FI that was lower than that of the unmodified CPT, likely attributed to lower hydrophobic properties and reduced membrane penetration, to reach the cell nuclei. Together these results confirm that CPT induced accumulation in G2/M and T98 glioblastoma cell arrest, and also demonstrate that CPT-FI provokes similar effects but requires longer incubation time and/or higher concentration, establishing the anticancer efficiency *in vitro* of the CPT-FI derivative.

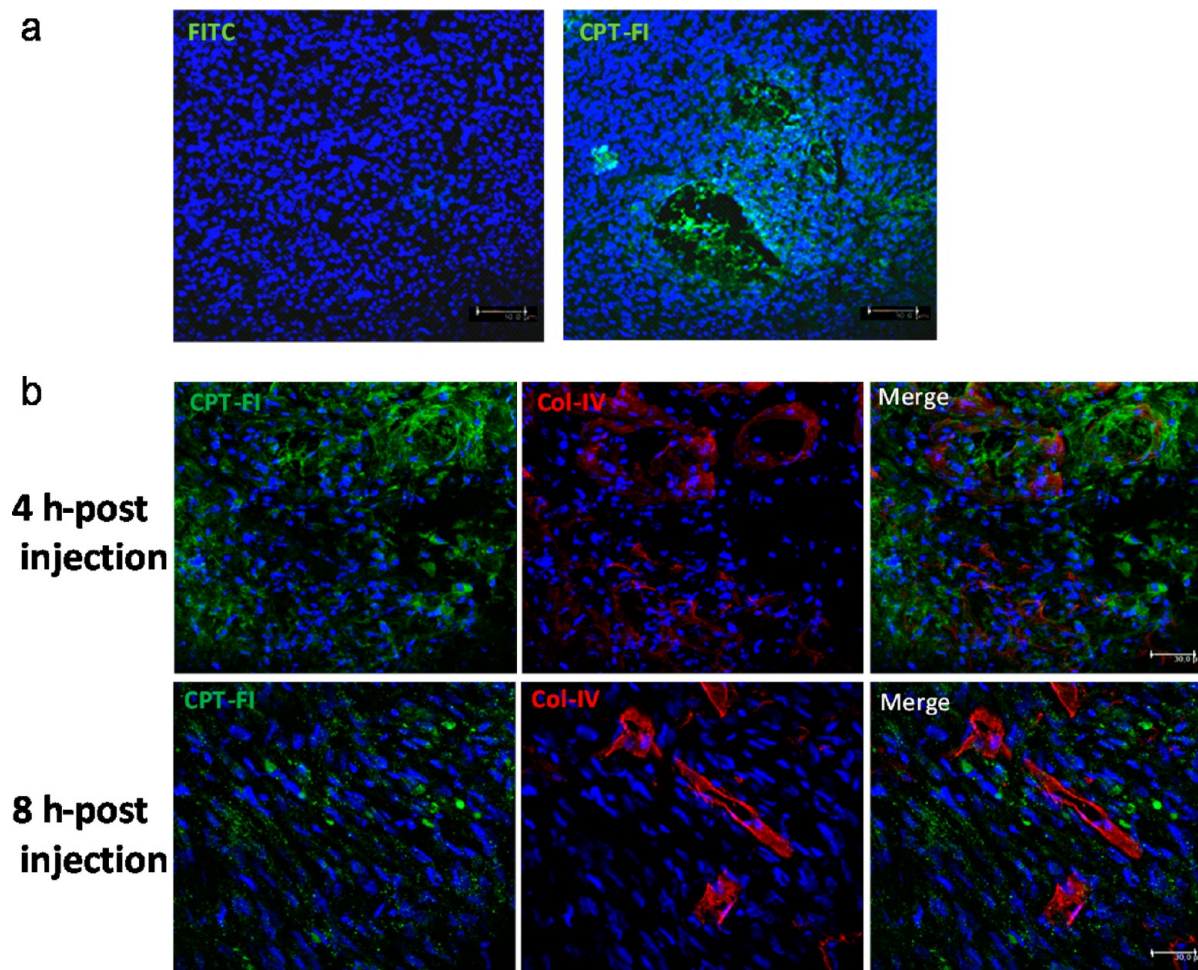
Unfortunately, most drugs are not amenable to direct *in vivo* follow-up because they lack sufficient color or fluorescent



**Figure 8.** Fluorescent detection of CPT-FI in NIH-3T3-forming tumors in Nude mice. Tumor formation was assessed after subcutaneously inoculating  $1 \times 10^6$  NIH-3T3 cells into right flanks. Tumors reaching  $700 \text{ mm}^3$  were treated *via* intratumoral injections of CPT-FI once a day during 4 days. Four mice were used for this experiment. (a) Photograph of a nude mouse with a solid tumor and enlarged image showing the phenotype of the extracted well delimited tumor before freezing, adjacent to the ruler indicating tumor size in mm (left). Right, alignment of consecutive sections of a CPT-FI treated NIH-3T3 tumor (daily during 4 days), showing green fluorescence around the site of the injection, whereas the rest of the tumor appears less labeled. The white square of the last section indicates the area shown in b with enlarged images. (b) Histological analysis of the tumors derived from NIH-3T3 injected Nude mice. Top, Distribution in tumor sections of the autofluorescence of control tumor (treated with PBS/DMSO) and nuclei counterstained with DAPI (blue). Bottom, Distribution in a tumor section of the CPT-FI fluorescence (green, treated with CPT-FI 40 mg/kg in PBS/DMSO) and nuclei counterstained with DAPI (blue). Scale bars,  $125 \mu\text{m}$ . Merge images correspond to the overlay of the DAPI labeling with control autofluorescence or CPT-FI green fluorescence. (c) Histological analysis of the CPT-FI distribution deeper in the tumor. Left, distribution in a tumor section of the CPT-FI fluorescence (green) and nuclei counterstained with DAPI (blue). The white arrows indicate the strong FI labeling and the less intensely stained nuclei suggesting a preapoptotic zone. Scale bars,  $125 \mu\text{m}$ . Right, Images of digitally zoomed corresponding images of a tumor area (white square) showing that FI labeling colocalizes with DAPI (cell delimited by the white dotted circle). Scale bar,  $60 \mu\text{m}$ .

properties except the clinically used drugs doxorubicin, mitoxantrone, and topotecan, which exhibit autofluorescence. But initial evidence for limited penetration through tissue of the commonly used anticancer drug doxorubicin was obtained by studying the distribution of its fluorescence in a multicellular layer model.<sup>33</sup> Here, to further extend the possible use of our CPT-fluorescent probe as a cytotoxic drug whose fate can be followed *in vivo*, intratumoral administrations of CPT-FI (CPT-FI,  $5 \mu\text{M}$ ,  $n = 4$ ) were performed once daily during four days in

xenografts of NIH-3T3 murine fibroblastic cells in Nude mice (Figure 8a). As compared to intratumoral injections of PBS/DMSO (sham,  $n = 4$ , not shown), histological examination of CPT-FI injected tumors revealed that green fluorescence accumulated to the greatest extent at the border of the tumor and near the site of injection (Figure 8a). At higher magnification, CPT-FI appeared to be mainly distributed in lacks area surrounding apparent viable cells, whereas PBS injected tumors failed to show any detectable autofluorescence



**Figure 9.** Fluorescent detection of CPT-FI in U87-forming tumors after intravenous administration in Nude mice. Tumor formation was assessed after subcutaneously inoculating  $1 \times 10^6$  U87 into right flanks. Tumors reaching  $300 \text{ mm}^3$  were treated *via* intravenous bolus injections of FITC ( $n = 2$ ) or CPT-FI ( $n = 3$ ). Mice received one intravenous injection of  $100 \mu\text{L}$  FITC (A,  $66 \text{ mg/kg}$ ) or CPT-FI (B,  $66 \text{ mg/kg}$ ) through the tail vein. After 4 h postinjection, mice were sacrificed and tumors were collected and frozen at  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  for postanalysis of fluorescence distribution. (a) Fluorescence images of glioma tumor cryosections showed no green fluorescence in FITC treated tumor and a marked parenchyma and perivascular green staining in the CPT-FI-treated tumor. (b) U87-bearing tumors corresponding to 4 and 8 h postinjections with CPT-FI were coimmunostained with an anticollagen IV antibody (Col-IV), in order to visualize the zones of neoangiogenic activity. DAPI, cell nuclei labeling in blue. Scale bar,  $30 \mu\text{m}$ .

(Figure 8b). Deeper inside the tumor, some CPT-FI green zones would show cytotoxicity and diminished cell viability, and colocalization of the CPT-FI and DAPI stainings in isolated cells illustrates *in vivo* intranuclear incorporation (Figure 8c). Thus, confocal images of the CPT-FI distribution in consecutive sections show that only the tumor area exposed to CPT-FI injections is detectable, suggesting limited penetration of the drug. This restricted diffusion into the tumor may be due (i) to rapid uptake of the drug by perivascular cells and (ii) mostly to the cellular packing density and the number of adhesions between cells, as recently proposed.<sup>34</sup> Thus, intravenous administration strategy was employed to monitor the *in vivo* behavior of CPT-FI compared to FITC alone and to characterize tumor distribution. FITC ( $100 \mu\text{L}$ ,  $n = 2$ ) or CPT-FI ( $100 \mu\text{L}$ ,  $n = 3$ ) solutions at  $66 \text{ mg/kg}$  were bolus injected through the tail vein into Nude mice bearing U87 glioblastoma tumors. After 4 and 8 h, tumors were frozen and then analyzed. Confocal microscopic images were acquired 4 h after FITC or CPT-FI injection (Figure 9a). As expected, tumors did not show FITC signal whereas they exhibited very dense green staining in vascular and perivascular compartments after exposure to systemic CPT-FI (Figure 9a), and was mainly colocalized with collagen IV (Figure 9b). After 8

h, CPT-FI was not found with collagen IV immunostaining, and was more distributed throughout the glioma tumor parenchyma (Figure 9b). This data clearly indicate that CPT-FI can be delivered *via* intravenous injection, and that 8 h after administration, the labeled chemotherapy penetrated into the tumor parenchyma through the leaky tumoral vascular network, particularly dense in glioma tumors. Thus, it can be expected that this type of small tagged-anticancer molecules may be more widely dedicated to the study and the evaluation of pharmacokinetic, tumor penetration, and noncancerous sites of deleterious side effects.

## ■ CONCLUSIONS

In summary, we have described for the first time an original synthetic approach enabling the efficient fluorescent labeling of anticancer drug camptothecin which is known to exhibit a moderate chemical stability. The key point was the introduction of an azido-terminated linker onto the C10 position of the CPT quinoline ring, which acts as an optimal protecting group for the primary amino group only unveiled immediately prior to the final fluorescent labeling based on a peptide-type coupling reaction.

Besides, careful functionalization at the C10 position of the pentacyclic alkaloid has shown to preserve the essential biological features of the CPT bioactive alkaloid, although longer incubation periods or higher concentrations are required. In addition, we demonstrated the feasibility of using a fluorescent topoisomerase inhibitor CPT as a model drug to monitor in real-time cell *in vivo* delivery by fluorescent imaging inducing tumor senescence and arrest of cell growth. This new FI-tagged chemotherapy with similar characteristics as the CPT of interest will be very useful for continuous *in vivo* monitoring of a pseudo-drug upon externally triggered delivery. But mainly, the present aim was to open a new avenue of specific design of anticancer molecules as fluorescent probes, for the understanding of specific anticancer effects as well as undesired effects including anemia, fatigue, or cognitive deficits commonly described in patients after chemotherapy.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### 📄 Supporting Information

<sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR data for all compounds and their HPLC chromatograph, and experimental details about photophysical characterization of CPT-FI. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

\*H.C.: e-mail [helene.castel@univ-rouen.fr](mailto:helene.castel@univ-rouen.fr); phone + 33 (0)2 35 14 66 30. For C.S.: e-mail [cyrille.sabot@univ-rouen.fr](mailto:cyrille.sabot@univ-rouen.fr); phone + 33 (0)2 35 52 24 39.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (Programme PIRIBio 2009, ANR “CLICKMAS-SLINK”) for a postdoctoral fellowship to S.D., La Région Haute-Normandie via the CRUNCH program (CPER 2007-2013) and the CNRS. We thank Albert Marcual (COBRA - CNRS UMR 6014) for HRMS analyses, Annick Leboisselier (COBRA - CNRS UMR 6014, INSA de Rouen) for elemental analyses, and Laetitia Bailly (COBRA - CNRS UMR 6014, INSA de Rouen) for chiral HPLC analyses. Xavier Brune (Research master trainee, Université de Rouen, January-June 2012) is greatly acknowledged for his contribution to the large-scale synthesis of fluorescein-isonipecotic acid derivative 4.

## ■ REFERENCES

- (1) Wall, M. E.; Wani, C. M.; Cook, K. H.; McPhail, A. T., and Sim, G. A. (1966) Plant antitumor agents. I. The isolation and structure of camptothecin, a novel alkaloidal leukemia and tumor inhibitor from *Camptotheca acuminata*. *J. Am. Chem. Soc.* 88, 3888–3890.
- (2) Pommier, Y. (2009) DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology, and interfacial inhibition. *Chem. Rev.* 109, 2894–2902.
- (3) Negoro, S.; Fukuoka, M.; Masuda, N.; Takada, M.; Kusunoki, Y.; Matsui, K.; Takifuji, N.; Kudoh, S.; Niitani, H.; and Tagushi, T. (1991) Phase I study of weekly intravenous infusions of CPT-11, a new derivative of camptothecin, in the treatment of advanced non-small-cell lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 83, 1164–1168.
- (4) Kawato, Y.; Aonuma, M.; Hirota, Y.; Kuga, H., and Sato, K. (1991) Intracellular roles of SN-38, a metabolite of the camptothecin derivative CPT-11, in the antitumor effect of CPT-11. *Cancer Res.* 51, 4187–4191.
- (5) Kingsbury, W. D.; Boehm, J. C.; Jakas, D. R.; Holden, K. G.; Hetch, S. M.; Gallagher, G.; Caranfa, M. J.; McCabe, F. L.; Faucette, L. F.; Johnson, R. K., and Hertzberg, R. P. (1991) Synthesis of water-soluble

(aminoalkyl)camptothecin analogs: inhibition of topoisomerase I and antitumor activity. *J. Med. Chem.* 34, 98–107.

(6) Gonçalves, M. S. T. (2009) Fluorescent labeling of biomolecules with organic probes. *Chem. Rev.* 109, 190–212.

(7) Middleton, R. J., and Kellam, B. (2005) Fluorophore-tagged GPCR ligands. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 9, 517–525.

(8) Alonso, D.; Vazquez-Villa, H.; Gamo, A. M.; Martínez-Esper, M. F.; Tortosa, M.; Viso, A.; Fernandez de la Pradilla, R.; Junquera, E.; Aicart, E.; Martín-Fontecha, M.; Benhamú, B.; Lopez-Rodríguez, M. L., and Ortega-Gutiérrez, S. (2010) Development of fluorescent ligands for the human 5-HT<sub>1A</sub> receptor. *ACS Med. Chem. Lett.* 1, 249–253.

(9) Redy, O., and Shabat, D. (2012) Modular theranostic prodrug based on a FRET-activated self-immolative linker. *J. Controlled Release* 164, 276–282.

(10) Liu, Y.-Q.; Dai, W.; Tian, J. L.; Yank, G.; Feng, X.-W.; Zhou, L.; Kou, Y.-L.; Zhao, W.-Q.; Li, L.-H., and Li, H.-Y. (2011) Synthesis and insecticidal activities of novel spin-labeled derivatives of camptothecin. *Heteroat. Chem.* 22, 687–691.

(11) Gao, M.; Miller, K. D.; Sledge, G. W., and Zheng, Q.-H. (2005) Radiosynthesis of carbon-11-labeled camptothecin derivatives as potential positron emission tomography tracers for imaging of topoisomerase I in cancers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 15, 3865–3869.

(12) Hinz, H. R.; Harris, N. J.; Giovannella, B. C.; Ezell, E. L., and Liehr, J. G. (1996) Stabilities of 3H- and 2H-labelled camptothecins. *J. Label. Compd. Radiopharm.*, 733–742.

(13) Verma, R. P., and Hansch, C. (2009) Camptothecins: A SAR/QSAR Study. *Chem. Rev.* 109, 213–235.

(14) Devert, M.; Sabot, C.; Giboreau, P.; Constant, J.-F.; Greene, A. E., and Kanazawa, A. (2010) Total synthesis of (±)-17-norcamptothecin, a novel E-ring modified camptothecin. *Tetrahedron* 66, 7227–7231.

(15) Ziomkowska, B.; Kruszewski, S.; Siuda, R., and Cyrankiewicz, M. (2006) Deactivation rate of camptothecin determined by factor analysis of steady-state fluorescence and absorption spectra. *Optica Applicata* 1, 137–146.

(16) Chourpa, I.; Millot, J.-M.; Sockalingum, G. D.; Riou, J.-F., and Manfait, M. (1998) Kinetics of lactone hydrolysis in antitumor drugs of camptothecin series as studied by fluorescence spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* 1379, 353–366.

(17) Kim, M.; Ock, K.; Cho, K.; Joo, S.-W., and Lee, S. Y. (2012) Live-cell monitoring of the glutathione-triggered release of the anticancer drug topotecan on gold nanoparticles in serum-containing media. *Chem. Commun.* 48, 4205–4207.

(18) Weissleder, W., and Ntziachristos, V. (2003) Shedding light onto live molecular targets. *Nat. Med.* 9, 123–128.

(19) Fulmer, G. R.; Miller, A. J. M.; Sherden, N. H.; Gottlieb, H. E.; Nudelman, A.; Stoltz, B. M.; Bercaw, J. E., and Goldberg, K. I. (2010) NMR chemical shifts of trace impurities: common laboratory solvents, organics, and gases in deuterated solvents relevant to the organometallic chemist. *Organometallics* 29, 2176.

(20) Olmsted, J. (1979) Calorimetric determinations of absolute fluorescence quantum yields. *J. Phys. Chem.* 83, 2581–2584.

(21) Fang, F. G.; Xie, S., and Lowery, M. W. (1994) Catalytic enantioselective synthesis of 20(S)-camptothecin: a practical application of the sharpless asymmetric dihydroxylation reaction. *J. Org. Chem.* 59, 6142–6143.

(22) Massif, C.; Dautrey, S.; Haefele, A.; Ziessel, R.; Renard, P.-Y., and Romieu, A. (2012) New insights into the water-solubilisation of fluorophores by post-synthetic “click” and Sonogashira reactions. *Org. Biomol. Chem.* 10, 4330–4336.

(23) Duan, Y.; Liu, M.; Sun, W.; Wang, M.; Liu, S., and Li, Q. X. (2009) Recent progress on synthesis of fluorescein probes. *Mini-Rev. Org. Chem.* 6, 35–43.

(24) Kobayashi, H.; Ogawa, M.; Alford, R.; Choyke, P. L., and Urano, Y. (2010) New strategies for fluorescent probe design in medical diagnostic imaging. *Chem. Rev.* 110, 2620–2640.

(25) Comins, D. L., and Nolan, J. M. (2001) A practical six-step synthesis of (S)-camptothecin. *Org. Lett.* 3, 4255–4257.

(26) Gao, J.; Wang, P., and Giese, R. W. (2012) Xanthamide fluorescent dyes. *Anal. Chem.* 74, 6397.

(27) Nadler, A., Hain, C., and Diederichsen, U. (2009) Histidine analog amino acids providing metal-binding sites derived from bioinorganic model systems. *Eur. J. Org. Chem.*, 4593–4599.

(28) Reddy, P. G., Pratap, T. V., Kumar, G. D. K., Mohanty, S. K., and Baskaran, S. (2002) The Lindlar catalyst revitalized: a highly chemoselective method for the direct conversion of azides to N-(tert-butoxycarbonyl)amines. *Eur. J. Org. Chem.*, 3740–3743.

(29) D'Arpa, P., and Liu, L. F. (1989) Topoisomerase-targeting antitumor drugs. *Biochim. Biophys. Acta* 989, 163–77.

(30) Friedman, H. S., Keir, S. T., and Houghton, P. J. (2003) The emerging role of irinotecan (CPT-11) in the treatment of malignant glioma in brain tumors. *Cancer*, 2359–62.

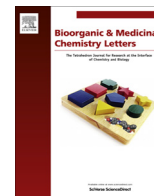
(31) Kim, C. Y., Lee, S. J., Kim, S. K., Park, C. K., Wang, K. C., and Cho, B. K. (2012) Antitumor activity of CKD-602, a camptothecin derivative, in a mouse glioma model. *J. Clin. Neuro. Sci.* 19, 301–305.

(32) Tanizawa, A., Kohn, K. W., Kohlhagen, G., Leteurtre, F., and Pommier, Y. (1995) Differential stabilization of eukaryotic DNA topoisomerase I cleavable complexes by camptothecin derivatives. *Biochemistry* 34, 7200–7206.

(33) Minchinton, A. I., and Tannock, I. F. (2006) Drug penetration in solid tumours. *Nat. Rev. Cancer* 6, 583–592.

(34) Grantab, R. H., and Tannock, I. F. (2012) Penetration of anticancer drugs through tumour tissue as a function of cellular packing density and interstitial fluid pressure and its modification by bortezomib. *BMC Cancer* 12, 214.





## Synthesis and biological evaluation of a novel $^{99m}\text{Tc}$ labeled 2-nitroimidazole derivative as a potential agent for imaging tumor hypoxia



Yoann Joyard<sup>a,b</sup>, Vadim Le Joncour<sup>c</sup>, Hélène Castel<sup>c</sup>, Ch erif Bounana Diouf<sup>a</sup>, Laurent Bischoff<sup>b</sup>, Cyril Papamica el<sup>b,\*</sup>, Vincent Levacher<sup>b</sup>, Pierre Vera<sup>a</sup>, Pierre Bohn<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Nuclear Medicine, Henri Becquerel Center and Rouen University Hospital and QuantIF-LITIS (EA4108), 1 rue d'Amiens, 76038 Rouen Cedex, France

<sup>b</sup> UMR CNRS COBRA 6014, 1 rue Tesnière, 76130 Mont-Saint-Aignan, France

<sup>c</sup> Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 5 April 2013

Revised 3 May 2013

Accepted 7 May 2013

Available online 16 May 2013

#### Keywords:

Technetium-99m

2-Nitroimidazole

Hypoxia imaging agent

Biodistribution

Tripeptide ligand

Scintigraphic image

### ABSTRACT

Tumor hypoxia plays a major role in reducing the efficacy of therapeutic modalities like chemotherapy and radiation therapy in combating cancer. In order to target hypoxic tissues, a tripeptide ligand having a 2-nitroimidazole moiety, as a bioreductive species, was synthesized. The latter was radiolabeled with  $^{99m}\text{Tc}$  for imaging hypoxic regions of tumors and was characterized by means of its rhenium analogue. The biodistribution and scintigraphic image of the corresponding  $^{99m}\text{Tc}$ -complex showed accumulation in tumor and these results suggest that it could be a marker for imaging tumor hypoxia.

Published by Elsevier Ltd.

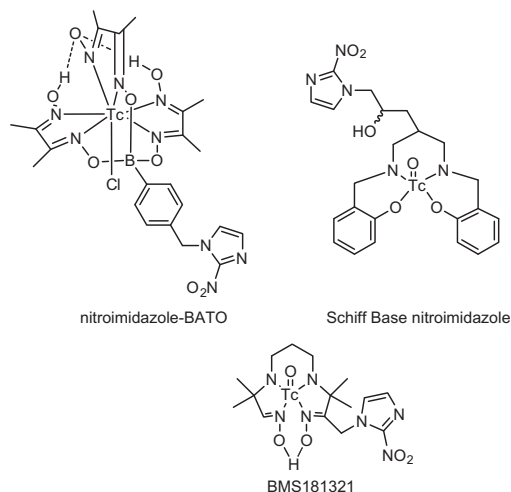
Hypoxia is characterized by an imbalance between the rate of cellular oxygen consumption and oxygen supply in cells. Hypoxic tissues are a hallmark of advanced solid tumors. The distribution of hypoxic tissue in tumors is heterogeneous and variable over time. It has been shown at the beginning of the twentieth century that hypoxia plays a role in increased radio resistance.<sup>1</sup> Indeed, oxygen has a crucial role in the response to radiotherapy. Being a potent radiosensitizer, it enhances the effect of ionizing radiation leading to a lethal effect on tumor cells by breaking the double-stranded DNA. More recently it has been shown that hypoxia was a predictor for drug resistance.<sup>2</sup> The decrease in the response to radiotherapy of hypoxic cells then leads to an increased risk of metastasis and poor prognosis for the patient.<sup>3</sup> It is therefore of major interest to have a precise knowledge of the level of oxygen in the tissues in order to understand the formation mechanism of this hypoxic state, and develop strategies to address this imbalance. This requires quantifying the level of oxygenation of tissues with good spatial and temporal resolution.

\* Corresponding authors. Tel.: +33 (0)2 355 224 84; fax: +33 (0)2 355 229 62 (C.P.); tel.: +33 (0)2 320 829 23; fax: +33 (0)2 320 825 50 (P.B.).

E-mail addresses: [cyril.papamicael@insa-rouen.fr](mailto:cyril.papamicael@insa-rouen.fr) (C. Papamica el), [pierre-bohn@chb.unicancer.fr](mailto:pierre-bohn@chb.unicancer.fr) (P. Bohn).

We can distinguish two classes of markers of hypoxia: the nitroimidazole ligands and non-nitroimidazoles ligands. Nitroimidazole derivatives are known for their ability to be selectively retained in hypoxic tissues. Nakamura has first demonstrated in 1955 that, the 2-nitroimidazole showed activity against particular types of infections associated with a deficiency of oxygen.<sup>4</sup> Therefore nitroimidazole analogues were synthesized and proved to be effective against bacteria and protozoa that proliferate in hypoxic cells.<sup>5</sup> This particular behavior of nitroimidazole derivatives in oxygen-deficient environment led to their study in the detection of hypoxia.<sup>6,7</sup>

Most clinically used tracers are  $^{18}\text{F}$ -labeled tracers in order to perform a PET imaging but this radiochemistry needs a cyclotron and a GMP laboratory. Thus, owing to limited availability, high cost of production and short half-life of cyclotron isotopes, a  $^{99m}\text{Tc}$ -based agent could be a better alternative, especially as all nuclear medicine centers possess gamma cameras whereas only few have one PET-CT camera. So, many radio pharmaceuticals<sup>8–10</sup> (Fig. 1) having a nitroimidazole moiety and radiolabeled with technetium-99m for SPECT imaging of hypoxic tissues were developed. However, due to their high background levels in normal tissues, quantification of hypoxia may be difficult.<sup>11</sup> So, there is a crucial need to develop new technetium-99m candidates.

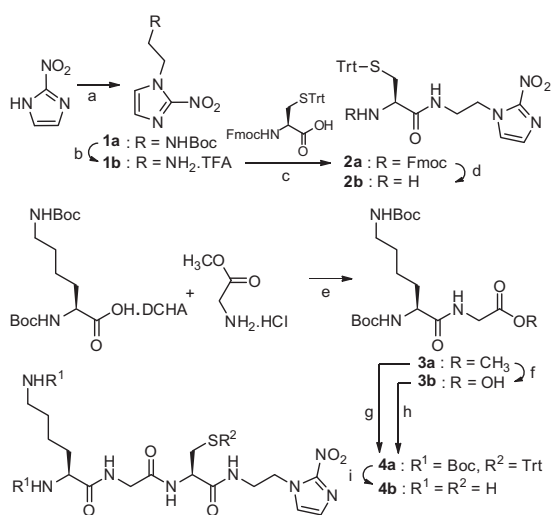


**Figure 1.** Structures of selected technetium-containing nitroimidazoles tested for imaging.

There are many examples in the literature<sup>12</sup> reporting the use of peptides acting as chelating agent of  $^{99m}\text{Tc}$  ( $\text{N}_x\text{S}_{4-x}$ ). But to date there are only few examples of hypoxia radiotracers using such ligands to complex  $^{99m}\text{Tc}$ . Indeed, only Ballinger and co-workers,<sup>13</sup> report the use of sequences glycine–serine–cysteine and glycine–cysteine–glycine to chelate  $^{99m}\text{Tc}$ .

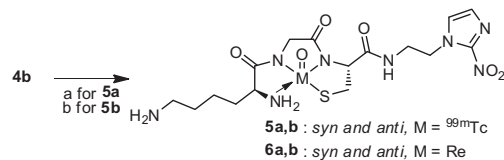
In this study, a cysteine–glycine–lysine sequence with a bio-reducible moiety, 2-nitroimidazole, was synthesized and labeled with  $^{99m}\text{Tc}$ . We chose to use a 2-nitroimidazole moiety as a vector since it has a better response to hypoxia than 4- and 5-nitroimidazoles isomers.<sup>14</sup> The latter was then evaluated as a tumor hypoxia marker.

The chelating agent **4b** was synthesized through a multi-step reaction using 2-nitroimidazole as a starting material. The synthesis procedure is outlined in Scheme 1. On the one hand, according to a procedure reported in the literature by Hay et al.,<sup>15</sup> 2-nitroimidazole was reacted with *tert*-butyl 2-bromoethylcarbamate to give compound **1a**. Then, the Boc protecting group was cleaved



**Scheme 1.** Reagents and conditions: (a) *tert*-Butyl 2-bromoethylcarbamate,  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , DMF, 110 °C, 5 h (57%); (b) TFA, 25 °C, 10 min (99%); (c) T3P<sup>®</sup>, DIEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25 °C, 12 h (86%); (d) piperidine (20% mol), DMF, 25 °C, 16 h (53%); (e) T3P<sup>®</sup>, DIEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25 °C, 12 h (86%); (f) LiOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , 25 °C, 12 h (85%); (g) LiOH,  $\text{H}_2\text{O}$ , DMF,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  then 2b, HBTU, DIEA, DMF, 25 °C, 12 h (43%); (h) 2b, T3P<sup>®</sup>, DIEA,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , 25 °C, 12 h (53%); (i) TFA,  $\text{H}_2\text{O}$ , TES, phenol, 0 °C, 1 h (52%).

with trifluoroacetic acid to lead to the expected derivative **1b**. The so-obtained amine was reacted with commercially available Fmoc-L-Cys(Trt)-OH using propylphosphonic anhydride T3P<sup>®</sup> to afford the desired protected nitroimidazole derivative **2a**. The subsequent Fmoc-deprotection was achieved by classical reaction with piperidine, leading to amine **2b**. On the other hand, a peptidic coupling reaction with available glycine methyl ester hydrochloride and Boc-L-Lys(Boc)-OH, DCHA gave the protected dipeptide **3a**. The ester group of **3a** was also converted into an acid moiety to give **3b**. Then, the required protected tripeptide **4a** was prepared from ester **3a** following a classical hydrolysis with LiOH and coupling with **2b** in the presence of the cationic coupling agent HBTU. Moreover, it should be noted that the protected tripeptide **4a** was also synthesized starting from **3b** and T3P<sup>®</sup>. Finally, the cleavage of both NH-Boc and S-Trityl protecting groups was conducted by means of TFA in the presence of triethylsilane and phenol as scavengers to give the desired tripeptide **4b**. Optimization of the radiolabeling procedure of **4b** was then conducted (Scheme 2, Table 1). So, peptide **4b** (10  $\mu\text{g}$ ) was radiolabeled with sodium tartrate (20 mg in 0.5 mL, pH 7),  $^{99m}\text{TcO}_4^-$  (740 MBq) and tin(II) chloride (40  $\mu\text{g}$  in 0.1 mL). The resulting solution was analyzed by radio-HPLC. The reaction was first studied at 25 °C and a 95% radiochemical yield was obtained when the reaction time was changed from 10 to 60 min (Table 1, entries 2 and 3). We then decided to perform the reaction at 100 °C (Table 1, entry 4). These conditions have enabled us to considerably reduce the reaction time to 10 min (Table 1, entry 4). Using this labeling procedure, the complex was obtained with a radiochemical purity of 95% as a *syn* and *anti*-diastereoisomers mixture **5a,b** (Fig. 2). It has been demonstrated that the presence of two radiometric peaks is due to the resolution of diastereoisomers resulting from the chiral centers on the peptide backbone and the chiral technetium.<sup>12b,16</sup> It is difficult to determine directly the formation of the  $^{99m}\text{Tc}$ -complex because of the extremely small amount of the compound present. However, the formation of  $^{99m}\text{Tc}$ -complex **5a,b** could be indirectly determined by comparison with **6a,b** which can be easily prepared. Re and Tc belongs to the same group of the periodic table and are similar in size. In our case, the analogue rhenium complex **6a,b** was



**Scheme 2.** Reagents and conditions. (a)  $\text{SnCl}_2$ ,  $^{99m}\text{TcO}_4^-$ , sodium tartrate pH 7.0, 100 °C, 10 min (radiochemical yield 95%); (b)  $\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2$ , NaOAc, MeOH, 70 °C, 4 h.

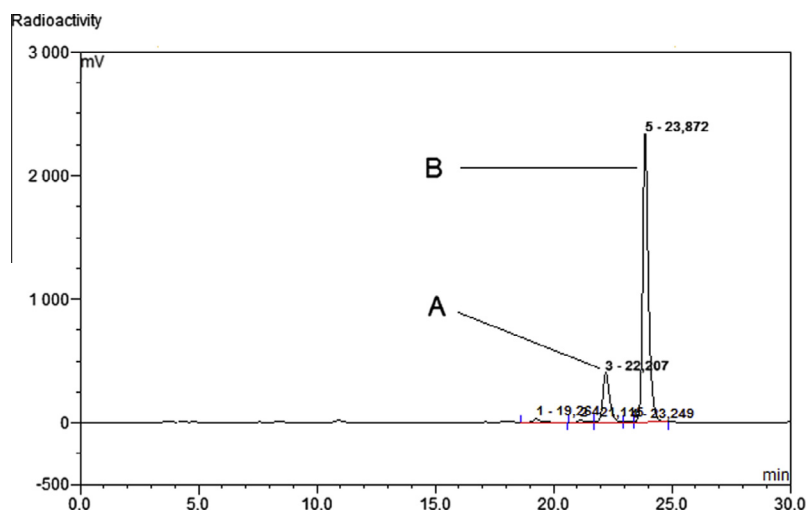
**Table 1**

Labeling conditions of  $^{99m}\text{Tc}$ -complex **5a,b** with sodium pertechnetate and tin(II) chloride

Entry	<b>4b</b> ( $\mu\text{g}$ )	Sodium tartrate (mg)	Final pH	Temperature (°C)	Time (min)	RCY (%)
1	100	—	5	25	10	76
2	10	20	5	25	10	89
3	10	20	5	25	60	95
4	10	20	5	100	10	95
5	10	20	9 <sup>a</sup>	100	10	38
6	10	20	4 <sup>b</sup>	100	10	38

<sup>a</sup> Phosphate buffer 0.2 M pH 9, 0.5 mL.

<sup>b</sup> Citric acid buffer, 20 mM pH 4, 0.5 mL.



**Figure 2.** Representative radio-HPLC pattern of *syn* and *anti*-diastereoisomers **5a,b**. Peaks A and B are thought to be *syn* and *anti*-forms of the Tc=O group.

prepared by substitution of ligand **4b** on the rhenium precursor  $\text{ReOCl}_3(\text{PPh}_3)_2$  (Scheme 2).

The HPLC analysis, UV detection, of the reaction mixture showed two main peaks with similar retention times of the corresponding technetium-99m complex **5a,b**.

Besides, the LC-MS analysis of the reaction mixture exhibited two identical molecular ions at  $m/z$  645.1 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ ), which confirm the presence of *syn* and *anti*-diastereoisomers. In addition, the molecular ion value gives a further indication concerning the nature of the bond with the metal and the amine function of the lysine. Indeed, in this case, the metal undergoes a dative bond with amine function instead of a bond with the corresponding amide ion<sup>12a</sup>

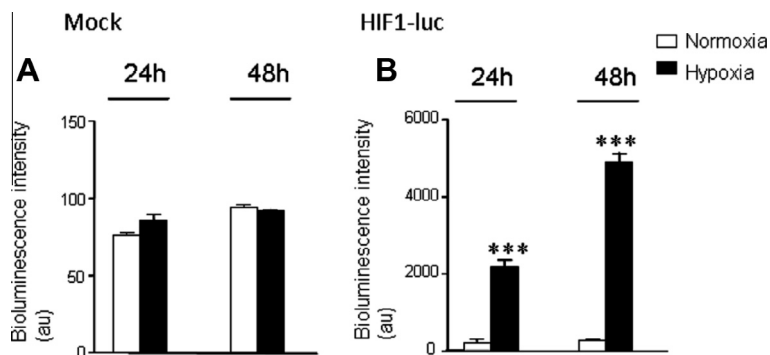
Complex **5a,b** was in vitro evaluated. The human glioblastoma cell line was cultured,<sup>17</sup> and used as a model of brain cancer. Glioblastoma multiforme is the most common and most aggressive malignant primary brain tumor in humans. Treatments are surgery, chemotherapy with temozolomide or bevacizumab and radiation therapy.<sup>18</sup> Glioblastoma is well-known to form tumors with hypoxic zones, which are resistant to standard radiation therapy.<sup>19</sup> The use of hypoxic tracers could help to customize treatments<sup>20</sup> with a real-time adjustment of the therapeutic beams (Image-guided radiation therapy).<sup>21</sup>

In hypoxic conditions, after 24 h, an increased expression of hypoxia-inducible factor (HIF1) was observed (Fig. 3) as a sign of

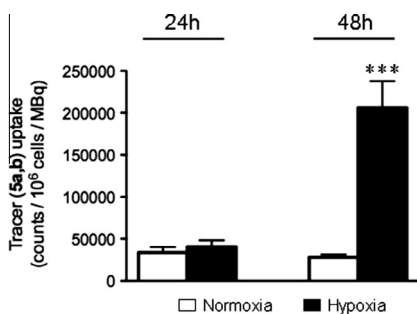
cellular stress in T98 cells. However, at this time, no significant uptake of tracer **5a,b** occurred. (Fig. 4) After 48 h in the same hypoxic conditions, expression of HIF1 increased by a factor of 2.5 (Fig. 3) and subsequently the tracer retention became highly significant (Fig. 4). Nitroimidazole moiety is only reduced in cells with long-lasting hypoxia, and reduction of this compound leads in covalent bonding to macromolecules and subsequently in tracer retention. Reduction of nitroimidazole only occurs in cells deprived of oxygen with an acidic and reductive cytoplasm. After 24 h in hypoxic conditions, T98 cells were stressed but their cytoplasm was not sufficiently reductive to retain compound **5a,b**. After 48 h, cell cytoplasm has reached optimal conditions to reduce the nitroimidazole moiety. Compound **5a,b** is thus a potential tracer of severe hypoxia.

Four nude mice<sup>25</sup> were xenografted with T98 cells in their left hind legs. 3 weeks after xenografting, the tumors have reached an average diameter of 10 mm. Compound **5a,b** was injected in tail vein (10 MBq). Two hours later, animals were sacrificed and the percent of injected dose per gram of tissue was calculated (Table 2). The tumor-to-muscle ratio was  $2.70 \pm 0.23$  in these conditions.

This result is better than the reported uptake of [<sup>18</sup>F]-FMISO in CaNT tumor, but lower than [<sup>99m</sup>Tc]-HL91 and [<sup>64</sup>Cu]-ATSM (Table 3).<sup>26</sup> This comparison should be interpreted carefully since this is not the same cell line used. To the best of our knowledge,



**Figure 3.** Effect of hypoxia on HIF1 production and luciferase activity. T98 glioblastoma cell line transfected<sup>22</sup> with no cDNA (Mock, **A**) and with cDNA encoding the HIF1 luciferase reporter vector (HIF1-Luc, **B**) were cultured in normoxic (20% O<sub>2</sub>) or hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions, 24 h or 48 h post-transfection. The luciferase activity was expressed as arbitrary bioluminescence units (au). In T98 not transfected with the HIF1-Luc cDNA vector, both normoxic and hypoxic conditions failed to evoke luciferase production. In T98-expressing luciferase under the HIF1-responsive element, 24 h and 48 h of hypoxic conditions drastically stimulate luciferase activity, suggesting enhanced production of HIF1.<sup>23</sup> Bars represent means  $\pm$  SEM. of a representative experiment with 10 replicates in each group. Statistical significance \*\*\* $P < 0.001$ ; hypoxia versus normoxia in B (one-way Anova followed by a Bonferroni post-test).



**Figure 4.** Effect of chronic hypoxia on tracer **5a,b** uptake. T98 glioblastoma cell lines were cultured in normoxic (20% O<sub>2</sub>) or hypoxic (1% O<sub>2</sub>) conditions during 24 or 48 h. After 24 h, no significant difference in uptake of tracer **5a,b** was observed in cells regardless of culture conditions. After 48 h, an uptake and retention of tracer **5a,b** was only observed in cells cultured in hypoxic conditions, suggesting that the nitroimidazole could be reduced in the cytoplasm of cells deprived of oxygen.<sup>24</sup> Bars represent means  $\pm$  SEM of a representative experiment with 8 replicates in each group. Statistical significance \*\*\* $P < 0.001$ ; hypoxia versus normoxia after 48 h (one-way Anova followed by a Bonferroni post-test).

**Table 2**  
Biodistribution (%ID/g, mean  $\pm$  SD) in mice ( $n = 4$ ) bearing a T98 tumor (glioblastoma cell line) 2 h following the injection of <sup>99m</sup>Tc labeled **5a,b**

Organ	<b>5a,b</b> uptake (%ID/g)
Kidney	3.73 $\pm$ 0.59
Liver	2.50 $\pm$ 0.50
Large intestine	0.20 $\pm$ 0.03
Muscle	0.11 $\pm$ 0.02
T98 tumor	0.29 $\pm$ 0.06
T/M ratio	2.70 $\pm$ 0.23

comparison between [<sup>99m</sup>Tc]-HL91, [<sup>18</sup>F]-FMISO and [<sup>64</sup>Cu]-ATSM uptakes in T98 tumor is not described in the literature.

To evaluate the interest of compound **5a,b** as a potential agent for imaging tumor hypoxia, T98 glioblastoma cell line was

**Table 3**  
Reported T/M ratio for hypoxia imaging agents in nude mice (isoflurane + room air; adenocarcinoma NT; 2 h post-injection)<sup>26</sup>

Imaging agent	T/M ratio
[ <sup>99m</sup> Tc]-HL91	4.6 $\pm$ 0.7
[ <sup>18</sup> F]-FMISO	2.2 $\pm$ 0.4
[ <sup>64</sup> Cu]-ATSM	4.0 $\pm$ 0.3



**Figure 5.** Scintigraphic image obtained with 10 MBq of complex **5a,b** 60 min after injection into the tail vein.

xenografted in the right hind limb of nude mouse and after four weeks the tumor diameter was 10 mm. Scintigraphic image was obtained with 10 MBq of compound **5a,b** 60 min after injection into the tail vein. An important uptake was observed in kidneys and intestinal tract as a sign of tracer excretion. A heterogeneous tracer uptake was observed in the tumor (an interesting tumor-to-muscle ratio of 10 was determined) as a potential uptake in hypoxic areas (Fig. 5). Besides, scintigraphic images were also obtained after 2 and 3 h and we observed a constant tumor-to-muscle ratio.

In conclusion, the tripeptide **4b** can be labeled with technetium-99m to give the complex **5a,b** with a radiochemical purity of 95%. A specific uptake of the latter compound **5a,b** in hypoxic tumor cells was observed in vitro. A first biodistribution assay showed a tumor-to-muscle ratio of  $2.70 \pm 0.23$  in vivo. To complete this study, a scintigraphic image showed a specific tracer uptake in hypoxic areas. These results suggest that the complex **5a,b** might be an useful tracer for hypoxic tumor imaging.

### Acknowledgements

The authors thank the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (Grant No. #543/2010) and La ligue contre le Cancer (CD76) for funding Yoann Joyard.

### References and notes

- (a) Schwarz, G. *Munch. Med. Wochenschr.* **1909**, *24*, 1; (b) Mottram, J. C. *Br. J. Radiol.* **1936**, *9*, 606.
- (a) Brizel, D. M.; Scully, S. P.; Harrelson, J. M.; Layfield, L. J.; Bean, J. M.; Prosnitz, L. R.; Dewhirst, M. W. *Cancer Res.* **1996**, *56*, 941; (b) Graeber, T. G.; Osmanian, C.; Jacks, T.; Housman, D. E.; Koch, C. J.; Lowe, S. W.; Giaccia, A. J. *Nature* **1996**, *379*, 88; (c) McKeown, S. R.; Cowen, R. L.; Williams, K. J. *Clin. Oncol.* **2007**, *19*, 427.
- (a) Vaupel, P.; Thew, O.; Hoekel *Med. Oncol.* **2001**, *18*, 243; (b) Sannazzari, G. L.; Ricardi, U.; Filippi, A. R. *Rays* **2002**, *27*, 175; (c) Nordmark, A.; Bentzen, S. M.; Rudat, V.; Brizel, D.; Lartigau, E.; Stadler, P.; Becker, A.; Adam, M.; Molls, M.; Dunst, J.; Terris, D. J.; Overgaard, J. *Radiother. Oncol.* **2005**, *77*, 18.
- (a) Bock, M. *Arzneimittelforschung* **1961**, *11*, 587; (b) Hoffer, M.; Grunberg, E. J. *Med. Chem.* **1974**, *1019*, 17.
- Nakamura, S. *Pharm. Bull.* **1955**, *3*, 379.
- (a) Nunn, A.; Linder, K.; Strauss, H. W. *Eur. J. Nucl. Med.* **1995**, *22*, 265; (b) Mei, L.; Wang, Y.; Chu, T. *Eur. J. Med. Chem.* **2012**, *58*, 50.
- Huang, H.; Zhou, H.; Li, Z.; Wang, X.; Chu, T. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22*, 172.
- Linder, K. E.; Chan, Y. W.; Cyr, J. E.; Nowotnik, D. P.; Eckelman, W. C.; Nunn, A. D. *Bioconjugate Chem.* **1993**, *4*, 326.
- Neumeier, R.; Kramp, W.; Macke, H. Eur. Patent Appl. 0417 870 A2. 1990.
- (a) Schneider, R. F.; Engelhardt, E. L.; Stobbe, C. C.; Fenning, M. C.; Chapman, J. D. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **1997**, *39*, 541; (b) Mannan, R. H.; Somayaji, V. V.; Lee, J.; Mercer, J. R.; Chapman, J. D.; Wiebe, L. I. *J. Nucl. Med.* **1991**, *32*, 1764.
- (a) Ballinger, J. R.; Kee, J. W. M.; Rauth, A. M. *J. Nucl. Med.* **1996**, *1023*, 37; (b) Mees, G.; Dierckx, R.; Vangestel, C.; Vand de Wiele, C. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* **2009**, *36*, 1674.
- (a) Cantorias, M. V.; Howell, R. C.; Todaro, L.; Cyr, J. E.; Berndorff, D.; Rogers, R. D.; Francesconi, L. C. *Inorg. Chem.* **2007**, *46*, 7326. and references therein; (b) Liu, S.; Edwards, D. S. *Chem. Rev.* **1999**, *99*, 2235. and references therein.
- (a) Su, Z.-F.; Zhang, X.; Ballinger, J. R.; Rauth, A. M.; Pollak, A.; Thornback, J. R. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 897; (b) Zhang, X.; Su, Z.-F.; Ballinger, J. R.; Rauth, A. M.; Pollak, A.; Thornback, J. R. *Bioconjugate Chem.* **2000**, *11*, 401.
- (a) Mallia, M. B.; Subramanian, S.; Mathur, A.; Sarma, H. D.; Venkatesh, M.; Banerjee, S. J. *Labelled Compd. Radiopharm.* **2008**, *51*, 308; (b) Mallia, M. B.; Subramanian, S.; Mathur, A.; Sarma, H. D.; Venkatesh, M.; Banerjee, S. J. *Labelled Compd. Radiopharm.* **2010**, *53*, 535.
- Hay, M. P.; Wilson, W. R.; Moselen, J. W.; Palmer, B. D.; Denny, W. A. *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 381.
- Meegalla, S. K.; Plössl, K.; Kung, M.-P.; Chumpradit, S.; Stevenson, D. A.; Kushner, S. A.; McElgin, W. T.; Mozley, P. D.; Kung, H. F. *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 9.
- Cell culture.* The human glioblastoma cell line T98 was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, LGC Standards, Molsheim, France). The T98 cells were maintained in HAM-F12 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FBS, Lonza, Bâle, Suisse), 2 mM L-glutamine and 100 U/ml penicillin/streptomycin (Gibco, Fischer Scientific, Illkirch, France) at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator. Culture media were replaced every 3 days.
- Wainwright, D. A.; Nigam, P.; Thaci, B.; Dey, M.; Lesniak, M. S. *Expert Opin. Emerg Drugs* **2012**, *17*, 181.

19. Yang, L.; Lin, C.; Wang, L.; Guo, H.; Wang, X. *Exp. Cell. Res.* **2012**, *318*, 2417.
20. Valk, P. E.; Mathis, C. A.; Prados, M. D.; Gilbert, J. C.; Budinger, T. F. *J. Nucl. Med.* **1992**, *33*, 2133.
21. (a) Krohn, K. A.; Link, J. M.; Mason, R. P. *J. Nucl. Med.* **2008**, *49*, 129S; (b) Vera, P.; Thureau, S.; Bohn, P. *Méd. Nucl.* **2011**, *35*, 433.
22. For transfection, T98 cells were plated in 24-well plates (Costar,  $10 \times 10^3$  cells/well) for 24 h before transfection in HAM-F12 (for T98 cells), supplemented with 10% FBS. The pHIF1-pTL-Luc (HIF1 Luciferase reporter vector, Panomics, Milano, Italy) is designed to measure transcriptional activity of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1). HIF-1 binds to the hypoxia responsive element and activates genes involved in angiogenesis, glucose metabolism, cell proliferation, survival and invasion/metastasis. The transient transfection of the Plasmid pHIF1-Luc (0.2  $\mu$ g/well) or without vector (Mock) was performed using FuGene 6 (1.8  $\mu$ l/well, Promega) following the manufacturer's protocol. The response of these cells to hypoxia was obtained after 24 or 48 h incubation in the presence of a gas mixture containing 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> and balanced N<sub>2</sub> (Incu Safe Incubator, VWR, Fontenay-sous-Bois, France).
23. *Luciferase assay.* All cell extracts were prepared and analyzed using the Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI). Briefly, 24-well plates were washed twice with cold  $1 \times$  phosphate-buffered saline (PBS) and 100  $\mu$ l of  $1 \times$  lysis buffer was then added to the cells. Samples were lysed and collected and 20  $\mu$ l aliquots were assayed using luciferase assay reagent. Luminescence was measured using a Victor V plate reader (PerkinElmer, Courtaboeuf, France). Background absorbance from samples not transfected was systematically measured.
24. *Tracer uptake assay.* T98 cells were incubated with **5a,b** (2–3 MBq) for 1 h then washed twice with cold PBS. Cells radioactivity was measured by a Wallac Wizard 1470 Gamma Counter. Results were expressed as decay-corrected counts in  $10^6$  cells/MBq.
25. Animals were maintained in a facility approved by the French ministry of agriculture in accordance with current regulations and standards and registered under the number B76-450-05. 'Principles of laboratory animal care' (NIH publication No. 86-23, revised 1985) were strictly followed. Animals were housed four per cage and fed ad libitum. The experiments have been approved by an ethical committee and registered under the number N/02-06-12/12/06-15.
26. Kersemans, V.; Cornelissen, B.; Hueting, R.; Tredwell, M.; Hussien, K.; Allen, P. D.; Falzone, N.; Hill, S. A.; Dilworth, J. R.; Gouverneur, V.; Muschel, R. J.; Smart, S. C. *PLoS One* **2011**, *6*, e25911.

## Impact of meriolins, a new class of cyclin-dependent kinase inhibitors, on malignant glioma proliferation and neo-angiogenesis

Marie Jarry, Céline Lecointre, Céline Malleval, Laurence Desrues, Marie-Thérèse Schouft, Vadim Lejoncour, François Liger, Gildas Lyvynec, Benoît Joseph, Nadège Loäc, Laurent Meijer, Jérôme Honnorat, Pierrick Gandolfo†, and Hélène Castel†

*Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, Astrocyte and Vascular Niche, Biomedical Research Institute (IRIB), PRES Normandy, TC2N network, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France (M.J., C.L., L.D., M.-T.S., V.L., P.G., H.C.); Neuro-oncology department, Hospices Civils de Lyon, Hôpital Neurologique, Bron, France (C.M., J.H.); Lyon Neuroscience Research Center INSERM U1028/CNRS UMR 5292, Lyon, France (C.M., J.H.); University of Claude Bernard - Lyon 1, Villeurbanne, France (C.M., J.H.); Institut de Chimie et Biochimie Moléculaires et Supramoléculaires UMR 5246, University of Claude Bernard - Lyon 1, Villeurbanne, France (F.L., G.L., B.J., N.L.); Protein Phosphorylation & Human Disease Group & USR3151, Station Biologique, Roscoff, France (N.L., L.M.); ManRos Therapeutics, Roscoff, France (L.M.)*

**Corresponding Author:** Hélène Castel, PhD, Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, DC2N, Astrocyte and Vascular Niche, Biomedical Research Institute (IRIB), PRES Normandy, TC2N network, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France (helene.castel@univ-rouen.fr).

†Indicates co-last authors.

**Background.** Glioblastomas are the most frequent and most aggressive primary brain tumors in adults. The median overall survival is limited to a few months despite surgery, radiotherapy, and chemotherapy. It is now clearly established that hyperactivity of cyclin-dependent kinases (CDKs) is one of the processes underlying hyperproliferation and tumoral growth. The marine natural products meridianins and variolins, characterized as CDK inhibitors, display a kinase-inhibitory activity associated with cytotoxic effects. In order to improve selectivity and efficiency of these CDK inhibitors, a series of hybrid compounds called meriolins have been synthesized.

**Methods.** The potential antitumoral activity of meriolins was investigated in vitro on glioma cell lines (SW1088 and U87), native neural cells, and a human endothelial cell line (HUV-EC-C). The impact of intraperitoneal or intratumoral administrations of meriolin 15 was evaluated in vivo on 2 different nude mice-xenografted glioma models.

**Results.** Meriolins 3, 5, and 15 exhibited antiproliferative properties with nanomolar  $IC_{50}$  and induced cell-cycle arrest and CDK inhibition associated with apoptotic events in human glioma cell lines. These meriolins blocked the proliferation rate of HUV-EC-C through cell cycle arrest and apoptosis. In vivo, meriolin 15 provoked a robust reduction in tumor volume in spite of toxicity for highest doses, associated with inhibition of cell division, activation of caspase 3, reduction of CD133 cells, and modifications of the vascular architecture.

**Conclusion.** Meriolins, and meriolin 15 in particular, exhibit antiproliferative and proapoptotic activities on both glioma and intratumoral endothelial cells, constituting key promising therapeutic lead compounds for the treatment of glioblastoma.

**Keywords:** cyclin-dependent kinase, glioma, meriolin, nude mice, tumor growth.

Brain tumors comprise only 1% of all cancers but contribute to 2.5% of overall cancer mortality and are the third leading cause of cancer death in young adults.<sup>1</sup> Malignant gliomas are the most common group of primary brain tumors, with an incidence of 8.9 cases per 100 000 persons/year in the United States.<sup>2</sup> These glial tumors represent a wide spectrum of malignancies ranging from slowly growing (low-grade astrocytoma) to highly aggressive glioblastoma (GBM) tumors<sup>3</sup> associated with very poor prognosis. Indeed, GBMs

are highly vascularized and extremely invasive, conferring resistance to standard treatments (ie, surgery plus radiotherapy, eventually followed by chemotherapy).<sup>4,5</sup> The poor prognosis associated with GBM warrants continued intensive investigation of new therapeutic options, and rapid translation into clinical applications is an urgent necessity.

A hallmark of many human cancers is deregulation of cell-cycle progression affecting regulatory pathways and cellular

Received 27 August 2013; accepted 3 May 2014

© The Author(s) 2014. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Neuro-Oncology. All rights reserved.

For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com.

processes such as proliferation, differentiation, DNA repair, and apoptosis leading to genetic instability, tumorigenesis, and malignancy.<sup>6</sup> Cell-cycle abnormalities are mainly due to hyperactivation of cyclin-dependent kinases (CDKs), members of the serine/threonine-specific protein kinase family, consisting of 20 members exhibiting conserved catalytic domains and similar activation mechanisms through the binding of a regulatory subunit (usually a cyclin) and post-translational modifications. Abnormal regulation of the CDK4- and CDK6-cyclin D-INK4-retinoblastoma protein (Rb) signaling pathway is among the most common aberrations found in many human cancers,<sup>7</sup> particularly GBM.<sup>8-13</sup> Recent profiling of molecular tumors has further highlighted the critical role of CDK4/CDK6 activation in the pathogenesis of GBM.<sup>14,15</sup> Taking account these observations, CDKs have since been extensively pursued as oncology drug targets among many other protein kinases with roles in cell cycle regulation.<sup>16,17</sup> Accordingly, depletion of either CDK1 or CDK2 slows down the progression through G2/M or G1/S, respectively, but combined depletion of CDK1 and CDK2 leads to much stronger G2/M arrest in the non-small cell lung cell line or apoptosis in osteosarcoma cells. In the same way, simultaneous inactivation of CDK1, CDK2, and CDK9 not only arrested cell cycle but also substantially induced apoptosis.<sup>18</sup> However, highly specific inactivation of any CDK, including CDK1, would not be as efficient as more broad inhibition of multiple CDKs. In addition, multitarget inhibitors may find appropriate medicinal use because they are less likely to allow development of resistance and may be more efficient. All CDK inhibitors identified to date are ATP competitive.<sup>19</sup> Many of them have been found to display promising antitumor activities, and a number are currently undergoing clinical evaluation as anticancer drugs.<sup>20-22</sup>

New synthetic 3-((2-amino)pyrimidin-4-yl)-7-azaindole CDK inhibitors, meriolins, are hybrid molecules derived from meridianins, a family of 3-((2-amino)pyrimidin-4-yl)indoles, and variolin B containing a central pyrido[3',2':4,5]pyrrolo[1,2-c]pyridine core substituted with a 2-aminopyrimidine ring.<sup>23,24</sup> Meridianins and variolin B are marine natural compounds that exhibit various levels of kinase inhibition and are extracted from the Ascidian *Aplidium meridianum*<sup>25</sup> and *Kirkpatrickia variolosa*, a rare Antarctic sponge,<sup>26,27</sup> respectively.<sup>28,29</sup> Recent studies established that variolin B and deoxyvariolin display CDK inhibition and antitumor activity,<sup>30</sup> whereas a first series of meriolins has shown potent inhibitory activities towards CDKs and antiproliferative and pro-apoptotic behaviors on human cancer cell lines in culture.<sup>24</sup> In particular, phosphorylation at CDK1-, CDK4-, and CDK9-specific sites has been shown to be counteracted by meriolins in neuroblastoma SH-SY5Y.<sup>23</sup> Meriolin 3 potently inhibited growth of Ewing's sarcoma and LS174T colorectal carcinoma xenografted into nude mice.<sup>23</sup> In the present study, the potential antitumoral activity of a new series of meriolin has been specifically evaluated on malignant glioma development, both in vitro and in vivo.

## Materials and Methods

### Compounds, Cell Lines and Culture Conditions

Meriolins were synthesized by Benoît Joseph's research group (ICBMS, University of Lyon) and provided by Dr. Laurent Meijer (ManRos Therapeutics). Meriolins were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO) at a 10 mM stock solution and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### Culture of Cell Lines

Human cell lines from anaplastic astrocytoma (SW1088) and glioblastoma (U87), human (HUV-EC-C), and murine (bEnd3) endothelial cell lines were obtained from the American Type Culture Collection. SW1088 cells were maintained in Leibovitz L-15 containing 10% fetal bovine serum (FBS; Lonza) and 1% sodium pyruvate at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere. U87 and bEnd3 cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Invitrogen) containing 10% FBS and 1% sodium pyruvate at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . The HUV-EC-C cells were maintained in F12K (Invitrogen) containing 10% FBS, 1% sodium pyruvate, 0.1 mg/mL heparin, and 0.05 mg/mL endothelial growth factors (Invitrogen) at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$ . Culture media were replaced every 3 days.

### Culture of Rat Astrocytes

Primary cultures of astrocytes were prepared as previously described.<sup>30</sup> Briefly, cerebella from 7-day-old (P7) Wistar rats were collected in DMEM/Ham-F12 (21, v/v%) culture medium supplemented with 2 mM glutamine, 1% insulin, 5 mM HEPES, 0.4% D(+)-glucose, and 1% of antibiotic-antimycotic solution. The tissues were disaggregated mechanically with a syringe equipped with a 1 mm gauge needle and filtered through a  $100\ \mu\text{m}$  pore-size mesh filter (Falcon; Becton Dickinson). Dissociated cells were resuspended in culture medium supplemented with 10% heat-inactivated FBS and seeded in  $150\text{-cm}^2$  culture flasks (Falcon) at a density of  $20 \times 10^6$  cells/flask. Cells were incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere (5%  $\text{CO}_2$ ), and the medium was changed twice a week. When cultures were confluent, the flasks were gently shaken on an orbital shaker at 250 g for 2 hours. Dislodged cells were discarded, and a second step of purification was performed at 250 g for 14–16 hours. Remaining adhesive cells were collected by trypsination, centrifuged (800 g for 10 min) and plated in  $150\text{ cm}^2$  flasks. Suspended astrocytes were harvested and seeded in 24-well poly-L-lysine-coated plates.

### Culture of Neurons and Co-culture of Astrocyte-neuron

Cerebellar granule cell cultures were prepared from cerebella of P7 Wistar rats as described previously.<sup>31</sup> Isolated cells were plated on 14 mm culture dishes coated with poly-L-lysine (5 mM) at a density of  $1.5 \times 10^6$  cells/dish and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere (5%  $\text{CO}_2$ ) for 1 to 10 days before use. Culture medium consisted of DMEM/Ham's F12 (75%/25%) supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  insulin, 25 mM KCl, and 1% of antibiotic-antimycotic solution. Culture of neurons and co-cultures were obtained by seeding granule cells ( $1.5 \times 10^6$  cells/mL) directly on fibronectine or astrocytes plated in 24-well plates after 12 hours. Co-cultures were maintained in the specific medium for neuron and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  in a humidified atmosphere (5%  $\text{CO}_2$ ) for only 4 days.

### Cell Growth Assay

SW1088, U87, HUV-EC-C, and bEnd3 cells were cultured in 24-well plates (Costar;  $5 \times 10^3$  cells/well for SW1088 and HUV-EC-C,  $15 \times 10^3$  cells/well for U87 and bEnd3) for 24 hours

before treatment in L-15, DMEM, DMEM, or F12K, respectively, supplemented with 10% FBS. Cells were then incubated in the absence or presence of graded concentrations of meriolins (10 pM to 10  $\mu$ M) for 48h, 48h, 24h, and 72 h, respectively. Controls were determined by using a DMSO concentration corresponding to the dilution of meriolins used for each concentration tested. After treatment, cells were harvested, and cellular density was measured by direct cell counting with an electronic cell counter (Z2; Coulter Beckmann).

### Cell Cycle Analysis

U87 and HUV-EC-C cell lines were plated in 75 cm<sup>2</sup> Falcon flasks. When cells reached 80% confluence, they were incubated in the absence or presence of meriolins 5 and 15 (0.1  $\mu$ M) for 24 hours. Cells treated with DMSO corresponding to meriolin concentration were used as control. Cell cycle analysis was done by DNA staining with propidium iodide by flow cytometry. Briefly, after treatment, cells were trypsinized, harvested in PBS, and fixed in ice cold 70% ethanol for 2 hours. Staining was done with 0.6 mg/mL RNase (30 min; room temperature [RT]; Sigma-Aldrich) and 50  $\mu$ g/mL propidium iodide (30 min; RT; Sigma-Aldrich). Cell cycle status was quantified by FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences) using CellQuest analysis software (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

### Apoptosis Analysis Through Determination of $\Delta\Psi_m$

SW1088, U87, and HUV-EC-C cell lines were plated in 25 cm<sup>2</sup> Falcon flasks. When cells reached 80% confluence, they were incubated in the absence or presence of meriolins 3, 5, 7, and/or 15 (0.1  $\mu$ M) for 24 hours or 48 hours. Cells treated with DMSO corresponding to the meriolin concentration were used as control. Staurosporine treatment for 1 hour was used as a positive control. Changes in mitochondrial function induced by different apoptotic stimuli were associated with the mitochondrial membrane potential.<sup>32</sup> Damaged mitochondria lose membrane integrity and are not able to maintain their transmembrane potential as a consequence. Mitochondrial potential labeling,  $\Delta\Psi_m$ , was determined by monitoring the fluorescence of the cationic potentiometric dye tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM). Briefly, after treatment, cells were harvested, rinsed in PBS, resuspended in a buffer containing 10 mM HEPES, 135 mM NaCl, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, and incubated 15 minutes in a fresh TMRM solution (200 nM, 37°C in the dark; Molecular Probes; Fischer Scientific). Red fluorescence was determined by FACS Calibur flow cytometer (BD Biosciences) in the FL2 channel at 575 nm using CellQuest analysis software. Representative results were shown as 2-dimensional density plots of TMRM-stained cells illustrating the percentage of cells with intact  $\Delta\Psi_m$  (TMRM fluorescence in top right quadrant).

### Electrophoresis and Western Blotting

Following heat denaturation for 3 minutes, Sc1 cell proteins were separated on a minigel electrophoresis system (Invitrogen) using NuPage 10% Bis-Tris, 10- or 12-well polyacrylamide gels. Electrophoresis and transfer were performed in XCell SureLock Mini-Cell system and XCell II Blot module from Invitrogen. The 0.45  $\mu$ m nitrocellulose membrane was from Fisher Bioblock. These were

blocked for 1 hour with 5% low-fat milk in Tris-buffered saline-Tween-20, incubated overnight at 4°C, and analyzed by enhanced chemiluminescence. Monoclonal antibodies against actin were from Calbiochem. Monoclonal antibodies against Rb were purchased from BD Biosciences. Polyclonal antibody against phospho-Ser249/Thr252-Rb was provided by Biosource. Polyclonal antibody against phospho-Thr320-protein phosphatase 1 $\alpha$  (PP1 $\alpha$ ) was from Cell Signaling. Polyclonal antibodies against RNA polymerase II and phospho-Ser2-RNA polymerase II were supplied by Covance Research Products. Polyclonal antibodies against PARP and against Mcl-1 were obtained from Santa Cruz Biotechnology.

### Heterotopic Tumoral Growth Study

We used 2 different xenografted animal models to test the effect of meriolin 15 *in vivo*. Animal experiments were performed according to the recommendations of the French Ethical Committee and under the supervision of authorized investigators. First, we used U87 human glioblastoma cell line xenografted in nude mice. A cohort of 6–7-week-old male Swiss nude mice (Charles River Laboratory) was sedated by isoflurane inhalation (Aerane; Baxter) and implanted subcutaneously into the flanks with  $3 \times 10^6$  U87 cells/100  $\mu$ L PBS. During the protocol, tumor growth was evaluated every day. When tumors reached a volume of 100–150 mm<sup>3</sup>, 100  $\mu$ L of meriolin 15 or vehicle at the corresponding concentration were injected intraperitoneally (i.p.). A stock solution of 25 mg/mL in DMSO was prepared and stored at –20°C. In a first experiment, meriolin 15 was administered at doses of 2 mg/kg every 2 days (meriolin 15, 2 mg/kg/2 d), 5 mg/kg every 2 days (meriolin 15, 5 mg/kg/2 d) or every day (meriolin 15, 5 mg/kg/d), diluted in DMSO in NaCl 0.9% (5/95, v/v%). In a second experiment, meriolin 15 was administered at doses of 2.5 mg/kg twice daily (meriolin 15, 2  $\times$  2.5 mg/kg), 5 mg/kg twice daily (meriolin 15, 2  $\times$  5 mg/kg) or 10 mg/kg twice daily (meriolin 15, 5  $\times$  10 mg/kg) diluted in polyethylene glycol (PEG)-300 in NaCl 0.9%. For the control, we injected mice with the same solutions but without meriolin 15. This model was used for *ex vivo* immunohistochemical investigation of proliferation, apoptosis, or vascular architecture. Thus, U87 tumor xenografts were collected, frozen in isopentane, and maintained at –80°C.

To confirm the observed effects on U87 human GBM cell line, we tested meriolin 15 on a second animal model. This model was developed in 2003 at the Neurology Department and Medical School of Vandoeuvre-lès-Nancy, France<sup>33</sup> using a piece of human GBM obtained after neurosurgical resection and grafted into nude mice (see details in Supplementary Materials and Methods). The obtained xenograft was maintained in nude mice by serial passages when tumors reached 1–2 cm<sup>3</sup>. The day of xenograft was considered as day 0 (D0). At the onset of treatment, once tumors reached  $\sim 250$  mm<sup>3</sup>  $\pm$  40 mm<sup>3</sup> in volume, mice were arbitrarily assigned to different groups ( $n = 6$  to 8 each). Two independent experiments were conducted with intratumoral injection of meriolin 15 for 5 or 10 days. We tested different concentrations (2.5 mg/kg/day for 5 days, 1.25 mg/kg/day for 5 days, 1.25 mg/kg/day for 10 days, and 1.8 mg/kg/day for 5 days). Meriolin 15 was diluted in 5% DMSO, 45% PEG, and 50% NaCl; for the control, we used as mice injected with the same solution without meriolin 15. During the 2 protocols, tumor growth



was evaluated every day, and animals were weighed every 2 days. The tumor volume was estimated according to its major and minor axes as measured with a slide caliper. Tumor volumes were calculated by assuming a spherical shape and using the formula:  $\text{volume} = (\frac{a^2 \times A}{2})$ , where “A” and “a” are the long and short diameters, respectively. Mice were euthanized when the tumor volume reached 2 cm<sup>3</sup>, and this day was considered as the survival time of the mice. Survival times were analyzed using the Kaplan-Meier method, and we also used the Wilcoxon statistical test to compare tumoral sizes.

### Immunohistochemical Staining

Tumor sections (10 μm thick) were cut in a cryostat (Cryostat CM1950; Leica Microsystems), mounted on gelatin-coated slides, and maintained at −20°C until experiment. Briefly, slides were first rinsed in PBS, fixed in a paraformaldehyde solution (4%; 20 min; RT) and washed 3 times in PBS. Sections were permeabilized and preincubated in a PBS, Triton X100 0.3%, normal donkey antiserum NDS 1:50, and bovine serum albumin 0.5% solution (30 min; RT). Slides were then incubated with primary antibodies (4°C) (ie, anti-Ki67), -caspase 3, -collagen IV antibody (Santa Cruz Biotechnology), and anti-CD133 antibodies (1:200; overnight; Millipore). After treatment, slices were washed 3 times in PBS (10 min; RT) and incubated with corresponding secondary antibodies in a PBS/Triton 0.03% solution (1:300; 2 h; RT; in the dark). Finally, after washing, slices were incubated in 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI; 1:1,000; 10 min; RT; Sigma-Aldrich), washed again, and mounted in Mowiol 4–88 (Calbiochem). Tumor slices were then examined using a confocal microscope (Leica TCS SP2 AOBS). Quantitative analyses from the confocal acquisitions were calculated by using ImageJ 1.44. software.

### Statistical Analysis

All statistical analyses were conducted using tGraphPad Prism 4.00 software (GraphPad Software). Data were expressed as mean values ± SEM of 3 or more separate experiments. Among the experiments, data were analyzed with different statistical tests (ie, Friedman test followed by Dunn' and Dunnett' multi-comparison test [cell cycle, apoptosis, kinetic of tumor growth], Wilcoxon or Mann-Whitney tests [tumoral volume of heterotopic xenografts and mouse weight], Kruskal-Wallis test [quantification of immunohistochemical labeling], or the Cox-Mantel log-rank test (survival).

## Results

### Selected Meriolins Inhibit Human Glioma Cell Growth *in Vitro*

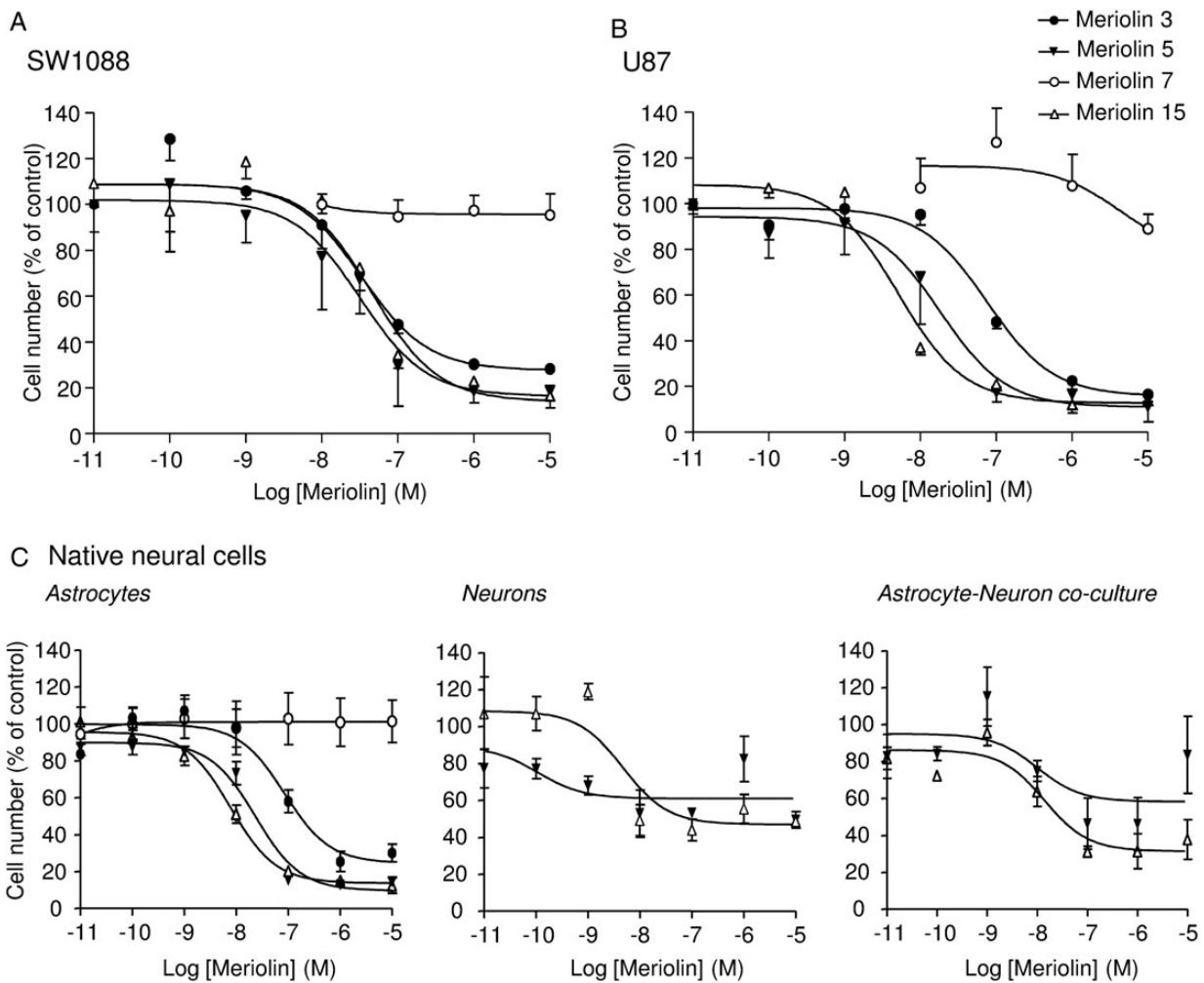
We explored the antitumoral activity of various meriolins on 2 human glioma cell lines (ie, anaplastic astrocytoma [SW1088] and human glioblastoma [U87]). Both cell lines were exposed to increasing concentrations yielding dose-dependent proliferation rate inhibition after 48 hours of treatment. IC50 values indicated that 19 meriolins efficiently decreased cell growth in a concentration range from 1 nM to 1 μM (data not shown). Among them, meriolins 3, 5, and 15, whose structures are illustrated in

Figure S1, showed an interesting reduction of more than 70% of the proliferation rate of both glioma cell lines with IC50 values of 34, 32, and 46 nM, respectively, for SW1088 (Fig. 1A) and of 76, 18.4, and 5.1 nM, respectively, for U87 (Fig. 1B). Conversely, meriolin 7, which presents a modified irrelevant structure (Fig. S1), was devoid of antiproliferative activity (Fig. 1A and B). The cytotoxic effect of meriolins was also tested on primary proliferating astrocyte and neuron cultures as well as astrocyte-neuron co-cultures from 7-day-old cerebellum rat pups. Meriolins 5 and 15 still showed antiproliferative and pro-death activities, yielding IC50 values for meriolin 15 of 7.8 nM in astrocytes and 4.7 nM in neurons (Fig. 1C, left and middle panels). An important feature of this study was that the astrocytes remained more quiescent, whereas neurons started differentiating in the astrocyte-neuron co-cultures.<sup>34,35</sup> In these less proliferating and more differentiating co-cultured native cells, meriolins 5 and 15 exhibited lower activities than in glioma cells (Fig. 1C, right panel).

### Meriolins Induce Arrest of Cell Cycle and Promote Apoptosis of Human Glioma Cell Lines

The cell cycle distribution of the U87 glioblastoma cell line was examined using flow cytometry with propidium iodide in the absence or the presence of meriolins 5 and 15 (0.1 μM each) (Fig. 2A). As illustrated in Figure 2A and B, after a 48 hour exposure with meriolins 5 and 15, the G1 phase appeared significantly reduced ( $P < .01$ ), whereas the G2/M phase markedly increased compared with control ( $P < .05$ ). No significant sub-G1 accumulation could be observed after 48 hours of treatment (Fig. 2B). In addition, systematic cell cycle analysis revealed a progressive accumulation of cells in the diploid phase of the cycle with both meriolin 5 and meriolin 15 (data not shown). The meriolin 15-induced morphological changes and cell cycle arrest would be accompanied by cell death events potentially including delayed apoptotic and nonapoptotic mechanisms. One of the initial events of mitochondrial alteration is a decreased mitochondrial membrane potential  $\Delta\Psi_m$ , likely detectable by loss of the orange/red fluorescence of the fluorescent dye TMRM, as described in the Materials and Methods section. In representative 2-dimensional density plots of TMRM-stained cells illustrating percentage numbers of still-alive cells with intact  $\Delta\Psi_m$  (TMRM fluorescence in top right quadrant), it was shown that 24 hour exposure of SW1088 and U87 to meriolins 5 and 15 (0.1 μM, each) increased cell death and remaining healthy cells decreased from 70% to 51% and 44% in SW1088 and from 77% to 67% and 71% in the presence of meriolins 5 and 15, respectively (Fig. 3A); however, only the effect of meriolin 5 (SW1088) was significant at 24 hours (Fig. 3B,  $P < .05$ ). In U87, the effect of meriolins 5 and 15 was moderate at 24 hours and marked at 48 hours (Fig. 3A). In both glioma cell lines, the proapoptotic agent staurosporine (0.1 μg/mL; 1 h) induced loss of  $\Delta\Psi_m$  in glioma cells, whereas no change occurred with meriolin 7 (Fig. 3A). These data suggest that meriolins 5 and 15 induce astrocytoma and glioblastoma cell-cycle arrest in G2/M phase and loss of mitochondrial potential, reflecting apoptosis and/or nonapoptotic cell death that likely contribute to the inhibition of proliferation and glioma cell death *in vitro*.

We also analyzed the effects of meriolin 15 on various markers in human GBM Sc1 cells (Fig. 4). Sc1 cells were exposed to 65 nM meriolin 15 (corresponding to 3 times the IC50 value for meriolin



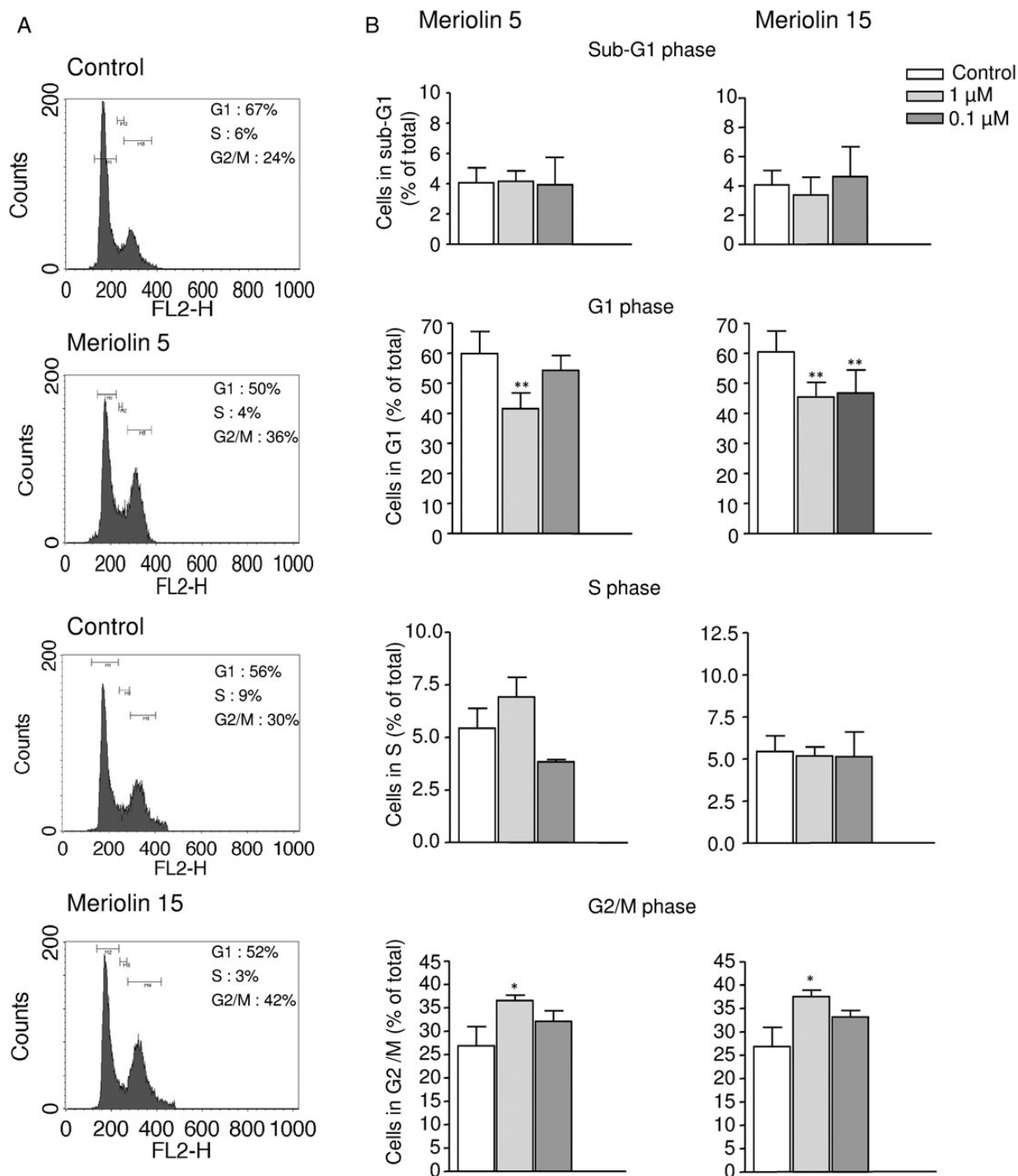
**Fig. 1.** Antiproliferative effect of selected meriolins on human glioma cells and native astrocytes and neurons in vitro. (A and B) Human anaplastic astrocytoma cells SW1088 (A) and human glioblastoma cells U87 (B) were incubated for 48 hours with graded concentrations of meriolin 7 (10 nM to 10  $\mu$ M) or meriolins 3, 5, and 15 (10 pM to 10  $\mu$ M) and counted using a Coulter counter. (C) Rat native neonatal astrocytes (left) were treated for 48 hours with graded concentrations of meriolins 3, 5, 7, and 15 (10 pM to 10  $\mu$ M), whereas neurons (middle) or astrocytes and neurons in co-culture (right) were treated for 48 hours with meriolins 5 and 15 (10 pM to 10  $\mu$ M) and then counted using the Coulter counter. The active and potent meriolins 3, 5, and 15 induced growth inhibition in tumoral cells but also in native neural cells, which were mostly proliferating. Data are mean of 3 to 9 independent experiments performed in triplicate.

15 on this cell line) for increasing durations (1.5 h to 24 h). Cells were then collected, and proteins were extracted and resolved by SDS-PAGE, followed by analysis by Western blotting with various antibodies. Meriolin 15 induced downregulation of the survival factor Mcl-1, caspase 3, RNA polymerase II, and PARP cleavage as well as dephosphorylation of the CDK1/CDK2/CDK7/CDK9 sites on protein phosphatase 1 $\alpha$  (Thr320), RNA polymerase II (Ser 2), and Rb (Ser249/Thr252, Ser807/Ser811). These results confirm the direct effect of meriolin 15 on endogenous CDKs, leading at least in part to the activation of an apoptotic pathway.

### Meriolins Inhibit Cell Growth, Arrest Cell Cycle, and Induce Apoptosis of Endothelial Cells

Growth and expansion of high-grade glioma tumors are associated with vascular endothelial cell proliferation and migration,

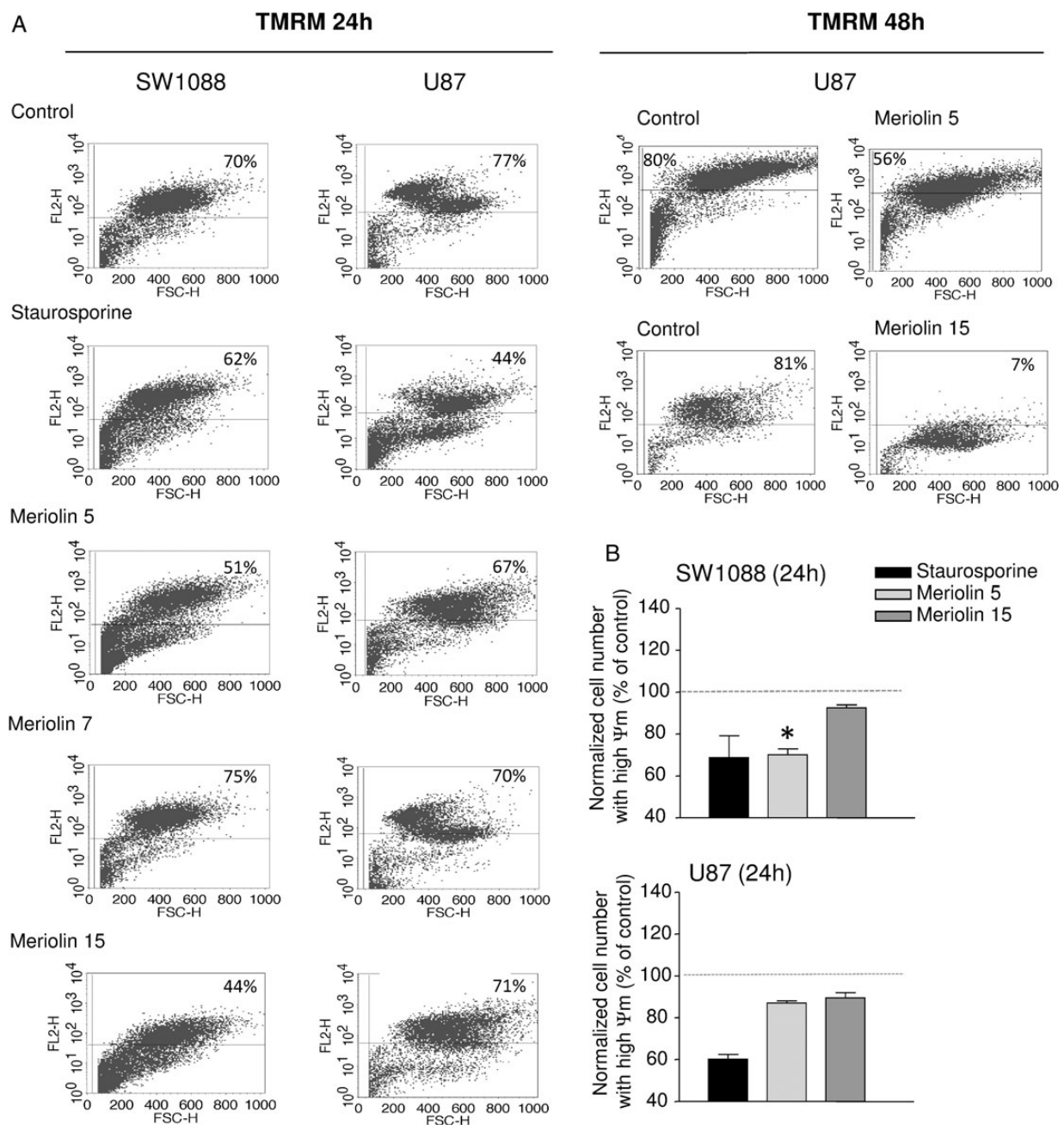
leading to lumen formation referred to as neoangiogenesis. Thus, because meriolins exhibited antimitogenic activity on glioma cells, we also investigated their potential role on transformed human (HUV-EC-C) and mouse (bEnd3) endothelial cell lines. In the presence of the corresponding concentration of DMSO (as control) or meriolin 7, HUV-EC-C cells exhibited elongated forms, whereas relevant proapoptotic morphological changes and cell detachment have been observed in the presence of meriolin 15. A 72 hour treatment with meriolins 3, 5, or 15 at a concentration of 0.1  $\mu$ M decreased the growth of the HUV-EC-C endothelial cells by 29.5%, 42.5%, and 58.2%, respectively (Fig. 5A). Similar meriolin-inducing cell death has been detected on the murine bEnd3 cell line with IC<sub>50</sub> values in the micromolar range (Table S1; Fig. S2). We analyzed the effect of the most efficient meriolins (5 and 15) on the cell cycle profile of HUV-EC-C cells. In the representative example, only meriolin 15 (24 h) caused G2/M phase arrest and retention, with the G2/M



**Fig. 2.** Meriolins 5 and 15 arrested cell cycle in G2/M phase. (A) Representative effect of meriolins 5 and 15 (0.1 μM) on U87 cell cycle after 24 hour treatment. Cell cycle analysis following propidium iodide intercalation into the cellular chromatin was performed by flow cytometry. Data are representative of relative fluorescence intensity of G1, S, and G2/M-phase populations in a 2-dimensional FACS profile. The percentage of cells in each phase is indicated. (B) Bar graph of the percentage of U87 cells in G1, S, and G2/M phases after 24 hour treatment with DMSO 0.1% (control) and meriolins 5 and 15 (0.1 μM and 1 μM) in culture medium. Statistical significance was determined using 1-way ANOVA test followed by the Dunnett' post test. \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ , meriolin 5 or 15 (1 and 0.1 μM) versus control group.

population increasing from 15% for control cells (DMSO) to 21% (meriolin 15, 0.1 μM) (Fig. 5B). Accordingly, the population in S phase decreased from 6% to 2% without significant modification

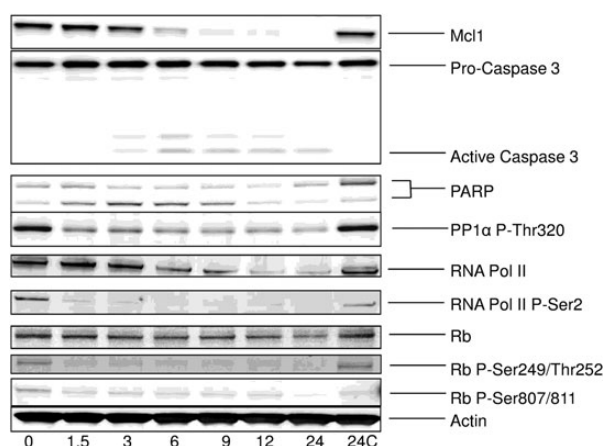
of G1 phase after 24 hours of treatment. As already described in glioma cells, we did not observe an increase in the sub-G1 fraction of meriolin 15-treated HUV-EC-C cells. To analyze the



**Fig. 3.** Meriolins 5 and 15 induced loss of mitochondrial potential. Apoptotic events were determined through characterization of the changes in mitochondrial membrane potential  $\Delta\Psi_m$  as revealed by the orange/red decrease of TMRM labeling. Results are shown as color-enhanced density dot plots, and values in upper right quadrants indicate percentage of viable cells with intact  $\Delta\Psi_m$ . (A, left) SW1088 and U87 cells were treated for 24 hours in the absence or presence of meriolins 5, 7, and 15 (0.1  $\mu\text{M}$ , each) or the validated proapoptotic agent staurosporine (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 2 h). Right, U87 cells were also incubated with meriolins 5 and 15 during 48 hours and exhibited drastic loss of  $\Delta\Psi_m$ . (B) Quantification of the effect of meriolins 5 and 15 on SW1088 and U87 cell number with intact  $\Delta\Psi_m$ . The data are presented as mean  $\pm$  SEM from 3 independent experiments. Statistical significance was determined using the 1-way ANOVA test followed by the Dunnett' post test. \* $P < .05$ ; meriolin 5 (0.1  $\mu\text{M}$ ) versus control group.

mechanisms involved in inhibition of cell proliferation, we examined  $\Delta\Psi_m$  change in HUV-EC-C with TMRM fluorescence. As depicted by the orange/red TMRM labeling, the majority of untreated (DMSO) or meriolin 7-treated endothelial cells (95%) were viable (Fig. 5C). In contrast, staurosporine (0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 1 h),

meriolins 5 and 15 (0.1  $\mu\text{M}$  each; 24 h) led to cell integrity loss of 88%, 65%, and 59% as illustrated by a diminished number of TMRM-labeled cells in the right quadrant (Fig. 5C). Our findings demonstrated that meriolins 5 and 15 have markedly stopped human endothelial cell proliferation by arresting cell cycle



**Fig. 4.** Meriolin 15 inhibited endogenous CDKs and activated apoptosis in human GBM Sc1 cells. Sc1 cells were treated with 65 nM ( $3 \times IC_{50}$ ) meriolin 15 for increasing durations (0 h–24 h). Cell proteins were extracted and resolved by SDS-PAGE followed by analysis by Western blot with antibodies directed Mcl-1, caspase 3, Poly-ADP ribose polymerase (PARP), phospho-Thr320 protein phosphatase 1 $\alpha$  (PP1 $\alpha$  P-Thr320), RNA polymerase II (RNA Pol II), phospho-Ser2 RNA polymerase II (RNA Pol II P-Ser), Retinoblastoma protein (Rb), phospho-Rb Ser249/Thr252, Ser807/Ser811 (Rb P-Ser249/Thr252), and P-Ser807/811). Actin was used as a loading control. Some cells (24C) were exposed to DMSO vehicle only for 24 hours.

progression and exhibited proapoptotic/cell death activities in both tumoral glioma and endothelial cells. Thus, the most efficient meriolin, 15, has demonstrated effects on glioma growth, cell cycle arrest, and apoptosis/nonapoptotic death in endothelial and glioma cells, which makes it a promising candidate to optimize for treatment of high-grade glioma.

#### ***In Vivo* Antitumoral Activity of Meriolin 15 on GBM Growth in Nude Mice**

To investigate whether inhibition of CDKs by meriolins leads to tumor regression, meriolin 15 was administered i.p. in nude mice xenografted with human glioblastoma U87 cells (Fig. 6A and B) or intratumorally in other nude mice xenografted with human GBM Sc1 (Fig. 6C–F). In the set of U87 xenografts, meriolin 15 significantly slowed glioblastoma growth at a dose of 5 mg/kg, compared with the vehicle group (corresponding DMSO dilution in NaCl 0.9%) when administered daily (Fig. 6A). In particular, an 8-day treatment with meriolin 15 led to about 50% (2 mg/kg/2d), 40% (5 mg/kg/2d), or 60% (5 mg/kg/d) inhibition of tumor growth *in vivo*, with mean tumor volume values of  $998 \pm 294 \text{ mm}^3$  in vehicle (DMSO) and  $446 \pm 42$  ( $P < .05$ ),  $603 \pm 114$  and  $362 \pm 95 \text{ mm}^3$  ( $P < .05$ ) under meriolin 15 treatments, respectively. No systemic toxicities, such as food and water consumption or spontaneous activity, were detected in these animals, and mice weight gains were not significantly different between vehicle- and meriolin-treated groups (Fig. S3A). In order to enhance meriolin 15 doses, taking into account the insolubility above 5 mg/mL, meriolin 15 was diluted in PEG-300 and administered i.p. twice a day from 2.5 mg/kg to 10 mg/kg to reach optimum tumor cytotoxicity. At 5 mg per day ( $2 \times 2.5 \text{ mg/kg}$ ), meriolin 15 exhibited a very similar inhibitory effect on

glioblastoma tumor growth during 14 days of treatment (Fig. 6B). Again, the mean tumor volume 8 days after the first meriolin injection was significantly lower in the meriolin-treated mice ( $P < .01$ ), but mouse survival was not significantly enhanced. However, when 10 mg/kg and 20 mg/kg were administered daily, animals exhibited drastic weight loss (Fig. S3B) and death after 8 and 2 days of treatment, respectively. Thus, these data showed that meriolin 15 delays tumor growth after systemic administration but induces animal toxicity at high doses.

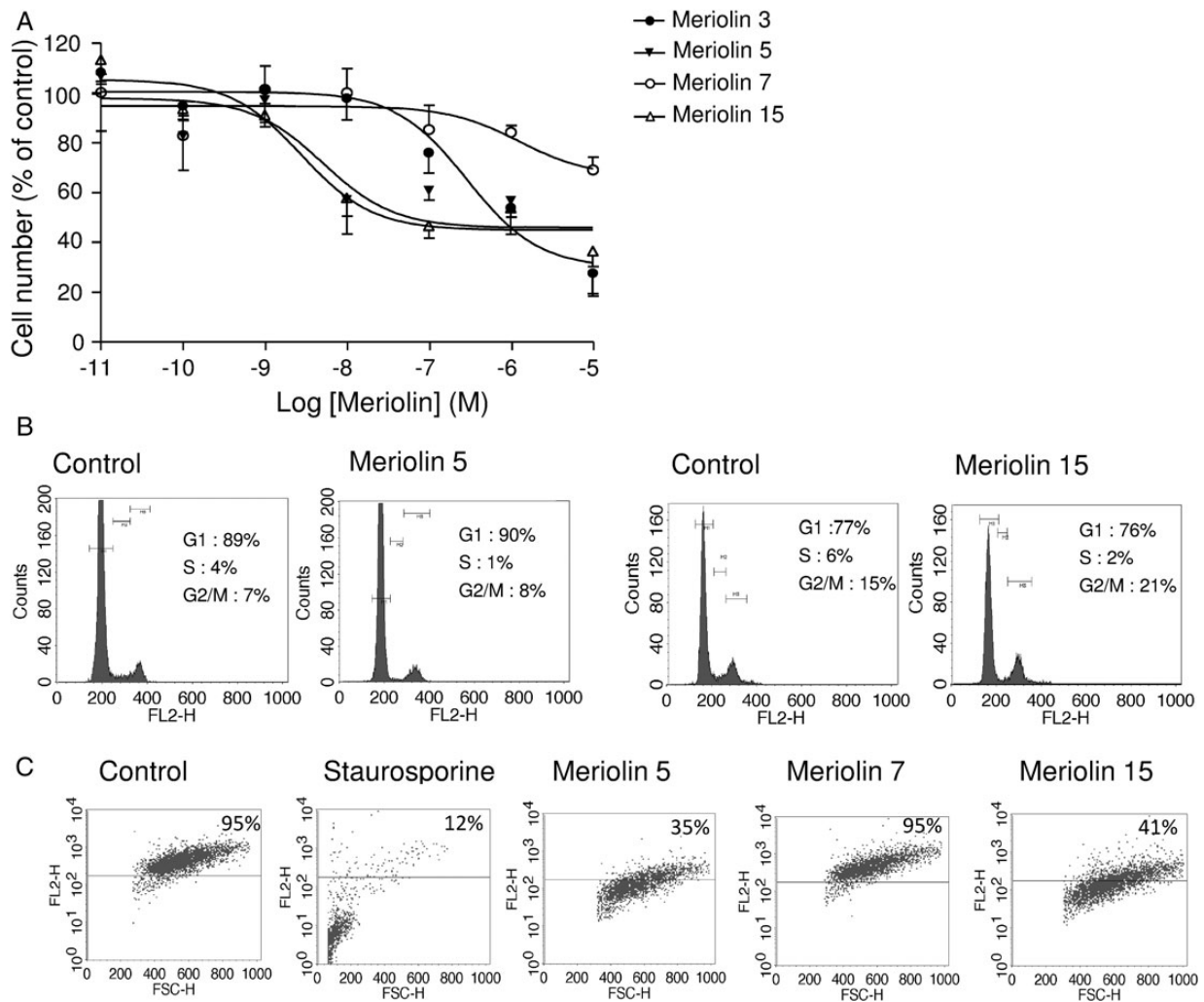
To confirm the efficacy of meriolin 15 *in vivo*, we tested an intratumoral injection procedure using 2.5 mg/kg/day during 5 days on human GBM Sc1. We observed significant inhibition of the tumor growth (Fig. 6C,  $P < .05$ ) and increase of the overall survival compared with the PEG-DMSO vehicle ( $P = .02$ ; Fig. 6D), and 3 of the 7 treated mice were totally cured. However, at this dose we observed an important inflammatory cutaneous reaction, which was associated with a local necrosis, in all treated mice. To avoid this toxic effect, we tested 1.8 mg/kg/day during 5 days and 1.25 mg/kg/day during 10 days. No local inflammatory reaction was detected with these protocols, and tumor growth was significantly delayed (Fig. 6E). Significant differences in mouse survival were observed with the 1.25 mg/kg/day dose during the 10 day schedule ( $P = .051$  or 1.8 mg/kg/day during 5 days ( $P = .015$ ) compared with vehicle, where there were no cured mice (Fig. 6F).

#### ***Analysis of in Vivo* Antitumoral Effect of Meriolin 15**

U87-bearing tumor sections were examined for the effect of i.p. administered meriolin 15 (Fig. 7A) on proliferation, differentiation, and/or apoptosis/cell death. Immunohistochemical analysis showed that the rate of cell division within the tumor, as revealed by labeling of the proliferation marker Ki67, significantly decreased by 36.6% after treatment with 2 mg/kg/2day (Fig. 7A). This mechanism was correlated with the enhanced activity of caspase 3 (Fig. 7B). In addition, the expression of CD133, the marker for tumoral stem cells or undifferentiated cells, was significantly inhibited by 86.05% in tumor sections extracted from meriolin 15-treated mice (5 mg/kg/d) (Fig. 7C). We also tested whether tumor cell death was tightly coupled to blood vessel regression and measured the number of vessels. Interestingly, analysis of the vascular basement membrane through collagen IV immunolabeling indicated that the basement membrane did not disappear but rather showed thin strands of basement membrane, the number of which number decreased significantly after (5 mg/kg) of meriolin 15 (Fig. 7D) accompanied by large blood lakes. These data indicate that a systemic treatment with meriolin 15 inhibits cell proliferation, reduces the number of undifferentiated cells and vascular components, and induces cell death at least in part via a caspase-3-dependent apoptotic pathway.

#### **Discussion**

We investigated the potential antitumoral effects of a series of meriolins designed as synthetic hybrid molecules between 2 different classes of marine natural products named meridianins (extracted from an ascidian) and variolins (extracted from a sponge), which have been previously characterized as kinase/CDK inhibitors and antitumoral agents.<sup>24,28,29</sup> A first set of meriolins

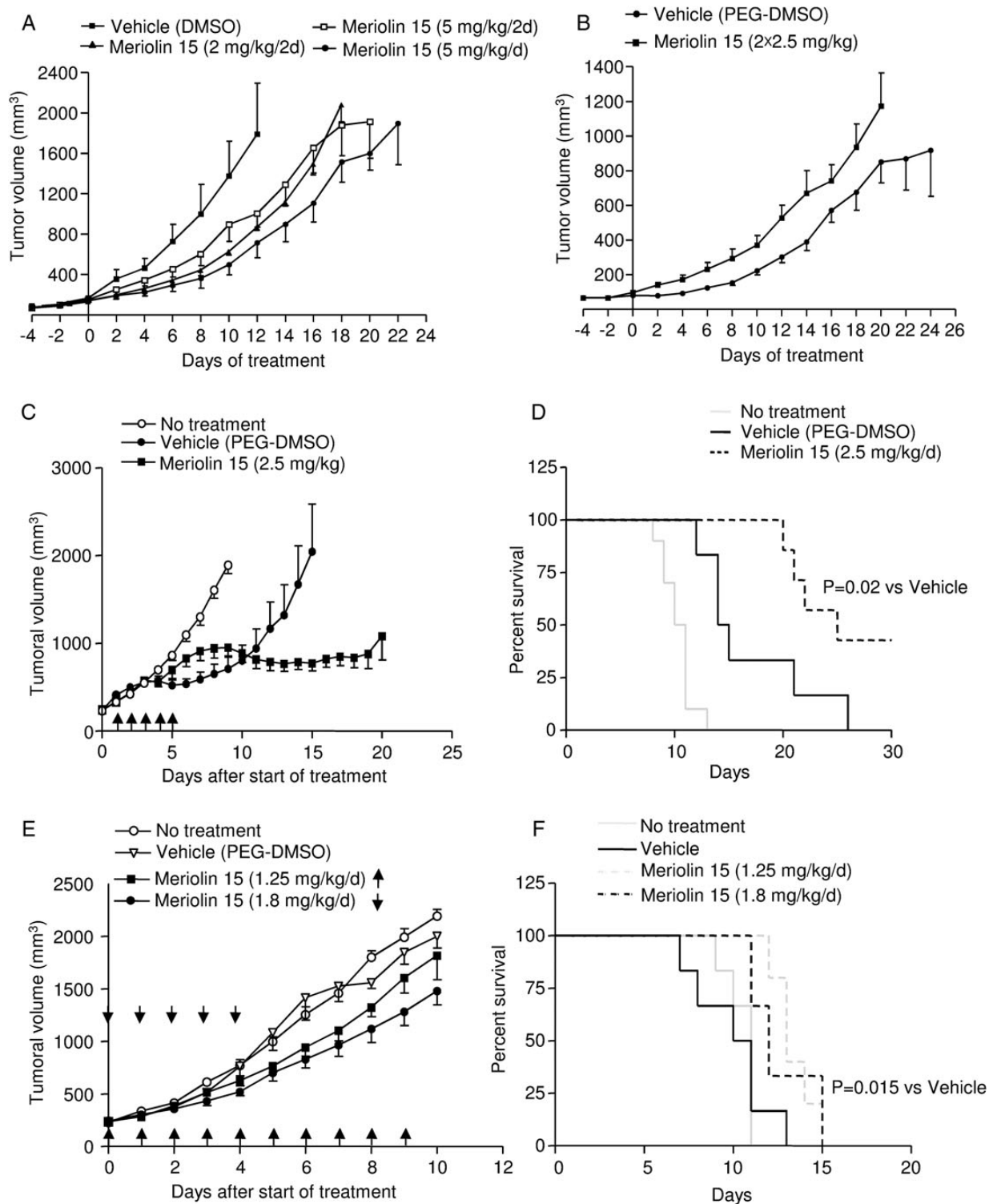


**Fig. 5.** Meriolins 3, 5, and 15 inhibited cell growth, arrested cell cycle in G2/M phase, and induced apoptosis of human endothelial cells in vitro. (A) Effect of increasing concentrations (10 pM to 10  $\mu$ M) of meriolins 3, 5, 7, or 15 on the number of human endothelial cells HUVEC-C. (B) Effect of meriolins 5 and 15 (0.1  $\mu$ M, 72 h) on HUVEC-C cell cycle by analysis of DNA content by FACS. Cell population decreased in S phase and increased in G2/M, as indicated on the graph. (C) Evaluation of changes of  $\Delta\Psi_m$  in the absence or presence of meriolins 5, 7, and 15 (0.1  $\mu$ M each, 24 h) or staurosporine (0.1  $\mu$ g/mL, 1 h) through FACS analysis of TMRM labeling represented as color-enhanced density plots. Values indicate percentage cells with intact  $\Delta\Psi_m$  after treatment with meriolins 5, 7, and 15 in a representative experiment.

(meriolins 1–14) was synthesized, and previous data indicated that some of them induced cell death in 5 tumorigenic or transformed cell lines: neuroblastoma SH-SY5Y, HEK293, glioma GBM cells in primary culture, multiple myeloma KMS-11, and colorectal adenocarcinoma LS1746T cell lines.<sup>24</sup> We tested the ability of variolin B and different meriolins to affect SW1088 anaplastic astrocytoma and U87 glioblastoma cell growth. Among the many compounds tested, some were clearly inactive, including meriolin 7, and others were more efficient than variolin B ( $IC_{50}$  values from 1 nM to 1  $\mu$ M); meriolins 3, 5, and 15 exhibited the higher potency with nanomolar  $IC_{50}$  values. The co-crystallization of variolin B or meriolin 5, interacting with CDK2/cyclin A, showed a different orientation of these 2 inhibitors in the ATP-binding pocket of CDK2.<sup>24</sup> This observation may at least in part explain the increased efficiency of the meriolin family on CDK2 inhibition and consequently on glioma cell growth. In addition, increased meriolin efficiency would also result from the target preference for kinases. Indeed

variolin B has been reported to inhibit CDK1, CDK2, CDK9, FLT3,<sup>23</sup> and to a lesser extent, CDK7,<sup>29</sup> whereas some meriolins have exhibited preference for CDK1, CDK2, CDK4, and CDK9.<sup>24</sup> Thus, targeting CDK4 may provide a key advantage for meriolins in the treatment of malignant glioma.

In our study, we demonstrated that meriolins 5 and 15 showed the most potent antiproliferative effect on both astrocytoma and GBM cells in vitro. We also investigated whether the susceptibility to meriolins was specific for the neoplastic phenotype of glioma cells or if it could be observed in untransformed isolated rat astrocytes and neurons as well as astrocytes and neurons in co-culture. Treatment at different doses of meriolins 5 and 15 resulted in astrocytic and immature neuron detachment and death. When these neural cells were co-cultured, likely leading to a reduced proliferation rate of astrocytes and pro-differentiation of neurons,<sup>34,35</sup> the toxic effects of meriolins appeared to be a lesser degree than in glioma cells. The lack of



**Fig. 6.** Inhibitory role of meriolin 15 on U87 and human GBM sc1 xenograft development in nude mice. (A and B) U87 cells ( $3 \times 10^6$  cells, 100  $\mu$ L PBS) were implanted subcutaneously into the right flanks of nude mice. (A) When tumors reached a volume of  $\sim 100$ – $150$  mm<sup>3</sup>, mice were treated i.p. every 2 days with meriolin 15 (2 mg/kg/2d,  $n = 4$ ) or (5 mg/kg/2d,  $n = 5$ ) or every day (5 mg/kg/d,  $n = 4$ ) or with vehicle (DMSO in NaCl 0.9%,  $n = 4$ ) during 22 days. Statistical significance was determined by the Friedman test followed by the Dunn' multiple comparison test. \* $P < .05$ , meriolin 15 (2 mg/kg/2d) group versus vehicle group. #,  $P < .05$ , meriolin 15 (5 mg/kg/d) group versus vehicle group. (B) Mice were treated intraperitoneally twice a day every day with meriolin 15 ( $2 \times 2.5$  mg/kg/2d,  $n = 9$ ), ( $2 \times 5$  mg/kg/2d), ( $2 \times 10$  mg/kg), or vehicle (PEG-DMSO,  $n = 8$ ) during 24 days. Statistical significance was

specificity for the neoplastic phenotype of glioma cells may be attributed, on one hand, to the proliferating behavior of normal astrocytes (or immature neurons in culture) and, on the other hand, to pro-death/apoptotic function, likely predicting neurotoxicity.

In glioma, meriolin 15 diminished the number of cells in the S phase and increased the cell proportion in the G2/M phase, triggering cell cycle arrest. It was noted that no sub-G1s were clearly visible in cell cycle experiments, which suggested no DNA fragmentation (a hallmark of apoptotic cells), whereas meriolin15 induced caspase-3 activation and PARP cleavage. It has been previously suggested that apoptotic cells in which DNA degradation is terminated at 50–300 kb fragments and does not proceed to internucleosomal-size fragments, may not be identified as sub-G1 cells.<sup>36</sup> However, we also found that meriolins 3, 5, and 15 initiated cell death hallmarks, such as cell cycle arrest and decrease in the mitochondrial membrane potential  $\Delta\Psi_m$  revealed by the fluorescent shift of TMRM.<sup>37</sup> Indeed, although apoptosis is the best characterized form of programmed cell death, nonapoptotic forms of cell death, referred as programmed cell death II (autophagy) or III (oncosis) independent of caspase activation and chromatin condensation, are now recognized as playing significant roles in cancer regression.<sup>38,39</sup> It has been shown that apoptosis and oncosis, a prelethal process that occurs in ATP-depleted cells,<sup>40</sup> have some features in common, such as the mitochondrial permeability transition and loss of  $\Delta\Psi_m$ . In addition, we observed that meriolin-treated cells underwent morphological changes (ie, retraction and rounding) that have been previously associated with cell injury and widespread cytoskeletal framework disruption<sup>41</sup> resembling oncosis-associated morphological change.<sup>40</sup> Furthermore, cells showed a visible reduction of ability to adhere and spread, suggesting a loss in cell matrix adhesion.<sup>42</sup> Then, nonapoptotic oncosis cell death associated with cell and organelle swelling and swollen nuclei may also occur after meriolin 15 treatment, simultaneously developing with apoptosis in glioma. The cellular swelling accompanying oncosis, which is characterized by release of inflammatory signals<sup>43,44</sup> and stimulation of cell-mediated immunity,<sup>45</sup> may explain at least in part the necrotic features of the GBM sc1 tumors after intratumoral injections of meriolin 15. Together, we propose that meriolin 15, via potent inhibition of cyclin-dependent kinases by occupying the ATP binding site of enzymes' catalytic subunits, activates the intrinsic apoptotic pathway and nonapoptotic cascades that lead to necrosis.

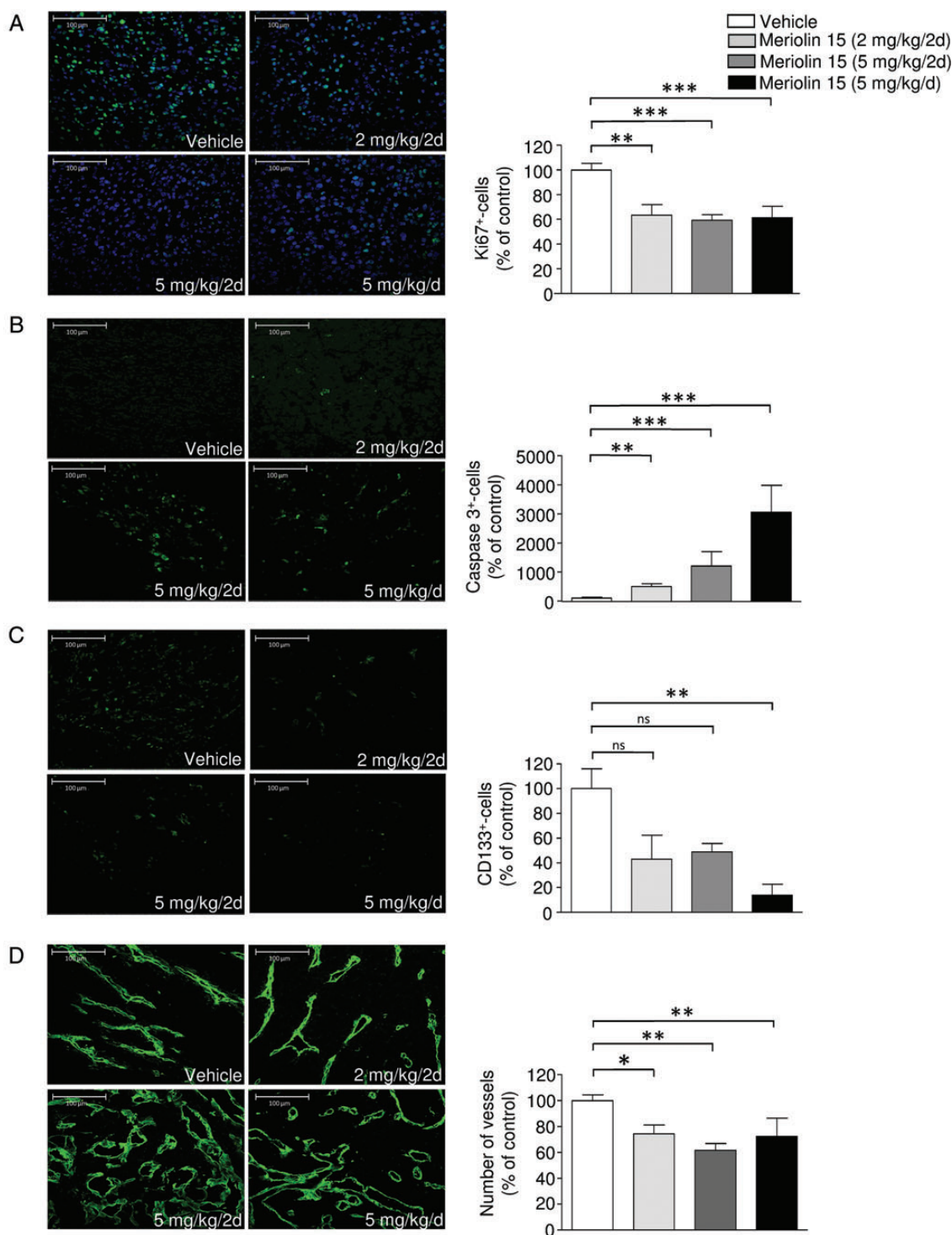
Thus, it is proposed that meriolins and, more particularly, meriolin 15 inhibit CDK7/CDK9 and consequently decrease RNA

polymerase II and its phosphorylation and lead to downregulation of the survival factor Mcl-1 (Fig. 4), thereby allowing the activation of proapoptotic factors (Noxa, Bim, etc.). These mechanisms likely explain the mitochondrial membrane potential changes and caspase 3-dependent activation of apoptosis that are observable in vitro and in vivo. A similar CDK7/CDK9 – RNA polymerase II – Mcl-1 – apoptosis sequence has been described in detail for the action of roscovitine and S-CR8.<sup>46,47</sup> Moreover, the disruption of cell cycle progression, both at the G1/S and G2/M transition, would result from inhibition of CDK1 and CDK2 and allow E2F1-dependent apoptosis.<sup>48</sup> Recent genetic evidence that mice survive in the absence of all interphase CDKs suggests that CDK1 is the critical kinase and that it is able to substitute missing activity of any other CDKs. In addition, Shapiro demonstrated the significance of only CDK1, CDK2, and CDK9 for cell cycle and viability.<sup>18</sup> The ability of meriolins to block cell cycle and induce apoptosis in glioma regardless of their p53 status and CDK mutations<sup>49</sup> is thus probably due to the combined CDK1, CDK2, and CDK9 inhibition mechanisms. From this observation, it appears that highly specific inactivation of any CDK would not be as efficient as broader inhibition of multiple CDKs as long as it includes CDK1. From this point of view, meriolins constitute a promising new CDK-inhibitor family with significant antitumoral activity on the most malignant glioma.

Besides the direct effects of oncogenic changes on cell proliferation and survival, the genomic alterations that occur during cancer progression are known to promote invasion and neoangiogenesis. An important factor underlying this phenotype is enhanced VEGF expression, which is commonly observed in malignant glioma.<sup>50</sup> Several existing CDK inhibitors have been shown to influence angiogenesis. For example, the potent selective CDK inhibitor SNS-032 prevents migration of HUVECs and reduces formation of a capillary network from these cells in culture.<sup>51</sup> Here, meriolins 3, 5, and 15 significantly decreased the endothelial cell HUV-EC-C proliferation rate, slowed the progression through G2/M and G1/S, and drastically initiated apoptosis/mitochondrial dysfunction. Connections between angiogenesis, mRNA transcription, and CDK9 have been previously suggested. Indeed, some CDK inhibitors (including flavopiridol, SNS-032, and roscovitine), which are currently under clinical evaluation as anticancer drugs, have also been shown to inhibit angiogenesis in vitro,<sup>51–54</sup> whereas they all share significant activity on CDK9. Thus, the effects of meriolins on endothelial cells are probably mediated by inhibition of CDK1/2 (cell cycle arrest) and CDK9 (apoptosis), leading to antimitogenic and cytotoxic activities. Considering the

determined by a Mann-Whitney test.  $^{**}P < .01$ , meriolin 15 ( $2 \times 2.5$  mg/kg/d) group versus vehicle group,  $^{***}P < .001$ , meriolin 15 ( $2 \times 2.5$  mg/kg) group versus vehicle group. (C–F) Inhibitory role of meriolin 15 on human GBM sc1 xenograft development in nude mice. GBM Sc1 fragments were implanted subcutaneously into the right flanks of nude mice. (C) Once tumors reached  $\sim 250$  mm<sup>3</sup> in volume, mice received no injection or intratumoral injection of meriolin 15 (2.5 mg/kg,  $n = 7$ ) or vehicle (PEG-DMSO,  $n = 6$ ) during 5 days as indicated by black arrows. Statistical significance was determined by the Mann-Whitney test.  $^{**}P < .01$ , meriolin 15 (2.5 mg/kg) groups versus vehicle (PEG-DMSO) group. Statistical significance was determined by the Friedman test, followed by the Dunn' multiple comparison test.  $P = .3$ , meriolin 15 (1.8 mg/kg) groups versus vehicle group. (D) Kaplan-Meier survival rates of nude mice with flank xenografted GBM Sc1 for each of the treatments described in C. Statistical significance was determined by the log-rank test.  $P = .02$ , meriolin 15 (2.5 mg/kg/d) group versus vehicle group. (E) Mice received no injection or intratumoral injection of meriolin 15 in vehicle (1.8 mg/kg,  $n = 6$ ), (1.25 mg/kg,  $n = 5$ ) or vehicle (PEG-DMSO,  $n = 6$ ) during 5 days or 10 days, respectively, as indicated by black arrows. Statistical significance was determined by the Friedman test followed by the Dunn' multiple comparison test.  $^{*}P < .05$ , meriolin 15 (1.8 mg/kg) groups versus vehicle group. (F) Kaplan-Meier survival rates of nude mice with GBM Sc1 flank xenografts for each of the treatments described in E. Statistical significance was determined by the log-rank test.  $P = .051$ , meriolin 15 (1.8 mg/kg/d) and  $P = .015$ , meriolin 15 (1.8 mg/kg/d) groups versus vehicle group.





**Fig. 7.** In situ analysis of the proliferation rate, differentiation, apoptosis, and vascular content of U87-bearing tumoral sections from intraperitoneally treated mice. Immunostaining and quantitative analysis of the effect of meriolin 15 (2 mg/kg/2d, 5 mg/kg/2d, 5 mg/kg/d) on (A) cell proliferation using Ki67, (B) apoptosis using caspase 3, (C) stem cell numbers using CD133, and (D) vascularization using collagen IV antibodies in U87 xenografts. Immunostaining was performed on tumors at the end stage of experiment. Statistical significance was determined by the Kruskal-Wallis test followed by the Dunn post hoc test. \* $P < .05$ ; \*\* $P < .01$ ; \*\*\* $P < .001$  meriolin 15 groups versus vehicle group.

double impact of this new series of CDK inhibitors on both glial tumor and vascular compartments, it may represent a key targeted treatment for high-grade malignant glioma.

In vivo, meriolin 15 was investigated in a subcutaneous implanted xenograft model of U87 glioblastoma cells in which various oncogenes have been shown to be activated or

overexpressed,<sup>49</sup> a process classically used to test the antitumor activity of a number of cell cycle disruptors and antiangiogenic-targeted therapies. In a previous study, meriolin 3 had been shown to exhibit antitumoral activity on A4573 Ewing's sarcoma and LS174T colorectal carcinoma xenografted in nude mice.<sup>23</sup> A significant antitumor effect of meriolin 15 was detected during the first week of treatment and appeared to be enhanced by increasing the dose and the frequency of administration. However, systemic toxicity was observed at doses greater than 5 mg/kg/day. We tested a secondary model in which GBM was xenografted into nude mice, and a daily infusion schedule of meriolin 15 diluted in DMSO delayed tumor volume development and/or even led to tumor disappearance. The proper effect of DMSO on glioma growth in vivo is not surprising since this adjuvant has been found to suppress proliferation of mouse breast cancer cells,<sup>55</sup> arrest the cell cycle of lymphoid cell lines,<sup>56,57</sup> and provoke leukemia cellular differentiation leading to the disappearance of proliferation properties.<sup>58,59</sup> However, the sustained inhibition of human GBM sc1 growth after the end of the treatment period clearly indicates the direct long-term impact of meriolin 15 on glioma cell death.

Immunohistochemical analysis of treated tumors indicates that in vivo i.p. administration of meriolin 15 triggers a dose-dependent inhibition of glioma cell proliferation (decreased number of Ki67-positive cells), activation of the proapoptotic cascade (increased number of caspase 3-positive cells), and reduces detection of undifferentiated/glioma stem cells (less expression of the specific CD133 marker). Because CD133-expressing tumoral stem cells appear to be resistant to radiation therapy and chemotherapy and are therefore likely contribute to tumor recurrence and relapse,<sup>60</sup> meriolins may constitute a beneficial therapy via their antiproliferative and proapoptotic actions and through tumoral stem cell differentiation and/or death.

There is increasing evidence to support the concept of a microvascular niche in brain tumors where tumoral stem cells likely reside in close proximity to endothelial cells.<sup>61</sup> Interestingly, a recent work reported a decrease in stem cell numbers when tumors were treated with antiangiogenic agents, suggesting a direct impact of the specialized vascular compartment on tumoral stem cell survival.<sup>62</sup> Accordingly, the meriolin 15-induced disappearance of CD133-positive cells in xenografted U87 tumors suggests an in vivo antiangiogenic effect of these CDK inhibitors. In the meriolin 15-treated glioblastoma, we observed abundant type IV collagen immunoreactive basement membrane sleeves that resembled blood vessels with interconnection to survival vascular structures. Part of the difficulty in interpretation comes from incomplete knowledge of how antiangiogenic factors affect blood vessels. Strictly speaking, neo-angiogenic inhibitors block the growth of new blood vessels from existing vessels, but they also initiate regression and normalization of others.<sup>63</sup> As already described in tumors treated with VEGF inhibitors,<sup>64</sup> sleeves of type IV collagen have been shown to be particularly dense, whereas endothelial cells have degenerated. Here, we observed that meriolin 15 decreased the total number of collagen-positive structures and enlarged the caliber of basement membrane. These structures did not colocalize with CD31-positive vascular compartments (data not shown). This suggests that meriolin 15 initiates regression of tumoral glioma vascular endothelium, a process previously observed

during tumor vascular normalization following antiangiogenic therapies.<sup>65-67</sup>

Altogether, the marked in vitro and in vivo antitumoral activities of the new class of CDK inhibitors represented by meriolins, and meriolin 15 in particular, target malignant glioma cells and endothelial cells with cell cycle arrest and apoptosis induction and therefore might represent an interesting lead compound. However, the described characteristics of meriolin 15 in the present study suggest pan-CDK inhibitory properties of the molecule that regulates multiple pathways for inducing cell death in glioma. This may be advantageous in apoptotic-resistant glioblastoma, but the downside resides in the antiproliferative impact upon neonatal astrocytes and toxicities. In this context, the only possible clinical use for meriolin 15 in human glioma would be local administration after surgery. In particular, meriolin 15 should be administered through convection-enhanced delivery<sup>68</sup> to limit toxicities to surrounding normal tissues. However, the competing toxicities did not make meriolin 15 the compound of choice among the meriolin library for clinical usage. Consequently, we are currently refining our meriolin-lead compounds and evaluating their quantitative structure-activity relationships to identify the best drug candidate. The issues involved in developing the optimal meriolin derivative are evaluation of the blood-brain barrier's permeability, the acquired less-toxic effects toward normal tissues, and the possible efficient combination with other chemotherapeutic agents as temozolomide and/or radiotherapy.

## Authors' contributions

M.J., C.L., C.M., M.-T.S., and N.L. performed all the experiments (cell growth assays, cell cycle analysis, apoptosis, heterotopic xenografts, immunohistochemistry, and in vitro Sc1 experiments). L.D. and V.L. contributed to the heterotopic xenograft experiments and analysis. F.L., G.L. and B.J. synthesized meriolins. L.M. provided the background on meriolins, co-supervised the project (in particular the Mcl-1 and Myc sections), and contributed to the writing of the paper. J.H., P.G., and H.C. supervised the study and contributed to the writing of the paper.

## Funding

This work was supported by Inserm, ManRos Therapeutics, the National Institute on Cancer (INCA, GLIOMER project) (H.C., B.J., J.H., L.M.), Institute on Innovative and Biomedical Research (IRIB). This research was partly supported by an FP7-KBBE-2012 grant (BlueGenics) to L.M. The University of Rouen, M.J. and C.L. were recipients of a fellowship from the ministry.

## Acknowledgments

We gratefully acknowledge Mr Sébastien Arthaud, Mr Arnaud Arabo, Mr David Thomas, Mrs Huguette Lemonnier and Mrs Marie-Eve Mayer for skillful technical assistance.

*Conflict of interest statement:* None declared.

## References

- Wen PY, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. *N Engl J Med*. 2008; 359(5):492–507.
- Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system. Tumors diagnosed in the United States in 2006–2010. *Neuro Oncol*. 2013;15(2):ii1–ii56.
- Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol*. 2007; 114(2):97–109.
- Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, et al. Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res*. 2003;63(20):6962–6970.
- Wen PY, Brandes AA. Treatment of recurrent high-grade gliomas. *Curr Opin Neurol*. 2009;22(6):657–664.
- Deshpande A, Sicinski P, Hinds PW. Cyclins and cdks in development and cancer: a perspective. *Oncogene*. 2005;24(17):2909–2915.
- Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9(3):153–166.
- Jen J, Harper JW, Bigner SH, et al. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res*. 1994;54(24):6353–6358.
- He J, Allen JR, Collins VP, et al. CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res*. 1994;54(22):5804–5807.
- Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, et al. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A, MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene*. 1996;13(5):1065–1072.
- Ueki K, Ono Y, Henson JW, et al. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res*. 1996;56(1):150–153.
- Solomon DA, Kim J-S, Jean W, et al. Conspirators in a capital crime: co-deletion of p18INK4c and p16INK4a/p14ARF/p15INK4b in glioblastoma multiforme. *Cancer Res*. 2008;68(21):8657–8660.
- Wiedemeyer R, Brennan C, Heffernan TP, et al. Feedback circuit among INK4 tumor suppressors constrains human glioblastoma development. *Cancer Cell*. 2008;13(4):355–364.
- Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature*. 2008;455(7216): 1061–1068.
- Parsons DW, Jones S, Zhang X, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*. 2008;321(5897): 1807–1812.
- Galons H, Oumata N, Meijer L. Cyclin-dependent kinase inhibitors: a survey of recent patent literature. *Expert Opin Ther Pat*. 2010;20(3): 377–404.
- Galons H. Introduction for the special issue on kinase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2013;61:1.
- Shapiro GI. Cyclin-dependent kinase pathways as targets for cancer treatment. *J Clin Oncol*. 2006;24(11):1770–1783.
- Noble MEM, Endicott JA, Johnson LN. Protein kinase inhibitors: insights into drug design from structure. *Science*. 2004;303(5665): 1800–1805.
- Luke JJ, D'Adamo DR, Dickson MA, et al. The cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol potentiates doxorubicin efficacy in advanced sarcomas: preclinical investigations and results of a phase I dose-escalation clinical trial. *Clin Cancer Res*. 2012;18(9): 2638–2647.
- Dickson MA, Shah MA, Rathkopf D, et al. A phase I clinical trial of FOLFIRI in combination with the pan-cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor flavopiridol. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2010; 66(6):1113–1121.
- Lapenna S, Giordano A. Cell cycle kinases as therapeutic targets for cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2009;8(7):547–566.
- Bettayeb K, Tirado OM, Marionneau-Lambot S, et al. Meriolins, a new class of cell death inducing kinase inhibitors with enhanced selectivity for cyclin-dependent kinases. *Cancer Res*. 2007;67(17): 8325–8334.
- Echalier A, Bettayeb K, Ferandin Y, et al. Meriolins (3-(pyrimidin-4-yl)-7-azaindoles): synthesis, kinase inhibitory activity, cellular effects, and structure of a CDK2/cyclin A/meriolin complex. *J Med Chem*. 2008;51(4):737–751.
- Franco LH, Joffé EB, Puricelli L, et al. Indole alkaloids from the tunicate Aplidium meridianum. *J Nat Prod*. 1998;61(9):1130–1132.
- Perry NB, Ettouati L, Litaudon M, et al. Alkaloids from the Antarctic sponge Kirkpatrickia variolosa. I: Variolin B, a new antitumour and antiviral compound. *Tetrahedron*. 1994;50(13):3987–3992.
- Trimurtulu G, Faulkner DJ, Perry NB, et al. Alkaloids from the antarctic sponge Kirkpatrickia variolosa. Part 2: Variolin A and N(3')-methyl tetrahydrovariolin B. *Tetrahedron*. 1994;50(13):3993–4000.
- Gompel M, Leost M, De Kier Joffe EB, et al. Meridianins, a new family of protein kinase inhibitors isolated from the ascidian Aplidium meridianum. *Bioorg Med Chem Lett*. 2004;14(7):1703–1707.
- Simone M, Erba E, Damia G, et al. Variolin B and its derivate deoxy-variolin B: new marine natural compounds with cyclin-dependent kinase inhibitor activity. *Eur J Cancer*. 2005;41(15): 2366–2377.
- Castel H, Diallo M, Chatenet D, et al. Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J Neurochem*. 2006;99(2):582–595.
- Lefebvre T, Gonzalez BJ, Vaudry D, et al. Paradoxical effect of ethanol on potassium channel currents and cell survival in cerebellar granule neurons. *J Neurochem*. 2009;110(3):976–989.
- Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med*. 2000;6(5):513–519.
- Taillandier L, Antunes L, Angioi-Duprez KS. Models for neuro-oncological preclinical studies: solid orthotopic and heterotopic grafts of human gliomas into nude mice. *J Neurosci Methods*. 2003;125(1–2):147–157.
- Gasser UE, Hatten ME. Neuron-glia interactions of rat hippocampal cells in vitro: glial-guided neuronal migration and neuronal regulation of glial differentiation. *J Neurosci*. 1990;10(4):1276–1285.
- Wang LC, Baird DH, Hatten ME, et al. Astroglial differentiation is required for support of neurite outgrowth. *J Neurosci*. 1994; 14(5 Pt 2):3195–3207.
- Darzynkiewicz Z, Juan G, Li X, et al. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry*. 1997;27(1):1–20.
- Ehrenberg B, Montana V, Wei MD, et al. Membrane potential can be determined in individual cells from the nernstian distribution of cationic dyes. *Biophys J*. 1988;53(5):785–794.
- Galluzzi L, Vitale I, Vacchelli E, Kroemer G. Cell death signaling and anticancer therapy. *Front Oncol*. 2011;1:5.
- Folmer F, Jaspars M, Dicato M, et al. Marine cytotoxins: callers for the various dances of death. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*. 2009;2: 34–50.
- Weerasinghe P, Buja LM. Oncosis: an important non-apoptotic mode of cell death. *Exp Mol Pathol*. 2012;93(3):302–308.

41. Janmey PA. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling. *Physiol Rev.* 1998;78(3): 763–781.
42. Lakshman M, Subramaniam V, Jothy S. CD44 negatively regulates apoptosis in murine colonic epithelium via the mitochondrial pathway. *Exp Mol Pathol.* 2004;76(3):196–204.
43. Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(12):2405–2419.
44. Jaeschke H, Lemasters JJ. Apoptosis versus oncotic necrosis in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Gastroenterology.* 2003;125(4): 1246–1257.
45. Hoa N, Myers MP, Douglass TG, et al. Molecular mechanisms of paraptosis induction: implications for a non-genetically modified tumor vaccine. *PLoS ONE.* 2009;4(2):e4631.
46. Bettayeb K, Oumata N, Echalié A, et al. CR8, a potent and selective, roscovitine-derived inhibitor of cyclin-dependent kinases. *Oncogene.* 2008;27(44):5797–5807.
47. Bettayeb K, Baunbæk D, Delehouze C, et al. CDK Inhibitors Roscovitine and CR8 Trigger Mcl-1 Down-Regulation and Apoptotic Cell Death in Neuroblastoma Cells. *Genes Cancer.* 2010;1(4): 369–380.
48. Cai D, Byth KF, Shapiro GI. AZ703, an imidazo[1,2-a]pyridine inhibitor of cyclin-dependent kinases 1 and 2, induces E2F-1-dependent apoptosis enhanced by depletion of cyclin-dependent kinase 9. *Cancer Res.* 2006;66(1):435–444.
49. Michaud K, Solomon DA, Oermann E, et al. Pharmacologic inhibition of cyclin-dependent kinases 4 and 6 arrests the growth of glioblastoma multiforme intracranial xenografts. *Cancer Res.* 2010; 70(8):3228–3238.
50. Pore N, Liu S, Haas-Kogan DA, et al. PTEN mutation and epidermal growth factor receptor activation regulate vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA expression in human glioblastoma cells by transactivating the proximal VEGF promoter. *Cancer Res.* 2003;63(1):236–241.
51. Ali MA, Choy H, Habib AA, et al. SNS-032 prevents tumor cell-induced angiogenesis by inhibiting vascular endothelial growth factor. *Neoplasia.* 2007;9(5):370–381.
52. Melillo G, Sausville EA, Cloud K, et al. Flavopiridol, a protein kinase inhibitor, down-regulates hypoxic induction of vascular endothelial growth factor expression in human monocytes. *Cancer Res.* 1999; 59(21):5433–5437.
53. Liebl J, Weitensteiner SB, Vereb G, et al. Cyclin-dependent kinase 5 regulates endothelial cell migration and angiogenesis. *J Biol Chem.* 2010;285(46):35932–35943.
54. Zahler S, Liebl J, Fürst R, et al. Anti-angiogenic potential of small molecular inhibitors of cyclin dependent kinases in vitro. *Angiogenesis.* 2010;13(3):239–249.
55. Oz ES, Aydemir E, Fişkin K. DMSO exhibits similar cytotoxicity effects to thalidomide in mouse breast cancer cells. *Oncol Lett.* 2012;3(4): 927–929.
56. Takase K, Sawai M, Yamamoto K, et al. Reversible G1 arrest induced by dimethyl sulfoxide in human lymphoid cell lines: kinetics of the arrest and expression of the cell cycle marker proliferating cell nuclear antigen in Raji cells. *Cell Growth Differ.* 1992;3(8):515–521.
57. Teraoka H, Mikoshiba M, Takase K, et al. Reversible G1 arrest induced by dimethyl sulfoxide in human lymphoid cell lines: dimethyl sulfoxide inhibits IL-6-induced differentiation of SKW6-CL4 into IgM-secreting plasma cells. *Exp Cell Res.* 1996;222(1):218–224.
58. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, et al. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol.* 2003;65(7):1035–1041.
59. Collins SJ, Ruscetti FW, Gallagher RE, et al. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1978;75(5): 2458–2462.
60. He J, Shan Z, Li L, et al. Expression of glioma stem cell marker CD133 and O6-methylguanine-DNA methyltransferase is associated with resistance to radiotherapy in gliomas. *Oncol Rep.* 2011;26(5): 1305–1313.
61. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, et al. A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell.* 2007;11(1):69–82.
62. Folkins C, Man S, Xu P, et al. Anticancer therapies combining antiangiogenic and tumor cell cytotoxic effects reduce the tumor stem-like cell fraction in glioma xenograft tumors. *Cancer Res.* 2007;67(8):3560–3564.
63. McDonald DM, Choyke PL. Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic. *Nat Med.* 2003;9(6):713–725.
64. Inai T, Mancuso M, Hashizume H, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in cancer causes loss of endothelial fenestrations, regression of tumor vessels, and appearance of basement membrane ghosts. *Am J Pathol.* 2004; 165(1):35–52.
65. Baluk P, Morikawa S, Haskell A, et al. Abnormalities of basement membrane on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. *Am J Pathol.* 2003;163(5):1801–1815.
66. Baluk P, Hashizume H, McDonald DM. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. *Curr Opin Genet Dev.* 2005;15(1): 102–111.
67. Verreault M, Strutt D, Masin D, et al. Vascular normalization in orthotopic glioblastoma following intravenous treatment with lipid-based nanoparticulate formulations of irinotecan (Irinophore C™), doxorubicin (Caelyx®) or vincristine. *BMC Cancer.* 2011;11:124.
68. Lopez KA, Waziri AE, Canoll PD, et al. Convection-enhanced delivery in the treatment of malignant glioma. *Neurol Res.* 2006;28(5): 542–548.

RESEARCH ARTICLE

# Evaluation of the Impact of the Cancer Therapy Everolimus on the Central Nervous System in Mice

Martine Dubois<sup>1,2,3</sup>, Vadim Le Joncour<sup>1,2</sup>, Marie-Christine Tonon<sup>1,2</sup>, Youssef Anouar<sup>1,2</sup>, François Proust<sup>1,2</sup>, Fabrice Morin<sup>1,2</sup>, Pierrick Gandolfo<sup>1,2,3</sup>, Florence Joly<sup>3,4,5,6</sup>, Pascal Hilber<sup>3,4</sup>, Hélène Castel<sup>1,2,3\*</sup>



 OPEN ACCESS

**Citation:** Dubois M, Le Joncour V, Tonon M-C, Anouar Y, Proust F, et al. (2014) Evaluation of the Impact of the Cancer Therapy Everolimus on the Central Nervous System in Mice. PLoS ONE 9(12): e113533. doi:10.1371/journal.pone.0113533

**Editor:** David L. McCormick, IIT Research Institute, United States of America

**Received:** April 17, 2014

**Accepted:** October 24, 2014

**Published:** December 1, 2014

**Copyright:**   2014 Dubois et al. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability:** The authors confirm that all data underlying the findings are fully available without restriction. All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This work was supported by university of Roue, Inserm and the Baclesse center receiving a grant by Novartis (Novartis) 071160-001141-05. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have read the journal's policy and have the following conflict: The Grant to the baclesse Center of Caen, France, by Novartis (Novartis- 071160-31 001141-05) was a general educational grant and was used to support a post-doc leading the research on everolimus. In addition, the authors received everolimus and the microemulsion through an MTA with Novartis. Pr Florence Joly is a member of a consulting scientific board of Novartis. There are no further patents, products in development or marketed products to declare. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

1. Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation (DC2N), Astrocyte and Vascular Niche, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France, 2. PRES Normandie Université, Institute of Research and Biomedical Innovation (IRIB), University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France, 3. North-West Canc ropole (CNO), Lille, France, 4. EA4700, Laboratory of Psychology and Neurosciences of Cognition and Affectivity (PSY-NCA), University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France, 5. Centre François Baclesse, Caen, France, 6. Centre Hospitalo-Universitaire, Caen, France

\*[helene.castel@univ-rouen.fr](mailto:helene.castel@univ-rouen.fr)

## Abstract

Cancer and treatments may induce cognitive impairments in cancer patients, and the causal link between chemotherapy and cognitive dysfunctions was recently validated in animal models. New cancer targeted therapies have become widely used, and their impact on brain functions and quality of life needs to be explored. We evaluated the impact of everolimus, an anticancer agent targeting the mTOR pathway, on cognitive functions, cerebral metabolism, and hippocampal cell proliferation/vascular density in mice. Adult mice received everolimus daily for 2 weeks, and behavioral tests were performed from 1 week after the last treatment. Everolimus-treated mice displayed a marked reduction in weight gain from the last day of the treatment period. *Ex vivo* analysis showed altered cytochrome oxidase activity in selective cerebral regions involved in energy balance, food intake, reward, learning and memory modulation, sleep/wake cycle regulation, and arousal. Like chemotherapy, everolimus did not alter emotional reactivity, learning and memory performances, but in contrast to chemotherapy, did not affect behavioral flexibility or reactivity to novelty. *In vivo* hippocampal neural cell proliferation and vascular density were also unchanged after everolimus treatments. In conclusion, two weeks daily everolimus treatment at the clinical dose did not evoke alteration of cognitive performances evaluated in hippocampal- and prefrontal cortex-dependent tasks that would persist at one to four weeks after the end of the treatment completion. However, acute everolimus treatment caused selective CO modifications without altering the mTOR effector P70S6 kinase in

cerebral regions involved in feeding behavior and/or the sleep/wake cycle, at least in part under control of the solitary nucleus and the parasubthalamic region of the hypothalamus. Thus, this area may represent a key target for everolimus-mediated peripheral modifications, which has been previously associated with symptoms such as weight loss and fatigue.

---

## Introduction

Although the emergence of potent anticancer agents has improved patient survival, there is increasing evidence that both cancer and its treatments can induce cognitive dysfunctions that affect daily quality of life. Patients receiving chemotherapy report attention and concentration alterations, visual and verbal memory deficits, and slowing of psychomotor processing (referred to as “chemofog” or “chemobrain”) which can persist for several years after treatment completion [1]. In recent years, targeted agents have been increasingly used in cancer treatment, and previous reports suggest that some of them may permeate the blood-brain barrier and act directly in the brain, affecting cerebral angiogenesis and functioning [2]. Consistent with this hypothesis, administration of bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer and sunitinib in patients with metastatic renal cancer resulted in several reported cases of posterior leukoencephalopathy [3,4]. Furthermore, an unexplained fatigue or asthenia, associated with targeted cancer treatments, that cannot be counteracted by rest or sleep may severely affect both cognitive function and quality of life [5].

The phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/AKT/mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade is a key molecular target for cancer treatment [6]. mTOR signaling components are expressed at high levels in several areas of the brain [7,8], and the mTOR pathway is known to be involved in various neurobiological processes, including neurite outgrowth [9], axon regeneration [10], myelination [11], and cellular metabolism [12]. In particular, mTOR has been shown to be a central regulator of cell growth and is controlled by a large number of signals including nutrients such as glucose and amino acids, and growth factors such as insulin and IGF-1. mTOR activation also stimulates protein synthesis and cellular hypertrophy in various cells and organs. In addition, mTOR activation is involved in hippocampal synaptic plasticity and learning and memory processes *via* protein synthesis [13]. For example, inhibition of mTOR activity by rapamycin has been shown to block inhibitory avoidance long-term memory [14] and to impair auditory [15], fear [16,17], and spatial memory consolidation [18]. Moreover, genetic defects in Ras/Erk/PI3K/mTOR signaling pathways may be causally linked to several human genetic disorders classified as neuro-cardio-facial-cutaneous and hamartoma syndromes, and thus may be responsible for cognitive impairments [19]. Thus, it may be proposed that long-

term administration of mTOR inhibitors occurring in cancer treatment could affect brain functions involved in cognition and/or metabolism.

Everolimus (Afinitor, Novartis, Basel, Switzerland), an orally administered rapamycin derivative, directly blocks the kinase activity of the raptor/mTOR complex (mTORC1) *via* binding to the FKBP-12 and thus forming an inhibitory complex with mTOR [20]. This type of mTOR inhibitor is well characterized for anti-neoplastic properties, *i.e.* inducing decrease of tumor cell growth, proliferation, and angiogenesis *in vitro* and *in vivo* [21–23]. However, general side effects including fatigue, edema, asthenia, pyrexia, mucosal inflammation, anorexia, decreased weight and pain have been reported [24–27]. More specifically, central nervous system (CNS) side effects including headache/migraine or dysgeusia, have been also described [26].

The goal of the study was to evaluate the potential cognitive functioning–impairment likely to be induced by targeted therapies such as everolimus by using a validated mouse behavioral model [28]. We particularly gained attention in the dose used in order to be as much as possible in the cancer patient treatment conditions. Indeed, based on pharmacokinetic/dynamic studies [29–31] the most adapted and indicated dose in the advanced hormone receptor-positive, HER2-negative breast cancer, advanced neuroendocrine tumors of pancreatic origin, advanced renal cell carcinoma, renal angiomyolipoma with tuberous sclerosis complex (TSC) is 10 mg/daily, but in case of toxicity, the suggested dose is 5 mg/daily. Also, a number of studies were conducted in animal models with this 5 mg/daily administration [22, 32, 33] and studies demonstrated that this everolimus dose is orally active in mice and that steady state achieved within two weeks with daily dosing [22]. This 5 mg/kg/d schedule appears to be the minimal concentration for the maximal efficient dose with no apparent toxicity.

The potential long-lasting effects of everolimus treatment on mice cognition and neurobiological processes were evaluated using hippocampal- and frontal cortex-dependent behavioral tasks and on hippocampal cell proliferation, or vascular niche density respectively. Its acute impact on neural cell activity was investigated *ex vivo via* assessment of regional brain cytochrome oxidase activity.

## Material and Methods

### Animals and ethic statements

Male C57BL/6J Rj mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) 7 weeks of age were housed under controlled standard environmental conditions:  $22 \pm 1$  °C; 5 animals per cage; 12 hours/12 hours light/dark cycle (light on: 00:00); water and food available *ad libitum*. During the 2-weeks adaptation period, animals were handled daily for weight monitoring. Treatment administration began when mice were 9 weeks of age. Mice were weighed daily from the day of the 1st treatment ingestion to the 36th day after the last administration. The weight of animals before the 1st injection (D0) was used as the basis value to calculate the weight gain throughout the experiment. All procedures were performed in accordance with the French

Ethical Committee as well as the guidelines of European Parliament directive 2010/63/EU and the Council for the Protection of Animals Used for Scientific Purposes. This project was approved by the “Comité d’Ethique NORMandie en Matière d’EXpérimentation Animale” CENOMEXA under the National Committee on Animal Experimentation, and received the following number N/12-11-12/35/11-17. Animal manipulations were carried out under the supervision of an authorized investigator (H. Castel; authorization no. 76.98 from the Ministère de l’Alimentation, de l’Agriculture et de la Pêche).

### Drug administration

A microemulsion of everolimus formulated at 2% (w/v), provided by Novartis (Rueil-Malmaison, France), was dissolved in 0.9% NaCl and administered daily by oral gavage (5 mL/kg) *via* a feeding needle (Fine Science Tools, Heidelberg, Germany) at 5 mg/kg for 14 consecutive days [34].

### Cytochrome oxidase activity and brain metabolism

Mice that received vehicle ( $n=8$ ) or everolimus ( $n=9$ ) during 2 weeks were immediately euthanized after the last day of treatment to study cytochrome oxidase activity in various cerebral regions. Mice were anesthetized using isofluorane, decapitated, and their brains rapidly removed 24 hours after the last day of treatment, frozen in 2-methylbutane (Sigma-Aldrich, San-Quentin Fallavier, France) at  $-30^{\circ}\text{C}$  and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Cryostat sections, each 30  $\mu\text{m}$  thick, were cut from Bregma +3.20 mm to  $-6.48$  mm and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until processing. For each animal, 8 batches of 41 consecutive slices were taken, such as on one slide 2 sections were separated by 240  $\mu\text{m}$ .

All brain slices of one batch per animal were processed simultaneously under the same conditions. The protocol was adapted from previous publications [35, 36]. Sections were incubated in the dark ( $37^{\circ}\text{C}$ , 50 minutes) in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 120 mg horse-heart cytochrome c, 24 g sucrose, 300 mg DAB-4-HCl, and 108 mg catalase (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) per 540 ml. Slices were washed (5 min) with cold buffer (10% sucrose in PBS), immersed for 30 minutes in a 10% formalin/buffer solution, and washed twice (5 minutes) in buffer before dehydration. Sections were then cover-slipped with Eukitt (VWR International, Strasbourg, France) and microscopically examined.

The product of the histochemical reaction (oxidized DAB) was visible with optical microscopy. In each area of interest, its staining intensity was measured by densitometric analysis by means of a computer-assisted image analysis workstation (SAMBA Technologies, Meylan, France) [37]. For each area studied, a minimum of 2 slices per animal were used, depending of the anteroposterior length of the region, with measurements performed bilaterally when possible. The background was subtracted for each slide. The different cerebral regions were identified by means of the Franklin and Paxinos [38] mouse brain atlas.



## Behavioral testing

In total, 14 mice received everolimus treatment and 12 mice received solvent only (vehicle group) during 2 weeks. Behavioral testing began 7 days after the last treatment administration and lasted 23 days (Fig. S3A). All experiments were conducted between 13:00 and 18:00, during the beginning of the animals' active phase.

Cognitive functions were evaluated using the Morris water maze, in which mice are required to escape from a water basin by finding a platform placed in the pool [39]. A cylindrical tank (diameter 93 cm, height 45 cm) was filled with water (maintained at  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ ) to a height of 40 cm, made opaque with white, inert, aqueous acrylic emulsion (Accusol OP 301, Viewpoint, France). The tank was placed in an illuminated room (50 lux at the central surface of the pool) with extra-maze cues on the walls. The water maze was divided into four virtual quadrants: north-west (NW), north-east, south-east, and south-west, and animal behaviors were video tracked. On day 1, animals were familiarized with the pool and their motivation and visuo-motor abilities evaluated. An escape platform (diameter 9.7 cm) was placed in the tank center, emerging 1 cm above the water surface and with a small black ball fixed on it in order to facilitate its viewing on the part of the animals. Mice were placed on the platform for 20 seconds. Immediately afterwards, 1 session comprising four 60-second trials (inter-trial interval: 30 minutes) was conducted. Animals were placed, facing the wall, at 1 of 4 start locations (north, south, east or west) and allowed to swim to the visible platform for a maximum of 60 seconds. Mice not finding the platform were placed manually upon it for 20 seconds. On days 2–5, spatial learning abilities were evaluated in a training phase of 4 daily trials, maximum 60 seconds each, in which the escape platform was placed in the NW quadrant, immersed 1 cm below the water surface. 2 hours after the final trial of the last day of the training period, a probe test was conducted by removing the platform and allowing animals to swim for 60 seconds, with time spent in the previously correct quadrant (NW) measured. Spatial memory abilities were evaluated in a retrieval phase on day 10, using a single session of 4 trials under the same conditions as the training phase. Learning plasticity was evaluated in a transfer phase over 4 successive days (4 trials/day, maximum 60 seconds each) by daily changing the hidden platform location. Distance crossed and escape latency were measured.

## Hippocampal cell proliferation, vascular density and phosphorylated P70S6 kinase immunolabeling

5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU)-labeled cells inside and outside the subgranular zone of the hippocampus (SGZ) were counted. To label adult-generated cells in the dentate gyrus of the hippocampus, 6 intraperitoneal injections (50 mg/kg) of BrdU (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) were administered during the last days of the treatment period in mice not undergoing behavioral evaluation (Fig. S3C). The day following the last gavage, and 3 hours post-BrdU injection, mice were anesthetized using isoflurane, decapitated, and their brains rapidly

removed, frozen in 2-methylbutane (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at  $-30^{\circ}\text{C}$  and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. Brains were cut with a cryostat into serial coronal sections (thickness  $20\ \mu\text{m}$ ) from the anterior part of the dorsal hippocampus (anteroposterior,  $1.20\ \text{mm}$  from the Bregma  $-1.44\ \text{mm}$ ). Every 12th section, each separated by  $240\ \mu\text{m}$ , was mounted on slides coated with gelatin-chrome alum and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until processing.

Six hippocampal sections from each of 4 animals per group were stained simultaneously for BrdU visualization. Brain slices were fixed (4% paraformaldehyde in PBS, washed  $3 \times 5$  minutes with PBS pH 7.4, and incubated (2N HCl;  $45^{\circ}\text{C}$ ; 45 minutes) to denature DNA. Sections were then washed (PBS,  $3 \times 5$  minutes), incubated for 1 hour in blocking solution containing 1:50 normal donkey serum, 1% bovine serum albumin, and 0.3% Triton X-100 (VWR International, Strasbourg, France) in PBS, and incubated overnight at  $4^{\circ}\text{C}$  with sheep anti-BrdU immunoglobulin G (IgG; Abcam, Paris, France) at 1:400 in blocking solution. Subsequently, sections were washed (PBS,  $4 \times 5$  minutes) and incubated (2 hours, room temperature) with Alexa 488-conjugated donkey anti-sheep IgG (Invitrogen, Boulogne-Billancourt, France) at 1:400 in PBS. Rinsed sections were cover slipped with mowiol. Sections were examined on a Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon Instrument, Champigny-sur-Marne, France) interfaced with the Mercator software (ExploraNova, La Rochelle, France). A modified unbiased stereological method was used to count BrdU-positive cells in the SGZ of the dentate gyrus and in the area outside the SGZ [40, 41]. The number of stained cells in 6 sections was counted bilaterally, and, as every 12th section was used, this number was multiplied by 12. All counts were done by an investigator blinded to the treatment group.

For investigation of hippocampal vascular niche density, brain sections were fixed, washed, and incubated as described above. The primary antibody was rabbit anti-IQGAP1(H-109) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Tebu-bio, Le-Perray-en-Yvelines, France) diluted 1:400 in blocking solution, and the secondary antibody was Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG at 1:400 in PBS. Sections were counterstained with nuclear marker DAPI ( $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ ). Immunofluorescence was observed under a confocal microscope and IQGAP1-labeled structures in the SGZ assessed in 3 sections separated by  $240\ \mu\text{m}$  (between Bregma  $-1.68\ \text{mm}$  and  $-2.16\ \text{mm}$ ).

To investigate the active forms (phosphorylated) of P70S6 kinase (p-P70S6K), brain sections of vehicle and everolimus-treated mice were fixed, washed, and the p-P70S6K expression was measured by means of the primary antibody anti-p-P70S6K (Abcam ab60948, Paris, France) diluted 1:200 in blocking solution, and the secondary antibody was Alexa 488-conjugated donkey anti-rabbit IgG at 1:400 in blocking solution. P-P70S6K-labeled structures were assessed in 2 or 3 sections separated by  $240\ \mu\text{m}$  (between Bregma  $-0.98\ \text{mm}$  and  $-1.70\ \text{mm}$  for arc, Re, Rh, submed, VM; between  $-1.22\ \text{mm}$  and  $-1.94\ \text{mm}$  for EP, Ect and PRh; between  $-2.06\ \text{mm}$  and  $-2.54\ \text{mm}$  for PSTh) with Nikon Eclipse E600 microscope (Nikon Instrument, Champigny-sur-Marne, France) interfaced with the imaging software NIS-Elements.

## Culture of neural stem cells and endothelial cells

For neural stem cell (NSC) culture, brain from C57BL/6J Rj newborn mice were washed in trypsin. The cell suspension was centrifuged at 100 G for 4 minutes, and cells were placed into fresh serum-free medium. This medium consisted of Neurobasal (100 mL, Gibco, Saint-Aubin, France) supplemented with 5 mM HEPES buffer (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 1 mL B27 and 1 mL N2 growth supplement (Gibco), 20  $\mu$ L epidermal growth factor (20 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), 10  $\mu$ L basic fibroblast growth factor (10 ng/mL; Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France), and 7.32  $\mu$ L heparin (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) and was added with 33 mM glucose. Cells were plated at a density of 100 viable cells per microliter in this medium and were cultured in 25 cm<sup>2</sup> flasks at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub>–95% air humidified incubator. On day 7, well-developed neurospheres were collected and digested in trypsin for 10 minutes at 37°C. Secondary neurospheres (P<sub>1</sub>) and later passages were generated by mechanical and enzymatic dissociation of primary neurospheres. Cells were then incubated in the absence or presence of vehicle or everolimus for 24 to 48 hours. Using a 4 $\times$  objective of a Nikon (Nikon Eclipse TS100, Kingston, England) inverted microscope, we measured the mean diameter of 20 randomly chosen neurospheres per well (>40  $\mu$ m in diameter) in the visual field in 4 different areas of 3 wells of 24-well culture plates.

For endothelial cell culture, we used polyoma virus middle-sized tumor antigen (mT)-transformed mouse brain capillary endothelial cell line (bEND.3, obtained from Dr D. Gorecki, Portsmouth University, England). Cells were cultured in high glucose (4.5 g/L)-containing Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 1.5 g/L sodium bicarbonate, 100 U/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin, and 10% fetal bovine serum (FBS) at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>. To determine cell survival and proliferation, cells were plated in triplicate in multiple sets of 12-well culture plates. Incubation  $\pm$  vehicle/everolimus for 24–48 hours was in FBS-free medium. Cell proliferation was quantified by electronically counting cell numbers (Z2, Beckman Coulter, Villepinte, France).

## Statistical analysis

Body weight gain and spatial learning performances were analyzed by 3-ways ANOVA with repeated measurements followed by least significant difference (LSD) post hoc analyses when they were necessary. For probe test of the Morris water maze, time spent in the quadrant where the platform was located was compared with that predicted by chance by means of  $\chi^2$  tests. Other behavioral data, immunohistochemical and cytochrome oxidase activity data were analyzed with Student *t* tests. These data were analyzed with Statistica© 5.1. Data of the hippocampal cell proliferation and data of the culture studies were analyzed with the nonparametric Mann-Whitney U-test and ANOVA of Kruskal-Wallis followed by Dunn's tests with GraphPad Prism 5. For all statistical tests, the threshold of significance was set at  $p \leq .05$ .

## Results

### Everolimus-induced weight gain alterations

We first evaluated the consequences of a chronic mTOR inhibition on body weight in mice. Administration of everolimus (5 mg/kg) daily to young mice by gavage during 2 weeks produced no apparent morbidity and/or mortality. Whereas the control (emulsion) group continued to gain weight over the course of the experiment, the everolimus-treated mice had reduced weight (treatment  $\times$  day interaction:  $F_{23,552}=8.29$ ,  $p<.001$ ) from the 17rd day after the introduction of the mTOR inhibitor, and continued to weigh less throughout the following experimental period (LSD post hoc  $p<.01$ ; [Fig. 1](#)).

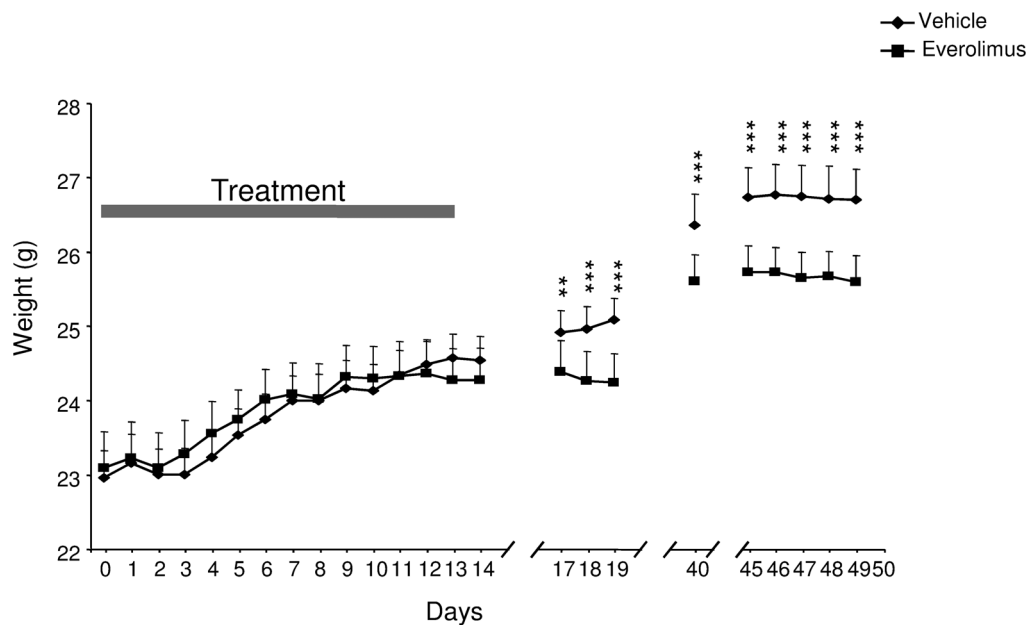
### Short-term impact of everolimus on cerebral cytochrome oxidase activity and P70S6 kinase phosphotylated form

In order to evaluate the impact of the mTOR inhibitor on cerebral cell metabolism, a histochemical analysis revealing cytochrome oxidase activity has been performed in brain slices of control and treated mice ([Table 1](#)). In everolimus-treated mice, 4 days after the end of the treatment period, a significant decrease ( $p<.05$ ) of cytochrome oxidase activity was present in the shell part of the accumbens nucleus ( $t_{13}=2.52$ ), the prelimbic cortex ( $t_{15}=2.20$ ), the lateral preoptic area ( $t_{14}=2.33$ ) and the motor trigeminal nucleus ( $t_{13}=2.38$ ). Moreover, everolimus treatment resulted in increased metabolic activity in the ectorhinal cortex ( $t_{14}=-2.61$ ), the entopeduncular nucleus ( $t_{13}=-2.27$ ), the parasubthalamic nucleus of the hypothalamus ( $t_{14}=-2.91$ ), the solitary nucleus ( $t_{13}=-2.49$ ), and in the thalamic reuniens ( $t_{14}=-2.48$ ), rhomboid ( $t_{14}=-2.31$ ), submedialis ( $t_{14}=-2.30$ ), and ventromedial ( $t_{14}=-2.56$ ) nuclei (all  $p<.05$ ) ([Fig. 2A](#) and [Table 1](#)). In order to investigate the potential direct or indirect inhibition of mTOR in these brain areas, the activity of a downstream effector of the mTOR pathway was assessed by immunostained levels of the phospho-P70S6 kinase (p-P70S6K) in various brain areas exhibiting or not CO metabolic changes. The treatment did not significantly modify P70S6K-positive labeling in the ectorhinal cortex, entopeduncular nucleus, reuniens, rhomboid, ventromedial and submedial thalamic nuclei and the parasubthalamic nucleus exhibiting modified CO activities, as well as in perirhinal cortex and arcuate hypothalamic nucleus showing no changes in CO activities ([Fig. 2B and C](#)).

### No emotional and cognitive alteration after everolimus treatment

#### Emotional behavior

Seven days after the end of the treatment period, the percentage of open-arm entries in the elevated plus maze (See Material and Methods S1) was not significantly different between the 2 treatment groups, suggesting that everolimus did not affect anxiety-like behavior ( $t_{24}=1.66$ ,  $p>.05$ ; [Fig. S1A](#)). In the forced swimming test, the immobility duration was not statistically different between



**Figure 1. Impact of everolimus treatment on the mean body weight of mice.** Body weight of vehicle- and everolimus-treated mice was evaluated at long term after the end of the treatment period (gray bar). Mice received vehicle or everolimus once a day during 14 continuous days. Bars represent standard error of the mean. ANOVA, Treatment x Day interaction  $p < .001$  followed by LSD post hoc: \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$ .

doi:10.1371/journal.pone.0113533.g001

groups, indicating that everolimus did not modify depressive-like behavior ( $t_{24} = 0.65$ ,  $p > .05$ ; Fig. S1B).

### Spatial learning and memory

During the familiarization phase of the Morris water maze test, swimming speed ( $t_{24} = -0.69$ ,  $p > .05$ ; not shown), distance crossed ( $t_{24} = 0.49$ ,  $p > .05$ ; not shown) and time taken to find the emerged platform ( $t_{24} = 0.93$ ,  $p > .05$ ; Fig. 3A) were not significantly modified by treatment, indicating that motivation and visuo-motor ability were unaffected by everolimus. During the acquisition phase, everolimus did not alter spatial learning performance 15 days after the end of the treatment period, as the escape latency ( $F_{1,24} = 0.94$ ,  $p > .05$ ; Fig. 3B) and distance crossed ( $F_{1,24} = 0.32$ ,  $p > .05$ ; Fig. 3C) were not significantly different between groups. Performances improved significantly as the test was repeated (escape latency  $F_{3,72} = 18.38$ ,  $p < .001$  and distance crossed  $F_{3,72} = 19.51$ ,  $p < .001$ ). During the probe test, all mice spent significantly more time in the previously correct quadrant than predicted by chance (vehicle:  $X^2_{11} = 117.67$ ,  $p > .001$ ; everolimus:  $X^2_{13} = 231.80$ ,  $p < .001$ ; Fig. 3D). During the retrieval phase, everolimus-treated mice did not display spatial memory performance impairment, as their escape latency ( $t_{24} = 0.49$ ,  $p > .05$ ; Fig. 3B) and distance crossed ( $t_{24} = 0.40$ ,  $p > .05$ ; Fig. 3C) did not differ significantly from those of vehicle mice.

During the transfer phase of the Morris water maze test, animals improved their performances across trials (escape latency:  $F_{3,72} = 9.76$ ,  $p < .001$ ; distance crossed  $F_{3,72} = 14.99$ ,  $p < .001$ ; Figs. 3E and 3F). Learning plasticity, assessed by

**Table 1.** Cytochrome oxidase activity in cerebral areas of vehicle and everolimus-treated mice.

Regions	Vehicle	Everolimus
<b>Telencephalon</b>		
<b>Amygdala</b>		
Basolateral	112.54 (1.70)	115.97 (1.16)
Basomedial	101.60 (1.62)	104.77 (1.30)
Central	116.16 (1.35)	115.34 (0.85)
Cortical	108.68 (2.89)	113.31 (1.64)
Lateral	100.04 (1.71)	100.21 (0.47)
Medial	102.65 (2.03)	105.05 (1.35)
<b>Basal ganglia</b>		
<b>Accumbens n.</b>		
-Core	110.96 (1.41)	108.66 (1.16)
-Shell	114.10 (1.87)	108.97 (0.99)*
Caudate Putamen	105.42 (2.74)	105.47 (1.20)
Globus pallidus	87.26 (1.43)	88.85 (0.84)
Ventral pallidum	98.19 (2.91)	99.58 (1.14)
Bed n. stria terminalis	103.36 (1.21)	105.72 (1.31)
Clastrum	94.91 (0.83)	95.15 (0.97)
<b>Cortex</b>		
Auditory	125.65 (2.56)	130.08 (2.59)
Cingulate	112.31 (2.71)	109.97 (0.86)
Dorsal peduncular	96.46 (1.64)	99.98 (1.30)
Ectorhinal	113.38 (1.57)	118.67 (1.31)*
Entorhinal	113.36 (1.84)	118.75 (2.60)
Frontal association	106.32 (1.64)	106.79 (1.09)
Infralimbic	97.94 (0.58)	97.30 (0.86)
Perirhinal	111.61 (1.65)	114.40 (0.71)
Piriform	98.87 (0.87)	101.85 (1.21)
Prelimbic	102.51 (1.10)	99.50 (0.85)*
Primary motor	106.51 (1.37)	104.62 (1.36)
Retrosplenial	123.56 (1.16)	121.18 (0.85)
Somatosensory	118.71 (1.74)	117.23 (1.23)
Visual	128.71 (1.97)	132.99 (2.60)
Dorsal endopiriform	102.57 (1.29)	104.30 (1.12)
<b>Diag. band</b>		
n. of the horiz. limb	100.17 (1.76)	97.68 (0.56)
n. of the vert. limb	100.91 (3.08)	105.71 (1.04)
<b>Hippocampal formation</b>		
CA1	115.25 (1.52)	116.18 (0.93)
CA3	111.05 (0.41)	113.30 (1.25)
Dentate gyrus	109.60 (0.98)	109.71 (1.20)
Subiculum	135.15 (1.55)	139.47 (2.62)
Olfactory tubercle	108.20 (5.66)	115.22 (3.69)
<b>Preoptic</b>		
Lateral a.	97.60 (1.09)	93.96 (1.08)*

Table 1. Cont.

Regions	Vehicle	Everolimus
<b>Magnocellular n.</b>	102.27 (2.60)	101.96 (1.38)
<b>Medial n.</b>	99.42 (1.15)	99.32 (1.40)
<b>Septal n.</b>		
<b>Lateral</b>	106.21 (3.54)	106.46 (1.39)
<b>Medial</b>	101.56 (3.81)	103.58 (1.98)
<b>Diencephalon</b>		
<b>Entopeduncular</b>	62.16 (1.28)	65.95 (1.10)*
<b>Epithalamus</b>		
<b>Lateral habenular n.</b>	124.94 (2.30)	128.72 (2.18)
<b>Medial habenular n.</b>	101.25 (1.99)	103.06 (2.98)
<b>Hypothalamus</b>		
<b>Anterior a., anterior part</b>	108.69 (3.81)	102.84 (0.92)
<b>Anterior a., central part</b>	105.71 (3.24)	106.72 (1.77)
<b>Anterior a., posterior part</b>	102.26 (1.57)	103.46 (2.38)
<b>Arcuate n.</b>	89.40 (3.43)	88.97 (3.69)
<b>Dorsomedial n.</b>	101.80 (1.09)	103.16 (1.65)
<b>Lateroanterior n.</b>	106.02 (2.81)	100.70 (2.35)
<b>Lateral a.</b>		90.73 (1.66)
<b>Parasubthalamic n.</b>	81.72 (1.74)	87.67 (1.21)*
<b>Paraventricular n.</b>	98.68 (1.40)	99.56 (1.51)
<b>Peduncular part</b>	91.79 (2.15)	91.22 (1.93)
<b>Perifornical n.</b>	93.73 (2.28)	92.70 (1.97)
<b>Posterior a., dorsal</b>	105.77 (3.79)	102.67 (4.55)
<b>Posterior n.</b>	104.86 (1.50)	106.51 (2.03)
<b>Suprachiasmatic n.</b>	91.51 (4.41)	96.79 (3.92)
<b>Ventromedial n.</b>	105.25 (2.66)	104.41 (1.81)
<b>Medial mammillary n.</b>	138.23 (2.66)	144.49 (3.90)
<b>Subthalamic n.</b>	132.66 (1.88)	131.93 (1.49)
<b>Thalamus</b>		
<b>Anterior n.</b>		
<b>-Anterodorsal</b>	144.31 (2.43)	145.93 (1.93)
<b>-Anteromedial</b>	114.68 (1.74)	114.96 (2.47)
<b>-Anteroventral</b>	127.96 (1.57)	132.74 (2.09)
<b>Dorsal lateral genic. n.</b>	106.06 (1.97)	107.05 (1.49)
<b>Intralaminar n.</b>		
<b>-Centrolateral</b>	112.21 (1.90)	116.31 (1.88)
<b>-Centromedial</b>	118.27 (3.81)	118.46 (3.02)
<b>-Paracentral</b>	108.03 (3.35)	107.26 (2.00)
<b>-Parafascicular</b>	104.10 (3.31)	109.70 (1.67)
<b>Laterodorsal n.</b>	129.54 (2.81)	132.30 (1.96)
<b>Midline n.</b>		
<b>-Paraventricular</b>	116.20 (2.26)	117.55 (2.74)
<b>-Paraventricular, ant.</b>	123.24 (4.31)	125.60 (1.49)
<b>-Reuniens</b>	109.64 (2.70)	119.00 (2.59)*

Table 1. Cont.

Regions	Vehicle	Everolimus
<b>-Rhomboid</b>	113.11 (1.62)	123.04 (3.56)*
<b>Mediodorsal</b>	129.12 (1.81)	130.42 (1.96)
<b>Posterior</b>	108.10 (1.94)	109.29 (1.53)
<b>Reticular</b>	93.41 (1.63)	98.07 (1.54)
<b>Submedius</b>	117.77 (1.56)	128.02 (3.72)*
<b>Ventral n.</b>		
<b>-Ventrolateral</b>	115.16 (1.43)	118.83 (1.79)
<b>-Ventromedial</b>	104.00 (1.24)	109.65 (1.68)*
<b>-Ventral posterolateral</b>	97.83 (1.93)	100.97 (1.09)
<b>-Ventral posteromedial</b>	110.85 (2.32)	112.80 (2.19)
<b>Zona incerta</b>	106.57 (2.40)	110.03 (0.86)
<b>Mesencephalon</b>		
<b>Inferior colliculus</b>	126.02 (2.01)	123.32 (2.87)
<b>Interpeduncular n.</b>	159.87 (2.23)	168.43 (5.59)
<b>Mesenc. ret. form.</b>	98.86 (1.26)	95.53 (1.46)
<b>Periaqueducal gray</b>	118.98 (1.21)	119.50 (1.37)
<b>Red n.</b>		
<b>Magnocellular part</b>	112.03 (2.06)	115.13 (3.07)
<b>Parvocellular part</b>	104.66 (2.62)	110.54 (2.97)
<b>Substantia nigra</b>	110.48 (2.24)	113.25 (2.71)
<b>Superior colliculus</b>	116.87 (2.13)	120.36 (2.83)
<b>Metencephalon</b>		
<b>Lateral lemniscus</b>		
<b>Intermediate n.</b>	137.60 (3.61)	134.12 (3.51)
<b>Ventral n.</b>	144.65 (1.27)	143.11 (3.09)
<b>Lateral superior olive</b>	120.39 (6.03)	122.06 (4.00)
<b>Locus coeruleus</b>	105.65 (1.23)	106.70 (1.69)
<b>Parabrachial n.</b>		
<b>Lateral</b>	99.34 (1.67)	96.21 (1.81)
<b>Medial</b>	103.23 (2.31)	100.26 (3.33)
<b>Pontine n.</b>	115.02 (2.93)	118.41 (1.82)
<b>Pontine ret. n.</b>		
<b>Caudal part</b>	86.33 (1.15)	84.45 (1.45)
<b>Oral part</b>	106.13 (1.28)	105.19 (0.89)
<b>Raphe n.</b>		
<b>Dorsal</b>	122.78 (2.19)	125.04 (2.13)
<b>Medial</b>	113.43 (0.96)	112.64 (2.03)
<b>Tegmental n.</b>		
<b>Dorsal</b>	137.89 (2.37)	138.54 (3.08)
<b>Laterodorsal</b>	116.94 (3.13)	113.76 (1.28)
<b>Pedunculotegmental</b>	90.56 (0.89)	91.18 (1.20)
<b>Reticulotegmental</b>	100.18 (1.99)	101.81 (2.73)
<b>Subpeduncular</b>	97.91 (1.22)	95.06 (1.18)
<b>Trapezoid body, n.</b>	91.97 (3.11)	93.58 (2.02)



Table 1. Cont.

Regions	Vehicle	Everolimus
<b>Trigeminal n.</b>		
Motor	112.20 (0.91)	107.67 (1.58)*
Principal sensory	117.21 (1.70)	117.04 (1.59)
<b>Myelencephalon</b>		
Solitary n.	100.39 (0.51)	104.83 (1.39)*
<b>Cochlear n.</b>		
Dorsal	147.11 (2.16)	147.40 (2.69)
Ventral	118.03 (5.03)	117.68 (2.85)
Gigantocellular ret. n.	87.09 (0.71)	88.32 (1.23)
<b>Cerebellum</b>		
Granule cell layer	128.45 (1.98)	126.64 (1.91)
Molecular cell layer	130.08 (1.90)	127.05 (1.62)
<b>Cerebellar n.</b>		
Interposed	119.34 (1.39)	117.96 (1.38)
Lateral (Dentate)	131.43 (1.36)	130.17 (1.52)
Medial (Fastigial)	90.65 (1.71)	91.17 (1.78)
<b>Vestibular n.</b>		
Lateral (Deiters)	89.73 (1.06)	90.16 (2.33)
<b>Medial vestibular n.</b>		
-Magnocellular part	112.01 (0.91)	111.83 (3.16)
-Parvocellular part	138.46 (1.52)	140.51 (1.98)

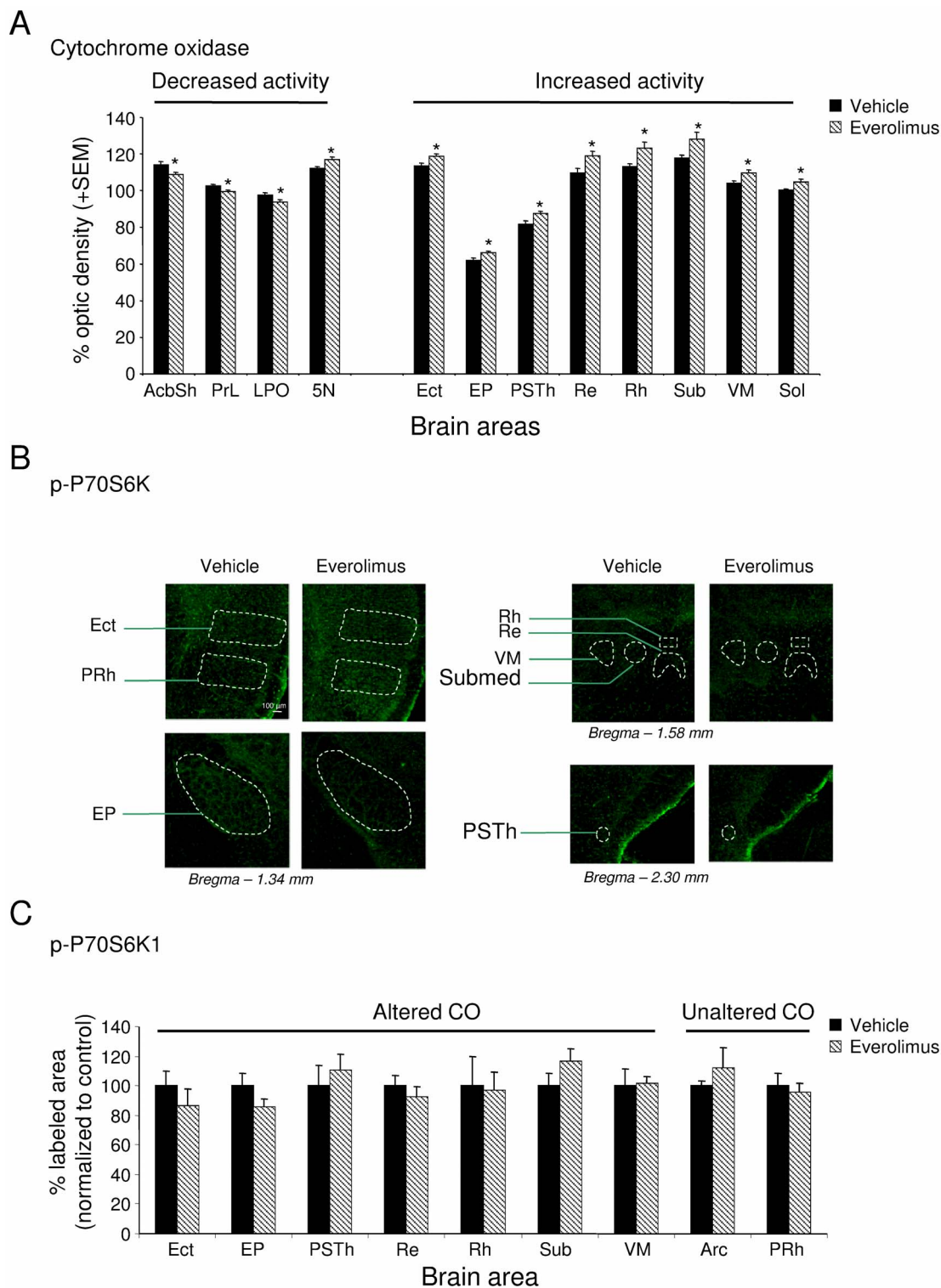
Percentage of optical densities of cytochrome oxidase activity staining after everolimus treatment in the telencephalon, the diencephalon, the mesencephalon, the metencephalon, the myelencephalon and the cerebellum. Data are means +SEM. (Student *t* test, \**p*<.05). (a, area; ant, anterior; Diag, diagonal; horiz, horizontal; genic, geniculate; mesenc, mesencephalic; n, nucleus; ret, reticular; vert, vertical).

doi:10.1371/journal.pone.0113533.t001

daily modification of the platform location, was unaffected by treatment; escape latency before finding the hidden platform was similar between groups ( $F_{1,24}=3.36, p>.05$ ; Fig. 3E). However, the distance crossed by everolimus-treated mice was significantly increased compared with vehicle mice ( $F_{1,24}=6.08, p<.05$ ; Fig. 3F). ANOVA assessment revealed a significant treatment  $\times$  trial interaction in terms of swimming speed ( $F_{3,72}=3.69, p<.05$ ). LSD post hoc analyses indicated that everolimus-treated mice swam faster than vehicle mice during the first and third trials ( $p<.01$ ; Fig. 3G). During day 1 of the transfer phase, everolimus did not alter the time spent in the quadrant that was correct during the training phase ( $t_{24}=-0.39, p>.05$ ; Fig. 3H), suggesting the absence of behavioral perseveration.

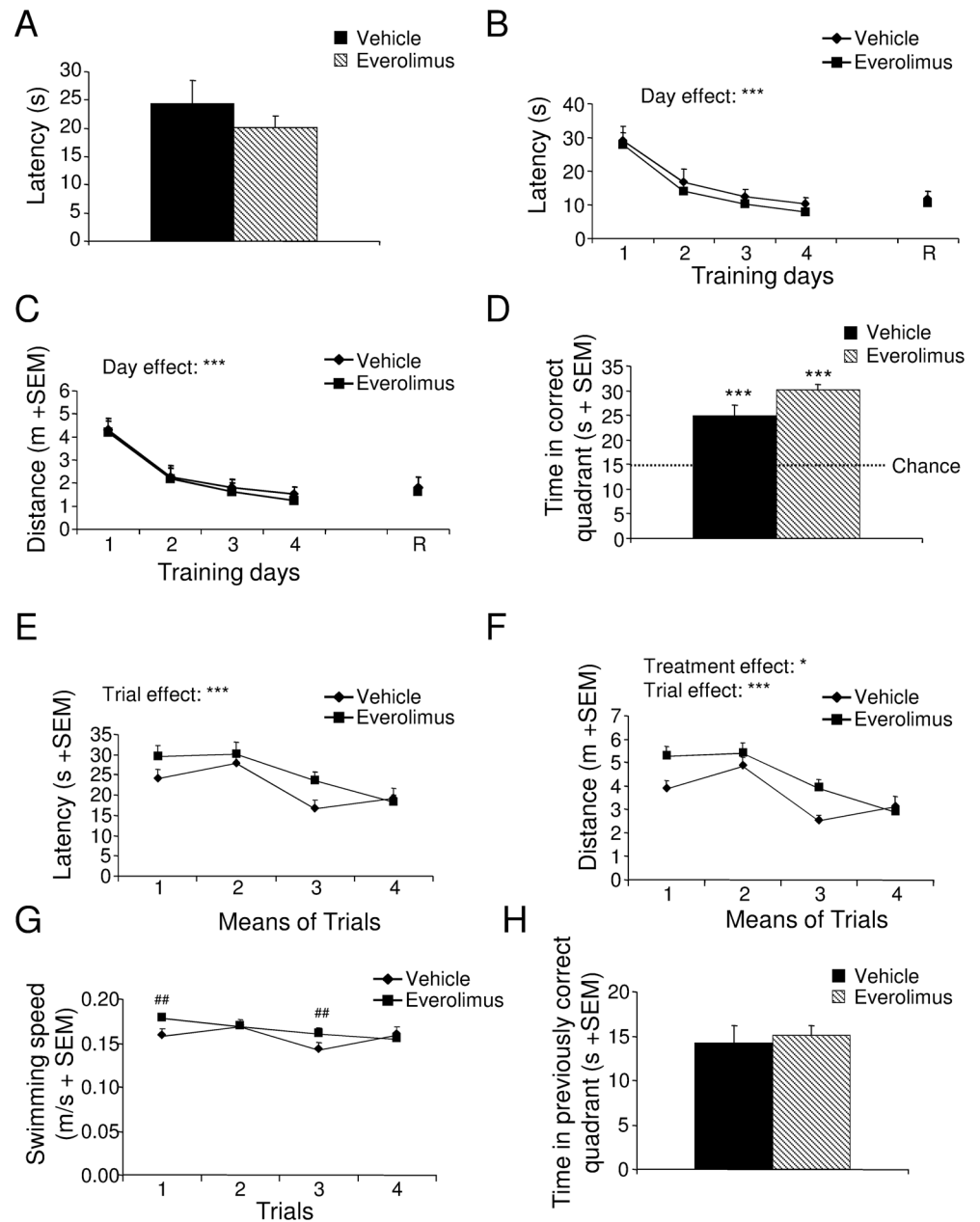
### Spontaneous activity and recognition memory

Everolimus did not modify spontaneous locomotor and vertical activities. The distance crossed and the leaning number were not significantly different between treatment groups ( $t_{24}=0.63, p>.05$  and  $t_{24}=0.39, p>.05$ , respectively; Figs. S1C and S1D). In the object recognition test, animals of both groups detected novelty, with longer exploration durations of the novel object vs the familiar ones (vehicle:



**Figure 2. Phospho-P70S6K labeling in brain regions of everolimus and vehicle mice.** (a) CO activity in selective vehicle- and everolimus-treated mice brain areas. (b) Representative images of Phospho-P70S6K (p-P70S6K) immunolabeling in cortex, entopeduncular nucleus, thalamus and hypothalamus of vehicle or everolimus-treated mice. (c) Mean percent of P-P70S6K-labeled surface (normalized to vehicle) (+SEM) in the different brain areas. Arc: arcuate nucleus; Ect: ectorhinal cortex; EP: entopeduncular nucleus; PRh: perirhinal cortex; PSTh: parasubthalamic nucleus; Re: reuniens thalamic nucleus; Rh: rhomboid thalamic nucleus; Submed: submedial thalamic nucleus; VM: ventromedial thalamic nucleus.

doi:10.1371/journal.pone.0113533.g002



**Figure 3. Spatial learning and memory, and behavioral flexibility of mice treated with vehicle or everolimus in the Morris water maze test.** (A) Motivation and visuo-motor abilities after vehicle or everolimus treatment (Student *t* test,  $p > .05$ ). (B and C) During the training and retrieval (R) phases, latency (B) and distance crossed (C) after vehicle or everolimus treatment (ANOVA, Day effect  $***p < .001$ ). (D) During the probe test, time spent by animals of both groups in the quadrant where the platform was located during the training phase ( $\chi^2$ ,  $***p < .001$  vs chance). During the transfer phase, escape latency (E), distance crossed (F), and swimming speed (G) in vehicle- or everolimus-treated mice (ANOVA, Treatment effect  $*p < .05$ , Trial effect  $***p < .001$  followed by LSD post hoc  $##p < .01$ ). (H) During the 1st day of the transfer phase, time spent in the previously correct northwest quadrant after vehicle or everolimus treatment (Student *t* test,  $p > .05$ ). Data are means +SEM.

doi:10.1371/journal.pone.0113533.g003

$t_{11} = -2.90$ ,  $p < .05$ ; everolimus:  $t_{13} = -4.51$ ,  $p < .001$ ; Fig. S1E). No significant difference in exploration durations between groups was detected for either novel ( $t_{24} = -0.37$ ,  $p > .05$ ) or familiar objects ( $t_{24} = -0.23$ ,  $p > .05$ ; Fig. S1E). For details of procedures, please refer to Material and Methods S1.

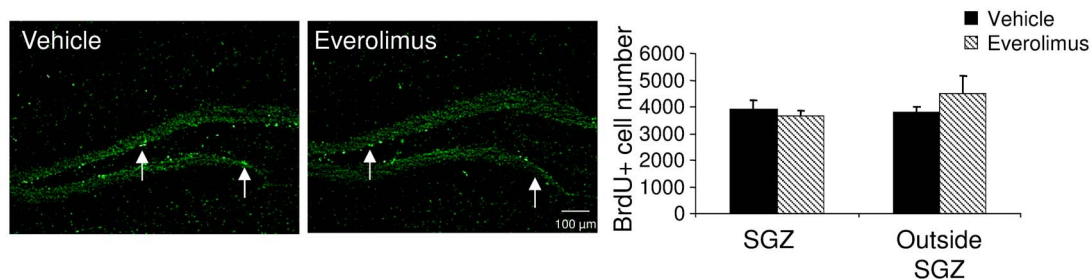
### Hippocampal neural precursor cell proliferation *in vivo* and *in vitro*

The learning and memory tasks used are dependent on hippocampal functions, thus we first assessed whether everolimus would have affected neural precursor cell proliferation and survival. As shown in Fig. 4A, everolimus treatment over a 14-day period did not modify the number of BrdU-positive cells, either in the SGZ ( $U = 6$ ,  $p > .05$ ) or outside this area ( $U = 6.5$ ,  $p > .05$ ). To verify whether targeted therapies altering the mTOR pathway may affect neural stem cells (NSC), everolimus was directly tested on NSC in culture. NSC cultured from mouse newborn neuroepithelium formed (after 3 passages) small aggregates likely containing less than 10 cells (Fig. 4B). Neurospheres became bigger at day 2 (24 hours) and day 3 (48 hours) after the third passage. Everolimus ( $10^{-5}$  M) led to a significant increase of mean neurosphere volume compared with vehicle ( $10^{-5}$  M,  $U = 2435.5$ ,  $p < .01$ ) and compared with control conditions at 24 hours ( $H_5 = 32.95$ ,  $p < .001$ , followed by Dunn's test  $p < .001$ ) and at 48 hours ( $U = 333.5$ ,  $p < .05$ ;  $H_5 = 10.72$ ,  $p < .05$ , followed by Dunn's test  $p < .01$ , respectively) (Fig. 4B). However, the increase in mean volume of neurospheres induced by everolimus at higher doses might be explained by a reduced proportion of neurospheres with smaller volumes and an increased proportion of neurospheres with larger volumes (Fig. 4C). In agreement, everolimus did not modify cell cycle progression of NSC as shown in Fig. S2.

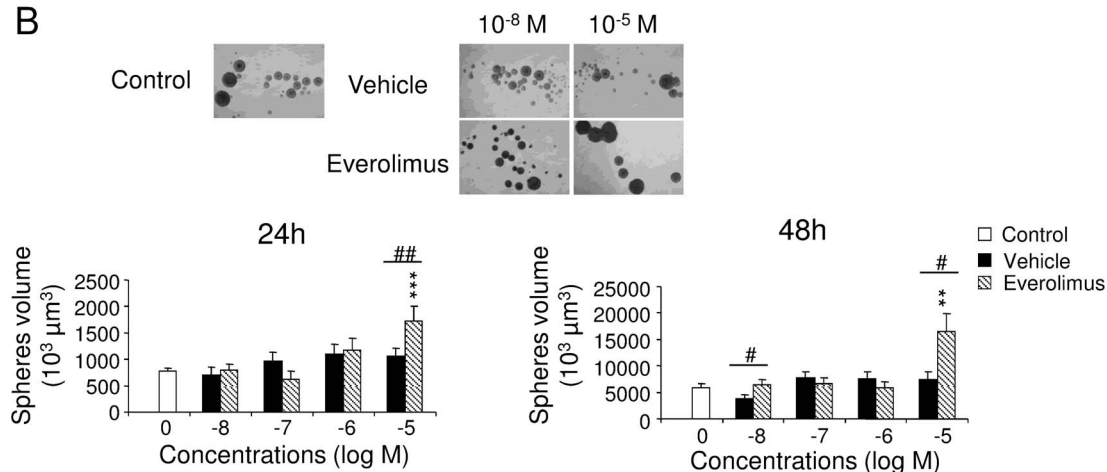
### Vascular component density

To visualize brain vessel architecture, we studied the labeling of IQGAP1 scaffolding protein, known to be expressed in adult mouse brain by parenchymal endothelium, ventricular epithelial ependymal cells, and neural progenitor and neuronal precursor cells in the SGZ [42]. Prolonged everolimus treatment did not significantly diminish IQGAP1-positive structure area ( $U = 4$ ,  $p > .05$ ) and number of labeled structures ( $U = 1$ ,  $p > .05$ ; Fig. 5A). We then investigated the direct effect of everolimus on endothelial cells by using the bEND.3 cell line [43, 44] (Fig. 5B). We showed that everolimus from  $10^{-9}$  to  $10^{-5}$  M inhibited cell survival compared with the control condition at 24 hours ( $H_7 = 63.21$ ,  $p < .001$ , followed by Dunn's tests  $p < .05$ ) and at 48 hours ( $H_7 = 70.12$ ,  $p < .001$ , followed by Dunn's tests  $p < .05$ ). Compared with vehicle, everolimus decreased cell numbers at concentrations comprising between  $10^{-11}$  M and  $10^{-8}$  M at 24 hours ( $U > 0$ ,  $p < .05$ ) and at concentrations comprising between  $10^{-11}$  M and  $10^{-6}$  M at 48 hours (Fig. 5B) ( $U > 0$ ,  $p < .01$ ). At  $10^{-5}$  M, vehicle led to reduced cell numbers compared with control at 24 hours ( $H_7 = 28.90$ ,  $p < .001$ , followed by Dunn's test  $p < .001$ ) and 48 hours ( $H_7 = 32.06$ ,  $p < .001$ , followed by Dunn's test  $p < .001$ ).

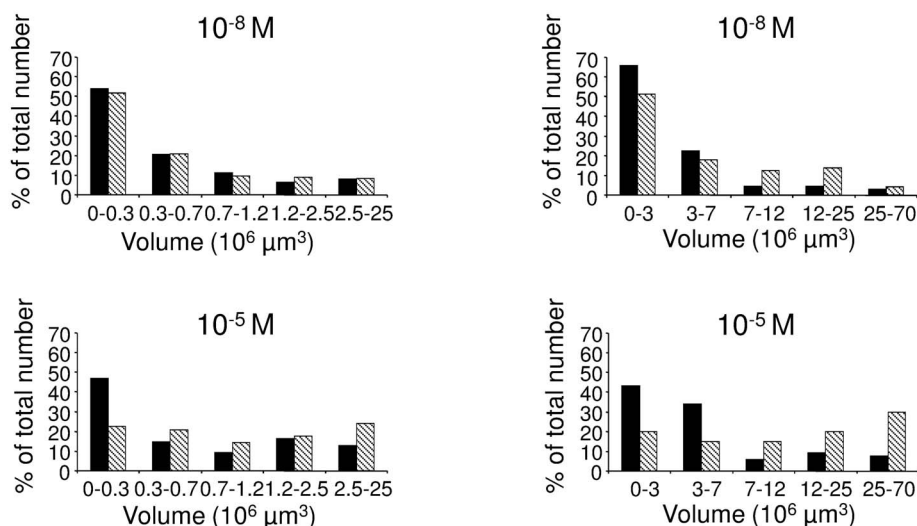
A



B

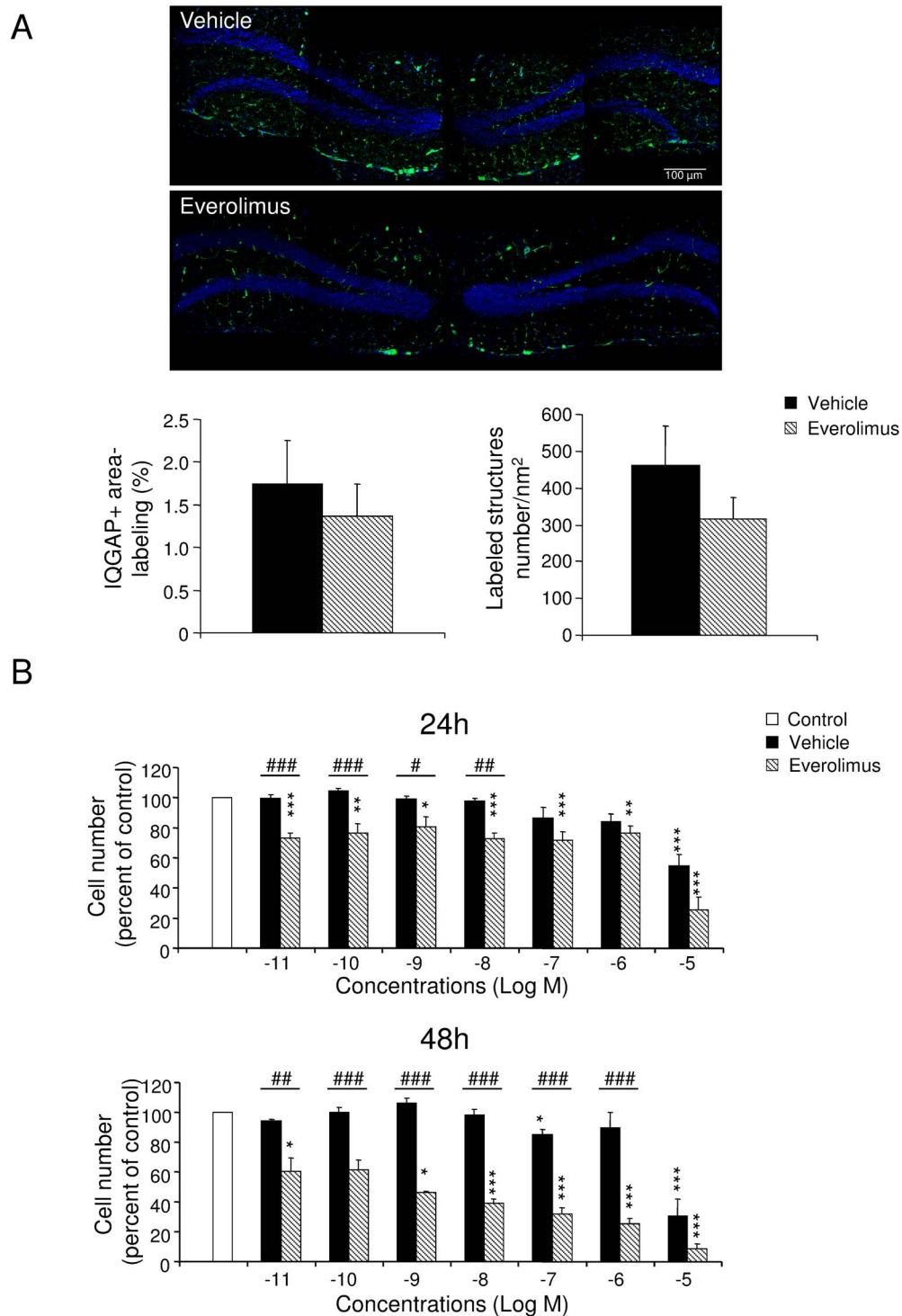


C



**Figure 4. Effect of everolimus on precursor cell proliferation *in vivo* and *in vitro*.** (A) Effect of *in vivo* administration of everolimus on neural precursor cell proliferation in the hippocampus. Left, BrdU-positive cells (intense green cells, white arrows) were counted in the subgranular zone (SGZ) and the remaining part of the dentate gyrus (outside SGZ). Bregma  $-2.16$  mm; Scale bar,  $100 \mu\text{m}$ . Right, Number of BrdU<sup>+</sup> cells in the SGZ or outside SGZ (Mann whitney U tests,  $p > .05$ ). (B and C) Effect of increasing concentrations of vehicle and everolimus on neural stem cell growth in culture. (B) *Upper*, Phase-contrast image of floating neurospheres at 24 hours after treatment with vehicle and everolimus ( $10^{-8}$  and  $10^{-5}$  M). *Below*, Neurosphere volume in the absence (control: 0) and presence of vehicle and everolimus after 24 hours and 48 hours of treatment (Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's tests  $***p < .001$  vs 0; Mann Whitney U-tests,  $\#p < .05$ ,  $\#\#p < .01$  everolimus vs vehicle. Data represent means +SEM. (C) Proportion of neurospheres according to different categories of volumes. The increase of neurosphere mean volume might be explained by an increased proportion of bigger neurospheres and a decreased proportion of smaller neurospheres associated with everolimus treatment.

doi:10.1371/journal.pone.0113533.g004



**Figure 5. Vascular component density in hippocampus and endothelial cell proliferation *in vitro*.** (A) Vascular density in the dentate gyrus of the hippocampus. *Upper*, IQGAP1-immunolabeled vascular niches in the dentate gyrus were illustrated from brain slices of vehicle- and everolimus-treated mice (Bregma  $-1.68$  mm). Scale bar,  $100 \mu\text{m}$ . *Below*, Mean IQGAP1-positive surface labeling and number of branches/ $\text{nm}^2$  ( $\pm$ SEM) in the dentate gyrus (Mann-Whitney U-tests,  $p > .05$ ). (B) Effects of increasing concentrations of vehicle and everolimus on the bEND.3 endothelial cell growth, as evaluated by endothelial cell number after

24 hours and 48 hours of treatment with vehicle or everolimus. Values are normalized to the mean number of cells in the control condition (white bar). Effect of everolimus, Kruskal-Wallis ANOVA followed by Dunn's tests \* $p < .05$ , \*\* $p < .01$ , \*\*\* $p < .001$  vs control; Effect of everolimus compared with vehicle (Mann-Whitney tests, # $p < .05$ , ## $p < .01$ , ### $p < .001$ ).

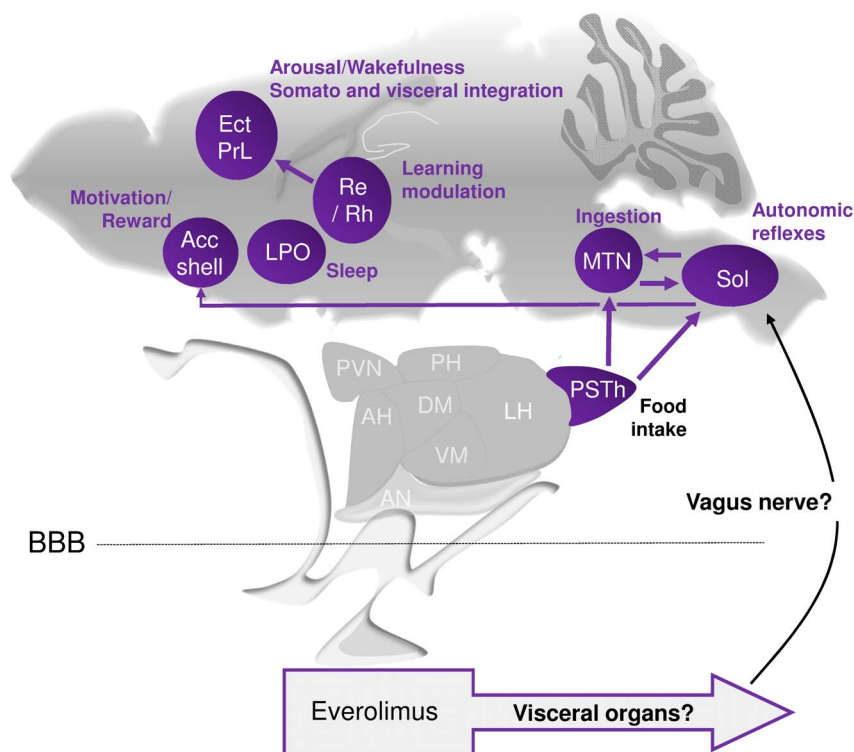
doi:10.1371/journal.pone.0113533.g005

## Discussion

As cancer treatments are constantly improving, *via* the more widely used targeted therapies, more efforts have to be made to implement prevention and management of side effects in delivering cancer therapy. In general, molecular-targeted therapies can be considered relatively safe, compared with chemotherapy. However, inhibitors of the p-Akt/mTOR pathway such as everolimus, although well tolerated, are reported to be associated with fatigue, hyperglycemia, hypertriglyceridemia, hypercholesterolemia, gastrointestinal syndromes, anorexia, rash, mucositis or headache [25, 26]. More specifically, CNS side effects have been also described, including headache/migraine (up to 30%), convulsions (up to 29%), dysgeusia (up to 19%), dizziness (up to 14%) or paresthesia (up to 5%) (26). In addition, the inhibition of the mTOR pathway was described affecting cognitive functions [18, 45, 46]. Thus, fatigue in addition to other observed and/or on studied CNS symptoms should greatly affect quality of life and wellbeing, and can adversely affect physical and mental functioning such as cognitive functions. Understanding the potential impact or the safety of systemic administration of everolimus on cognitive function and brain neural cell activity should provide key insights to better define solutions for planning, guiding, and monitoring this cancer therapy.

As such, we took advantage of a validated animal model as an original sensitive neuropsychological paradigm [28], which is an unique way to explore direct causal links between targeted therapy and disorders in learning and memory processes, behavioral flexibility and neural cell activity. Previous experiments indicated that antibodies recognizing mTOR components present an ubiquitous distribution in the CNS and there is scattered expression of phosphorylated mTOR in the cortex, hippocampus and hypothalamus [7].

In studies of patients with solid tumors treated with chemotherapy, moderate cognitive dysfunction has been reported in 15%–50% of cases [1]. Such impairment mainly affects executive functions, resulting in reduced concentration levels and slowness of response and disorganization, but it may also include memory deficits, affecting recently learned information and spatial memory [1]. Previous studies have shown that consolidation relies on molecular mechanisms involving mTOR signaling pathway [47] and that infusion of mTOR inhibitor into the hippocampus during a short period around training impairs long-term memory in the object recognition task or the Morris water maze test [18, 45, 46]. In the current study, the potential lasting effect of a chronic oral administration of everolimus was evaluated by testing mice several days after the treatment was ended. Everolimus induced no changes in emotional reactivity and did neither



**Figure 6. Schematic representation of brain areas presenting cytochrome oxidase activity modifications in mice treated with everolimus.** Everolimus does not induce alteration of the phosphorylated P70S6K in the studied brain areas. It is here hypothesized that everolimus direct action on visceral organs would impact some cerebral areas through the vagus nerve. Among the brain areas with CO activity modifications are the solitary nucleus (Sol) as the principal recipient of visceral information conveyed by the vagus afferents and connected with the autonomic nervous system, motor nuclei of cranial nerves, nuclei in the brainstem and hypothalamus; the paraventricular nucleus (PVN) within the hypothalamus, and motor trigeminal nucleus (MTN) involved in ingestion; the accumbens (Acc) shell important for reward and motivation processes; the preoptic area (LPO) regulating sleep/wake state; and the thalamic reuniens (Re) and rhomboid (Rh) nuclei and cortical areas that integrate arousal, somatosensory and visceral information, and participate to the modulation of learning and memory, and maintenance of arousal and wakefulness. Thus brain areas with modified CO activity are involved in the integration of autonomic and neuroendocrine information important for regulation of food intake, weight, metabolic, motivational processes, and arousal, that could be associated with symptoms suggestive of fatigue and energy homeostasis alterations. Arrows in purple show connections between brain areas metabolically modified. AH, anterior hypothalamic area; BBB, brain blood barrier; DM, dorsomedial hypothalamic nucleus; Ect, ectorhinal cortex; LH, lateral hypothalamic area; PH, posterior hypothalamic nucleus; PrL, prelimbic cortex; PVN, paraventricular hypothalamic nucleus; VM, ventromedial hypothalamic nucleus.

doi:10.1371/journal.pone.0113533.g006

alter spatial learning/memory performances/learning flexibility nor memory in the object recognition task. These data differ from previous studies on chemotherapy-treated animals, which demonstrated deficits in behavioral flexibility and object recognition memory or longer object exploration [28, 48–51]. We demonstrated that systemic administration of everolimus did not modify spatial learning and memory or executive functions that would persist at one to four weeks after the end of the treatment completion. This observation also appears divergent from data showing that mTOR inhibitors such as rapamycin alter cognitive functions [18, 45, 46]. This discrepancy may be explained by the direct infusion of



rapamycin into the hippocampus parenchyma in the study from Dash *et al.* and Myskiw *et al.* [18, 45] compared with the evaluation of the learning and memory performances after systemic administration of everolimus, only after and not during the treatment in the present study. Also, it can be mentioned that everolimus was suggested to slowly penetrate brain as evidenced by inhibition of S6 kinase phosphorylation in the cortex and the striatum only when 20  $\mu\text{mol/kg}$  dose was used [52, 53]. These data may suggest that the dose of everolimus (5 mg/kg) used here remained rather low to cross the blood brain barrier and accumulate into various brain area.

Our study also verified the potential impact of the mTOR pathway inhibitor on hippocampal precursor neural cell proliferation during acute treatment. Everolimus did not affect cellular proliferation in the dentate gyrus of the hippocampus when evaluated immediately after the last day of treatment. This suggests that mTOR inhibition may not be associated with alteration of NSC mitogenesis within the subgranular zone in particular and/or that two weeks of everolimus should not control NSC within vascular niches in the hippocampal neurogenic area. Interestingly, we confirmed *in vitro* that everolimus from  $10^{-8}$  to  $10^{-6}$  M did not affect NSC cell cycle and neurosphere growth. Accordingly, previous data suggest that mTOR inhibition may, indeed, have no impact on self-renewal [54] but would likely prevent the growth of neural stem/progenitor cells more particularly under hypoxic [55] or kainate-induced seizure [56] conditions. Thus, under normoxic experimental conditions, the mTOR pathway would not be sufficiently activated and involved in NSC cell cycle, supporting the absence of observed effect of everolimus on NSC proliferation.

Targeted therapies based on small molecule inhibitors directed against the mTOR pathway would alternatively impede synaptic plasticity and/or cerebrovascular function. We thus hypothesized that everolimus would have modified the vascular architecture and the organization of vascular niches. The immunolabeling of IQGAP-1 in the hippocampus revealed no significant alteration of the vascular densities or branching in brain slices from everolimus-treated mice, suggesting that everolimus may not interfere with vascular architecture. To clarify this aspect, we tested whether everolimus may interact *in vitro* with proliferation/survival of brain endothelial rodent bEND.3 cells and showed altered cell survival compared with control conditions. These findings were consistent with the results of Barilli *et al.*, [57] who demonstrated that prolonged exposure to rapamycin affects *in vitro* human umbilical vein endothelial cell and human aortic endothelial cell viability at concentrations equal to or larger than 10 nM, increasing both necrotic and apoptotic parameters. This drastic diminution of endothelial cell number indicates that everolimus can directly affect the endothelial function at least *in vitro*. Together, the absence of *in vivo* effects one day after the end of the treatment, on neural cell division and vascular organization in the hippocampus would suggest that everolimus does induce alterations of some key brain areas (such as the hippocampus) involved in cognitive functions.

We can still emphasize that everolimus led to a delayed and persistent reduction in weight gain from the last day of the treatment period. A weight loss has been reported in patients [25, 58] and in animal models [22, 33, 59] treated with everolimus. For instance, in the study of Farb [59], everolimus-treated animals, experience weight loss (10%) and loss of appetite but appeared healthy otherwise, according to the authors. Moreover, Mabuchi et al. [22] reported that in transgenic mice developing bilateral ovarian serous adenocarcinoma, 5 mg/kg/ twice a week led to a 10% lower weight than vehicle mice beginning from the third week of treatment. After 5 weeks of treatment, they mentioned histopathological analyses of liver, spleen, pancreas, kidney, small and large intestine, uterus and ovaries, and conclude with no evident toxic changes [22]. As mTOR signaling pathway plays an important role in homeostasis in visceral organs and brain [2, 60], weight loss described after everolimus treatment could be associated with a skeletal muscle atrophy caused by a protein synthesis alteration in muscles [58] and/or inhibition of fat accumulation [61], but also with troubles with feeding behavior. Accordingly, rats treated with a single dose of peripheral rapamycin maintained a lower body weight whereas it did not induce malaise of illness and this effect seems to be mediated at least partially by the brain [62]. Altogether, mTOR inhibition by everolimus would mimic deficiency in nutrients and growth factors and may alter whole body energy homeostasis and food intake in particular through gastric, pancreatic, adipocytes and/or cerebral functions [63–67].

In order to investigate the global impact of everolimus on cerebral functions, a mapping of regional brain cell activity (cytochrome oxidase staining) was performed immediately following the two-week long period treatment. As summarized in Figure 6, selective alterations of cytochrome oxidase activity were detected in regions involved in energy homeostasis and weight regulation (parasubthalamic area of the hypothalamus), food intake and ingestion (hypothalamus, motor trigeminal nucleus, solitary nucleus), reward and motivation (accumbens shell), learning and memory modulation (thalamus, cerebral cortex), and sleep/wakefulness control and arousal (preoptic area, cerebral cortex) [68–72]. However, the level of activation of the P70S6K (phospho-P70S6K) within these cerebral areas were not modified after everolimus treatment, suggesting a rather direct peripheral mTOR inhibition leading, in turn, to indirect brain alterations. For instance, the hepatic vagus nerve senses glucose production in the liver and the vagal afferents can be activated by the gastrointestinal system, then sending signals to the CNS and more particularly the solitary nucleus. We may propose that under inhibition of mTOR by everolimus, the use of glucose by the muscle, fat, the liver or the gut produces glucose and ketones leading to activation of the nucleus of the solitary tract through the vagus nerve (Fig. 6). The parasubthalamic area, through its connections with the solitary nucleus, the accumbens nucleus, or the motor trigeminal nucleus, is positioned to influence feeding behavior and weight [73–76]. In particular, the parasubthalamic nucleus is suggested to be involved in the restraining of food intake in some situations such as conditioned taste aversion and indispensable amino acids

deficiency [76,77]. Thus, autonomic functions, orofacial control, feeding and motivation may be particularly affected during cancer treatment with everolimus, but we cannot conclude whether these symptoms would potentially last more than 1 week after the end of the treatment completion.

In conclusion, chronic systemic treatment with the mTOR inhibitor everolimus did not affect emotional reactivity, spontaneous activity, spatial learning and memory, behavioral flexibility, and object recognition memory when evaluated 7 to 29 days after the end of the treatment. Also, this therapy provided *via* oral administration did not modify neural precursor cell proliferation or vascular component distribution in the hippocampus. However, cerebral metabolism, in selective regions connected with the solitary nucleus and the hypothalamus and related to weight regulation and motivation, was altered by acute administration of everolimus. This evaluation of cognitive functioning and brain metabolic activity following everolimus treatment might help to elucidate the pathophysiology of the neurological alterations observed among cancer patients treated with targeted therapies such as mTOR inhibitors.

## Supporting Information

**Figure S1. Emotional reactivity, spontaneous activity, and object recognition memory of mice treated with everolimus or vehicle.** The anxiety-like behaviors evaluated in the elevated plus maze (A), the depressive-like behaviors evaluated in the forced swim test (B), and the spontaneous locomotor (C) and vertical activity (D) were not modified by treatment (Student *t* test,  $p > .05$ ). (E) Everolimus did not modify object recognition memory performances, and mice in both groups detected novelty (Student *t* test,  $*p < .05$ ,  $**p < .01$ , *vs* familiar). Data are means  $\pm$  SEM.

[doi:10.1371/journal.pone.0113533.s001](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113533.s001) (PDF)

**Figure S2. Cell cycle evaluation of neural stem cells after everolimus treatment.** Effects of increasing concentrations of vehicle or everolimus on neural stem cell cycle after 24 hours of treatment. Cell cycle analysis following propidium iodide intercalation into the cellular chromatin was performed by flow cytometry in the absence or presence of vehicle or everolimus ( $10^{-8}$ – $10^{-5}$  M). Data are represented as relative fluorescence intensity of sub G1, G1, S and G2/M-phase population in a 2-dimensional cytometry profile. At  $10^{-5}$  M, the number of cells in the sub-G1 phase increased in both vehicle and everolimus conditions.

[doi:10.1371/journal.pone.0113533.s002](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113533.s002) (PDF)

**Figure S3. Chronology of behavioral and *ex vivo* studies following the treatment period.** (A) From day 0 to day 13, mice were treated with vehicle or everolimus, with a 7-day interval before initiation of behavioral evaluations on day 20, which continued for 23 days. (B) 24 hours subsequent to the 14 days treatment period, mice brains were removed and processed to reveal cytochrome oxidase activity. (C) After 6 injections of 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU), and 24 hours following the last treatment with vehicle or everolimus, mice brains were

removed and immunohistochemically labeled for neural cell proliferation and vascular density.

[doi:10.1371/journal.pone.0113533.s003](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113533.s003) (PDF)

### Material and Methods S1.

[doi:10.1371/journal.pone.0113533.s004](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113533.s004) (DOC)

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: HC PG FM FP. Performed the experiments: MD VL M-CT. Analyzed the data: HC MD FJ. Contributed reagents/materials/analysis tools: PH YA. Wrote the paper: MD HC.

## References

1. Joly F, Rigal O, Noal S, Giffard B (2011) Cognitive dysfunction and cancer: which consequences in terms of disease management? *Psychooncology* 20: 1251–1258.
2. Tsang CK, Qi H, Liu LF, Zheng XF (2007) Targeting mammalian target of rapamycin (mTOR) for health and diseases. *Drug Discov Today* 12: 112–124.
3. Glusker P, Recht L, Lane B (2006) Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome and bevacizumab. *N Engl J Med* 354: 980–982; discussion 980–982.
4. Martin G, Bellido L, Cruz JJ (2007) Reversible posterior leukoencephalopathy syndrome induced by sunitinib. *J Clin Oncol* 25: 3559.
5. Larkin JM, Pyle LM, Gore ME (2010) Fatigue in renal cell carcinoma: the hidden burden of current targeted therapies. *Oncologist* 15: 1135–1146.
6. Meric-Bernstam F, Gonzalez-Angulo AM (2009) Targeting the mTOR signaling network for cancer therapy. *J Clin Oncol* 27: 2278–2287.
7. Cota D, Proulx K, Smith KA, Kozma SC, Thomas G, et al. (2006) Hypothalamic mTOR signaling regulates food intake. *Science* 312: 927–930.
8. Sabers CJ, Martin MM, Brunn GJ, Williams JM, Dumont FJ, et al. (1995) Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem* 270: 815–822.
9. Okada K, Tanaka H, Temporin K, Okamoto M, Kuroda Y, et al. (2011) Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway regulates neurite outgrowth in cerebellar granule neurons stimulated by methylcobalamin. *Neurosci Lett* 495: 201–204.
10. Park KK, Liu K, Hu Y, Smith PD, Wang C, et al. (2008) Promoting axon regeneration in the adult CNS by modulation of the PTEN/mTOR pathway. *Science* 322: 963–966.
11. Narayanan SP, Flores AI, Wang F, Macklin WB (2009) Akt signals through the mammalian target of rapamycin pathway to regulate CNS myelination. *J Neurosci* 29: 6860–6870.
12. Yang X, Yang C, Farberman A, Rideout TC, de Lange CF, et al. (2008) The mammalian target of rapamycin-signaling pathway in regulating metabolism and growth. *J Anim Sci* 86: E36–50.
13. Hoeffler CA, Klann E (2010) mTOR signaling: at the crossroads of plasticity, memory and disease. *Trends Neurosci* 33: 67–75.
14. Bekinschtein P, Katze C, Slipczuk LN, Igaz LM, Cammarota M, et al. (2007) mTOR signaling in the hippocampus is necessary for memory formation. *Neurobiol Learn Mem* 87: 303–307.
15. Tischmeyer W, Schicknick H, Kraus M, Seidenbecher CI, Staak S, et al. (2003) Rapamycin-sensitive signalling in long-term consolidation of auditory cortex-dependent memory. *Eur J Neurosci* 18: 942–950.
16. Blundell J, Kouser M, Powell CM (2008) Systemic inhibition of mammalian target of rapamycin inhibits fear memory reconsolidation. *Neurobiol Learn Mem* 90: 28–35.

17. **Parsons RG, Gafford GM, Helmstetter FJ** (2006) Translational control via the mammalian target of rapamycin pathway is critical for the formation and stability of long-term fear memory in amygdala neurons. *J Neurosci* 26: 12977–12983.
18. **Dash PK, Orsi SA, Moore AN** (2006) Spatial memory formation and memory-enhancing effect of glucose involves activation of the tuberous sclerosis complex-Mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci* 26: 8048–8056.
19. **Krab LC, Goorden SM, Elgersma Y** (2008) Oncogenes on my mind: ERK and MTOR signaling in cognitive diseases. *Trends Genet* 24: 498–510.
20. **Dowling RJ, Topisirovic I, Fonseca BD, Sonenberg N** (2010) Dissecting the role of mTOR: lessons from mTOR inhibitors. *Biochim Biophys Acta* 1804: 433–439.
21. **Mabuchi S, Altomare DA, Cheung M, Zhang L, Poulikakos PI, et al.** (2007a) RAD001 inhibits human ovarian cancer cell proliferation, enhances cisplatin-induced apoptosis, and prolongs survival in an ovarian cancer model. *Clin Cancer Res* 13: 4261–4270.
22. **Mabuchi S, Altomare DA, Connolly DC, Klein-Szanto A, Litwin S, et al.** (2007) RAD001 (Everolimus) delays tumor onset and progression in a transgenic mouse model of ovarian cancer. *Cancer Res* 67: 2408–2413.
23. **Manegold PC, Paringer C, Kulka U, Krimmel K, Eichhorn ME, et al.** (2008) Antiangiogenic therapy with mammalian target of rapamycin inhibitor RAD001 (Everolimus) increases radiosensitivity in solid cancer. *Clin Cancer Res* 14: 892–900.
24. **Anandappa G, Hollingdale A, Eisen T** (2010) Everolimus - a new approach in the treatment of renal cell carcinoma. *Cancer Manag Res* 2: 61–70.
25. **Yee KW, Zeng Z, Konopleva M, Verstovsek S, Ravandi F, et al.** (2006) Phase I/II study of the mammalian target of rapamycin inhibitor everolimus (RAD001) in patients with relapsed or refractory hematologic malignancies. *Clin Cancer Res* 12: 5165–5173.
26. **Motzer RJ, Escudier B, Oudard S, Hutson TE, Porta C, et al.** (2010) Phase 3 trial of everolimus for metastatic renal cell carcinoma: final results and analysis of prognostic factors. *Cancer* 116: 4256–4265.
27. **Di Lorenzo G, Porta C, Bellmunt J, Sternberg C, Kirkali Z, et al.** (2011) Toxicities of targeted therapy and their management in kidney cancer. *Eur Urol* 59: 526–540.
28. **Dubois M, Lapinte N, Villier V, Lecointre C, Roy V, et al.** (2014) Chemotherapy-induced long-term alteration of executive functions and hippocampal cell proliferation: Role of glucose as adjuvant. *Neuropharmacology* 79: 234–248.
29. **Taberero J, Rojo F, Calvo E, Burris H, Judson I, et al.** (2008) Dose- and schedule-dependent inhibition of the mammalian target of rapamycin pathway with everolimus: a phase I tumor pharmacodynamic study in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 26: 1603–1610.
30. **Tanaka C, O'Reilly T, Kovarik JM, Shand N, Hazell K, et al.** (2008) Identifying optimal biologic doses of everolimus (RAD001) in patients with cancer based on the modeling of preclinical and clinical pharmacokinetic and pharmacodynamic data. *J Clin Oncol* 26: 1596–1602.
31. **Boulay A, Zumstein-Mecker S, Stephan C, Beuvink I, Zilbermann F, et al.** (2004) Antitumor efficacy of intermittent treatment schedules with the rapamycin derivative RAD001 correlates with prolonged inactivation of ribosomal protein S6 kinase 1 in peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Res* 64: 252–261.
32. **Huynh H, Chow KH, Soo KC, Toh HC, Choo SP, et al.** (2009) RAD001 (everolimus) inhibits tumour growth in xenograft models of human hepatocellular carcinoma. *J Cell Mol Med* 13: 1371–1380.
33. **O'Reilly T, McSheehy PM, Kawai R, Kretz O, McMahon L, et al.** (2009) Comparative pharmacokinetics of RAD001 (everolimus) in normal and tumor-bearing rodents. *Cancer Chemother Pharmacol* 65: 625–639.
34. **Bianco R, Garofalo S, Rosa R, Damiano V, Gelardi T, et al.** (2008) Inhibition of mTOR pathway by everolimus cooperates with EGFR inhibitors in human tumours sensitive and resistant to anti-EGFR drugs. *Br J Cancer* 98: 923–930.
35. **Strazielle C, Kremarik P, Gherzi-Egea JF, Lalonde R** (1998) Regional brain variations of cytochrome oxidase activity and motor coordination in Lurcher mutant mice. *Exp Brain Res* 121: 35–45.
36. **Wong-Riley M** (1979) Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res* 171: 11–28.

37. **Arabo A, Costa O, Dubois M, Tron F, Caston J** (2005) Effects of systemic lupus erythematosus on spatial cognition and cerebral regional metabolic reactivity in BxSB lupus-prone mice. *Neuroscience* 135: 691–702.
38. **Franklin KBJ, Paxinos G** (2007) *The mouse brain in stereotaxic coordinates*, Academic Press, San Diego.
39. **Morris RG, Garrud P, Rawlins JN, O'Keefe J** (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature* 297: 681–683.
40. **Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ** (1999) Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* 2: 260–265.
41. **Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS** (2000) Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus. *J Neurosci* 20: 9104–9110.
42. **Balenci L, Saoudi Y, Grunwald D, Deloulme JC, Bouron A, et al.** (2007) IQGAP1 regulates adult neural progenitors in vivo and vascular endothelial growth factor-triggered neural progenitor migration in vitro. *J Neurosci* 27: 4716–4724.
43. **Hallmann R, Savigni DL, Morgan EH, Baker E** (2000) Characterization of iron uptake from transferrin by murine endothelial cells. *Endothelium* 7: 135–147.
44. **Soga N, Connolly JO, Chellaiah M, Kawamura J, Hruska KA** (2001) Rac regulates vascular endothelial growth factor stimulated motility. *Cell Commun Adhes* 8: 1–13.
45. **Myskiw JC, Rossato JI, Bevilacqua LR, Medina JH, Izquierdo I, et al.** (2008) On the participation of mTOR in recognition memory. *Neurobiol Learn Mem* 89: 338–351.
46. **Horwood JM, Dufour F, Laroche S, Davis S** (2006) Signalling mechanisms mediated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt cascade in synaptic plasticity and memory in the rat. *Eur J Neurosci* 23: 3375–3384.
47. **Tang SJ, Reis G, Kang H, Gingras AC, Sonenberg N, et al.** (2002) A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 467–472.
48. **Fardell JE, Vardy J, Shah JD, Johnston IN** (2012) Cognitive impairments caused by oxaliplatin and 5-fluorouracil chemotherapy are ameliorated by physical activity. *Psychopharmacology (Berl)* 220: 183–193.
49. **Seigers R, Schagen SB, Beerling W, Boogerd W, van Tellingen O, et al.** (2008) Long-lasting suppression of hippocampal cell proliferation and impaired cognitive performance by methotrexate in the rat. *Behav Brain Res* 186: 168–175.
50. **Winocur G, Vardy J, Binns MA, Kerr L, Tannock I** (2006) The effects of the anti-cancer drugs, methotrexate and 5-fluorouracil, on cognitive function in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 85: 66–75.
51. **Gandal MJ, Ehrlichman RS, Rudnick ND, Siegel SJ** (2008) A novel electrophysiological model of chemotherapy-induced cognitive impairments in mice. *Neuroscience* 157: 95–104.
52. **Fox JH, Connor T, Chopra V, Dorsey K, Kama JA, et al.** (2010) The mTOR kinase inhibitor Everolimus decreases S6 kinase phosphorylation but fails to reduce mutant huntingtin levels in brain and is not neuroprotective in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Mol Neurodegener* 5: 26.
53. **Pawaskar DK, Straubinger RM, Fetterly GJ, Hylander BH, Repasky EA, et al.** (2013) Physiologically based pharmacokinetic models for everolimus and sorafenib in mice. *Cancer Chemother Pharmacol* 71: 1219–1229.
54. **Sato A, Sunayama J, Matsuda K, Tachibana K, Sakurada K, et al.** (2010) Regulation of neural stem/progenitor cell maintenance by PI3K and mTOR. *Neurosci Lett* 470: 115–120.
55. **Raman L, Kong X, Gilley JA, Kernie SG** (2012) Chronic hypoxia impairs murine hippocampal development and depletes the postnatal progenitor pool by attenuating mammalian target of rapamycin signaling. *Pediatr Res* 70: 159–165.
56. **Zeng LH, Rensing NR, Wong M** (2009) The mammalian target of rapamycin signaling pathway mediates epileptogenesis in a model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 29: 6964–6972.
57. **Barilli A, Visigalli R, Sala R, Gazzola GC, Parolari A, et al.** (2008) In human endothelial cells rapamycin causes mTORC2 inhibition and impairs cell viability and function. *Cardiovasc Res* 78: 563–571.

58. **Albiges L, Antoun S, Martin L, Merad M, Lorient Y, et al.** (2011) Effect of everolimus therapy on skeletal muscle wasting in patients with metastatic renal cell carcinoma (mRCC): Results from a placebo-controlled study. *J Clin Oncol* 29: Suppl 7, , abstr 319.
59. **Farb A, John M, Acampado E, Kolodgie FD, Prescott MF, et al.** (2002) Oral everolimus inhibits in-stent neointimal growth. *Circulation* 106: 2379–2384.
60. **Bjornsti MA, Houghton PJ** (2004) The TOR pathway: a target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 4: 335–348.
61. **Houde VP, Brule S, Festuccia WT, Blanchard PG, Bellmann K, et al.** (2010) Chronic rapamycin treatment causes glucose intolerance and hyperlipidemia by upregulating hepatic gluconeogenesis and impairing lipid deposition in adipose tissue. *Diabetes* 59: 1338–1348.
62. **Hebert M, Licursi M, Jensen B, Baker A, Milway S, et al.** (2014) Single rapamycin administration induces prolonged downward shift in defended body weight in rats. *PLoS One* 9: e93691.
63. **Laplante M, Sabatini DM** (2009) An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr Biol* 19: R1046–1052.
64. **Martins L, Fernandez-Mallo D, Novelle MG, Vazquez MJ, Tena-Sempere M, et al.** (2012) Hypothalamic mTOR signaling mediates the orexigenic action of ghrelin. *PLoS One* 7: e46923.
65. **Xu G, Li Y, An W, Zhao J, Xiang X, et al.** (2010) Regulation of gastric hormones by systemic rapamycin. *Peptides* 31: 2185–2192.
66. **Mori H, Inoki K, Opland D, Muenzberg H, Villanueva EC, et al.** (2009) Critical roles for the TSC-mTOR pathway in {beta}-cell function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E1013–1022.
67. **Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW** (2006) Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443: 289–295.
68. **Kelley AE, Baldo BA, Pratt WE, Will MJ** (2005) Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. *Physiol Behav* 86: 773–795.
69. **Baldo BA, Daniel RA, Berridge CW, Kelley AE** (2003) Overlapping distributions of orexin/hypocretin- and dopamine-beta-hydroxylase immunoreactive fibers in rat brain regions mediating arousal, motivation, and stress. *J Comp Neurol* 464: 220–237.
70. **Horvath TL, Peyron C, Diano S, Ivanov A, Aston-Jones G, et al.** (1999) Hypocretin (orexin) activation and synaptic innervation of the locus coeruleus noradrenergic system. *J Comp Neurol* 415: 145–159.
71. **Peyron C, Sapin E, Leger L, Luppi PH, Fort P** (2009) Role of the melanin-concentrating hormone neuropeptide in sleep regulation. *Peptides* 30: 2052–2059.
72. **Schwartz, M W, Woods SC, Porte DJr, Seeley RJ, Baskin DG** (2000) Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661–671.
73. **Ciriello J, Solano-Flores LP, Rosas-Arellano MP, Kirouac GJ, Babic T** (2008) Medullary pathways mediating the parasubthalamic nucleus depressor response. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294: R1276–1284.
74. **Goto M, Swanson LW** (2004) Axonal projections from the parasubthalamic nucleus. *J Comp Neurol* 469: 581–607.
75. **Mascaro MB, Bittencourt JC, Casatti CA, Elias CF** (2005) Alternative pathways for catecholamine action in oral motor control. *Neurosci Lett* 386: 34–39.
76. **Yasoshima Y, Scott TR, Yamamoto T** (2006) Memory-dependent c-Fos expression in the nucleus accumbens and extended amygdala following the expression of a conditioned taste aversive in the rat. *Neuroscience* 141: 35–45.
77. **Zhu X, Krasnow SM, Roth-Carter QR, Levasseur PR, Braun TP, et al.** (2012) Hypothalamic signaling in anorexia induced by indispensable amino acid deficiency. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 303: E1446–1458.

# **Signaling switch of the urotensin II vasosactive peptide GPCR: Prototypic chemotaxic mechanism in glioma**

Céline Lecointre<sup>1</sup>, Laurence Desrues<sup>1</sup>, Jane Eileen Joubert<sup>1</sup>, Nicolas Perzo<sup>1,2</sup>, Pierre-Olivier Guichet<sup>1</sup>, Vadim Le Joncour<sup>1</sup>, Cédric Brulé<sup>2,3</sup>, Marie Chabbert<sup>4</sup>, Richard Leduc<sup>2</sup>, Laurent Prézeau<sup>3</sup>, Annie Laquerrière<sup>5</sup>, François Proust<sup>1,6</sup>, Pierrick Gandolfo<sup>1</sup>, Fabrice Morin<sup>1</sup> and Hélène Castel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, DC2N, Astrocyte and Vascular Niche, Biomedical Research Institute (IRIB), TC2N network, University of Rouen, Mont-Saint-Aignan, France.

<sup>2</sup>Department of Pharmacology, Institut of Pharmacology, Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada.

<sup>3</sup>IGF, Institut of Functional Genomic, CNRS UMR 5203, Inserm U661, University of Montpellier 1 and 2, Montpellier, France.

<sup>4</sup>UMR CNRS 6214, Inserm 1083, Faculté de Médecine 3, Angers, France.

<sup>5</sup>Service of Anatomocytopathology, CHU of Rouen, ERI28 Inserm, IRIB, France.

<sup>6</sup>Service of Neurosurgery, CHU of Rouen, France.

**Running title:** Chemotaxic behavior of urotensin II in glioma

**Key Words:** glioma, urotensin II, migration, adhesion, G protein precoupling, UT signaling pathway

\*Address for correspondence: Hélène Castel, Inserm U982, Laboratory of Neuronal and Neuroendocrine Communication and Differentiation, DC2N, Astrocyte and Vascular Niche, Biomedical Research Institute (IRIB), TC2N network, University of Rouen, 76821 Mont-Saint-Aignan, France

E-mail: [helene.castel@univ-rouen.fr](mailto:helene.castel@univ-rouen.fr); Tel: (33) 235-14-6630; Fax: (33) 235-14-6946.

Manuscript word count: 4,500 words

Figures: 6

Supplementary Information and 7 Supp figures



## **Abstract**

Glioblastoma (GBM) are the most frequent and aggressive primary brain tumors in adults. The poor prognosis is due to neo-angiogenesis and invasive properties, processes that require complex chemotactic mechanisms involving motility, migration and adhesion. Understanding these different cellular events implies the identification of signals, receptors and transduction pathways leading to either migration or adhesion. Here, we established that glioma express the vasoactive peptide urotensin II (UII) and its receptor UT, and that UT-mediated signaling cascades are involved in glioma cell migration and adhesion.

The UII and UT components are widely expressed in patient-derived GBM tissue sections, glioma cell lines and fresh biopsy explants. Interestingly, gradient concentrations of UII induced chemoattracting migratory/motility effects in glioma as well as HEK293 cells expressing human UT. This effect mainly involved the  $G_{13}/\text{Rho}/\text{ROCK}$  pathway while partially requiring  $G_{i/o}/\text{PI3K}$  components. In contrast, we observed that homogeneous concentrations of UII drastically blocked cell motility and stimulated cell-matrix adhesions through a  $\text{UT}/G_{i/o}$  signaling cascade, partially involving PI3K. Finally, we provide evidence that in glioma, homogeneous concentration of UII allowed translocation of  $G_{\alpha 13}$  to the UT receptor at the plasma membrane and increased actin stress fibers, lamellipodia formation and vinculin-stained focal adhesions. UII also induced re-localization of UT pre-coupled to  $G_{\alpha i}$  in filipodia and initiated integrin-stained focal points.

Altogether, these findings suggest that UT behaves as a chemotactic receptor, relaying a signaling switch between directional migration and cell adhesion under gradient or homogeneous concentrations, redefining sequential mechanisms affecting tumor cells during glioma invasion. It should gather interest from chemotactic GPCR field and allow a proposed reliable model to improve the design of bias drugs or targeted therapies focusing specifically on the  $G_{i/o}$  signaling pathway.

## INTRODUCTION

Glial brain tumors comprise only 2% of all cancers but are the third leading cause of cancer death in young adults.<sup>1</sup> Highly malignant glioma, multiform glioblastoma (GBM), are the most common group of primary brain tumors with an incidence of 8.9 cases per 100,000 persons/year.<sup>2</sup> The median survival of patients with GBM is estimated at 14.6 months after surgery and combined treatment (radiotherapy and chemotherapy).<sup>3</sup> The prognosis is poor, mainly due to the major neo-angiogenic potential and the highly invasive nature of glioblastoma. Thus, over 95% of glioma recur in the margins of the resection cavity, which contains invasive tumor cells acting as a tumor reservoir.<sup>4,5</sup> Indeed, tumoral glial cells invade the parenchyma and follow the myelinated nerve fibers or migrate along blood vessels<sup>6</sup> which represent specific niches providing essential oxygen and nutrients for growth. This invasion occurs in response to chemoattractant factors such as growth factors, but also chemokines, cytokines and vasoactive peptides activating G protein-coupled receptors (GPCRs). Among chemotactic GPCRs, the chemokine receptor CXCR4 (CXC motif receptor 4) is undoubtedly well-recognized in metastatic processes and brain invasion by glioma cells.<sup>7,8</sup>

Vasoactive peptide receptors could also be involved in migration of various cell types including endothelial, vascular smooth muscle and/or immune cells. For instance, pro-migratory behaviors have been described for angiotensin II on vascular smooth muscle cells,<sup>9</sup> for endothelin-1 (ET-1) on endothelial and neural progenitor cells,<sup>10,11</sup> for neuropeptide Y (NPY) on a breast cancer cell line,<sup>12</sup> and for bradykinin on glioma cells.<sup>13</sup> More recently, the vasoactive neuropeptide urotensin II (UII) has been shown to induce chemoattraction of human monocytes and thus could be considered as a new chemokine.<sup>14</sup> UII and urotensin II-related peptide URP are cyclic neuropeptides of 11 and 8 amino acids and exhibit a fully conserved C-terminal cyclic hexapeptide CFWKYC core that plays a major role in biological activity.<sup>15,16</sup> UII and URP are considered the most potent endogenous vasoactive molecules

known so far acting through a common GPCR called UT. Recently, studies have revealed a UT-coupled Rho/ROCK signaling pathway leading to migration of rat fibroblasts,<sup>17</sup> rat endothelial progenitor cells<sup>18</sup> or human monocytes,<sup>14</sup> thus stressing the potential chemokine status of UII. Accordingly, it has been shown that UT receptor antagonism regulates prostatic cancer cells<sup>19</sup> and that UII may activate tumor necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-6, metalloproteinase 9 and nuclear factor-kappa while promoting lung adenocarcinoma growth.<sup>20,21</sup> Finally, UII mRNA has been detected in tumor cell lines of neural origin and has been shown to favor proliferation of human adrenocarcinoma and renal carcinoma cell lines.<sup>22,23</sup> In the CNS, UT was found in astroglial processes *in vivo*,<sup>24</sup> in cerebellar glial cells, in human native astrocytes and in a human glioblastoma cell line.<sup>25-27</sup> The potential chemoattractant activity of the UII-UT system may play multiple roles in invasion of the brain parenchyma by glial tumor cells, and thus constitutes a non-ubiquitous promising therapeutic target.

In this study, we established that glioblastoma expressed components of the urotensinergic system. We show that gradient concentrations of UII exhibited chemoattracting behavior on glioma cells and HEK293 cells expressing human UT. This chemotaxic effect mainly involved  $G_{13}$  and ROCK and partly required  $G_{i/o}$  and PI3K. In contrast, homogenous higher UII concentration drastically blocked cell motility of glioma cells by stimulating cell-matrix adhesion through UT- $G_{i/o}$  but also through a PI3K signaling cascade. Altogether, glioma cells can sense UII through expression of its receptor UT, to mediate migration and adhesion. It likely recapitulates a “chemotaxic behavior profile” resembling professional chemotaxic receptors.

## RESULTS

### Expression of UII and UT receptor in human glioblastoma biopsies and glioma cell lines

To further precise specific expression of UII and UT in human glioma, we analyzed the expression levels of UII and UT in high-grade GBM-derived consecutive tissue sections from patients (Figure S1). UII and UT intense staining were detected in pseudopalisadic perinecrotic areas and UII can be also found in perivascular CD34-positive regions (GBM 3, Figure 1a). UT receptor was also observed in fresh explants from 8 different resected GBM, in many tumor cells, in cells emerging from the explant and in vascular regions (Figure 1b). We showed UII and UT expression by flow cytometry, Western blot and immunocytochemistry in various astrocytoma (SW1783 and SW1088) and GBM (U87, 8MG, 42MG and GL15) cell lines. UT expression was systematically detected in human glioma cells whereas UII was present in 8MG, GL15 and 42MG and in SW1783 and SW1088 (Figure 1c) suggesting an auto/paracrine mechanism in tumor cells. We also confirmed UT protein expression by Western blot analysis in various glioma cells at a major of band of 42 kDa and a doublet of bands around 65 kDa (Figure 1d). These bands were specifically overexpressed in HEK293 cells expressing the human UT, and slightly attenuated in the presence of a specific shRNA directed against human UT (Figure S2). In SW1088 and U87, UT immunoreactivity appeared faint at the plasma membrane but intense and diffuse within the cytoplasm as punctiform green fluorescence (Digitally zoomed image, Figure 1e).

### Gradient concentration of UII mediates chemotaxis *via* UT/G<sub>13</sub> and Rho/ROCK pathways

Cell counting and cell cycle experiments reveal that UII displayed no significant effect on the HEK-UT as well as glioma cell survival/proliferation (Figure S3a and b). Since UII may also be considered as a chemotactic factor,<sup>14</sup> we investigated motility and migration properties of human UT expressing HEK293 cells and endogenously expressing glioma cells (Figure 2a

and 2b). A UII concentration gradient induced migration of HEK-UT and SW1088 or U87 compared with HEK-pCMV<sup>c-myc</sup> and control (untreated) groups, respectively (Figure 2a and b). This was blocked when adding a UT antagonist, either urantide or palosuran (Figure 2c). In glioma cells, UII provoked a concentration-dependent increase in migration (Figure S3c). In addition, *in vitro* wound healing assays demonstrated that U87 treated with UII migrated into the scratched area more rapidly than control (Figure S3d). In these conditions, they did not modify basal SW1088 migration but totally counteracted glioma cell directional migration induced by UII, validating the implication of the UT receptor in UII-induced chemotactic behavior.

We thus investigated the signaling pathways involved in UII-induced chemotactic migration. UII is classically recognized as a key activator of the UT/Ca<sup>2+</sup>/IP<sub>3</sub> and/or voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel signaling cascade as demonstrated here in HEK-UT (Figure S4a) but surprisingly, UII failed to cause a Ca<sup>2+</sup> rise in glioma cells even in UT-overexpressing cells (Figure S4b) and in fresh GBM explants (Figure S4c). These data strongly suggest that the urotensinergic system expressed in high grade glioma did not engage G<sub>q</sub> leading to Ca<sup>2+</sup> mobilization. To investigate potential roles of G protein couplings in cell migration, we tested in HEK293 cells the mutant UT<sub>ERY(AAA)</sub><sup>c-myc</sup> (Figure S5a and b), and showed that UII failed to induce a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> response (Figure S5c) and to stimulate cell migration (Figure 2d).

GPCR-induced chemotaxis has been shown to depend on the PI3K pathway and/or the Rho kinase cascade, but the G protein direct couplings remained less explored. Thus, we used BRET experiment and confirmed that UII provokes significant decrease of BRET signals between G<sub>αi</sub>-Rluc and G<sub>γ</sub>-eYFP and between G<sub>α13</sub>-RlucII and UT-eGFP2 (Figure 2e). In addition, we also found UT specific couplings to G<sub>αo</sub> proteins but not to G<sub>α12</sub> (Figure S5d). Thus, we examined whether inhibition of G<sub>i/o</sub> with PTX may affect constitutive and UII-induced glioma cell migration. Inhibition of G<sub>i/o</sub> reduced UII-induced SW1088 migration by

only 24.6%, raising the possibility that other G proteins may mediate migration (Figure 2f), like the  $G_{\alpha 13}$  family G proteins<sup>28</sup>. Indeed, down-regulation of  $G_{\alpha 13}$  through a specific siRNA totally abolished the UII-induced directional migration of SW1088 (Figure 2g). Also, as shown in Figure 2h, inhibition of PI3K by LY294002 reduced SW1088 migration by only 38.2% whereas ROCK blockade with Y27632 totally abolished cell migration (Figure 2h). The Rho/ROCK pathway constitutes a well-known downstream effector of  $G_{\alpha 13}$ . Incubation of UII ( $10^{-8}$  M) during 10 min induced a rapid increase of guanosine triphosphate (GTP)-bound active Rho (Figure 2i), suggesting that in glioma cells, the Rho pathway is one of the preferred UT signaling pathway, at the expense of the ERK1/2 proliferative/survival pathways (Figure S6a, c, e). Together, these observations demonstrate that UII behaves as a chemokine initiating directional cell migration through UT/ $G_{13}$  and Rho/ROCK signaling cascades, partially involving  $G_{i/o}$  and PI3K component correlated to AKT activation in glioma cells (Figure S6b, d, f).

UII induces actin polymerization and lamellipodia formation in glioma cell through distinct signaling pathways

We then tested the effect of UII on actin polymerization and lamellipodia formation in SW1088 cells. F-actin staining revealed that UII ( $10^{-10}$ , 1h) induced actin polymerization in native (145.5%) and UT<sup>eGFP</sup> overexpressing cells (236%) (Figure 3a and b). Moreover, the ROCK inhibitor totally blocked the UII-induced actin polymerization (Figure 3a and b) whereas the PI3K inhibitor or PTX remained ineffective. Interestingly, time-lapse videomicroscopy of SW1088 co-transfected with UT<sup>mcherry</sup> and  $G_{13}^{eYFP}$  revealed diffuse expression of  $G_{13}^{eYFP}$  within cytoplasm and a transient UT- $G_{13}$  co-localization only after UII administration (T=15 and 40 min) (Figure 3c). In addition, enhanced number of cells exhibiting lamellipodia were found after UII treatments ( $10^{-10}$  M, 1h), which exhibited intense

UT<sup>eGFP</sup> staining (Figure 3d and e). We showed that UII-induced lamellipodia genesis is relayed by the PI3K signaling pathway and likely involves a  $G_{i/o}$  coupling (Figure 3d and e). These data suggest that upon binding of UII, UT may recruit  $G_{13}$  and Rho/ROCK signaling pathway for actin polymerization and a  $G_i$ /PI3K route for lamellipodia formation.

#### Homogeneous concentration of UII reduces motility

Time-lapse phase movies made to track the movement of individual SW1088 cell showed that the mean covered distance was significantly higher and not directional in low homogeneous concentration of UII ( $10^{-10}$  M, 12h, Figure 4a). In contrast, this total distance was reduced in increased homogeneous UII concentration ( $10^{-8}$  M, 12h) with a loss of displacement efficiency and a path less straight than in untreated condition (Figure 4a). It was then tested whether disruption of the UII gradient would affect directional cell migration. Addition of UII to the bottom compartment of the migration chamber, produced a significant increase in the number of migrating SW1088 cells (Figure 4b). In contrast, when UII was added to the top or the top and bottom compartments, migration was not significantly different from control (Figure 4b), suggesting a reduction of cell motility and promotion of adhesion processes.

We showed that homogeneous concentration of UII ( $10^{-10}$  M: 119.7%,  $10^{-8}$  M: 116.5%, Figure 4c) significantly increased cell adhesion and reduced cell distance migration in a radial monolayer migration assay (Figure S7a and b). These data indicate that homogeneous concentrations of UII inhibited motility by reinforcing cell-matrix adhesion, and cell-cell contacts. To verify the specific role of UT in the UII-evoked adhesion properties, SW1088 were pre-incubated with the two antagonists 30 min before the adhesion test. Neither antagonist altered basal SW1088 adhesive properties whereas they totally inhibited the effect of UII on cell adhesion (Figure 4d). To address the role of  $G_{i/o}$ , SW1088 cells were then assayed for their adhesive response to UII in the presence of the  $G_{i/o}$  blocker PTX or Rho and

PI3K inhibitors Y27632 and LY294002, respectively (Figure 4e). The Rho inhibitor showed no significant impairment of UII-evoked adhesion whereas the  $G_{i/o}$  blocker PTX completely abolished, and the PI3K inhibitor partially reduced, the UII-mediated cell adhesion (Figure 4e). Furthermore, when activated by UII, HEK expressing UT showed 125% more adhesion than in control, whereas the  $UT_{ERY(AAA)}^{c-myc}$  mutant did not exhibit adherent properties (Figure 4f), showing the key role of G proteins in adhesion processes.

We next assessed the degree of colocalization of  $G_{i/o}$  and UT in glioma cells as well as their subcellular distribution upon ligand activation. SW1088 were transiently transfected with cDNA encoding  $UT^{mcherry}$  and  $G_{ai}^{eYFP}$ . Cell movement and protein subcellular distributions were recorded in living cells before ( $T=-10$  min), and during UII treatment (1 to 30 min). Before agonist treatment,  $G_{ai}^{eYFP}$  localized predominantly at the plasma membrane or in adjacent vesicles, in structures likely containing  $UT^{mcherry}$ . During UII incubations,  $G_{ai}$  and UT remained co-detected at the plasma membrane and large membrane-associated vesicles, and more particularly in structures forming the basis of the filopodia machinery formed after 15 and 30 min of treatment (Figure 4g). Note that  $G_{ai}^{eYFP}$  appeared to be more specifically expressed at the plasma membrane resembling to specialized microdomains. Collectively, our data are consistent with a requirement of a main UT- $G_{i/o}$  coupling to recruit signaling components involved in glioma cell adhesion in the presence of homogeneous concentrations of UII.

UII regulates focal adhesion (FA) formation and maturation in glioma

During cell migration, transient adhesive contacts occur at the leading edge of lamellipodia where integrins recruit proteins such as vinculin to form immature adhesive contacts called focal complexes, and transition to FA is marked by increase in size.<sup>29</sup> Thus, we determined the number and size of FA using vinculin staining in native SW1088 and/or SW1088



expressing UT<sup>eGFP</sup>. We observed significant differences in the overall number of FA after 1h UII treatment ( $10^{-8}$  M) (Figure 5a, c). The UII-increased number of FA was not antagonized by PI3K and ROCK inhibitors but was significantly reduced in the presence of PTX (Figure 5a, c). The size of FA was markedly increased in native ( $130.1 \pm 2.3\%$ ) or UT<sup>eGFP</sup> overexpressing SW1088 ( $144.41 \pm 2.4\%$ ) exposed during 1h with UII ( $10^{-8}$  M). This effect was associated with a change in FA area distribution towards larger FA ( $> 1 \mu\text{m}^2$ , Figure 5b, d). High magnification of microphotographies of Figure 5b showed that in the presence of UII, larger FA ( $> 1-2.5 \mu\text{m}^2$ ) were totally prevented by Y27632 (Figure 5d). Then, the high homogeneous concentration of UII initiating the formation of FA, may mainly involve the Rho/ROCK pathway whereas the increase of FA area would be mediated by  $G_{i/o}$ , both potentially involved in the observed restrained cell motility.

In migrating cells, lipid rafts are preferentially localized in the leading edges, where new sites of integrin-mediated adhesion to the extracellular matrix are forming.<sup>30</sup> Then, in glioma SW1088 cells expressing UT<sup>eGFP</sup>, we tested whether UII ( $10^{-8}$  M, 1h) stimulate the number of focal points (mature adhesions) formed through activation of  $\beta 3$  integrins at the plasma membrane (Figure 6a). We observed that UII initiated  $\beta 3$  integrin clusters forming adhesion points, a mechanism totally prevented by a pre-incubation with PTX, suggesting that a UT/ $G_{i/o}$  signaling pathway is involved in UII-induced focal points formation (Figure 6a).

## DISCUSSION

We demonstrate that UII and UT are expressed in human GBM biopsies, GBM explants as well as in astrocytoma and glioblastoma cell lines. In GBM biopsies, UT is expressed more particularly in cells surrounding necrotic areas, corresponding to the pseudopalisadic zone characterized by highly hypoxic features.<sup>31</sup> Interestingly, a similar distribution has also been reported for the professional chemotactic receptor CXCR4 in pseudopalisading glioma cells.<sup>32</sup> UII appeared also widely expressed within the GBM biopsies, and in UT-expressing tumor cells, likely indicating that the secreted peptide acts as an autocrine/paracrine chemokine towards astrotumoral and endothelial cells expressing UT, specifically in hypoxic conditions. Accordingly, an increase of UT receptor has been reported in human syncytiotrophoblast cells<sup>33</sup> under HIF1- $\alpha$ -relayed hypoxic environment, or of both UII and UT in cardiac fibroblasts involving transcriptional activity of AP-1.<sup>34</sup>

Chemoattractant effects of UII have been described on rat fibroblasts,<sup>17,35</sup> rat endothelial progenitor cells<sup>18,36</sup> and human monocytes<sup>14</sup> suggesting a potential chemotactic behavior of the UII-UT in glioma. We show that a gradient of UII stimulated the chemotactic migration of HEK-UT cells and glioma, and that UT antagonists completely blocked this mechanism. Accordingly, it has been recently found in prostate cancer LNCaP cells that shRNA-mediated UT knock-down or urantide by its own, are able to inhibit chemotactic migration and motility/invasion.<sup>19</sup> Here, we can propose that the potential expression of UII in some brain area<sup>16,37,38</sup> and CSF<sup>39,40</sup> as well as in endothelial territories can promote glioma invasion of the brain parenchyma.

Originally, it was found that UII binding to UT receptor mobilizes the G<sub>q</sub> pathway in HEK-UT and in cultures of spinal cord neurons<sup>41-43</sup> and also the G<sub>i</sub> protein,<sup>26</sup> and can signal through MAPK pathways, by phosphorylating ERK1/2. UT may also act as a chemotactic factor for peripheral blood mononuclear cells, through RhoA-Rho signaling pathway.<sup>14</sup> In our study, UII failed to evoke  $[Ca^{2+}]_c$  increase in glioma explants and in glioma cell lines, indicating that

UT exhibits a specific preferred signaling cascade independent of the  $\text{Ca}^{2+}/\text{IP}_3$  pathway. Similarly, the CXCR4 coupling to calcium described in non tumoral cells,<sup>44</sup> could not be detected in human hepatoma.<sup>45</sup> It seems that UT, exhibits a propensity to lose a G protein-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  signaling, and thus may behave more likely as a professional chemokine system.

Herein, we aimed to dissect the UT-associated signaling pathways involved in chemotactic migration, and first tested the effects of the  $\text{UT}_{\text{ERY(AAA)}}$  mutant. We show that UT evoked chemotactic migration in a G protein-dependent process and that glioma migration is partially prevented by  $\text{G}_{i/o}$  inhibition and completely blocked by down-regulation of  $\text{G}_{\alpha 13}$ , indicating that UT can directly recruit  $\text{G}_{13}$  and additionally  $\text{G}_i$ , as previously described.<sup>25,26,46,47</sup> Indeed, our current data newly showed that UT is localized in vesicles, in a precoupled conformation with  $\text{G}_{i/o}$  proteins in glioma. This is not consistent with the collision hypothesis and suggests that  $\text{G}_i$  can form a stable biochemical complex with the receptor, preserved after the addition of agonist, a previously described situation.<sup>48-50</sup> These preformed G protein/receptor complexes likely specific of  $\text{G}_{\alpha i/o}$  proteins,<sup>51</sup> would exhibit high agonist affinity.<sup>52</sup> However, in glioma cells co-expressing UT and  $\text{G}_{\alpha 13}$ , we did not show co-localization as the  $\text{G}_{\alpha 13}$  is diffusely distributed within the cell cytoplasm. In a good agreement, sparse studies demonstrated that  $\text{G}_{\alpha 13}$  is mainly localized in the cytoplasm and can be translocated at the plasma membrane after stimulation.<sup>53</sup> Here, UII initiates  $\text{G}_{\alpha 13}$  trafficking to the plasma membrane, suggesting transient UT-induced recruitment in glioma. Together, UT pre-associated to  $\text{G}_i$  proteins, can relay high affinity and fast signaling mechanisms during chemotactic migration, and then membrane-bound UT may transduce signals *via*  $\text{G}_{\alpha 13}$  cycling between cytoplasm and membranes, to potentially activate Rho-associated effectors.

Based on our data and as previously suggested in normal or tumorigenic cell types,<sup>14,17-19</sup> we propose that the obligatory ROCK signaling is mediated by a UT/ $\text{G}_{13}$  coupling to relay

chemotactic glioma migration. In addition to the main  $G_{13}/\text{Rho}/\text{ROCK}$  route, the contribution of PI3K could here reside in activation of the  $G_{i/o}\beta\gamma$  protein complex, leading to the recruitment of the  $\text{PIP}_3/\text{Rac}$ ,  $\text{Cdc42}$  and/or  $\text{PIP}_3/\text{AKT}$  downstream effectors. Our findings are consistent with the previously proposed multiple coupling to  $G_{13}/\text{ROCK}$  and  $G_{i/o}/\text{PI3K}$  pathways of the professional chemotactic CXCR4,<sup>54</sup> LPA or S1P receptors.<sup>55,56</sup> In addition, homogeneous concentration of UII induced actin polymerization in a ROCK dependent manner, as previously described in smooth muscle cells.<sup>57,58</sup> Marked actin polymerization was accompanied by lamellipodia formation around glioma cells through a  $\text{UT}/G_{i/o}/\text{PI3K}$ -dependent signaling pathway. This mechanism of lamellipodia formation is similar to that observed in breast cancer cells, in which SDF-1/CXCR4-evoked lamellipodia is totally antagonized by a  $G_{\beta\gamma i}$  blocker<sup>59</sup> or a PI3K inhibitor.<sup>60</sup> We thus propose that homogeneous activation of UT coupled to  $G_{\beta\gamma i/o}/\text{PI3K}/\text{AKT}$  (and/or Rac) would favor protrusion formation concomitantly to  $G_{13}/\text{Rho}/\text{ROCK}$ -induced actin polymerization.

We provide evidence that HEK-UT and glioma exhibit important adhesion following incubation in the presence of uniform UII concentrations. A similar propensity to adhere on substratum has already been demonstrated for endothelial cells expressing  $\text{UT}^{19,36,61,62}$  and for melanoma cells expressing CXCR4,<sup>63</sup> thus suggesting that UII, as a chemokine, markedly favors adhesion. This UII-mediated glioma adhesion is not observed with the  $\text{UT}_{\text{ERY}(\text{AAA})}$  mutant, is totally abolished by PTX and partially inhibited by the PI3K inhibitor. Thus, as already demonstrated in human bone marrow for SDF-1,<sup>64</sup> this adhesion process would partially involve the  $G_{i/o}/\text{PI3K}$  cascade, in addition to another  $G_{i/o}$ -dependent pathway specifically recruited in the presence of an homogeneous concentration of UII. In the present study, homogeneous UII treatment induced *i*) an increase in the number of focal complex comprising vinculin mainly depending on the  $G_{i/o}$  pathway and *ii*) an enlargement of the vinculin staining *via* the Rho/ROCK pathway suggestive of adhesion maturation. Indeed, it is

considered that focal complex formation involves PI3K,<sup>65</sup> whereas maturation of FA requires Rho. We can then suggest that a priming signaling pathway *i.e.*,  $G_{i/o}$ /PI3K would initiate adhesion and secondary step would allow engagement of a  $G_{13}$ /Rho/ROCK pathway leading to FA maturation. In addition, a  $G_{i/o}$ /integrin signaling in restricted cell microdomains would trigger focal point formation, bridging integrin receptors to the actin cytoskeleton.<sup>66</sup>

Together, we established that UII and its receptor UT are expressed in glioma and play a major role in glioma cell physiopathology, promoting migration and adhesion. We propose that during chemotaxis, a specific high affinity UT precoupled with  $G_{i/o}$  when activated by gradient UII concentrations, would activate  $G_{i/o}$  and promote protrusions/lamellipodia through PI3K/PIP<sub>3</sub> and Rac/Cdc42.  $G_{13}$ , randomly distributed, may be transiently recruited, promoting Rho/ROCK proteins allowing actin polymerization (Figure 6b). Under homogeneous higher concentrations of UII, the UT/ $G_{i/o}$ /integrin pathway should induce focal points and force adhesion (Figure 6b). The expression pattern and functional activity of this urotensin system highlight a professional chemokine behavior, leveraging a single receptor endowed of signaling switch to control migration and/or adhesion, two processes highly relevant in glioma invasion and neo-angiogenesis.

## MATERIAL AND METHODS

### Tissues and culture of cell lines

Glioblastoma (GBM) tissue specimens were obtained from Rouen University Hospital (Departments of Neurosurgery and Anatomocytopathology) after informed patient consent. Tumor explants were prepared from fragments of fresh tissue collected after resection. Tissue fragments were cut into pieces of 0.5-2 mm<sup>3</sup>, placed on poly-L-lysine-coated glass coverlips and incubated 1h in DMEM/Ham's F12 medium completed with N2 supplement, bFGF (10 ng/mL) and 0.4% Methyl-cellulose.

The glioma cell lines SW1088 and U87 were from American Type Culture Collection (ATCC). SW1783 cell line was given by Pr. L. Ouafick (APHM, Marseille, France) and HEK293 by Dr. C. Barrère (IGF, Montpellier, France). 8MG, 42MG<sup>67</sup> and GL15<sup>68</sup> were provided by Pr. J. Honnorat (CRNL, Lyon, France).

### Plasmid constructs, siRNA and transfection

The human UT receptor cDNA into pcDNA3.1 (cDNA Ressource Center, MI, USA) was subcloned into pCMV-c-myc (BD Biosciences), peGFP-N2, pmCherry-N2 and peYFP-N1 provided by Dr O. Wurtz (Inserm U982, Rouen, France). The ERY mutant UT receptor cDNA was constructed by oligonucleotide-directed mutagenesis (QuickChange Site-directed mutagenesis II; Roche Diagnostics) to introduce three Ala instead of Glu<sup>147</sup>, Arg<sup>148</sup>, Tyr<sup>149</sup>. G<sub>αi</sub> fused to RLuc or to eYFP, G<sub>γ</sub> fused to eYFP and G<sub>α13</sub> fused to eYFP were provided by Dr L. Prézeau. G<sub>α13</sub>-RLucII was prepared as described.<sup>69</sup> Control or G<sub>α13</sub> siRNA (5'GUUCAUGGUAUCGUGCAUGdTdT3';<sup>70</sup>) were from Dharmacon (Fisher Scientific, Illkirch, France). Control and UT shRNA were from Sigma Aldrich.

Plasmid DNAs transient transfections were performed using Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 (Invitrogen), FuGene 6 (Promega) or Cell line Nucleofector kit V (Lonza). Control or G<sub>α13</sub>

siRNA were transfected into SW1088 cells using X-tremGENE siRNA transfection reagent (Roche Diagnostics).

#### Pharmacology

Human UII was purchased from Polypeptide Laboratories (Strasbourg, France). Urantide<sup>TM</sup> was from Peptides International (Louisville, Kentucky, USA). Palosuran was provided by Actelion Pharmaceuticals (Allschwill, Suisse). PTX, Y27632 or LY294002 were purchased from Sigma-Aldrich.

#### Immunohistochemistry on patient-derived tissue sections

GBM biopsy immunohistochemistry was performed using EnVision G/2 Doublestain System Kit (Dako, Denmark) according to the manufacturer's instructions. Primary rabbit anti-human UII (1/50, Sigma Aldrich), rabbit anti-UT (1/100, Santa Cruz Biotechnology, France) and mouse anti-human CD34 (1/50, Leica Biosystems, France) were used. Nuclei were counterstained with hematoxylin solution (Sigma Aldrich).

#### Flow Cytometry

Glioma cells were pelleted and incubated with non-immune rabbit IgGs (10 µg/mL, 30 min) in PBS/BSA. After permeabilization with saponin (0.1%, 30 min), cells were incubated with antibodies directed against UT (2 µg/mL, Santa Cruz) or UII (10 µg/mL, Phoenix Pharmaceuticals) at RT for 30 min. After incubation with FITC-conjugated goat anti-rabbit (Santa Cruz, 1/200), cells were analyzed on a FACScalibur flow cytometer (Beckton Dickinson Biosciences, Le Pont-De-Claix, France) operated with the CellQuest software.

#### Immunocytochemistry

Glioma cells were fixed in PFA (4%, 10 min), permeabilized with Triton X-100 (0.05%, 5 min) and blocked with NDS (2%, 1h). Cells were incubated overnight with primary antibodies (Anti-UT, 0.5  $\mu$ g/mL, Santa Cruz; anti-vinculin, 0.5  $\mu$ g/mL, Sigma-Aldrich; Anti- $\beta$ 3 integrin, 0.5  $\mu$ g/mL, Abcam) at 4°C followed by incubation for 2h at RT with secondary fluorescent antibodies (Alexa 488 or 594 conjugated antibodies, 1/200, Invitrogen). Finally, cells were counterstained with DAPI (Invitrogen, 1  $\mu$ g/mL, 10 min), and imaged by confocal microscopy (Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope). For F-actin staining, cells were incubated with R415 rhodamine phalloidin (Molecular Probes, 110 nM, 20 min).

#### Western blotting

Cell lysates were prepared in ice-cold Lysis Buffer (20 mM HEPES, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10% NP40, 1X protease and/or phosphatase inhibitor cocktails), mixed with Laemmli buffer and loaded onto 10% SDS-PAGE gel. Proteins were transferred onto a nitrocellulose membrane. Membranes were blocked with 2% nonfat milk or 4% BSA, incubated with the primary UT (Abcam 78449, 0.5 $\mu$ g/ml) or actin antibody (Abcam 1801, 1 mg/ml), overnight at 4°C, then with HRP-conjugated secondary antibodies (Santa-Cruz) for 2h at RT. Anti-actin antibody (Abcam, 0.5 $\mu$ g/mL) was also used.

#### Rhotekin pull-down assay for RhoA activation

SW1088 cells were serum-starved for 4h and treated (10 min). Rhotekin pull-down assay was performed on cell lysate using the Active Rho Pull-Down and Detection Kit from Pierce (Fisher Scientific) according to the supplier instructions.

#### BRET G protein couplings



For the  $G_{\alpha 13}$  biosensor, cells were transfected using PEI (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) with plasmids encoding UT,  $G_{\alpha 13}$ ,  $G_{\beta 1}$  and GFP10- $G_{\gamma 1}$ . The  $G_{\alpha i/o}$  experiments were performed as previously described.<sup>71</sup>

#### Migration assay

Cells were seeded on fibronectin-coated transwell filters (Corning, Fisher Scientific). Migrating cells were fixed, stained with eosin/hematoxylin and filters were mounted on glass slides with Mowiol and randomly microphotographed with a Nikon microscope (Champigny-sur-Marne, France, 10 fields/filter). Cells on the microphotography were counted by using “Cell counter” plug-in on ImageJ software.

#### Motility assay

Glioma cells were plated into fibronectin coated plate in medium supplemented with FBS. After 12h of incubation (37°C), cells were incubated in the absence or the presence of UII in fresh serum-free medium. Images were collected every 5 min for 12h on a videomicroscope Leica (DM IRE2). Data were analyzed with cell tracking plug-in of the Metamorph software.

#### Adhesion assay

Cells were preincubated with cell tracker green for 30 min (Molecular probes), resuspended in serum-free medium and treated (37°C, 30 min). Cells were plated on fibronectin-coated 96-well plates and washed twice with PBS after 15 (HEK) or 30 min (SW1088), and adherent cells were measured with a fluorescence plate reader (FL600, Bio-Tek, Colmar, France) at 535 nm or microphotographed with a Nikon microscope and counted with ImageJ software.

#### G-protein dynamic

Glioma Cells were plated into fibronectin-coated glass bottom dish (MatTek corporation, Ashland, USA) in medium supplemented with FBS and co-transfected with cDNAs of UT<sup>mCherry</sup> and G<sub>ai</sub><sup>eYFP</sup> or G<sub>α13</sub><sup>eYFP</sup>. 48h post-transfection, cells were serum starved for 2h. Images were collected every 30s on a videomicroscope (Leica, DM IRE2), and UII was added 10 min after the beginning of recording.

## ABBREVIATIONS

[Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub>, cytosolic calcium concentration; AOBS, Acousto-Optical Beam Splitter; ATCC, American Type Culture Collection; bFGF, basic fibroblast growth factor; BRET, bioluminescence resonance energy transfer; CBTRUS, Central Brain Tumor Registry of the United States; CCD, charge-coupled device; CNS, central nervous system; CXCR4, CXC motif receptor 4; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; EGF, epidermal growth factor; endothelin-1, ET-1; FA, focal adhesion; FBS, fetal bovine serum; FRET, fluorescence resonance energy transfer; GBM, glioblastoma multiforme; GPCR, G protein-coupled receptor; HRP, horseradish peroxidase; HTRF, homogeneous time-resolved fluorescence; IP-1, inositol phosphate; NDS, normal donkey serum; NEAA, non essential amino acids; NPY, neuropeptide Y; PFA, paraformaldehyde; PI, propidium iodide; PI3K, phosphatidylinositol-3 kinase; PIP, polyphosphoinositide; PLC, phospholipase C; PTX, pertussis toxin; Rluc, renilla reniformis luciferase; Rb, retinoblastoma protein; RNAi, RNA interference; ROCK, rho kinase; s.c., subcutaneously; shRNA, small hairpin RNA; TMRM, tetramethylrhodamine, methyl ester; UII, urotensin II; URP, urotensin II-related peptide; UT, urotensin II receptor.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We gratefully acknowledge Mme Marie-Thérèse Schouft for its expertise in cytometry, the PRIMACEN platform (University of Rouen, France) for imaging equipments and Mr Arnaud Arabo and Mrs Huguette Lemonnier for skillful technical assistance.

This work was supported by Inserm, Géfluc, TC2N network, LARC Neuroscience, Institute on Innovative and Biomedical Research (IRIB), The University of Rouen, C.L, V.L., J-E. J. and P-O. G. were recipients of a fellowship from the Haute-Normandie or French ministry.

## **AUTHORS' CONTRIBUTIONS**

CL performed main experiments on glioma cells (cell growth assays, cell cycle analysis, apoptosis, transwell migration, adhesion, immunohistochemistry, Western blot, Elisa). LD participated to Western blot and Elisa experiments, J-EJ validated and tested the UT<sup>ERY(AAA)</sup> mutant on cell adhesion assay, VL validated the migration assay. P-OG performed immunohistochemical experiments on glioblastoma tissue biopsies. CB and NP, LP and RL provided background and experiments on BRET and FRET-HTRF biotechnologies, AL and FP provided glioblastoma biopsies from the Haute-Normandie tumorothèque, and PG, FM and HC supervised the study. HC and CL wrote the paper.

## **FINANCIAL DISCLOSURE**

The authors have no financial relationships relevant to this article to disclose.

## **CONFLICTS OF INTEREST**

The authors have no conflicts of interests to disclose.

## REFERENCES

1. Wen PY, Kesari S. Malignant Gliomas in Adults. *N Engl J Med* 2008; **359**:492–507.
2. Rigau V, Zouaoui S, Mathieu-Daudé H, Darlix A, Maran A, Trétarre B, *et al.* French brain tumor database: 5-year histological results on 25 756 cases. *Brain Pathol Zurich Switz* 2011; **21**:633–644.
3. Stupp R, Pavlidis N, Jelic S. ESMO Minimum Clinical Recommendations for diagnosis, treatment and follow-up of malignant glioma. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO* 2005; **16 Suppl 1**:i64–65.
4. Giese A, Bjerkvig R, Berens ME, Westphal M. Cost of migration: invasion of malignant gliomas and implications for treatment. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 2003; **21**:1624–1636.
5. Johnston ALM, Lun X, Rahn JJ, Liacini A, Wang L, Hamilton MG, *et al.* The p75 neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PLoS Biol* 2007; **5**:e212.
6. Zagzag D, Esencay M, Mendez O, Yee H, Smirnova I, Huang Y, *et al.* Hypoxia- and Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Stromal Cell-Derived Factor-1 $\alpha$ /CXCR4 Expression in Glioblastomas: One Plausible Explanation of Scherer's Structures. *Am J Pathol* 2008; **173**:545–560.
7. Wang S-C, Hong J-H, Hsueh C, Chiang C-S. Tumor-secreted SDF-1 promotes glioma invasiveness and TAM tropism toward hypoxia in a murine astrocytoma model. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 2012; **92**:151–162.
8. Rempel SA, Dudas S, Ge S, Gutiérrez JA. Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 2000; **6**:102–111.
9. Mugabe BE, Yaghini FA, Song CY, Buharalioglu CK, Waters CM, Malik KU. Angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-activated c-Src through spleen tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor transactivation. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; **332**:116–124.
10. Daher Z, Noël J, Claing A. Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. *Cell Signal* 2008; **20**:2256–2265.
11. Nishikawa K, Ayukawa K, Hara Y, Wada K, Aoki S. Endothelin/endothelin-B receptor signals regulate ventricle-directed interkinetic nuclear migration of cerebral cortical neural progenitors. *Neurochem Int* 2011; **58**:261–272.
12. Medeiros PJ, Al-Khazraji BK, Novielli NM, Postovit LM, Chambers AF, Jackson DN. Neuropeptide Y stimulates proliferation and migration in the 4T1 breast cancer cell line. *Int J Cancer J Int Cancer* 2012; **131**:276–286.
13. Lu D-Y, Leung Y-M, Huang S-M, Wong K-L. Bradykinin-induced cell migration and COX-2 production mediated by the bradykinin B1 receptor in glioma cells. *J Cell Biochem* 2010; **110**:141–150.

14. Segain J-P, Rolli-Derkinderen M, Gervois N, Raingeard de la Blétière D, Loirand G, Pacaud P. Urotensin II is a new chemotactic factor for UT receptor-expressing monocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* 2007; **179**:901–909.
15. Coulouarn Y, Lihmann I, Jegou S, Anouar Y, Tostivint H, Beauvillain JC, *et al.* Cloning of the cDNA encoding the urotensin II precursor in frog and human reveals intense expression of the urotensin II gene in motoneurons of the spinal cord. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; **95**:15803–15808.
16. Sugo T, Murakami Y, Shimomura Y, Harada M, Abe M, Ishibashi Y, *et al.* Identification of urotensin II-related peptide as the urotensin II-immunoreactive molecule in the rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **310**:860–868.
17. Zhang Y-G, Li J, Li Y-G, Wei R-H. Urotensin II induces phenotypic differentiation, migration, and collagen synthesis of adventitial fibroblasts from rat aorta. *J Hypertens* 2008; **26**:1119–1126.
18. Xu S, Jiang H, Wu B, Yang J, Chen S. Urotensin II induces migration of endothelial progenitor cells via activation of the RhoA/Rho kinase pathway. *Tohoku J Exp Med* 2009; **219**:283–288.
19. Grieco P, Franco R, Bozzuto G, Toccaceli L, Sgambato A, Marra M, *et al.* Urotensin II receptor predicts the clinical outcome of prostate cancer patients and is involved in the regulation of motility of prostate adenocarcinoma cells. *J Cell Biochem* 2011; **112**:341–353.
20. Wu Y-Q, Song Z, Zhou C-H, Xing S-H, Pei D-S, Zheng J-N. Expression of urotensin II and its receptor in human lung adenocarcinoma A549 cells and the effect of urotensin II on lung adenocarcinoma growth in vitro and in vivo. *Oncol Rep* 2010; **24**:1179–1184.
21. Zhou C-H, Wan Y-Y, Chu X-H, Song Z, Xing S-H, Wu Y-Q, *et al.* Urotensin II contributes to the formation of lung adenocarcinoma inflammatory microenvironment through the NF- $\kappa$ B pathway in tumor-bearing nude mice. *Oncol Lett* 2012; **4**:1259–1263.
22. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Shibahara S. Expression of urotensin II and urotensin II receptor mRNAs in various human tumor cell lines and secretion of urotensin II-like immunoreactivity by SW-13 adrenocortical carcinoma cells. *Peptides* 2001; **22**:1175–1179.
23. Takahashi K, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Noshiro T, Hayashi Y, *et al.* Expression of urotensin II and its receptor in adrenal tumors and stimulation of proliferation of cultured tumor cells by urotensin II. *Peptides* 2003; **24**:301–306.
24. Lin Y, Tsuchihashi T, Matsumura K, Fukuhara M, Ohya Y, Fujii K, *et al.* Central cardiovascular action of urotensin II in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res Off J Jpn Soc Hypertens* 2003; **26**:839–845.
25. Castel H, Diallo M, Chatenet D, Leprince J, Desrues L, Schouft M-T, *et al.* Biochemical and functional characterization of high-affinity urotensin II receptors in rat cortical astrocytes. *J Neurochem* 2006; **99**:582–595.

26. Jarry M, Diallo M, Lecointre C, Desrues L, Tokay T, Chatenet D, *et al.* The vasoactive peptides urotensin II and urotensin II-related peptide regulate astrocyte activity through common and distinct mechanisms: involvement in cell proliferation. *Biochem J* 2010; **428**:113–124.
27. Desrues L, Lefebvre T, Lecointre C, Schouft M-T, Leprince J, Compère V, *et al.* Down-regulation of GABA(A) receptor via promiscuity with the vasoactive peptide urotensin II receptor. Potential involvement in astrocyte plasticity. *PLoS One* 2012; **7**:e36319.
28. Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; **7**:79–94.
29. Jarjour AA, Durko M, Luk TL, Marçal N, Shekarabi M, Kennedy TE. Autocrine Netrin Function Inhibits Glioma Cell Motility and Promotes Focal Adhesion Formation. *PLoS ONE* 2011; **6**:e25408.
30. Mañes S, Mira E, Gómez-Moutón C, Ana Lacalle R, Keller P, Pablo Labrador J, *et al.* Membrane raft microdomains mediate front–rear polarity in migrating cells. *EMBO J* 1999; **18**:6211–6220.
31. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, Pecot M, Cohen C, Hammond EH, *et al.* Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res* 2004; **64**:920–927.
32. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, *et al.* Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest J Tech Methods Pathol* 2006; **86**:1221–1232.
33. Gould PS, Gu M, Liao J, Ahmad S, Cudmore MJ, Ahmed A, *et al.* Upregulation of urotensin II receptor in preeclampsia causes in vitro placental release of soluble vascular endothelial growth factor receptor 1 in hypoxia. *Hypertension* 2010; **56**:172–178.
34. Shyu K-G, Wang B-W, Chen W-J, Kuan P, Lin C-M. Angiotensin II mediates urotensin II expression by hypoxia in cultured cardiac fibroblast. *Eur J Clin Invest* 2012; **42**:17–26.
35. Zhang Y-G, Kuang Z-J, Mao Y-Y, Wei R-H, Bao S-L, Wu L-B, *et al.* Osteopontin is involved in urotensin II-induced migration of rat aortic adventitial fibroblasts. *Peptides* 2011; **32**:2452–2458.
36. Yi K, Yu M, Wu L, Tan X. Effects of urotensin II on functional activity of late endothelial progenitor cells. *Peptides* 2012; **33**:87–91.
37. Ames RS, Sarau HM, Chambers JK, Willette RN, Aiyar NV, Romanic AM, *et al.* Human urotensin-II is a potent vasoconstrictor and agonist for the orphan receptor GPR14. *Nature* 1999; **401**:282–286.
38. Totsune K, Takahashi K, Arihara Z, Sone M, Satoh F, Ito S, *et al.* Role of urotensin II in patients on dialysis. *Lancet* 2001; **358**:810–811.
39. Thompson JP, Watt P, Sanghavi S, Strupish JW, Lambert DG. A comparison of cerebrospinal fluid and plasma urotensin II concentrations in normotensive and

- hypertensive patients undergoing urological surgery during spinal anesthesia: a pilot study. *Anesth Analg* 2003; **97**:1501–1503.
40. Cowley E, Thompson JP, Sharpe P, Waugh J, Ali N, Lambert DG. Effects of pre-eclampsia on maternal plasma, cerebrospinal fluid, and umbilical cord urotensin II concentrations: a pilot study. *Br J Anaesth* 2005; **95**:495–499.
  41. Filipeanu CM, Brailoiu E, Le Dun S, Dun NJ. Urotensin-II regulates intracellular calcium in dissociated rat spinal cord neurons. *J Neurochem* 2002; **83**:879–884.
  42. Mori M, Sugo T, Abe M, Shimomura Y, Kurihara M, Kitada C, *et al.* Urotensin II is the endogenous ligand of a G-protein-coupled orphan receptor, SENR (GPR14). *Biochem Biophys Res Commun* 1999; **265**:123–129.
  43. Nothacker HP, Wang Z, McNeill AM, Saito Y, Merten S, O’Dowd B, *et al.* Identification of the natural ligand of an orphan G-protein-coupled receptor involved in the regulation of vasoconstriction. *Nat Cell Biol* 1999; **1**:383–385.
  44. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res* 2010; **16**:2927–2931.
  45. Mitra P, De A, Ethier MF, Mimori K, Kodys K, Shibuta K, *et al.* Loss of chemokine SDF-1 $\alpha$ -mediated CXCR4 signalling and receptor internalization in human hepatoma cell line HepG2. *Cell Signal* 2001; **13**:311–319.
  46. Ziltener P, Mueller C, Haenig B, Scherz MW, Nayler O. Urotensin II mediates ERK1/2 phosphorylation and proliferation in GPR14-transfected cell lines. *J Recept Signal Transduct Res* 2002; **22**:155–168.
  47. Song W, McDonald J, Camarda V, Calo G, Guerrini R, Marzola E, *et al.* Cell and tissue responses of a range of Urotensin II analogs at cloned and native urotensin II receptors. Evidence for coupling promiscuity. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; **373**:148–157.
  48. Munshi R, Pang IH, Sternweis PC, Linden J. A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. *J Biol Chem* 1991; **266**:22285–22289.
  49. Lachance M, Ethier N, Wolbring G, Schnetkamp PP, Hébert TE. Stable association of G proteins with beta 2AR is independent of the state of receptor activation. *Cell Signal* 1999; **11**:523–533.
  50. Baneres J-L, Martin A, Hullot P, Girard J-P, Rossi J-C, Parello J. Structure-based analysis of GPCR function: conformational adaptation of both agonist and receptor upon leukotriene B4 binding to recombinant BLT1. *J Mol Biol* 2003; **329**:801–814.
  51. Nobles M, Benians A, Tinker A. Heterotrimeric G proteins precouple with G protein-coupled receptors in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**:18706–18711.
  52. Kenakin T. Differences between natural and recombinant G protein-coupled receptor systems with varying receptor/G protein stoichiometry. *Trends Pharmacol Sci* 1997; **18**:456–464.



53. Yamazaki J, Katoh H, Yamaguchi Y, Negishi M. Two G12 family G proteins, G $\alpha$ 12 and G $\alpha$ 13, show different subcellular localization. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; **332**:782–786.
54. Tan W, Martin D, Gutkind JS. The G $\alpha$ 13-Rho signaling axis is required for SDF-1-induced migration through CXCR4. *J Biol Chem* 2006; **281**:39542–39549.
55. Panetti TS, Nowlen J, Mosher DF. Sphingosine-1-Phosphate and Lysophosphatidic Acid Stimulate Endothelial Cell Migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; **20**:1013–1019.
56. Bian D, Mahanivong C, Yu J, Frisch SM, Pan ZK, Ye RD, *et al.* The G12/13-RhoA signaling pathway contributes to efficient lysophosphatidic acid-stimulated cell migration. *Oncogene* 2006; **25**:2234–2244.
57. Sauzeau V, Le Mellionec E, Bertoglio J, Scalbert E, Pacaud P, Loirand G. Human urotensin II-induced contraction and arterial smooth muscle cell proliferation are mediated by RhoA and Rho-kinase. *Circ Res* 2001; **88**:1102–1104.
58. Matsusaka S, Wakabayashi I. Enhancement of vascular smooth muscle cell migration by urotensin II. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; **373**:381–386.
59. Kirui JK, Xie Y, Wolff DW, Jiang H, Abel PW, Tu Y. Gbetagamma signaling promotes breast cancer cell migration and invasion. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; **333**:393–403.
60. Xie Y, Abel PW, Kirui JK, Deng C, Sharma P, Wolff DW, *et al.* Identification of upregulated phosphoinositide 3-kinase  $\gamma$  as a target to suppress breast cancer cell migration and invasion. *Biochem Pharmacol* 2013; **85**:1454–1462.
61. Cirillo P, De Rosa S, Pacileo M, Gargiulo A, Angri V, Fiorentino I, *et al.* Human urotensin II induces tissue factor and cellular adhesion molecules expression in human coronary endothelial cells: an emerging role for urotensin II in cardiovascular disease. *J Thromb Haemost JTH* 2008; **6**:726–736.
62. Watson AMD, Olukman M, Koulis C, Tu Y, Samijono D, Yuen D, *et al.* Urotensin II receptor antagonism confers vasoprotective effects in diabetes associated atherosclerosis: studies in humans and in a mouse model of diabetes. *Diabetologia* 2013.
63. Monterrubio M, Mellado M, Carrera AC, Rodríguez-Frade JM. PI3K $\gamma$  activation by CXCL12 regulates tumor cell adhesion and invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **388**:199–204.
64. Glodek AM, Honczarenko M, Le Y, Campbell JJ, Silberstein LE. Sustained Activation of Cell Adhesion Is a Differentially Regulated Process in B Lymphopoiesis. *J Exp Med* 2003; **197**:461–473.
65. Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995; **81**:53–62.
66. Hotchin NA, Hall A. The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases. *J Cell Biol* 1995; **131**:1857–1865.

67. Perzelová A, Máčiková I, Mráz P, Bízík I, Steno J. Characterization of two new permanent glioma cell lines 8-MG-BA and 42-MG-BA. *Neoplasma* 1998; **45**:25–29.
68. Bocchini V, Casalone R, Collini P, Rebel G, Lo Curto F. Changes in glial fibrillary acidic protein and karyotype during culturing of two cell lines established from human glioblastoma multiforme. *Cell Tissue Res* 1991; **265**:73–81.
69. Yagi H, Tan W, Dillenburg-Pilla P, Armando S, Amornphimoltham P, Simaan M, *et al.* A synthetic biology approach reveals a CXCR4-G13-Rho signaling axis driving transendothelial migration of metastatic breast cancer cells. *Sci Signal* 2011; **4**:ra60.
70. Bartolomé RA, Wright N, Molina-Ortiz I, Sánchez-Luque FJ, Teixidó J. Activated G(alpha)13 impairs cell invasiveness through p190RhoGAP-mediated inhibition of RhoA activity. *Cancer Res* 2008; **68**:8221–8230.
71. Ayoub MA, Maurel D, Binet V, Fink M, Prézeau L, Ansanay H, *et al.* Real-time analysis of agonist-induced activation of protease-activated receptor 1/Galphai1 protein complex measured by bioluminescence resonance energy transfer in living cells. *Mol Pharmacol* 2007; **71**:1329–1340.

## LEGENDS TO FIGURES

**Figure 1.** UT and UII are expressed in glioblastoma and glioma cell lines. **(a)** UII and UT expression in different paraffin-embedded GBM patient biopsies exhibiting necrotic area and Ki67>10%. Left, eosin/hematoxylin staining showing characteristic necrotic area (\*). Human UII (Middle) and UT (Right) immunohistochemistry revealed intense labeling in tumor cells surrounding necrotic area. Pink labelings indicate CD34-positive features. Left, middle and right represent adjacent sections. Scale Bars, 50  $\mu\text{m}$ . **(b)** Immunoreactivity of UT in a fresh GBM tumoral explant, showing strong green labeling associated to a number of tumoral cells (a,  $z = 0 \mu\text{m}$ ), vascular components (b,  $z = 47 \mu\text{m}$ ) and invading cells emerging from the explants (c,  $z = 114 \mu\text{m}$ ). **(c)** Flow cytometry analysis of UT (upper) and UII (lower) expression levels in human astrocytoma grade III (SW1783 and SW1088) and glioblastoma grade IV (U87, 8MG, 42MG and GL15) cell lines. Cells were stained in permeabilized conditions and gray lines depict results from control staining with only secondary antibodies. **(d)** Western blot analysis of UT expression in the different glioma cell lines. UT specific immune-reactive bands were detected at  $\sim 45$  and  $\sim 65$  kDa in various glioma cell lines (SW1783, SW1088, U87, 8MG, 42MG and GL15). Black arrows indicate the position of the apparent molecular mass of UT. **(e)** Immunocytochemistry of UT (green) in SW1088 and U87 glioma cell lines. In SW1088, the UT labeling was revealed in both plasma membrane and cytosolic compartments, as visible on digitally zoomed region corresponding to the white box. Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Scale bars, 50  $\mu\text{m}$ .

**Figure 2.** Gradient concentration of UII mediated chemotaxis *via* UT/G<sub>13</sub> and Rho/ROCK pathway in glioma. **(a)** HEK293 transiently transfected with cDNA encoding c-myc (HEK) or UT<sup>c-myc</sup> (HEK-UT) were plated in the top chamber of transwell membranes and UII ( $10^{-9}$  M) was added in the bottom well for 24h. Cell motility was evaluated by counting cells in 10

random fields after eosin (0.2%)/hematoxylin (0.7%) counterstaining. **(b)** SW1088 and U87 migrate in the absence or the presence of UII ( $10^{-9}$  M, 24h) added in the bottom well. **(a, b)** Histograms show quantification of the migrating cells expressed as the percentage as compared to untreated cells (control). Each bar corresponds to mean  $\pm$  SEM obtained from 3 to 12 independent experiments in triplicates. Mann and Whitney test, ns, no significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . **(c)** SW1088 were exposed to the antagonists palosuran and urantide, respectively ( $10^{-5}$  M each) added both in the upper and bottom chambers in the absence or the presence of UII ( $10^{-9}$  M, bottom chamber). Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 3 independent experiments in triplicates. One way analysis of variance followed by a Dunnett's Multiple Comparison Test, \*\*\*,  $P < 0.001$ . **(d)** HEK293 transiently transfected with cDNA encoding c-myc (HEK),  $UT^{c-myc}$  (HEK-UT) or the UT mutated in the ERY site (HEK- $UT_{ERY(AAA)}$ ) were plated in the top chamber and UII ( $10^{-9}$  M) was added in the bottom well for 24h. Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 1 representative experiment in quadruplicates. Mann and Whitney test, ns, no significant; \*,  $P < 0.05$ . **(e)** BRET between  $G_{\alpha i}$  and  $G_{\beta \gamma i}$  or UT and  $G_{\alpha 13}$  in HEK293 co-expressing  $\alpha i$ -Rluc and  $\beta \gamma$ -eYFP or UT-RlucII and  $\alpha 13$ -eGFP2 in the presence of increasing concentrations of UII ( $10^{-11}$  to  $10^{-6}$  M). Mann and Whitney test, \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$  versus control (in the absence of UII). **(f)** SW1088 were exposed in the Boyden chamber to the  $G_{i/o}$  toxin inhibitor PTX (0.2  $\mu$ g/ml) pre-incubated (6h) and added both in the upper and bottom chambers in the absence or the presence of UII ( $10^{-9}$  M, bottom chamber). Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 3 independent experiments in triplicates. Mann and Whitney test, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . **(g)** SW1088 cells cotransfected with a control siRNA (si-Ctrl) or a siRNA directed against the human  $G_{\alpha 13}$  (si- $G_{\alpha 13}$ ) and cells were plated in the top chamber and UII ( $10^{-9}$  M) was added in the bottom well for 24h. Western blot analysis showing expression of  $G_{\alpha 13}$  after 48h transfection. The detection of a major band around 43 kDa was reduced after the si- $G_{\alpha 13}$

whereas expression of actin remained unaltered. Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 3 independent experiments in quadruplicates. Mann and Whitney test, ns, no significant; \*\*,  $P < 0.05$ . **(h)** SW1088 were exposed in the Boyden chamber to the ROCK inhibitor Y27632 and the PI3K inhibitor LY294002, respectively ( $10^{-5}$  M each) pre-incubated (6h) and added both in the upper and bottom chambers in the absence or the presence of UII ( $10^{-9}$  M, bottom chamber). Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 3 independent experiments in triplicates. Mann and Whitney test, ns, no significant; \*\*,  $P < 0.01$ . **(i)** Regulation of Rho small GTPase by UII in SW1088. SW1088 were treated in the absence (control), the presence of UII ( $10^{-8}$  M; 10 min) or FBS. Western blot assay showed the expression of total and activated Rho. Under-activated Rho : GDP; Over-activated Rho: GTP- $\gamma$ -S. Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 3 independent experiments in triplicates. Mann and Whitney test, \*,  $P < 0.05$ .

**Figure 3.** UII effect on actin polymerization and lamellipodia formation in glioma cells. **(a)** Immunofluorescence of SW1088-UT<sup>eGFP</sup> (green) and actin labeled with a phalloidin-rhodamine staining (red). SW1088 were non-transfected (SW1088) or transfected with cDNAs encoding UT<sup>eGFP</sup> (SW1088-UT<sup>eGFP</sup>) pre-treated 6h with LY294002, Y27632 or PTX and incubated in the absence (control) or the presence of UII ( $10^{-10}$  M) for 1h. Overlay images allowed visualization of colocalized UT and phalloidin, at the plasma membrane and in subcellular compartments (yellow). Scale bars indicate 25  $\mu$ m. **(b)** Quantification of phalloidin-rhodamine intensities (stress fiber formation) after various treatments of native SW1088 or recombinant SW1088-UT<sup>eGFP</sup>. Mann and Whitney test for comparison with control, ns, no significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ ; \*\*\*,  $P < 0.001$ . **(c)** Dynamic distribution of G <sub>$\alpha$ 13</sub><sup>eYFP</sup> proteins and UT<sup>mcherry</sup> in SW1088 before (T=-10 min) and after treatments with UII (T=1, 15 and 40 min). Living cells were imaged in real time by using time-lapse video

microscopy and Metamorph software at 30 s intervals for 40 min, and individual frames were shown before and during UII application. Overlay images allowed visualization of colocalized UT and  $G_{\alpha 13}$  (white arrows), at the plasma membrane and in a vesicle (yellow). **(d)** Immunofluorescence analysis of lamellipodia formation in SW1088-UT<sup>eGFP</sup> after pre-incubation with inhibitors (LY294002, Y27632 or PTX) and treatment with UII ( $10^{-10}$  M, 1h). **(e)** Quantification of cells with lamellipodia in the absence or the presence of inhibitors and after treatments with UII ( $10^{-10}$  M, 1h). Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 2 to 6 independent experiments. Mann and Whitney test, ns, no significant; \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$  *versus* Control; #,  $P < 0.05$ ; ###,  $P < 0.001$  *versus* in the absence of inhibitors.

**Figure 4.** Homogeneous concentration of UII regulates motility and adhesion through a  $G_{i/o}$  protein. **(a)** Time-lapse assessment of UII-induced SW1088 motility in 2D fibronectin substrate. Images were obtained using Metamorph software at 10 min intervals for 16h. Tracings generated by Metamorph of the continuous movement of these cells are shown by color lines on images and aggregated trajectories of individual cells redrawn illustrate distances. Values represent tracking of 42 to 69 individual cells from different experiments. Mann and Whitney test, \*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.01$ . **(b)** SW1088 were exposed in the Boyden chamber in the absence or the presence of UII ( $10^{-9}$  M) in the bottom chamber, the upper chamber or both, and cells were counted 24h after treatment. Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 3 independent experiments in quadruplicates. Statistical significance was determined by a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's Multiple Comparison test, ns, non significant; \*\*,  $P < 0.01$  compared with control. **(c)** Adhesion assay on fibronectin of SW1088 (loaded with cell tracker green) in the absence (control) or the presence of FBS or UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M). Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 1 representative experiment from 5 independent experiments in quintuplets. Mann and Whitney test, \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ .

P<0.01. **(d)** Adhesion assay of SW1088 preincubated with palosuran or urantide ( $10^{-5}$  M, 30 min, each) in the absence or the presence of UII ( $10^{-8}$  M). Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 3 experiments in quintuplets. Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's Multiple Comparison Test, \*\*, P<0.01. **(e)** Adhesion assay of SW1088 preincubated (6h) with PTX (0.2  $\mu$ g/ $\mu$ l), Y27632 ( $10^{-5}$  M) or LY294002 ( $10^{-5}$  M) and exposed to UII ( $10^{-8}$  M). Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 2 independent experiments in quintuplets. Mann and Whitney test, ns, non significant; \*\*, P<0.01; \*\*\*, P<0.001. **(f)** Adhesion assay on fibronectin of HEK293 transfected with the cDNA encoding c-myc (HEK), UT<sup>c-myc</sup> (HEK-UT) or UT<sub>ERY(AAA)</sub><sup>c-myc</sup> (HEK-UT<sub>ERY(AAA)</sub>) in the absence (control) or the presence of UII ( $10^{-10}$  and  $10^{-8}$  M). Bar graph represents mean  $\pm$  SEM obtained from 1 representative experiment from 3 independent experiments in quintuplets. Mann and Whitney test, ns, non significant; \*\*, P<0.01. **(g)** Dynamic distribution of G<sub>ai</sub><sup>eYFP</sup> proteins and UT<sup>mcherry</sup> in SW1088 before (T=0 min) and after treatment with UII (T=1, 15 and 30 min). Living cells were imaged in real time by using time-lapse video microscopy and Metamorph software at 30 s intervals for 40 min, and individual frames were shown before and during UII application. In SW1088, the G<sub>ai</sub> and UT co-localization (in yellow) was revealed in plasma membrane (white arrow head), in fine dynamic structures/vesicles in cytosolic compartments (white diamond) and in newly formed protrusions (white square) at the basement of filopodia, as visible on digitally zoomed region corresponding to the two white boxes.

**Figure 5.** Homogeneous concentration of UII regulates focal adhesion formation and maturation in glioma. SW1088 were non-transfected (SW1088) or transfected with cDNAs encoding UT<sup>eGFP</sup> (SW1088-UT<sup>eGFP</sup>) and incubated in the absence (control) or the presence of inhibitors (LY294002, Y27632 or PTX) and treated with UII ( $10^{-8}$  M, 1h). **(a)** Immunofluorescence analysis of the number of focal adhesion point labeled with an antibody

directed against vinculin (red) in SW1088-UT<sup>eGFP</sup> (green), in the absence or the presence of UII and/or the inhibitors. Overlay images allowed visualization of UT and vinculin in plasma and cytosolic cell compartments (yellow). Scale bars indicates 25  $\mu\text{m}$ . **(b)** Immunocytochemical analysis of focal adhesion point size of SW1088 after UII treatment in the absence or the presence of inhibitors (LY294002, Y27632, PTX). Area of vinculin enriched dots were measured after successive image treatment and focal adhesion points were divided into 3 groups according to their size (yellow, 0.5-1  $\mu\text{m}^2$ ; red, 1-2.5  $\mu\text{m}^2$ ; blue > 2.5  $\mu\text{m}^2$ ), illustrated on the images of the last panel (FA area). Scale bars indicates 25  $\mu\text{m}$ . **(c and d)** Quantification of focal adhesion points per cell (c) and distribution of focal adhesion area (d) in SW1088 or recombinant SW1088-UT<sup>eGFP</sup> exposed to UII ( $10^{-8}$  M, 1h) in the absence or the presence of inhibitors (LY294002, Y27632 or PTX). Mann and Whitney test, ns, non significant, \*,  $P < 0.05$ , \*\*,  $P < 0.01$ , \*\*\*,  $P < 0.001$ ; comparison with control. Stacked bar represents the percent of focal adhesion points per area interval in one representative experiment **(d)**.

**Figure 6.** UII regulates integrin-dependent adhesion through UT- $G_{i/o}$  protein coupling. **(a)** Immunofluorescence analysis of  $\beta_3$  integrin-enriched focal adhesion point formation. SW1088-UT<sup>eGFP</sup> cells were incubated in the absence or the presence of  $G_{i/o}$  inhibitory toxin PTX and treated with UII ( $10^{-8}$  M) for 1h. The number and thickness of focal adhesion points in SW1088-UT<sup>eGFP</sup> (green) labeled with an antibody directed against  $\beta_3$  integrin (red) was quantified. Mann and Whitney test, ns, non significant; \*\*,  $P < 0.01$ . **(b)** General proposed schema illustrating signaling pathways activated by the UII-UT system relaying glioma cell adhesion and chemotactic migration. During chemotaxis,  $G_{i/o}$  precoupled UT may promote lamellipodia formation through PI3K/PIP<sub>3</sub> and probably Rac components whereas  $G_{13}$  recruitment may lead to Rho/ROCK protein stimulation and actin polymerization. In the



absence of chemotaxis, when cells are exposed to homogenous higher concentrations of UII, adhesion formation may be initiated in part by UT/G<sub>i/o</sub>/integrin pathway and the Rho/Rock signaling cascade, both favoring adhesion properties. These two UT signaling pathways allow fine control mechanisms of migration and adhesion required for chemotaxis.

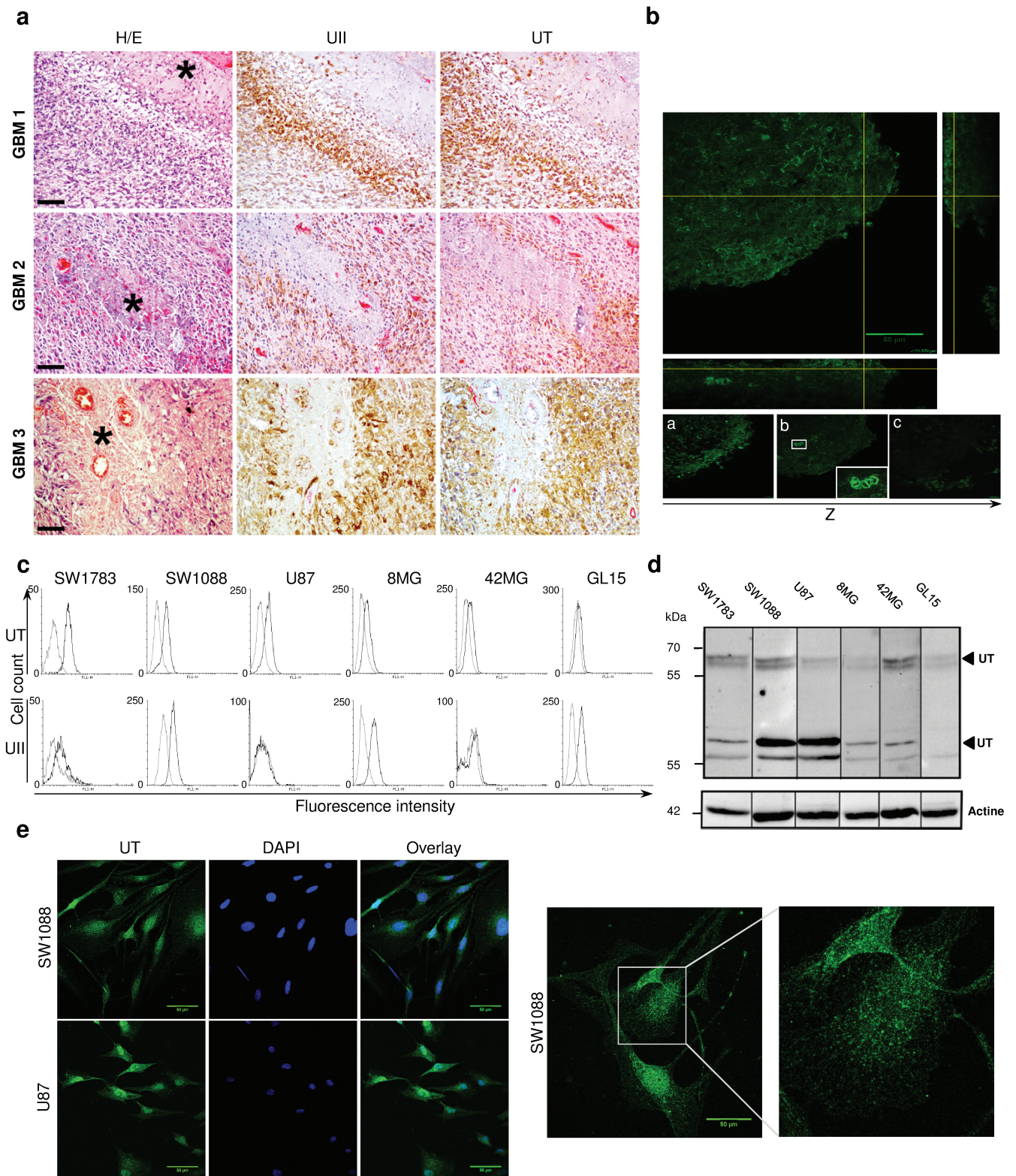


Figure 1  
Lecointre *et al.*

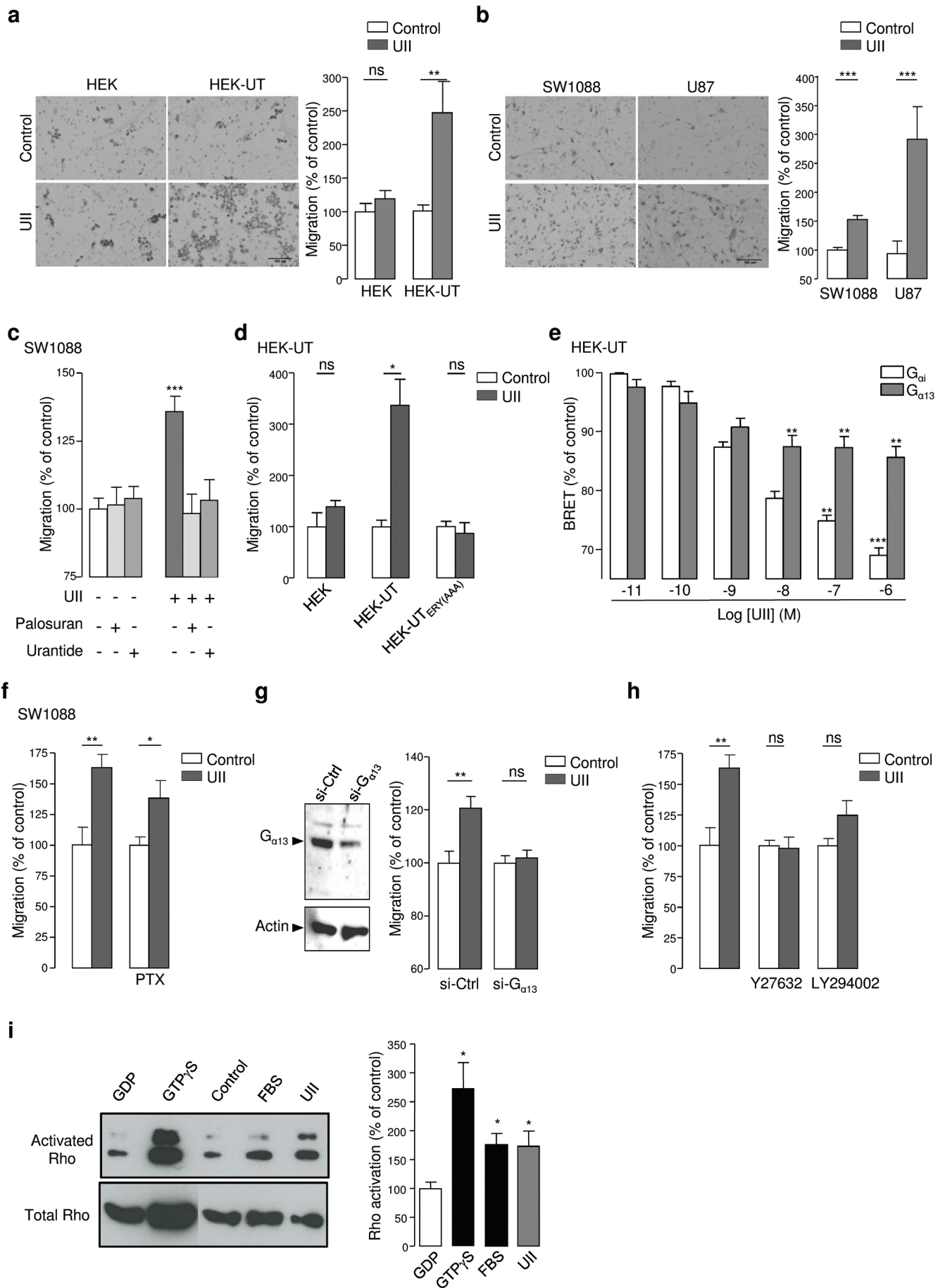
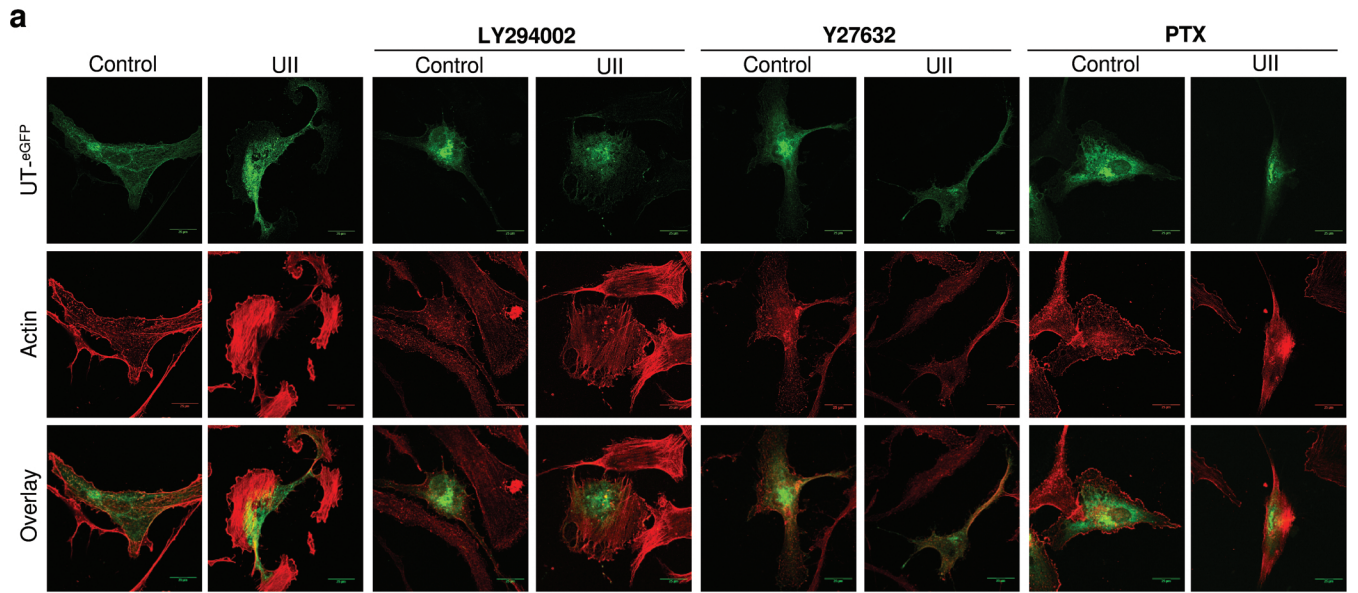


Figure 2  
Lecointre *et al.*



**b**

Phalloidin-rhodamine intensity (% of control)

	SW1088		SW1088-UT <sup>eGFP</sup>	
	Control	Ull	Control	Ull
	100 ± 5.3%	145.5 ± 7.7% ***	100 ± 7.0%	236 ± 18.4% ***
<b>LY294002</b>	100 ± 8.1%	141.7 ± 11.2% **	100 ± 10.0%	199.7 ± 13.7% ***
<b>Y27632</b>	100 ± 10.8%	113.9 ± 10.5% <sup>ns</sup>	100 ± 9.2%	81.0 ± 6.9% <sup>ns</sup>
<b>PTX</b>	100 ± 11.1%	146.1 ± 17.6% *	100 ± 12.6%	277.2 ± 31.2% ***

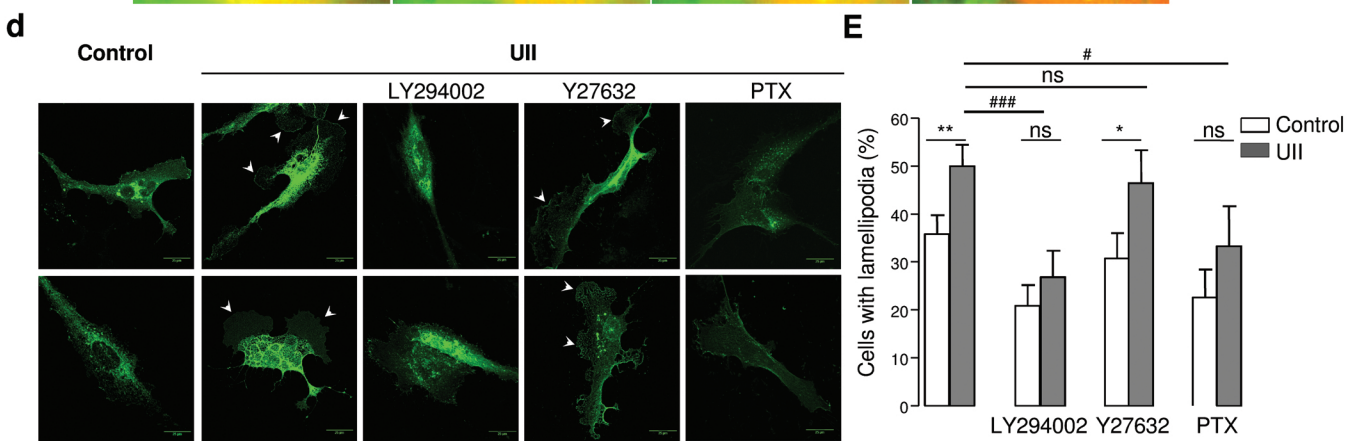
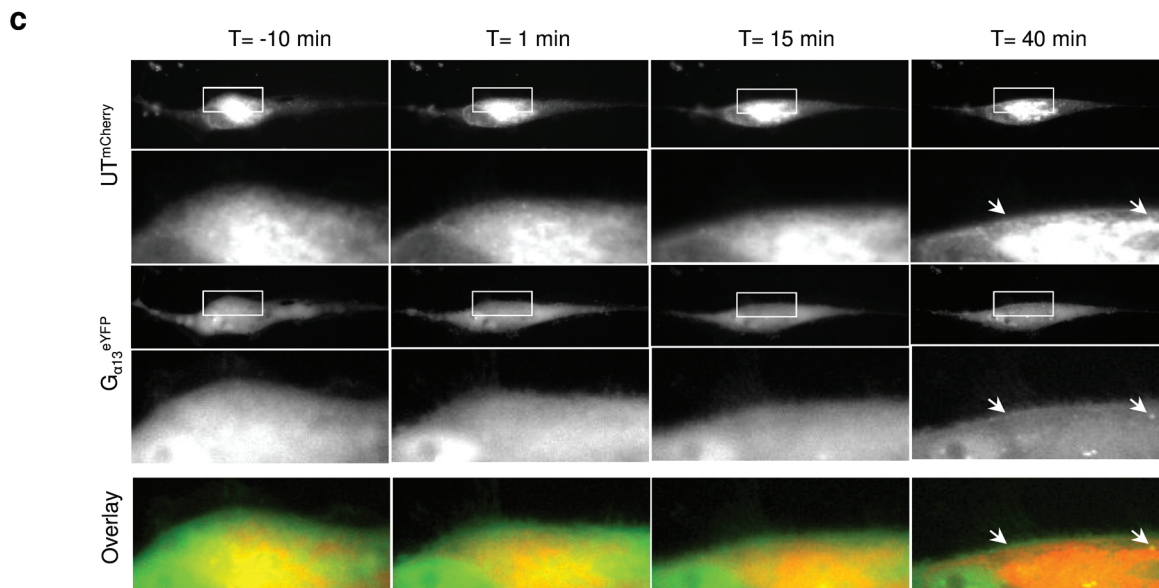


Figure 3  
Lecointre *et al.*

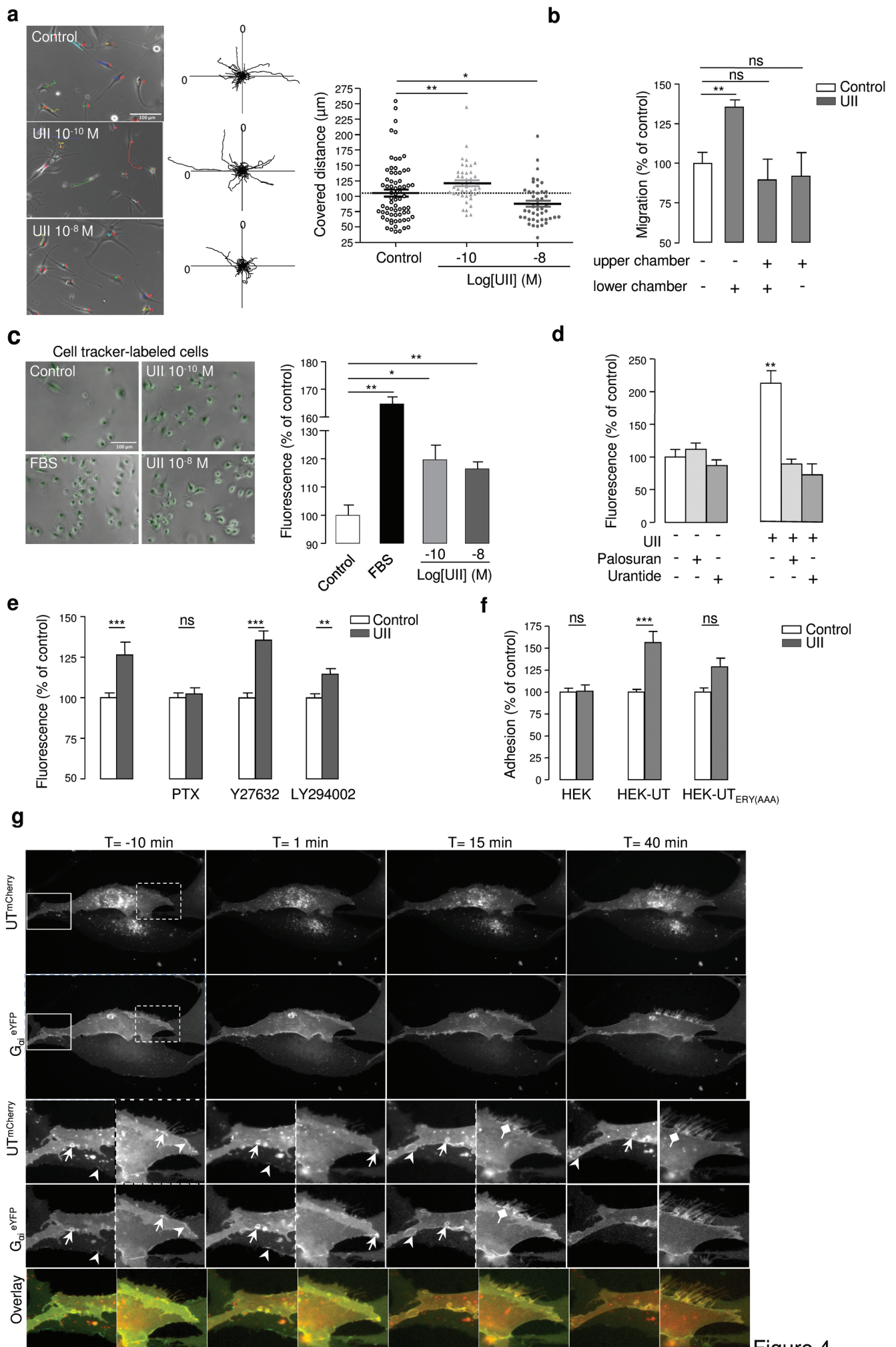
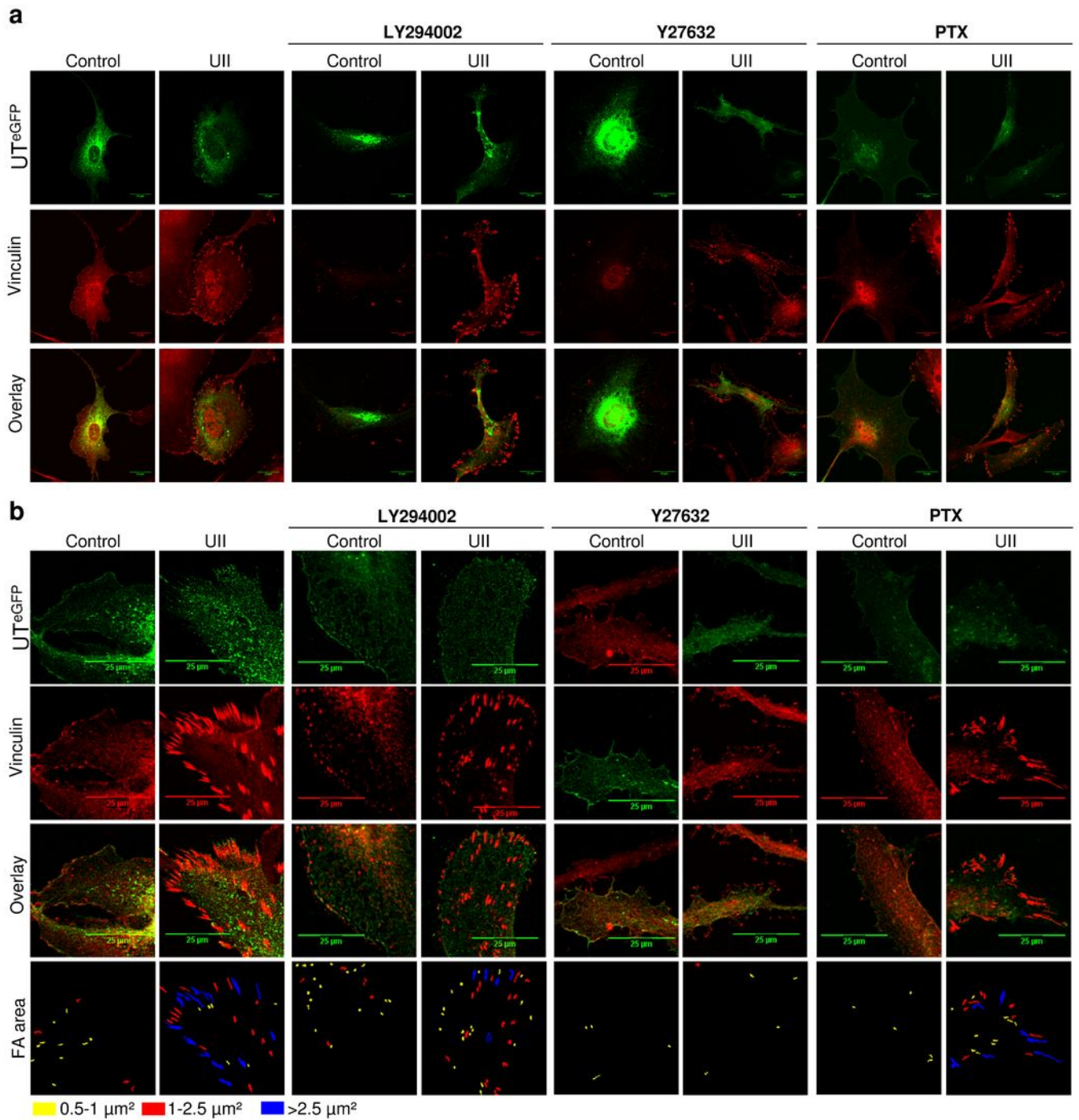


Figure 4  
Lecointre *et al.*



**c**

Number of focal adhesion point/ $\mu\text{m}^2$  of cell (% of control)

	SW1088		SW1088-UT <sup>eGFP</sup>	
	Control	Ull	Control	Ull
	100 $\pm$ 7.7%	170.9 $\pm$ 10.7% ***	100 $\pm$ 9.7%	286.1 $\pm$ 11.7% ***
<b>LY294002</b>	100 $\pm$ 7.0%	150.7 $\pm$ 17.0% *	100 $\pm$ 15.4%	242.7 $\pm$ 16.3% ***
<b>Y27632</b>	100 $\pm$ 24.1%	227.1 $\pm$ 37.9% **	100 $\pm$ 19.3%	227.6 $\pm$ 62.5% *
<b>PTX</b>	100 $\pm$ 8.7%	134.4 $\pm$ 15.6% *	100 $\pm$ 10.5%	153.8 $\pm$ 9.1% ***

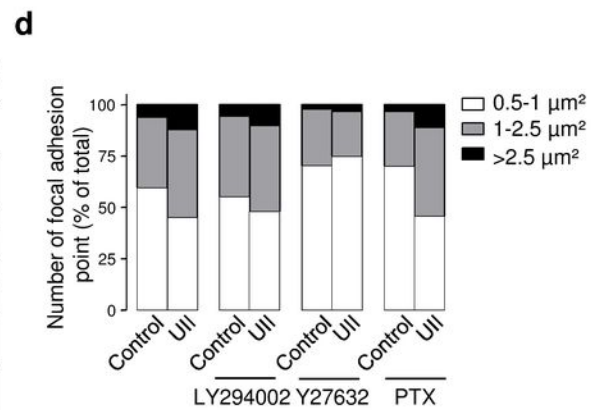


Figure 5  
Lecointre *et al.*

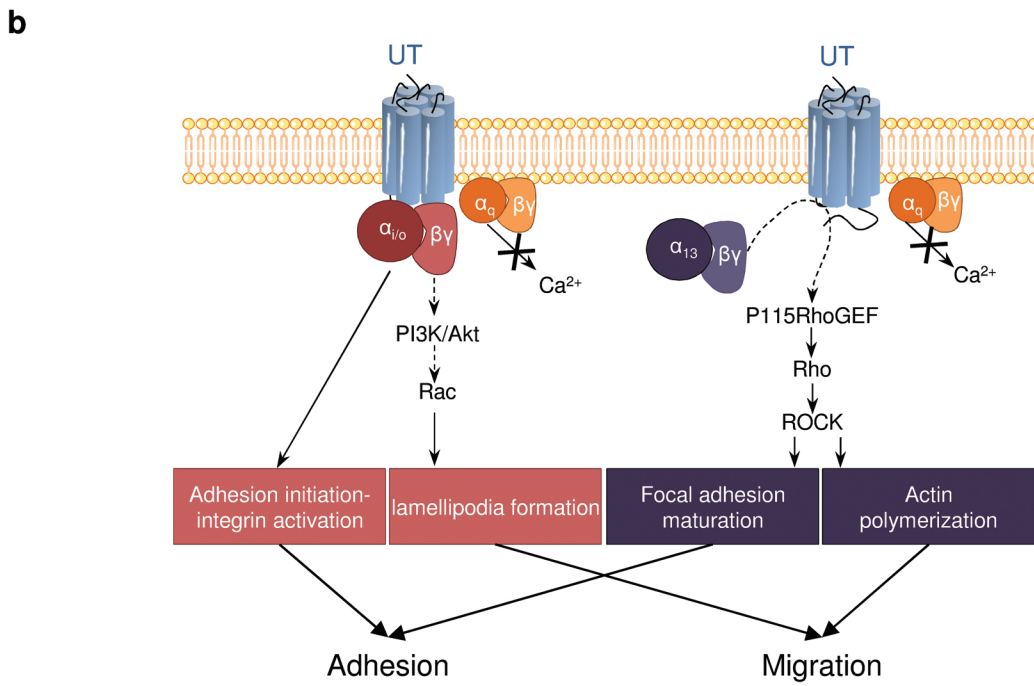
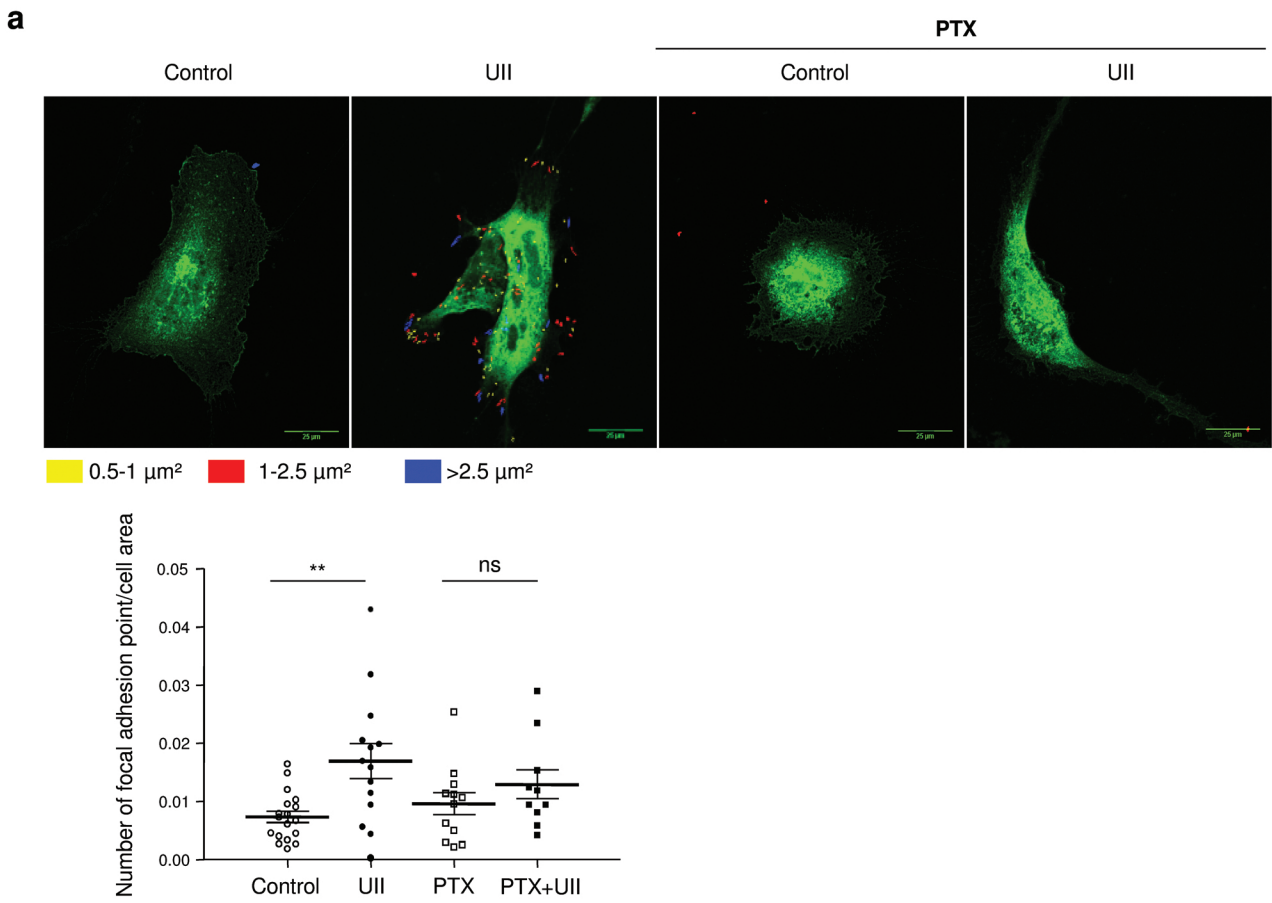


Figure 6  
Lecointre *et al.*,

<b>Tumor</b>	<b>Age at the time of surgery</b>	<b>Sex</b>	<b>Topography</b>	<b>% Ki67+ cells</b>	<b>WHO grade</b>
<b>GBM1</b>	74	M	Left parieto-occipital	15	IV
<b>GBM2</b>	68	M	Right temporal	NA	IV
<b>GBM3</b>	43	M	Left temporal	30	IV



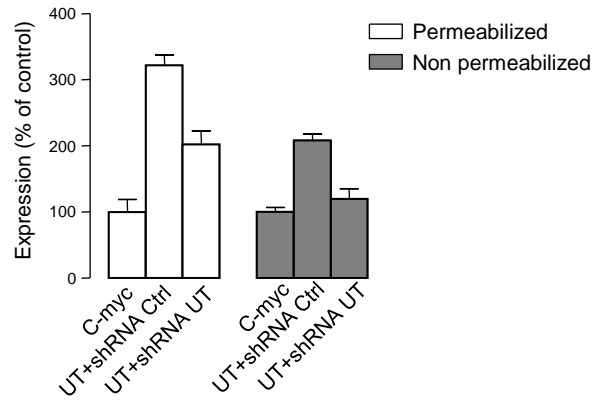
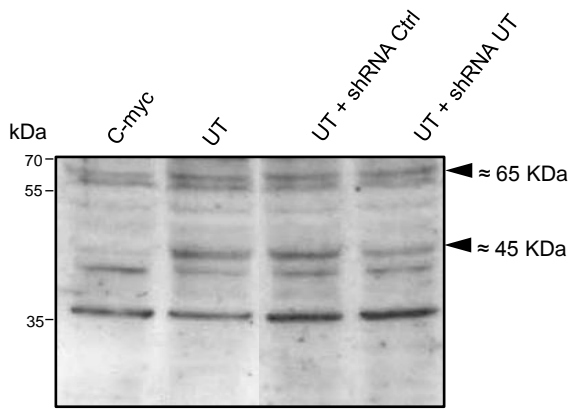
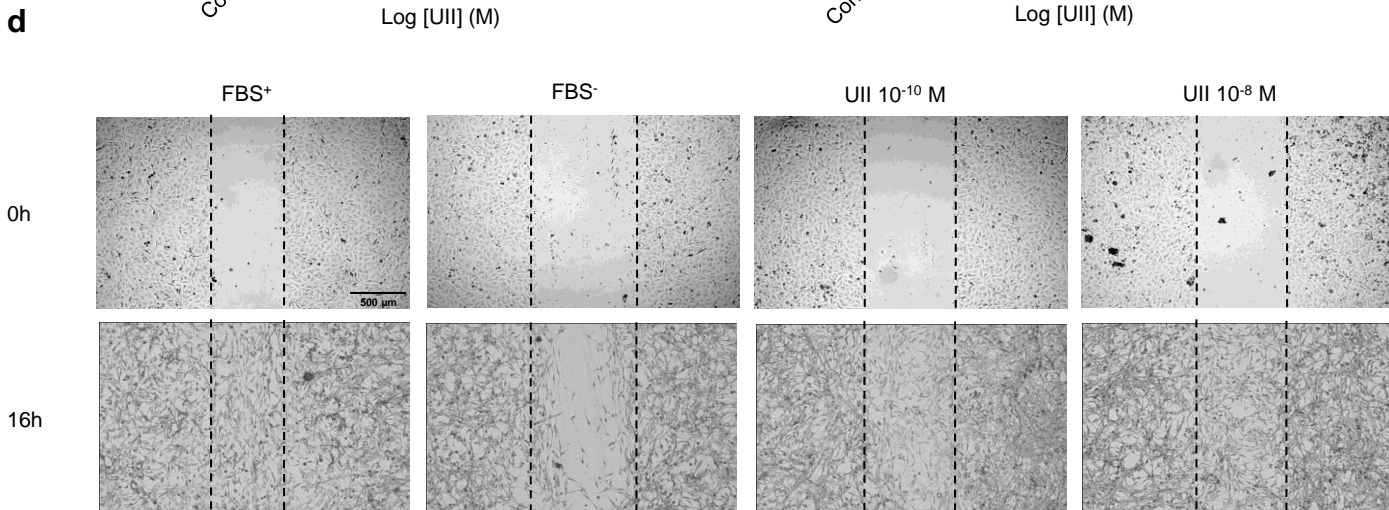
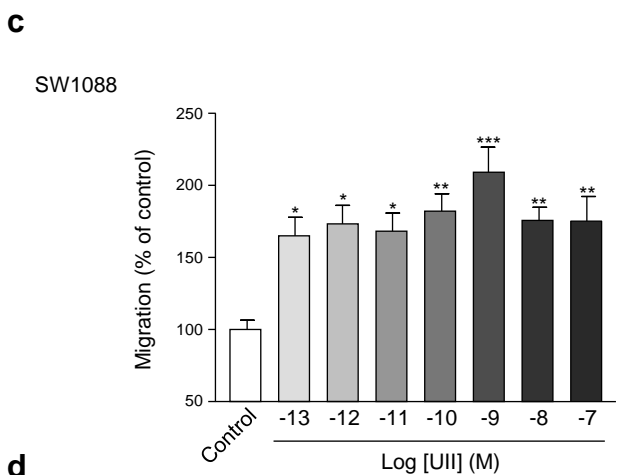
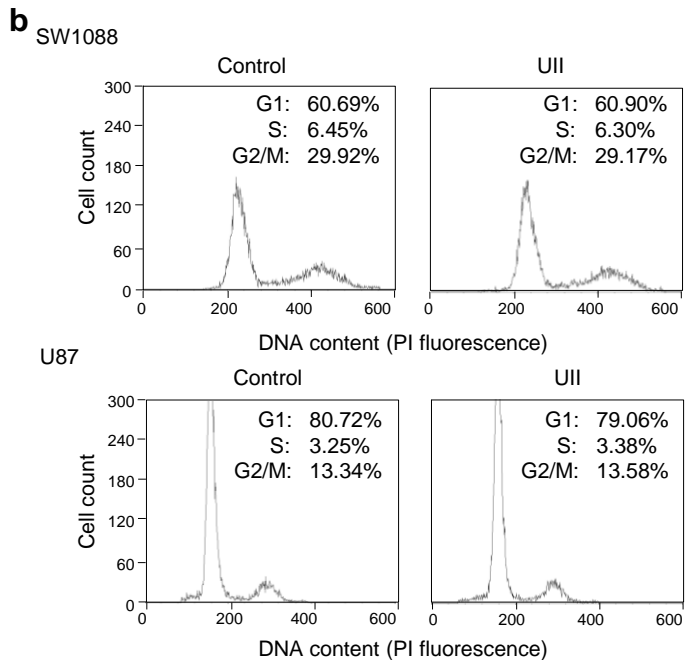
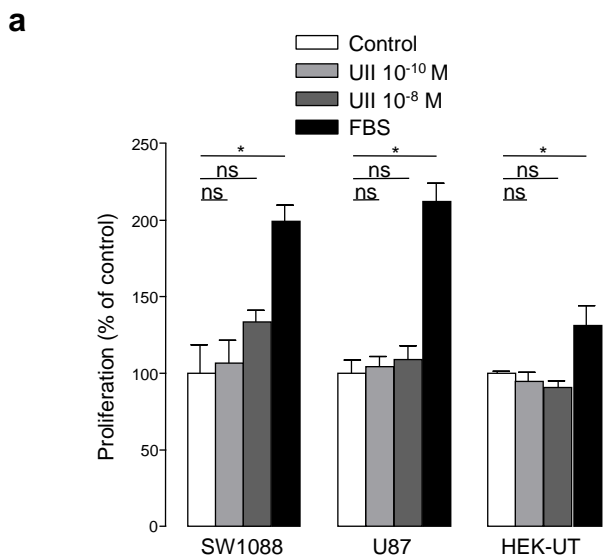


Figure Supp 2  
Lecointre *et al.*



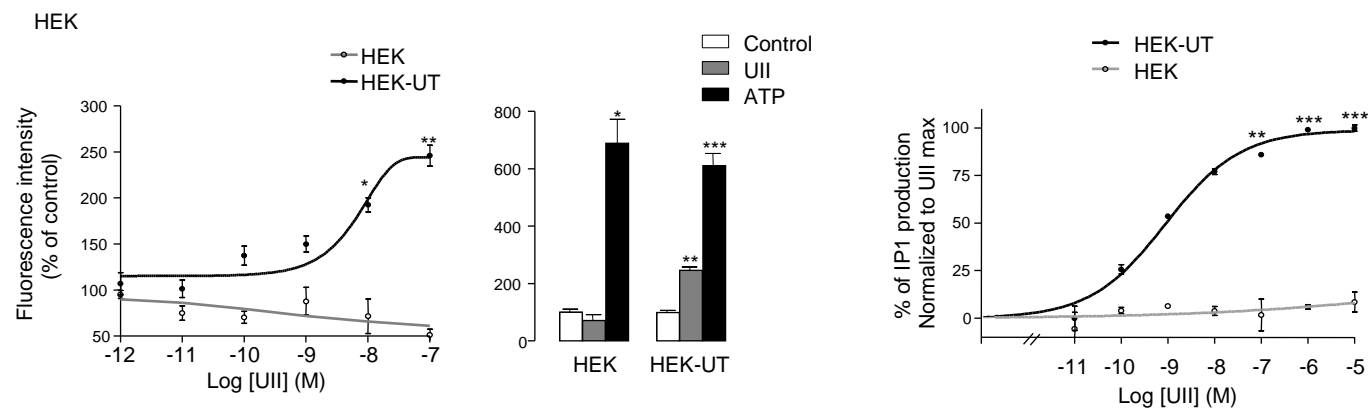
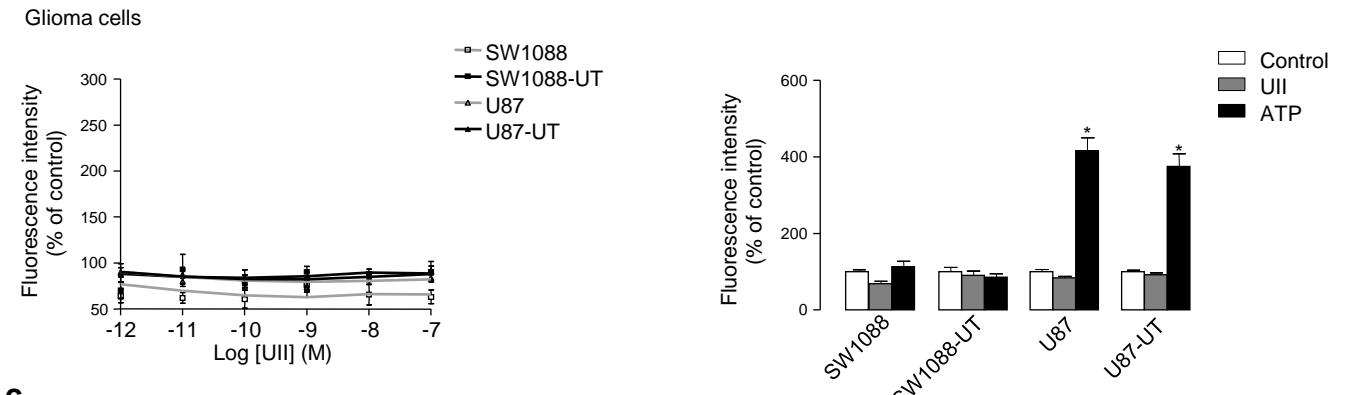
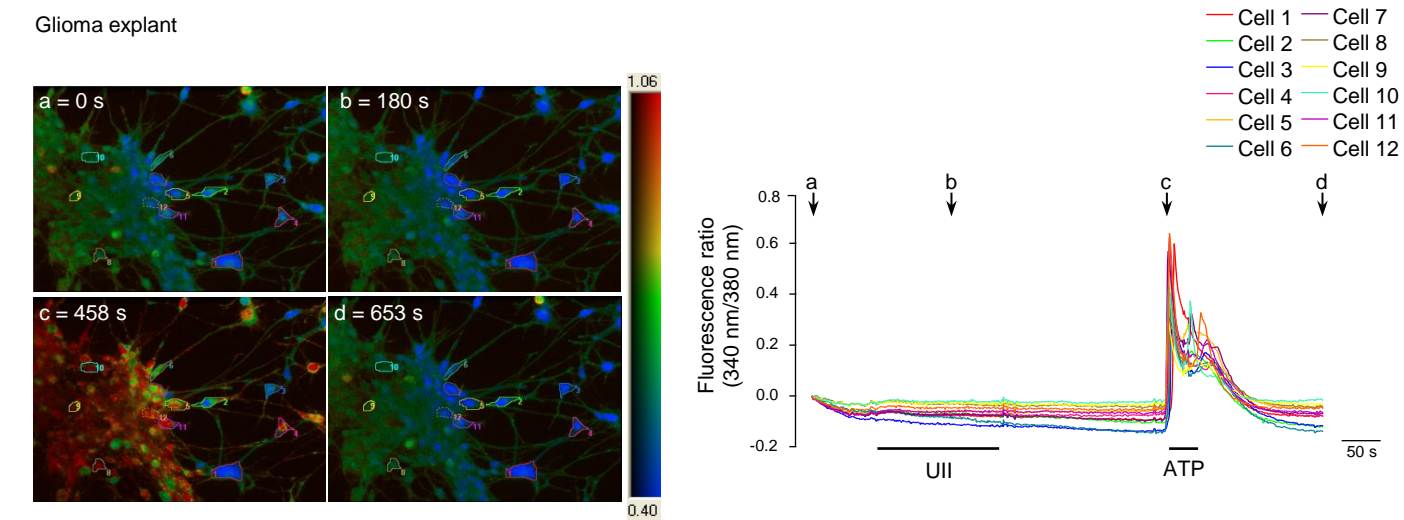
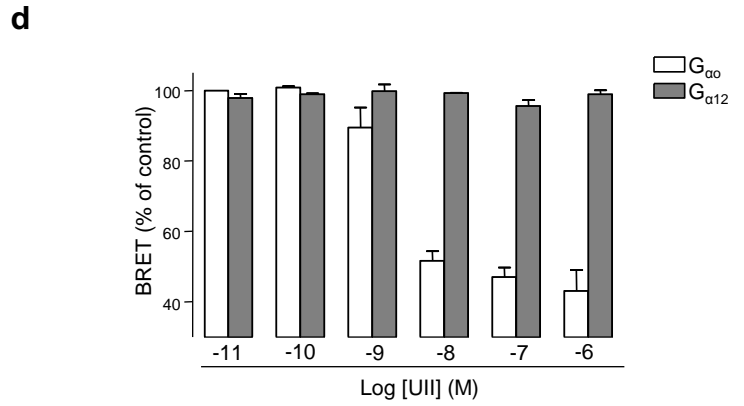
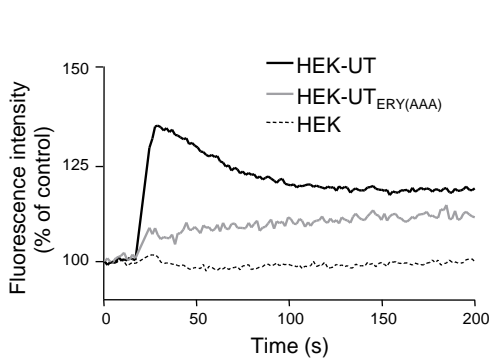
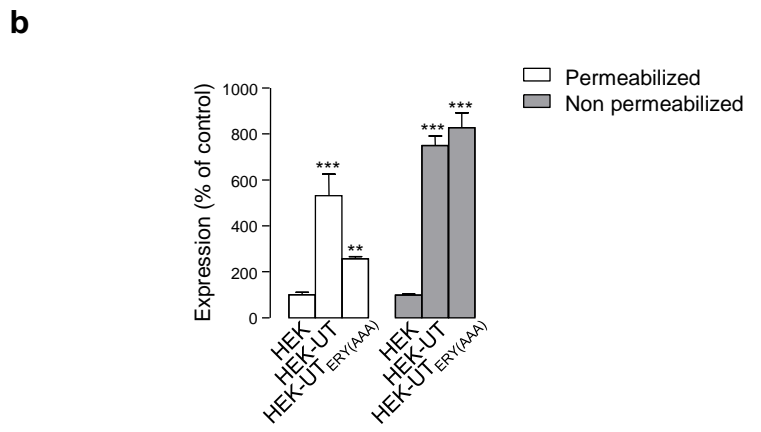
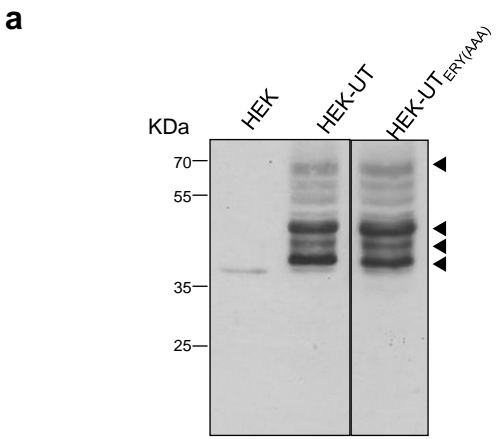
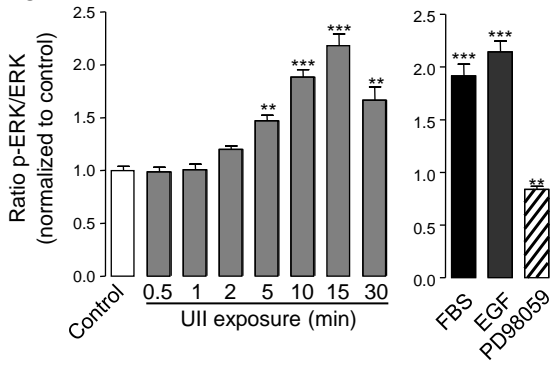
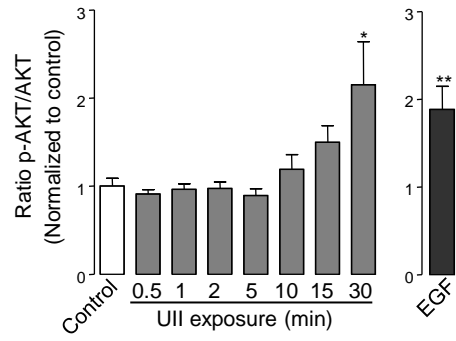
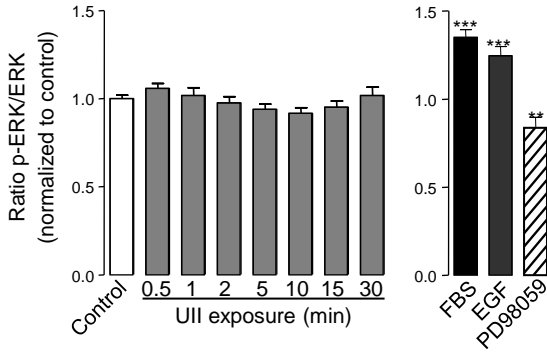
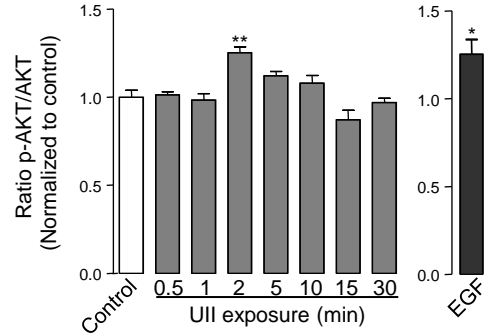
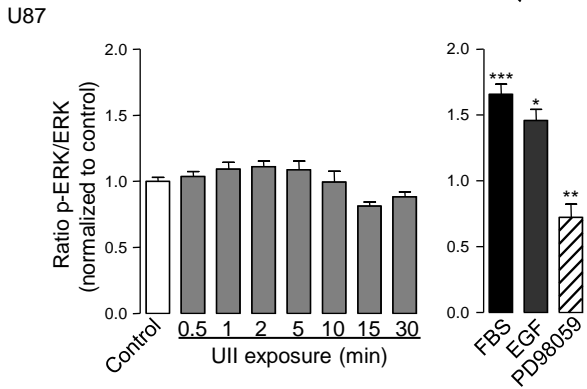
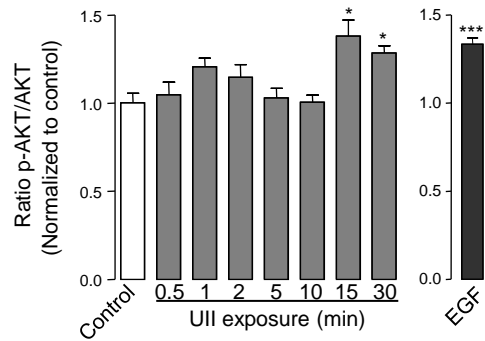
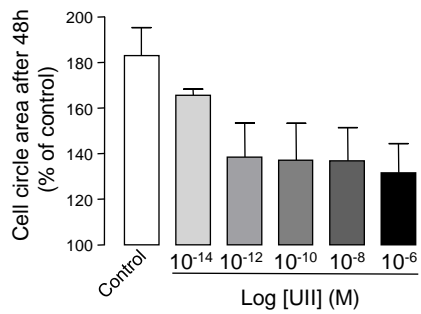
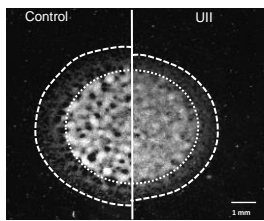
**a****b****c**

Figure Supp 4  
Lecointre *et al.*



**a** HEK-UT**b****c** SW1088**d****e****f**

**a****b**