



**Université de Strasbourg  
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé**

**Thèse**

Présentée pour le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG**

Discipline : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie  
Spécialité : Neurosciences

par

**Laurent JACOB**

Soutenue publiquement le 18 décembre 2013

**Propriétés anti-angiogéniques et anti-migratoires de peptides  
transmembranaires ciblant le complexe neuropiline-1/  
plexine-A1 dans le glioblastome.**

**Membres du jury**

Dr FEIGE Jean-Jacques  
Pr HONNORAT Jérôme  
Pr HAIECH Jacques  
Dr BAGNARD Dominique

DR, CEA, Grenoble  
PU, INSERM, Lyon  
PU, CNRS, Strasbourg  
MCU, INSERM, Strasbourg

Rapporteur externe  
Rapporteur externe  
Rapporteur interne  
Directeur de thèse

## Liste des abréviations

$\alpha$ SMA : Smooth Muscle Actin  $\alpha$ , alpha-actine des cellules musculaires lisses

ARN : Acide RiboNucléique

BACTH : Bacterial Adenylate Cyclase Two  
Hybride

CD3 : Cluster de Différenciation 3

CD4 : Cluster de Différenciation 4

CD31 Cluster de Différenciation 31

CD133 : Cluster de Différenciation 133

CDKN2A : Cyclin-Dependent Kinase inhibitor 2A

CHO: Chinese Hamster Ovary

C-KIT : V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog

C-MET : Met proto-oncogene, (Hepatocyte Growth Factor Receptor)

CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes

CRMP : Collapsin Response Mediator Protein

CUB : Complement binding protein homology

CXCR-4 : C-X-C chemokine Receptor type-4

DAP12 : DNAX Activation Protein

DCC : Deleted in Colorectal Cancer

DLL4: Delta Like Ligand -4

EAE : Experimental Autoimmune Encephalomyelitis

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFL7 : EGF-Like domain-containing protein 7

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

EGFRvIII : Epidermal Growth Factor Receptor variant III

EGR-1 : Early Growth Response protein -1

eNOS : endothelial Nitric Oxide Synthase

ERK 1/ 2 : Extracellular signal-Regulated Kinases 1/ 2

FAK : Focal Adhesion Kinase

FGFb: basic Fibroblast Growth Factor

FGFR1 / 2 / 3 / 4: Fibroblast Growth Factor Receptor 1 / 2 / 3 / 4

FlnA : Filamin-A

FLT-3: Fms-Like Tyrosine kinase -3

GABRA1: Gamma-AminoButyric Acid Receptor subunit alpha-1

GBM : Glioblastome Multiforme

GAPs : GTPase-Activating Proteins

GDP : Guanosine DiPhosphate

GEFs : Guanine Exchange Factors

GIPC : GAIP Interacting Protein, C terminus

GLUT-1 : Glucose Transporter -1

GPI : Glycosyl Phosphatidyl Inositol

GSK-3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinas-3 $\beta$

GTP : Guanosine TriPhosphate

Gy : Gray

HDAC7 : Histone Deacetylase 7

HER2 : Human Epidermal growth factor Receptor-2

HGF : Hepatocyte Growth Factor

HIF-1 $\alpha$ /  $\beta$ : Hypoxia Inducible Factor  $\alpha$  /  $\beta$

HTLV-1 : Human T-cell Lymphotropic

Virus type 1

IDH1/IDH2 : Isocitrate Dehydrogenase 1/ 2

IQGAP : IQ containing GTPase Activation Protein

ITAM : Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

JNK : c-Jun N-terminal Kinase

L1CAM : L1 Cell Adhesion Molecule

LARG : Leukemia Associated Rho6GEF

MAM : Mepri/A5/ $\mu$ -phosphatase

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinases

MBP : Myelin Basic Protein

MDM2 : Mouse Double Minute 2

mTOR : mechanistic Target Of Rapamycin

MTP : Membrane Targeting Peptide

NEFL : Neurofilaments

NRARP: Notch-Regulated Ankyrin Repeat Protein

NRP1 : Neuropiline-1

NRP2 : Neuropiline-2

NF1 : Neurofibromin-1

NFAT : Nuclear Factor of Activated T-cells

NG2 : Neural/Glial antigen-2

NIP : Neuropilin Interacting Protein

Nr-CAM : Neuronal Cell Adhesion

Molecule

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

OTK : Off-track

PAK : p21 Activated Kinase

PDGFA/ B : Platelet-Derived Growth Factor A/ B

PDGF-BB: homodimère composé de deux Platelet-Derived Growth Factor B

PDGFR  $\alpha$ /  $\beta$  : Platelet-Derived Growth Factor Receptor  $\alpha$ /  $\beta$

PAI-1: Plasminogen Activator Inhibitor -1

PDZ : PSD-95/Dlg/ZO-1

PI3K : Phosphatidylinositol 3 Kinase

PKC : Protein Kinase C

PKD : Protein Kinase D

PLC- $\gamma$  : Phospholipase C-gamma

PlexA1 : Plexine A1

PIGF: Placental Growth Factor

PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

pVHL : von Hippel-Lindau Ce

Ras : Rat sarcoma viral oncogene homolog

Raf : V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog

RB : Retinoblastoma-1

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

RnTPSNC : Recensement National des Tumeurs Primitives du Système Nerveux Central

RON : Récepteur d'Origine Nantais

SDF-1 $\alpha$  : Stromal cell-Derived Factor-1 $\alpha$

Sema3A : Sémaphorine 3A

siRNA : small interfering RNA

shRNA : small hairpin RNA

Shb : Src homology 2 domain containing adaptor protein B

SHH: Sonic Hedgehog

SAPK1: Stress-Activated Protein Kinase 1

SEA : sérine, acide glutamique, alanine

SMRs : Small Multidrug Resistance proteins

SOX4 : SRY-related HMG-box

SYT1 : Synaptotagmin-1

TCR : T Cell Receptor

TEP : Tomographie par Emission de Positrons

TGF $\beta$  : Transforming Growth Factor beta

TGF- $\beta$ R I / II : Transforming Growth Factor beta Receptor I / II

TIMPs: Tissue Inhibitors of Metalloproteases

TM : Transmembranaire

TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$

TP53 : Tumor protein p53

Treg : Regulatory T cells

TREM2 : Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2

TsAd : T-cell specific Adaptor

VE-cadherin : Vascular Endothelial cadherin

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR-1 / -2 / -3 : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1 / 2 / 3

## SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>4</b>
<b>I. LES TUMEURS DU SYSTEME NERVEUX CENTRAL</b>	<b>5</b>
<b>1. Epidémiologie</b>	<b>5</b>
<b>2. Les Gliomes</b>	<b>6</b>
2.1. Classification	6
2.1.1 Classification par type cellulaire	7
2.1.2 Classification par grade	7
2.1.3 Classification par localisation	11
2.1.4 La classification de Sainte-Anne	11
2.1.5 Limites des classifications	12
<b>3. Aspects cliniques des gliomes</b>	<b>13</b>
3.1. Symptômes et diagnostic médical	13
3.2. Pronostic et Survie	13
<b>4. Développement des gliomes</b>	<b>14</b>
4.1. Gliomagenèse	14
4.1.1. Altérations cytogénétiques et moléculaires des gliomes	14
4.1.2. Cellules d'origine des gliomes et voies de progression	15
4.1.3. Sous-types moléculaires	16
4.2. Cellules souches	17
4.3. L'angiogenèse physiologique et tumorale	18
<b>5. Traitement du glioblastome</b>	<b>20</b>
5.1. Traitement classique	20
5.2. Traitements ciblés	21
5.3. Le cas des traitements anti-angiogéniques	22
5.4. Traitements ciblant les cellules souches tumorales	24
<b>II. LE COMPLEXE NEUROPILINE-PLEXINE</b>	<b>25</b>
<b>1. Un complexe de récepteurs à la croisée de nombreuses fonctions biologiques et pathologiques</b>	<b>25</b>
1.1 Ligands du complexe neuropiline-plexine	25
1.1.1. Les sémaphorines	25
1.1.2. Les membres de la famille du VEGF	27
1.1.3. Autres ligands	28
1.2 Fonctions biologiques du complexe neuropiline-plexine	28
1.2.1. Rôle au cours du développement du système nerveux	28
1.2.2. Rôles dans le système cardiovasculaire	31

1.2.3.	Rôles dans le système osseux	34
1.2.4.	Dans le système immunitaire	35
1.2.5.	Implication dans les processus tumoraux	37
<b>2.</b>	<b>Présentation détaillée du complexe neuropiline-plexine</b>	<b>40</b>
2.1.	Les neuropilines	40
2.1.1	Structure des neuropilines	41
2.1.2	Données génétiques	43
2.2.	Identification des partenaires de signalisation des neuropilines	44
2.2.1.	Les plexines	44
2.2.2.	Les VEGFRs	44
2.2.3.	Les molécules d'adhérence	45
2.2.4.	Autres récepteurs	45
2.3.	La signalisation de neuropiline-1	46
2.3.1	Voies intracellulaires induites par la plexine-A1	46
2.3.2	Voies intracellulaires induites par les VEGFRs	48
2.4.	NRP1 est une cible thérapeutique validée	50
2.5.	Les plexines	52
2.5.1	La famille des plexines	52
2.5.2	Structures	52
2.6.	Les partenaires des plexines	54
2.6.1	Les neuropilines	54
2.6.2	Les récepteurs à activité tyrosine kinase	54
<b>III.</b>	<b>INTERACTIONS ENTRE DOMAINES TRANSMEMBRANAIRES</b>	<b>57</b>
1.	Les protéines membranaires et la membrane cellulaire	57
2.	Interactions entre segments transmembranaires	59
3.	Les motifs de dimérisation	61
4.	Mise en évidence de l'importance biologique des domaines transmembranaires	62
4.1.	Importance du segment transmembranaire pour les récepteurs à activité tyrosine kinase	62
4.2.	Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)	64
4.3.	Les récepteurs des molécules de la matrice extracellulaire	65
4.4.	Les récepteurs des cytokines	66
5.	Peptides transmembranaires comme agents thérapeutiques potentiels	67
6.	Notre stratégie peptidique	69
<b>RESULTATS</b>		<b>72</b>
<b>I.</b>	<b>CONTRIBUTION A L'ETUDE DE L'IMPACT DE L'INHIBITION DU DOMAINE TRANSMEMBRANAIRE DE NEUROPILINE-1 SUR L'ANGIOGENESE ET LA CROISSANCE DES GLIOMES</b>	<b>75</b>
	Objectifs et résumé des résultats	75

## **II. POURSUITE DE LA VALIDATION PRECLINIQUE DU PEPTIDE MTP-NRP1 ET DETERMINATION DU MOTIF MINIMAL NECESSAIRE POUR INDUIRE LES EFFETS INHIBITEURS**

**78**

- 1. Confirmation de l'effet anti-angiogénique du peptide MTP-NRP1** **78**
- 2. Analyse de la capacité de MTP-NRP1 à interférer avec les plateformes de signalisation** **80**
- 3. Validation des effets anti-tumoraux de MTP-NRP1 sur une seconde lignée de glioblastome humain.** **81**
- 4. Identification du motif minimal responsable de l'effet inhibiteur du peptide** **82**
  - 4.1. Mesure des effets anti-angiogéniques : test de culture des cellules HUVECs sur matrigel. **83**
  - 4.2. Mesure des effets anti-migratoires des peptides courts **83**
  - 4.3. Mesure des effets anti-tumoraux in vivo **83**

## **III. L'INHIBITION DE PLEXINE-A1 PAR UN PEPTIDE CIBLANT SON DOMAINE TRANSMEMBRANAIRE REDUIT LE DEVELOPPEMENT TUMORAL ET L'ANGIOGENESE ASSOCIEE DANS LE GLIOBLASTOME**

**86**

## **DISCUSSION ET PERSPECTIVES**

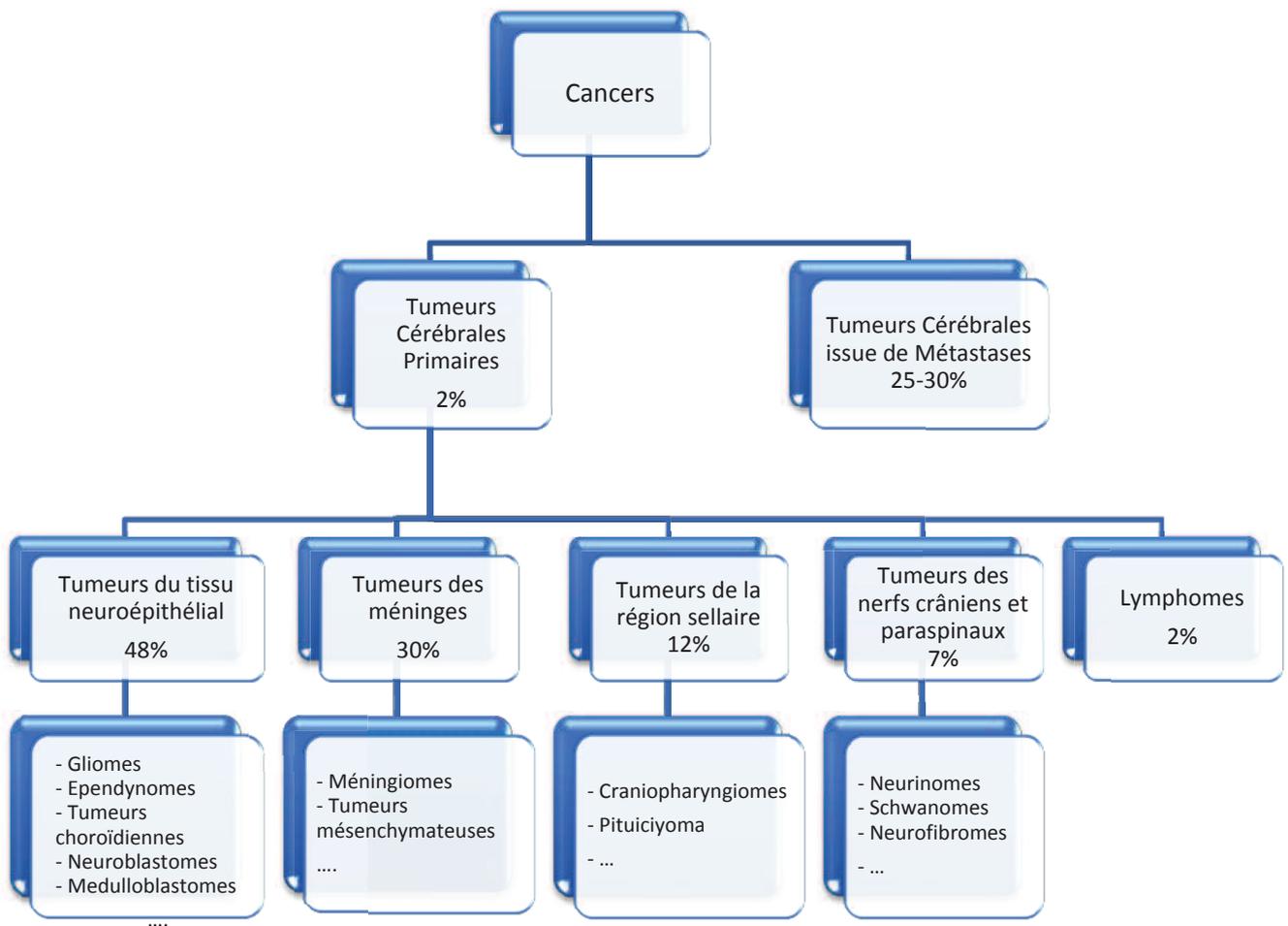
**88**

- 1. MTP-NRP1 est un puissant inhibiteur de l'angiogenèse** **89**
- 2. MTP-NRP1 permet l'inhibition spécifique de certains récepteurs** **91**
- 3. Vers une forme optimisée du peptide MTP-NRP1 ?** **92**
- 4. MTP-NRP1 est un inhibiteur de la croissance des cellules de gliome** **94**
- 5. MTP-NRP1 est un composé thérapeutique bien toléré** **95**
- 6. Plexine-A1 est un marqueur diagnostique et pronostique des GBM** **96**
- 7. Le domaine TM de plexine-A1 est au cœur de la formation d'une plateforme de signalisation** **98**
- 8. MTP-PlexA1 est un perturbateur du complexe PlexA1-NRP1** **101**
- 9. MTP-PlexA1 inhibe la fonction pro-angiogénique de plexine A1** **102**
- 10. MTP-PlexA1 est un inhibiteur de la croissance tumorale in vivo** **103**
- 11. Vers une nouvelle classe de thérapie ciblée des cancers ?** **105**

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**106**

# Introduction



**Figure 1: Représentation de la classification des tumeurs du système nerveux.** Les pourcentages indiqués sont représentatifs de chaque sous-groupe. D'après les données de l'OMS (Louis et al., 2007).

# I. Les Tumeurs du système nerveux central

## 1. Epidémiologie

Les tumeurs du système nerveux central désignent l'ensemble hétérogène et complexe des tumeurs qu'elles soient bénignes ou malignes, se développant dans le tissu du système nerveux central, aussi bien dans l'encéphale, dans la moelle épinière, ses prolongements ou ses enveloppes.

On peut observer deux grands groupes, les tumeurs primitives qui se développent directement à partir de cellules du système nerveux et les tumeurs issues de métastases qui découlent de cellules métastatiques provenant d'un cancer se développant dans un autre organe. Ces cellules métastatiques proviennent le plus souvent d'un cancer du poumon (34 %), du sein (30 %) (Sperduto, 2003), du rein, des mélanomes ou encore des cancers colorectaux. Les tumeurs cérébrales primitives ne représentent que 2 % de toutes les formes de cancer alors que les tumeurs cérébrales secondaires concernent entre 25 et 30 % des patients.

Ce travail est focalisé sur les tumeurs primitives. Elles sont subdivisées, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (Louis et al., 2007), en sous-groupes dépendant principalement de leur origine cellulaire, de leur niveau d'agressivité (leur grade) et de leur localisation. On retrouve donc (**Figure 1**) les tumeurs du tissu neuroépithélial (48 %) dérivant des neurones ou cellules gliales, les tumeurs dérivant des méninges (30 %), les tumeurs de la région sellaire (12 %), les tumeurs des nerfs crâniens et paraspiniaux (neurinomes ou schwannome, 8 %) dérivant des cellules de Schwann, les lymphomes cérébraux provenant d'une infiltration lymphocytaire (2 %) ainsi que les tumeurs des cellules germinales cérébrales qui sont extrêmement rares.

La fréquence des tumeurs primitives du système nerveux central (SNC) a été estimée en France pour la première fois par le registre Girondin. Cette étude a montré que l'incidence est de 15,5/100 000 habitants/an chez l'adulte (Elia-Pasquet et al., 2004). Le Recensement National des Tumeurs Primitives du Système Nerveux Central (RnTPSNC) a estimé cette incidence à 15,8/100 000 habitants/an sur l'ensemble de la population française (Bauchet et al., 2007). Différentes études semblent indiquer une augmentation de l'incidence globale des tumeurs primitives du système nerveux mais cette augmentation semble essentiellement liée à l'amélioration des approches diagnostiques ainsi qu'au vieillissement de la population (Hoffman et al., 2006).

Dans la suite de ce travail nous allons nous focaliser sur les gliomes et plus particulièrement le glioblastome multiforme, la forme la plus agressive et la plus courante des tumeurs du système nerveux central (environ 25 %).

## **2. Les Gliomes**

Les gliomes représentent presque 50 % des tumeurs primitives du système nerveux central avec une incidence comprise entre 3 et 6 pour 100 000 habitants selon les pays et les classifications.

Environ 5000 nouveaux cas par an en France, correspondant à une incidence de 5,25 pour 100 000 (6,3 pour l'homme et 4,2 pour la femme). Chez l'enfant, elles sont plus rares que chez l'adulte, mais restent plus fréquentes que les autres types de tumeurs (taux d'incidence de 2,4 pour 100 000 chez les garçons et de 1,5 pour 100 000 chez les filles avant 15 ans).

Au-delà de 50 ans, la progression des taux d'incidence est plus marquée, pour atteindre une valeur maximale de 26,9 pour 100 000 entre 75 et 79 ans chez les hommes et de 17,6 pour 100 000 entre 70 et 74 ans chez les femmes.

Il a été répertorié 3052 décès dus à des gliomes en 2012 dont 58 % chez l'homme. Ce cancer se situe au 13<sup>e</sup> rang des décès parmi 19 localisations examinées (les taux de mortalité, standardisés en fonction de l'âge, sont de 3,6 chez l'homme et de 2,2 chez la femme (Binder-Foucard et al, 2013).

### **2.1. Classification**

Elle vient historiquement de deux premières tentatives de classification proposées par Cushing et Bailey en 1926 et Kernohann en 1949 (KERNOHAN and MABON, 1949). La dernière classification de l'OMS date de 2007 (Louis et al., 2007).

Phénotypes	Différenciation	Densité cellulaire	Atypies nucléaires	Activité mitotique	Prolifération microvasculaire	Nécrose
Astrocytomes						
Grade II	Bien différencié	Modérément augmentée	Occasionnelles	Généralement absente	Absente	Absente
Grade III	Anaplasie régional ou diffuse	Augmentée	Présentes	Présente	Absente	Absente
Grade IV (GBM)	Faible	Fortement augmentée	Très marquées	Très marquée	Présente	Présente
Oligodendrogliomes						
Grade II	Bien différencié	Modérément augmentée	Peu marquées	Absente ou occasionnelle	Absente	Peu présente
Grade III	Anaplasie régionale ou diffuse	Augmentée	Marquées	Importante	Souvent importante	Peut être présente
Oligoastrocytomes						
Grade II	Bien différencié	Modérément augmentée	Occasionnelles	Absente ou occasionnelle	Absente	Absente
Grade III	Anaplasie	Fortement augmentée	Marquées	Forte	Peut être présente	Absente (sinon GBM)

**Tableau 1: Classification et critères histologiques des Gliomes.** (Adapté de Ricard, Ricard et al., 2012).

### 2.1.1 Classification par type cellulaire

La première étape, selon l'OMS, consiste donc à déterminer le type histologique de la tumeur pour pouvoir classer les gliomes dans une des familles déterminées par la cellule d'origine présumée dont-ils dérivent et donc plus exactement par des critères de ressemblance morphologique des cellules tumorales qui les composent avec les cellules cérébrales de la glie.

- Les astrocytomes dérivent des cellules astrocytaires.
- Les oligodendrogliomes sont composés d'oligodendrocytes.
- Les oligo-astrocytomes résultent d'un mélange de ces deux types cellulaires mais l'OMS n'a pas donné de proportions respectives des deux types cellulaires pour apposer un diagnostic d'oligo-astrocytome.
- Les épendynomes apparaissent à partir des cellules épendymaires.
- Les ganglioneuromes se développent le long du nerf sympathique.
- Et les tumeurs dérivant des cellules du plexus choroïde.

### 2.1.2 Classification par grade

L'OMS stratifie ensuite les gliomes selon leur agressivité et leur degré de malignité, par cinq critères histologiques qui vont déterminer leur appartenance à un certain grade : la densité cellulaire, l'atypie cellulaire, l'activité mitotique, la prolifération endothélio-capillaire ainsi que la nécrose (**Tableau 1**).

#### **Grade I :**

Les tumeurs ne présentent aucun des critères histologiques cités auparavant, il s'agit dans la plupart des cas de tumeurs bénignes comme les astrocytomes pilocytiques, l'astrocytome sous-épendymaire à cellules géantes, les gangliogliomes, les tumeurs neuroépithéliales dysembryoplasiques. Ce sont des tumeurs bien délimitées par rapport au parenchyme cérébral qui évoluent le plus souvent lentement et dont la croissance peut s'arrêter spontanément. Elles présentent un très bon pronostic de survie après exérèse de la tumeur et sont également peu récidivantes. Elles sont relativement rares chez l'adulte mais représentent 40 % à 50 % des tumeurs cérébrales chez l'enfant.

## **Grade II :**

Il représente 15 % des gliomes (incidence de l'ordre de 1/100 000 habitants par an). Ils affectent essentiellement les patients jeunes (âge médian aux alentours de 40 ans).

Ces tumeurs ne doivent plus être considérées comme des tumeurs «bénignes», mais bien comme des tumeurs «précancéreuses». La différenciation cellulaire est importante. L'atypie nucléaire est présente légèrement dans la tumeur, la croissance tumorale est relativement lente (4 mm/an) avec la possibilité d'évolution vers un grade supérieur avec un caractère infiltrant dans le tissu sain. Les récurrences sont relativement courantes. L'index de prolifération, déterminé par l'immunomarquage anti-Ki67, est habituellement en moyenne de 3,8 % (Wakimoto et al., 1996). Le marqueur GFAP est exprimé par les astrocytes normaux et également par certains oligodendrocytes, il ne peut donc pas servir de marqueur prédictif de l'astrocytome mais valide l'origine gliale de la tumeur.

L'astrocytome diffus ou infiltrant, présente un fort degré de différenciation astrocytaire, une croissance lente accompagnée d'une infiltration dans le parenchyme cérébral adjacent. Il se développe particulièrement chez les jeunes adultes et progresse régulièrement vers des stades supérieurs (III ou IV).

Sur le plan histologique l'OMS distingue trois sortes d'astrocytomes diffus :

-Les astrocytomes fibrillaires qui sont les plus fréquents, doivent leur nom à leur ressemblance avec les astrocytes fibreux de la substance blanche. Ces cellules ne présentent que peu de cytoplasme et on peut les distinguer d'un astrocyte normal par leurs atypies nucléaires.

-Les astrocytomes gémistocytiques correspondent aux tumeurs présentant plus de 20 % de noyaux gémistocytiques néoplasiques ce qui correspond à des cellules avec un cytoplasme abondant, éosinophile ballonné et également avec un noyau excentré contenant un petit nucléole. La présence dans ce bas grade est controversée par le fait que ces tumeurs évoluent très régulièrement vers des formes plus agressives.

-Les astrocytomes protoplasmiques sont composés principalement par des astrocytes néoplasiques et se rapprochent plus de la morphologie des astrocytes protoplasmiques de la substance grise. Ils ont des petits corps cellulaires, des prolongements pauvres en gliofilaments et un noyau rond ou ovale. Ils sont très rares.

L'oligodendrogliome

Ce sont des tumeurs de l'adulte, composées de cellules morphologiquement proches des oligodendrocytes, bien différenciées, infiltrantes et localisées dans les hémisphères cérébraux. Elles ont une densité cellulaire modérée, ce sont des cellules à noyau rond avec un halo péri-nucléaire qui leur donne l'aspect d'un "œuf au plat" et la clarification du cytoplasme leur donne un aspect de nid "d'abeille" à faible grossissement. Elles ont un réseau dense de capillaires ramifiés et des micro-calcifications. D'autres types d'oligodendrocytes néoplasiques peuvent être présents dans les oligodendrocytomes comme les minigémistocytes qui ressemblent à de petits gémistocytes, des oligodendrocytes gliofibrillaires avec un cytoplasme rempli de fibrilles, et des cellules granuleuses éosinophiles.

Il n'y a pas, non plus, de marqueur immunohistochimique capable de reconnaître l'oligodendrocyte tumoral.

#### L'oligoastrocytome

Selon la classification de l'OMS, il se définit par « la présence évidente de deux types cellulaires ressemblant morphologiquement aux cellules tumorales des astrocytomes et aux cellules tumorales des oligodendrogliomes de grade II ». Les deux composantes astrocytaire et oligodendrogliale peuvent être distinctes ou entremêlées. Les caractéristiques morphologiques et histologiques en sont peu modifiées.

#### **Grade III :**

Ce sont des gliomes anaplasiques que l'on retrouve également sous trois formes : astrocytomes anaplasiques, oligodendrocytomes anaplasiques et oligoastrocytomes anaplasiques. Ils représentent 20 % des cas de gliomes (Rigau et al., 2011) et sont retrouvés plus particulièrement chez les patients adultes avec une moyenne d'âge de 45 ans. L'incidence se situe aux alentours de 0,626 cas/1000 000 habitants chez l'adulte (Baldi et al., 2011). Ils peuvent se développer de novo ou suite à l'évolution d'un grade inférieur (gliomes diffus de grade II), on parle alors de transformation anaplasique. Cette catégorie de gliome anaplasique montre une forte hétérogénéité en termes de critères histologiques, cliniques ou de survie. En effet, pour un même diagnostic histologique, la survie des patients peut extrêmement varier, soit se rapprocher de celle d'un glioblastome (grade IV) et être de très mauvais pronostic ou bien se rapprocher de celle, bien meilleure, d'un gliome de grade II. Cette disparité reflète la difficulté de dissocier ces différentes classes en fonction du grade.

D'un point de vue histologique on va retrouver une atypie nucléaire prononcée, une forte prolifération (18,4 % d'index mitotique) associée à une angiogénèse. Ces gliomes

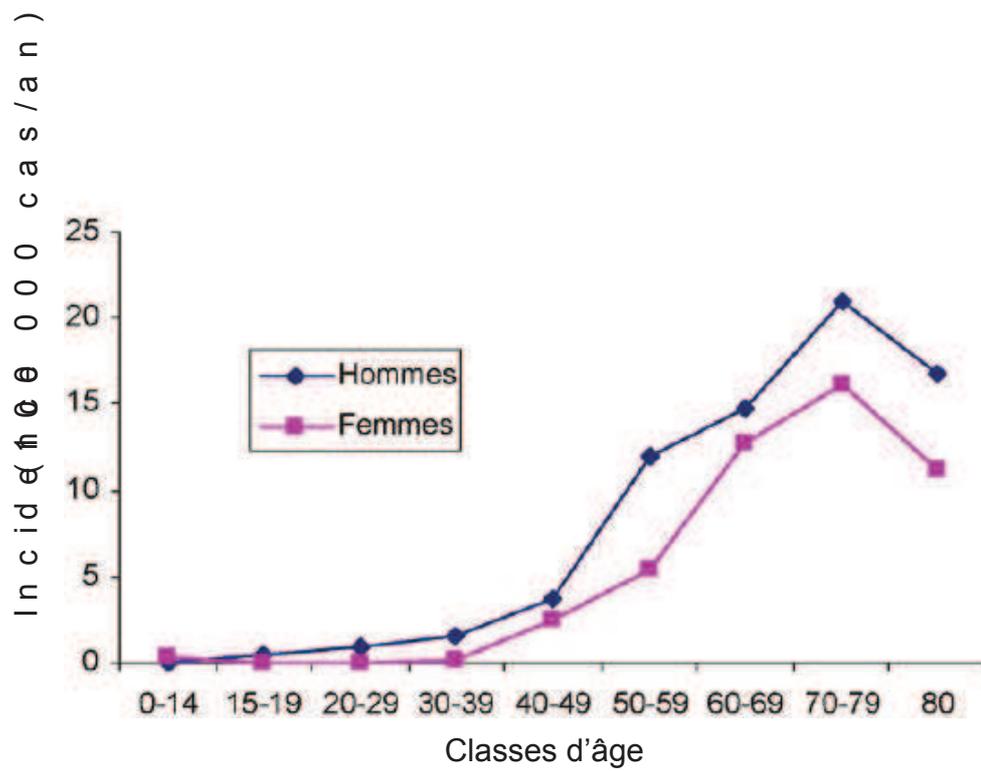


Figure 2: Incidence des glioblastomes selon l'âge et le sexe. Adaptée de Baldi I. et al 2010

peuvent diffuser dans d'autres zones saines du cerveau à partir du foyer primaire. Ils ont tendance à évoluer en grade supérieur et l'on observe souvent une récurrence post chirurgicale chez les patients.

#### **Grade IV :**

Appelé aussi glioblastome multiforme (GBM), l'incidence de ces tumeurs varie selon les pays. En France, elle est de 4,96/100 000 (Baldi et al., 2010) si l'on se base sur le registre Gironde et de 3,3/100 000 aux Etats-Unis. Les GBM représentent autour de 50 % des gliomes totaux, ce qui équivaut à environ 2000 cas histologiques par an en France (Zouaoui et al., 2012). L'incidence est très faible chez les enfants mais augmente avec l'âge pour atteindre un âge médian d'environ 64 ans (**Figure 2**). Le glioblastome prédomine chez l'homme (1,5 cas pour une femme)

Ce sont les tumeurs du système nerveux central les plus malignes. Elles ont une croissance très rapide et par conséquent un taux mitotique très élevé, avec un index de 31,6 %. Elles infiltrent fortement les autres zones saines du cerveau. L'atypie nucléaire y est très forte, on trouve des noyaux volumineux et polylobés, des nucléoplasmes clairs, de petits nucléoles ainsi qu'un cytoplasme d'aspect granuleux. L'angiogénèse est également importante pour maintenir la croissance. D'ailleurs, on considère que le GBM est la tumeur la plus angiogénique. Les tumeurs présentent des zones de nécrose dues à une croissance forte, induisant de l'hypoxie engendrant des vagues de mort cellulaire.

Différents sous-types de GBM appelés «variants» ou «patterns» ont été définis selon l'OMS 2007 d'un point de vue histopathologique par rapport au GBM «classique».

Les «variants» sont des GBM présentant des légères différences génomiques, morphologiques, histologiques et biologiques en comparaison des GBM classiques. Ces variations vont aboutir à des évolutions différentes de la tumeur et donc à une survie pour le patient également variable.

- Le gliosarcome : tumeur mixte rare composée d'un contingent malin glial, le plus souvent astrocytaire, et d'un contingent mésenchymateux.
- Les GBM à cellules géantes sont bien délimités mais leur présence est un critère de malignité.

Les «patterns» sont les GBM présentant seulement des modifications histologiques n'induisant pas d'impact pour la survie du patient.

- Le GBM à composante oligodendrogliale, foyer formé au sein d'un glioblastome.

### Espace supratentoriel

Gliomes  
Tumeurs choroïdiennes  
Méningiomes  
Lymphomes

### Espace sous-tentoriel

#### Thalamus/Hypothalamus

Tumeurs pontines  
Gliomes  
Gangliomes

#### Tronc cérébral

Tumeurs pontines  
Ependynomes  
Astrocytomes

#### Cervelet

Médulloblastomes  
Ependynomes  
Astrocytomes

Tentorium

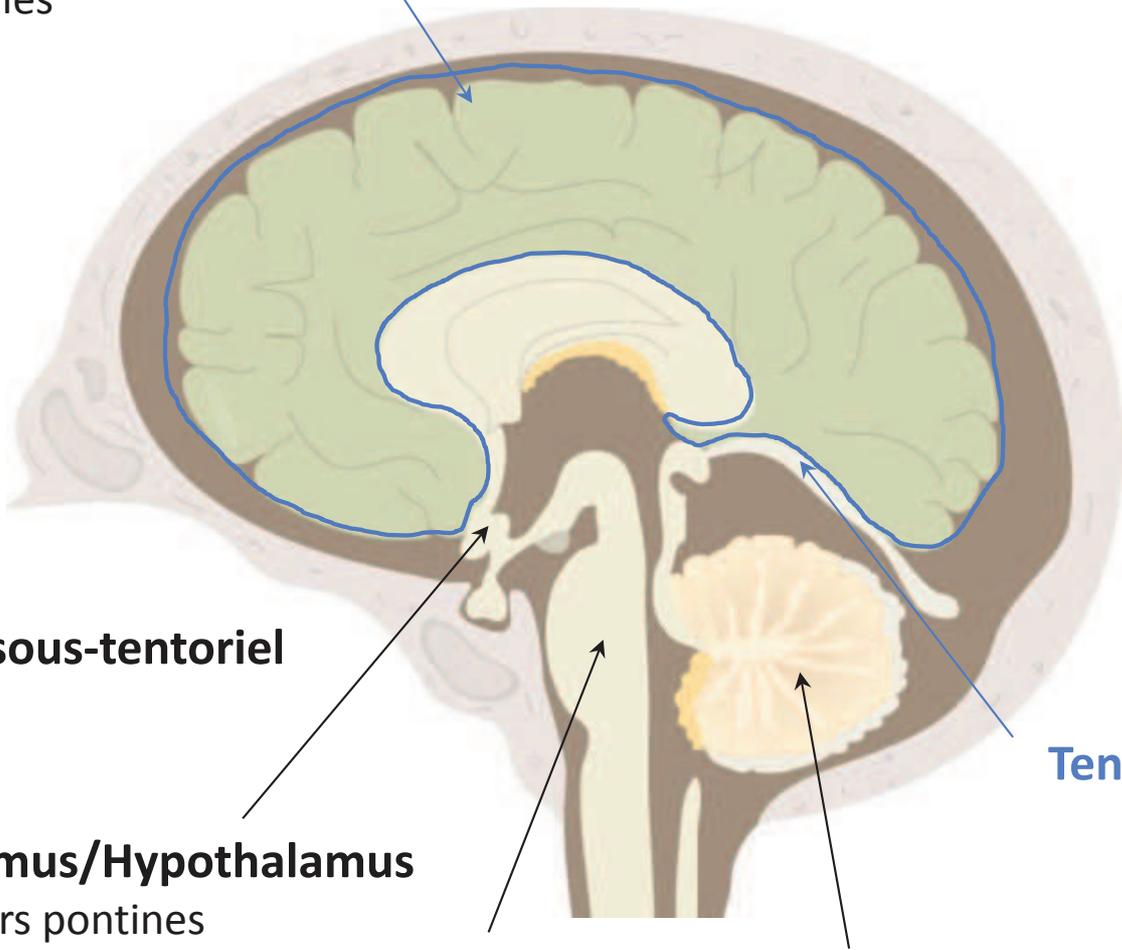


Figure 3: Coupe sagittale du cerveau humain avec la localisation des tumeurs selon le tentorium. Adaptée d'Adam et Mokthari 2011 et de Global Medical Education Project.

- Les GBM à petites cellules ont une taille plus restreinte que les autres GBM, due à leur faible rapport nucléocytoplasmique, puisque les cellules présentent peu ou pas de cytoplasme, l'activité mitotique y est particulièrement forte.
- Les GBM lipidisés sont rares, et on observe dans les cellules une surcharge lipidique cytoplasmique à l'origine de leur nom ; cette caractéristique est un critère de malignité.

### 2.1.3 Classification par localisation

Les gliomes peuvent être classés selon leur localisation par rapport à la membrane du tentorium qui sépare le cerveau (au-dessus) du cervelet (en dessous) (**Figure 3**).

Les tumeurs se développant au-dessus du tentorium sont appelées supratentorielles et sont à 70 % retrouvées chez l'adulte.

Les tumeurs se développant en-dessous du tentorium sont appelées sous-tentorielle et sont à 70 % retrouvées chez l'enfant.

Lorsqu'elles se développent dans le pont, qui est la partie centrale et renflée du tronc cérébral située entre le mésencéphale et le myélocéphale, impliqué dans des fonctions comme la motricité et la respiration, on les désigne comme des tumeurs pontines.

### 2.1.4 La classification de Sainte-Anne

En France, s'est développé un autre système de grade appelé la classification de Sainte-Anne (Daumas-Duport et al., 2000). Elle se base sur des données cliniques, diagnostiques, radiologiques et histopathologiques. Elle sépare les tumeurs selon leur structure solide ou infiltrante. On sait que les structures dites solides vont avoir une micro-angiogenèse plus importante et par conséquent augmenter la prise de contraste. Ainsi, la classification utilise ces deux critères : la présence d'une hyperplasie endothéliale et d'une forte prise de contraste en imagerie. Dans ces conditions il y a donc deux grades observés pour chaque catégorie :

Grade A : Pas d'hyperplasie endothéliale et de prise de contraste

Grade B : Présence d'hyperplasie endothéliale et/ou de prise de contraste

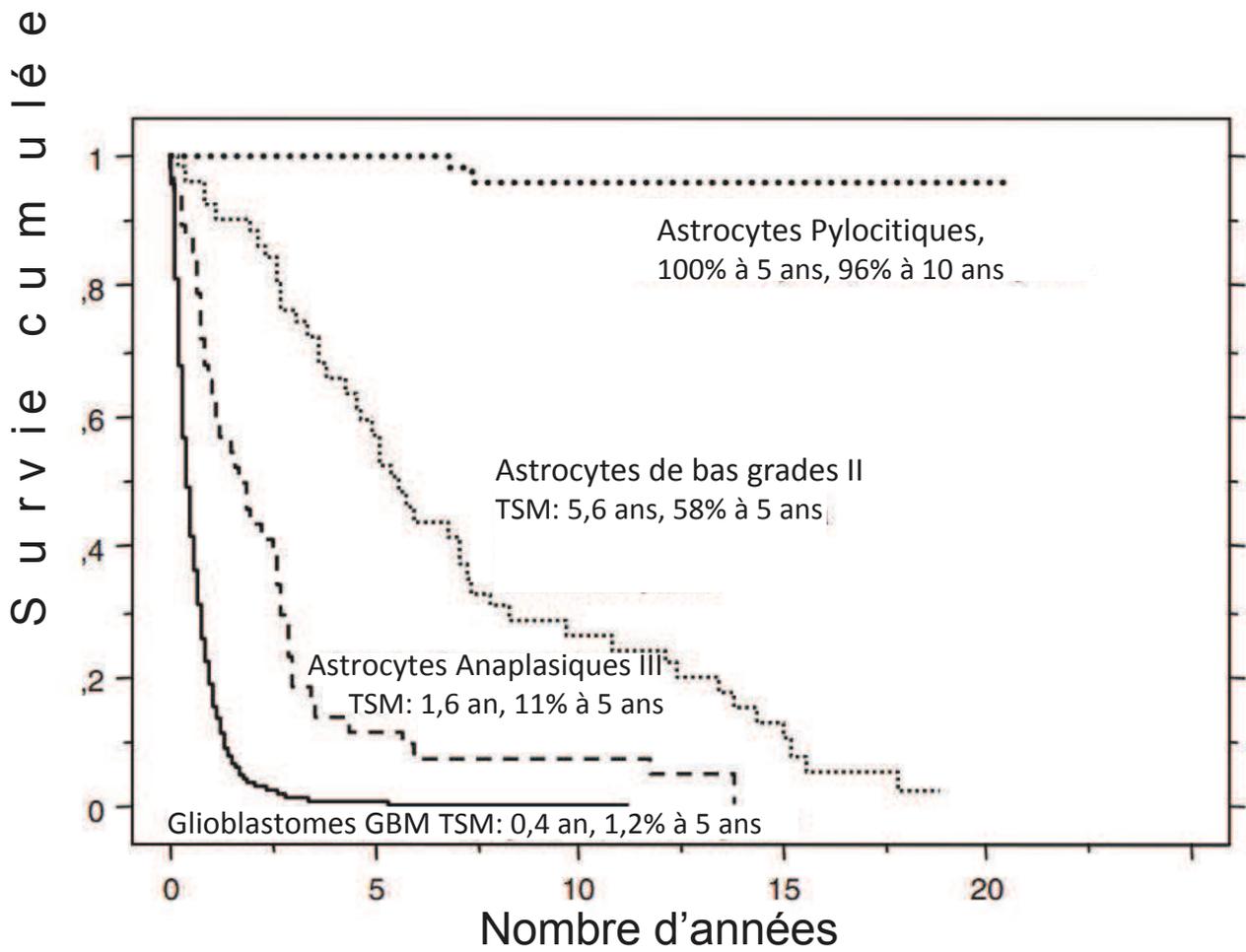
Avec ces critères, la classification de Sainte-Anne ne reconnaît pas l'astrocytome diffus de l'OMS. Elle défend que ce diagnostic serait dû à la présence de la gliose astrocytaire induite par l'oligodendrogliome infiltrant et qu'elle induirait donc une erreur d'interprétation.

L'avantage principal de cette classification est la prise en compte des données d'imagerie dans le diagnostic qui permet d'être plus reproductible mais aussi de s'affranchir des problèmes de non représentativité des biopsies dans des tumeurs hétérogènes. L'imagerie va être considérée comme une vue macroscopique de la tumeur. Malgré cela, cette classification a du mal à s'imposer face à la classification de l'OMS qui bénéficie d'une meilleure reconnaissance internationale.

### **2.1.5 Limites des classifications**

Ces classifications reposent en partie sur des données histologiques, morphologiques et cliniques qui sont dépendantes de l'observateur et donc subjectives, ce qui peut expliquer la variabilité inter- et même intra- observateurs lors de la pose d'un diagnostic pour un même patient à partir du même échantillon. En effet, une étude a démontré que le taux de concordance diagnostique, pour 4 anapathologistes différents analysant une série de gliome est d'environ 69 % (Coons et al., 1997). De plus, une autre étude a mis en évidence la concordance diagnostique faible de 50 % d'un même anapathologiste pour une même série de biopsies (Mittler et al., 1996). Nous savons aussi que le diagnostic est déterminé à partir d'une carotte obtenue par biopsie du patient et que cette carotte ne représente qu'une partie de la tumeur. Par conséquent, il est possible d'obtenir un diagnostic de faux négatif si la biopsie est par exemple dans une région peu agressive de la tumeur ou à l'inverse en diagnostiquant un faux positif par une biopsie non représentative de la gravité de la tumeur (Glantz et al., 1991). De plus, le nombre, le volume ainsi que la répartition spatiale des foyers tumoraux ne sont pas pris en compte dans ces classifications.

Aujourd'hui, une classification moléculaire des gliomes se développe. Elle se base sur des données génomiques, épigénétiques et sur des marqueurs moléculaires (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). Dans un futur proche il serait souhaitable d'avoir une intégration des approches histologiques, d'imageries et moléculaires afin d'obtenir une meilleure relevance clinique en améliorant la stratification des patients.



**Figure 4: Courbes de survie de patients atteints d'astrocytomes de différents grades.** TSM: Temps de Survie Moyen exprimé en année. Les pourcentages indiquent la survie à l'année indiquée. Adaptée de Ohgaki, 2009

### 3. Aspects cliniques des gliomes

#### 3.1. Symptômes et diagnostic médical

Les symptômes induits varient selon la localisation et la taille de la tumeur mais pas forcément en fonction du sous type de tumeurs. Ces symptômes neurologiques sont essentiellement des problèmes moteurs, des troubles de la conscience et des ataxies (problèmes de coordination des mouvements), de l'hypertension intracrânienne provoquant des maux de tête intenses et la survenue de crises d'épilepsie sans antécédents médicaux pour le patient. Tous ces symptômes sont des éléments précurseurs qui vont amener à faire des examens plus approfondis utilisant l'imagerie médicale avec ou sans contraste. L'imagerie par Résonance Magnétique (IRM) est l'examen de référence, un scanner cérébral ou une Tomographie par Emission de Positrons (TEP) sont également possibles. Aujourd'hui l'imagerie médicale est essentielle pour poser rapidement un diagnostic même si celui-ci nécessite une analyse histo-pathologique de la biopsie pour le valider et affiner le sous type. De plus, ces techniques d'imagerie vont pouvoir aider dans la localisation et la visualisation de la tumeur pour la résection chirurgicale ainsi que dans le suivi et la surveillance de la réponse aux traitements.

#### 3.2. Pronostic et Survie

Les facteurs pronostiques sont les suivants :

- L'âge du patient : les patients plus jeunes tolèrent mieux les traitements et y répondent généralement mieux.
- L'indice de performance de l'OMS qui va définir la capacité d'autonomie du patient. Plus il est élevé plus la maladie le rend dépendant.
- Le statut cognitif : il est corrélé avec une meilleure survie si celui-ci est bon.
- La qualité macroscopique de la résection chirurgicale. Plus l'exérèse de la tumeur est totale (peu de tissu résiduel tumoral et d'infiltration dans le tissu sain) plus le risque de récurrence diminue.
- Le phénotype tumoral : les oligodendrogliomes ont un meilleur pronostic que les gliomes mixtes qui ont eux-mêmes un meilleur pronostic que les astrocytomes.
- Le grade tumoral : il est inversement corrélé avec la survie (**Figure 4**).

- Les facteurs génétiques : la délétion complète du chromosome 1p caractérise un sous-groupe de tumeurs oligodendrogiales présentant une meilleure réponse aux traitements et donc un bon pronostic. La méthylation du promoteur de la MGMT est associée à une survie prolongée chez les patients atteints de GBM ou de gliomes anaplasiques traités avec des agents alkylants tels que le Témazolomide (Hegi et al., 2005). La mutation IDH1 semble être de bon pronostic quel que soit le type histologique et le grade tumoral (Sanson et al., 2009), (Yan et al., 2009).

## 4. Développement des gliomes

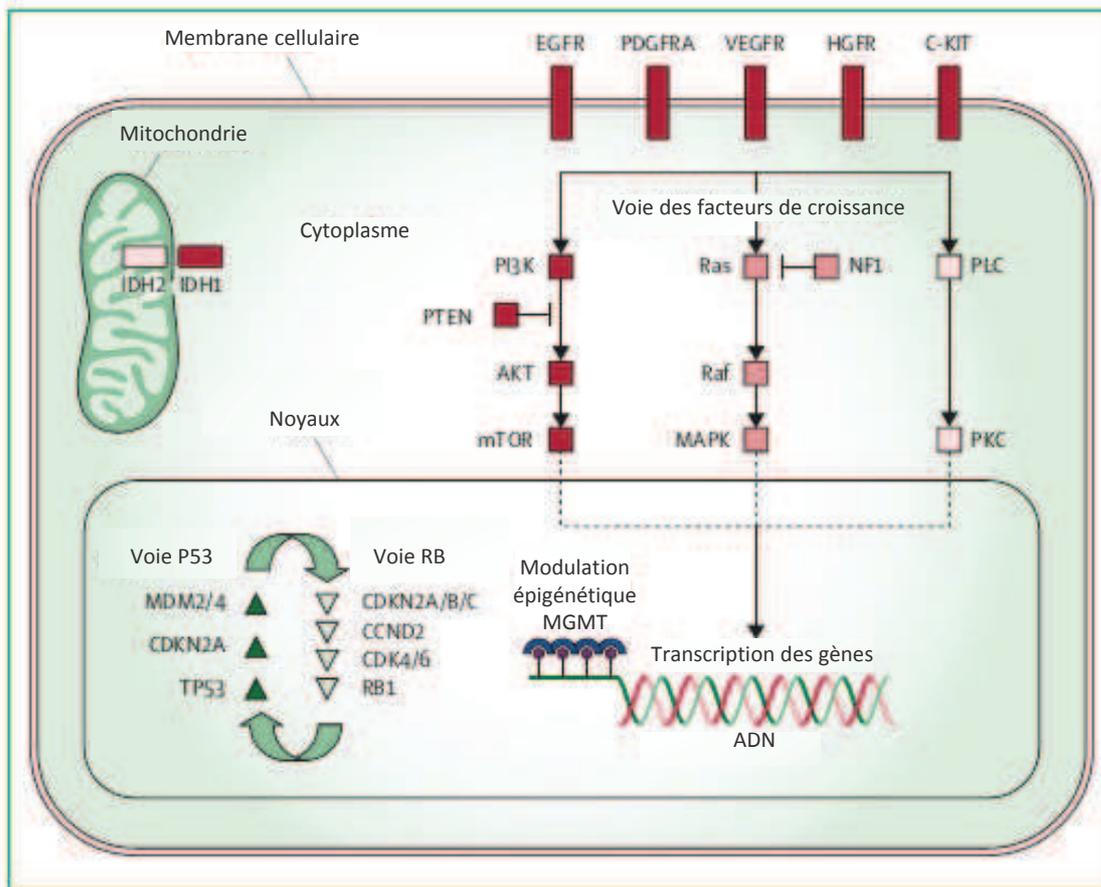
### 4.1. Gliomagenèse

#### 4.1.1. Altérations cytogénétiques et moléculaires des gliomes

Comme dans le cas des autres cancers, les gliomes se développent suite à une prolifération anormale des cellules gliales. Celle-ci est le plus souvent due à des modifications génétiques qui engendrent un dérèglement du cycle cellulaire de ces cellules.

Ces mutations vont toucher les gènes qui codent pour des protéines contrôlant les étapes du cycle cellulaire, soit en induisant une surexpression de protéines ayant un impact positif sur celui-ci, on les appelle les *proto-oncogènes*, soit en supprimant les protéines qui normalement ont un impact négatif sur le cycle cellulaire, on parle alors de gène *suppresseur de tumeur*.

Les proto-oncogènes codent donc de manière hyper active pour les facteurs de croissance, les récepteurs de facteurs de croissance, toutes protéines favorisant la mitose. Il suffit généralement qu'une seule copie des deux gènes soit modifiée pour que la mutation soit effective. Par contre, les suppresseurs de tumeurs codent pour des protéines qui ont normalement pour fonction de réguler négativement le cycle mais les mutations de ces protéines induisent une perte de leur fonction de base et le cycle cellulaire s'emballe. Dans ce cas, l'inactivation des deux allèles du gène est nécessaire pour perdre la fonction de gène suppresseur de tumeur.



**Figure 5. Principales protéines et voies de signalisation altérées dans les gliomes.**

IDH1= Isocitrate déhydrogénase 1. IDH2= Isocitrate déhydrogénase 2. mdm2/4= mdm 2/4 p53 binding protein homolog. CDKN2A= cyclin-dependent kinase inhibitor 2. TP53= tumor protein p53. CDKN2A/B/C= cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B/C. RB1= retinoblastoma 1. CDK4/6= cyclin dependent kinase 4/6. CCND2= cyclin D2. PI3K= phosphoinositide-3-kinase. PTEN= phosphatase and tensine homolog. AKT= V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1. mTOR= mechanistic target of rapamycin. Ras= rat sarcoma viral oncogene homolog. NF1= neurofibromin 1. Raf= V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog. MAPK= mitogen-activated protein kinase. PLC=phospholopase C. PKC= protein kinase C. EGFR= epidermal growth factor receptor. PDGFR $\alpha$ = platelet-derived growth factor  $\alpha$ . VEGFR= vascular endothelial growth factor receptor. HGFR= hepatocyte growth factor receptor. C-KIT=v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog. MGMT= 06-methylguanine-DNA-methyltransferase. (Adaptée de Ricard, Ricard et al., 2012).

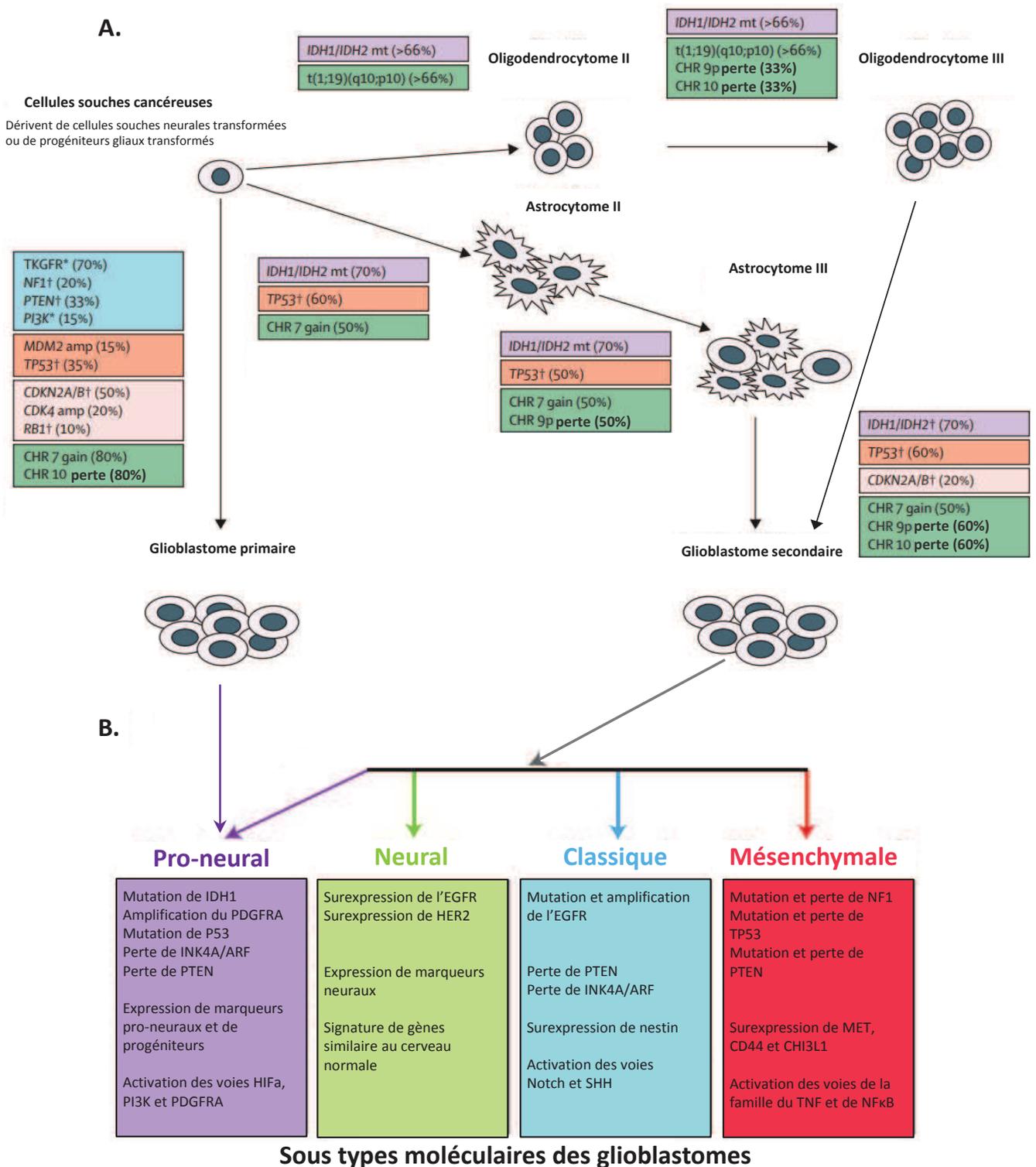
Plus précisément dans les gliomes, diverses mutations chromosomiques ont été décrites. Les plus fréquentes sont les délétions 1p, 9p, 10q, 13q, 17p, 19q, 22q et des gains sur le chromosome 7 (Rasheed et al., 1999), (Smith and Jenkins, 2000), (Ricard et al., 2012). Ces altérations sont rares dans les gliomes de bas grade et ont tendance à augmenter avec l'évolution maligne des tumeurs. Les conséquences fonctionnelles de ces délétions restent encore aujourd'hui mal connues mais la plupart des altérations trouvées (**Figure 5**) dans les gliomes touchent les voies de signalisation impliquées dans la transduction du signal (comme les voies Ras-MAPK et PI3K-Akt-mTOR), le contrôle du cycle cellulaire (avec les voies de signalisation TP53 et RB (retinoblastoma 1), l'angiogenèse principalement par la voie du VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) (Jain et al., 2007) et les voies du métabolisme cellulaire (l'enzyme oxydoréductase iso-citrate déshydrogénase (IDH1/IDH2)), (Ohgaki and Kleihues, 2007).

#### 4.1.2. Cellules d'origine des gliomes et voies de progression

L'origine de la formation des gliomes est un grand débat au sein de la communauté scientifique. Certains prônent la théorie des cellules souches neurales adultes qui seraient à l'origine des gliomes après qu'elles aient subi une série de mutations les orientant dans une voie tumorale. D'autres défendent la théorie des cellules gliales progénitrices qui, également à la suite de mutations, induiraient différents gliomes.

Aujourd'hui il se dessine deux schémas d'évolution grâce à l'étude de leur génotype, un vers les GBM primaires ou *de novo* qui dériveraient directement d'une cellule souche neurale devenant maligne suite à différentes mutations (Singh et al., 2004a) (**Figure 6A**). La surexpression de l'EGFR et du PDGFR, la mutation de PTEN, la perte du chromosome 10, l'amplification de MDM2 sont caractéristiques et conduisent à l'apparition direct du grade IV, par contre on y retrouve que rarement la mutation TP53 (Ohgaki and Kleihues, 2007).

Pour le GBM secondaire qui est la conséquence de l'évolution des grades inférieurs, des mutations géniques s'accumulent plus ou moins tardivement pendant l'évolution tumorale et ne sont pas retrouvées de manière équivalente dans les différents phénotypes tumoraux. Par exemple, la mutation de l'iso-citrate déshydrogénase 1 (IDH1) est retrouvée dans plus de 2/3 des gliomes de grade II, de grade III et conduirait à la formation du GBM secondaire, cette mutation n'est d'ailleurs pas retrouvée dans le GBM primaire (Parsons et al., 2008), (Nobusawa et al., 2009). On peut donc supposer



**Figure 6: Les chemins d'évolution vers le glioblastome primaire ou secondaire et sa classification moléculaire.** **A.** Les cadres bleus indiquent les gènes impliqués dans les voies de signalisation des récepteurs tyrosines kinases des facteurs de croissance (EGFR et PDGFR  $\alpha$ ). Le cadre orange désigne les voies de signalisation de p53. Les cadres rose et violet indiquent respectivement les voies de signalisation de RB et les voies du métabolisme cellulaire. Les déséquilibres chromosomiques fréquents sont représentés dans le cadre vert. NF1=neurofi bromin 1. PTEN=phosphatase and tensin homologue. PI3K=phosphoinositide-3-kinase. MDM2=mdm2 p53 binding protein homologue. amp= amplification importante. TP53=tumour protein p53. CDKN2A/B=cyclin-dependent kinase inhibitor 2A/B. CDK4=cyclin-dependent kinase 4. RB1=retinoblastoma 1. CHR=chromosome. IDH1=isocitrate dehydrogenase 1. IDH2=isocitrate dehydrogenase 2. mt=mutation. \*Gain de fonction à travers une amplification ou une mutation. † Déléation ou mutation homozygote. Adapté d'après (Ricard et al., 2012). **B.** Classification moléculaire des glioblastomes selon (Verhaak et al., 2010). Le cadre violet correspond à la classe Pro-neural, le cadre vert à la classe Neural, le bleu à la classe Classique et le rouge à la classe Mesenchymal. INK4A= Inhibitor kinase 4A, ARF= alternate reading frame, HIFa=Hypoxia inducible factor a. SHH= Sonic Hedghog, MET= Hepatocyte growth factor, CD44= CD44 antigen, CHI3L1= chitinas 3 -like 1. TNF= tumor necrosis factor, NFκB= nucleor factor Kb. (Adapté d'après Agnihotri et al.,2013)

qu'il y ait eu une mutation IDH1 précoce qui orienterait le développement tumoral dans une voie spécifique vers le GBM secondaire. La cellule d'origine serait dans ce cas un progéniteur glial NG2 positif (Persson et al., 2010) qui subirait la mutation IDH1 induisant son développement néoplasique. Cette voie est caractérisée par une mutation de TP53 ainsi qu'une surexpression précoce du PDGFR $\alpha$ /PDGFA. Le développement tumoral passe donc par les différents stades II et III avant d'aboutir au GBM secondaire (Maher et al., 2006).

#### 4.1.3. Sous-types moléculaires

Les études génomiques, génotypiques et moléculaires dévoilent les prémices d'une classification d'un nouveau genre, ne se basant plus sur l'histologie.

Par exemple, l'une des délétions la plus courante est la co-délétion de 1p-19q qui est une translocation réciproque de 19q vers 1p. Elle est associée avec un phénotype oligodendrogial, une évolution plus lente de la progression tumorale et une meilleure réponse aux traitements. (Jenkins et al., 2006), (Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402 et al., 2006).

La perte partielle de 1p est quant à elle plus associée avec les gliomes astrocytiques (Idbaih et al., 2005). La mutation TP53 est, elle aussi, typiquement associée avec un phénotype astrocytaire mais n'indique pas le pronostic de malignité. Inversement, plusieurs altérations sont associées avec les gliomes anaplasiques de haut grade et les GBM, ces altérations sont principalement la perte du chromosome 10, la délétion CDKN2A et l'amplification de l'EGFR qui est retrouvée dans plus de 45 % des GBM primaires. Dans 50 % des cas, l'amplification de l'EGFR est associée avec une expression du mutant EGFR activé de manière constante, appelé EGFRvIII ; il est caractéristique des GBM primaires.

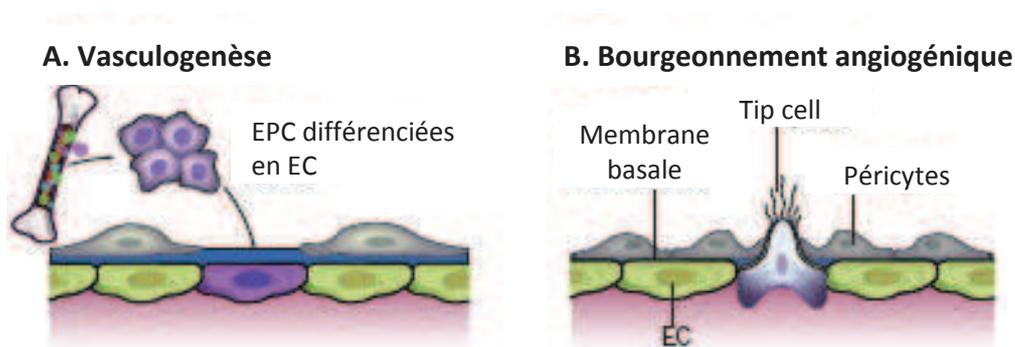
Ainsi, il se dessine progressivement une classification des tumeurs non plus par leurs critères purement histologiques mais par leur carte d'identité génomique et moléculaire. C'est dans cette direction que travaille le consortium du Cancer Genome Atlas qui a réévalué la classification des gliomes en prenant en compte des données génomiques et transcriptomiques de gliomes humains. Cette approche aboutit à quatre classes distinctes basées sur leurs différentes signatures moléculaires (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008). On retrouve ainsi les sous types Neural, Pro-neural,

Classique et Mésenchymateux (**Figure 6B**) (Verhaak et al., 2010). L'expression anormale de l'EGFR est une caractéristique du sous type Classique, la mutation NF1 est typique du sous type Mésenchymateux, l'expression du PDGFR $\alpha$  associée à la mutation IDH1 correspond au sous type Pro-neural et le sous type Neural est défini par l'expression de marqueurs neuronaux comme NEFL (Neurofilaments), GABRA1 (Gamma-aminobutyric acid receptor subunit alpha-1) et SYT1 (Synaptotagmin-1).

## 4.2. Cellules souches

Les cellules souches de gliomes sont des cellules ayant la capacité d'auto-renouvellement tout en montrant des possibilités de différenciation en différents types cellulaires (neuronal, astrocytaire ou oligodendrocytaire). Elles sont présentes dans toutes les tumeurs du système nerveux mais leur nombre n'excède souvent pas 1 à 3 % des cellules de la masse tumorale. Ces cellules peuvent être identifiées par différents marqueurs comme le CD133 (Singh et al., 2004b) mais plus généralement nécessite une batterie de marqueurs en raison de l'existence de nombreuses sous populations (Magee et al., 2012), (Tirino et al., 2013). Leur capacité d'auto-renouvellement à l'origine de la formation des tumeurs est sans doute la meilleure caractéristique de ces cellules. Les mécanismes moléculaires contrôlant ces cellules souches sont encore peu décrits. Cependant, la voie sonic hedgehog (SHH) et Notch semble être très importante pour le maintien à l'état prolifératif de ces cellules souches (Clement et al., 2007), (Purow et al., 2005). D'autres voies sont impliquées dans la signalisation des cellules souches de gliomes comme la voie Wnt/ $\beta$ -catenin ou les récepteurs à tyrosine kinase de différents facteurs tels que VEGF, EGF, FGFb et PDGF (Vescovi et al., 2006).

Certains travaux laissent penser une interaction étroite entre le système vasculaire et les cellules souches de gliomes qui se développent autour de ce que les auteurs appellent une niche vasculaire. Cette niche, bordant la vascularisation tumorale aberrante, produirait une matrice extracellulaire spécifique ainsi que des signaux locaux afin de maintenir les cellules souches dans une activité métabolique favorisant la prolifération (Calabrese et al., 2007). Ces cellules seraient également des acteurs de l'angiogenèse des gliomes (Hardee and Zagzag, 2012).

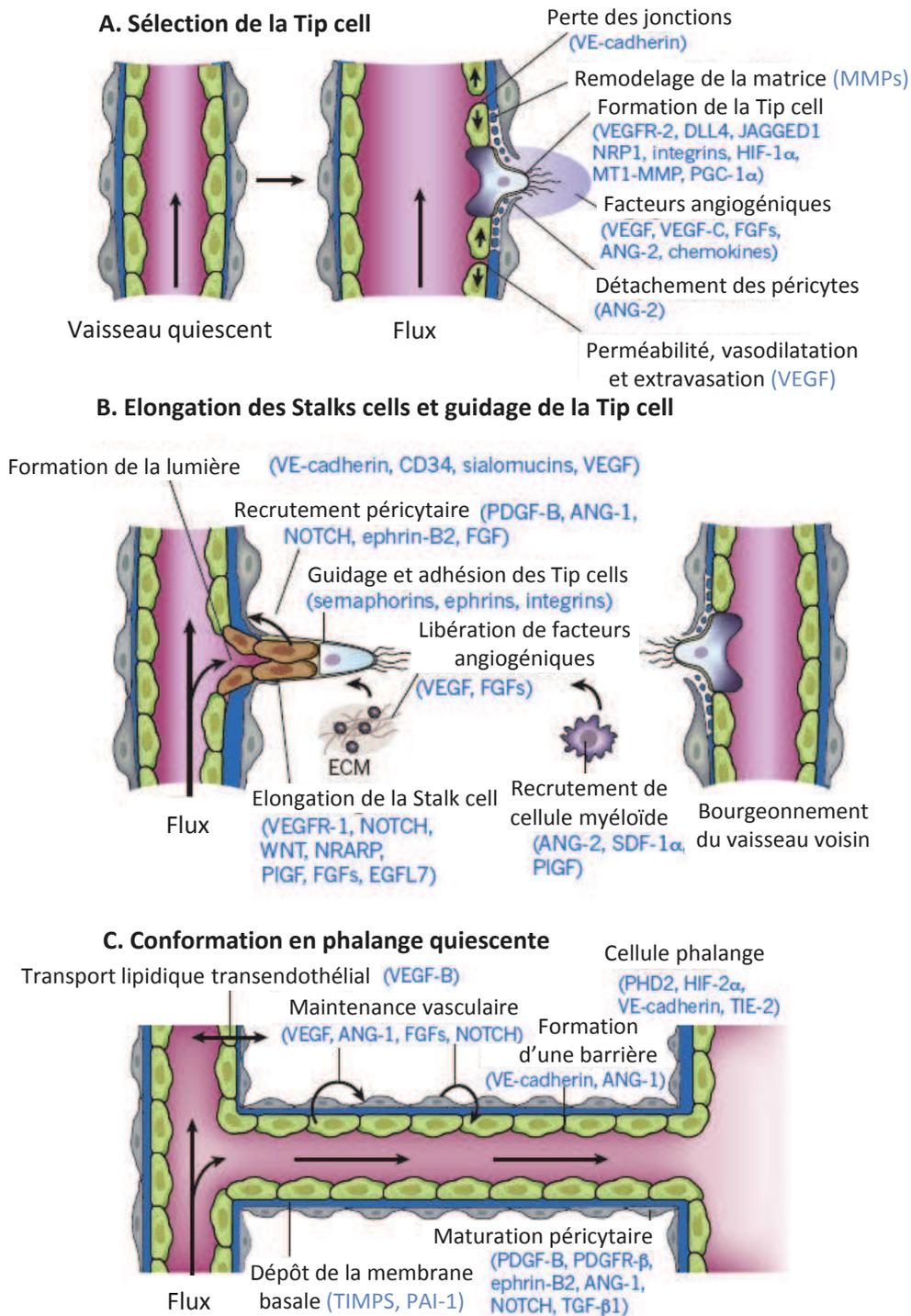


**Figure 7: Mécanismes physiologiques de la formation des vaisseaux sanguins. A.** La vasculogenèse: les cellules progénitrices des cellules endothéliales (EPC) provenant de la moelle osseuse ou déjà présentes dans le mur vasculaire se différencient en cellules endothéliales (EC) et participent à la formation des vaisseaux. **B.** Le sprouting ou bourgeoisement à partir de vaisseaux préexistant: une sélection d'une cellule endothéliale leader: la Tip cell va orienter la croissance. Adaptée de Carmeliet and Jain, 2011.

### 4.3. L'angiogenèse physiologique et tumorale

La formation des vaisseaux sanguins débute par un processus de vasculogénèse observé au cours du développement embryonnaire (Risau and Flamme, 1995) mais également chez l'adulte (**Figure 7A**). Les hémangioblastes, précurseurs communs des cellules hématopoïétiques et endothéliales, vont se différencier en cellules endothéliales via un état intermédiaire de progéniteur endothélial. Ces cellules vont former les prémices d'un réseau, le plexus vasculaire, répondant aux besoins du tissu embryonnaire en développement. Dans un second temps ces vaisseaux naissants prendront une orientation différentielle artère/veine contrôlée par des mécanismes spécifiques (Swift and Weinstein, 2009). La deuxième phase de formation des vaisseaux est l'angiogenèse appelé encore le « *sprouting angiogenic* » (bourgeonnement angiogénique) (**Figure 7B**) qui va enrichir et complexifier le réseau vasculaire en ajoutant des embranchements aux vaisseaux déjà formés. L'angiogenèse est une succession d'étapes ordonnées impliquant différents types cellulaires et de nombreux facteurs solubles ou non comme les facteurs de croissance et les molécules de la matrice extracellulaire qui vont orchestrer ce phénomène complexe.

L'hypoxie est le premier acteur de ce ballet, elle est induite quand le tissu, la tumeur n'ont pas assez d'oxygène ou par l'inflammation. Dans ces conditions, le facteur HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor  $\alpha$ ) n'est pas hydroxylé et ne peut donc pas faire l'objet de l'ubiquitinylation par pVHL (von Hippel-Lindau) nécessaire à sa dégradation par le protéasome comme c'est le cas en normoxie. Cette absence de dégradation entraîne une augmentation de HIF-1 $\alpha$  qui va par conséquent pouvoir être transloqué dans le noyau et dimériser avec son partenaire HIF-1 $\beta$ . Le dimère ainsi formé provoque l'induction de l'expression de gènes sensibles à l'hypoxie comme par exemple celui des cinq membres de la famille du VEGF (A, B, C, D, E) (Fraisl et al., 2009), du SDF-1 $\alpha$  ou de CXCR-4 (Zagzag et al., 2006). Les cellules endothéliales des vaisseaux quiescents vont recevoir les signaux pro-angiogéniques induits par la situation d'hypoxie entraînant ainsi une cascade d'événements favorisant l'angiogenèse (**Figure 8A**). L'angiopoïétine 2 contribue par exemple au détachement des péricytes de la paroi vasculaire, les cellules endothéliales perdent quant à elles leurs jonctions sous l'effet du VEGF et vont devenir de plus en plus perméables provoquant une fuite des protéines plasmatiques formant alors une matrice extracellulaire provisoire servant d'échafaudage à la migration des cellules endothéliales. Pour éviter que toutes les cellules endothéliales ne migrent de façon anarchique vers les signaux pro-angiogéniques, une cellule va devenir la cellule leader, la Tip cell, pour guider la croissance du néo-vaisseau. Le récepteur



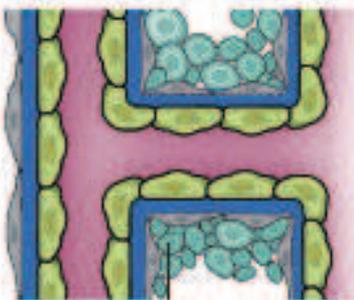
**Figure 8: Bases moléculaires du bourgeonnement vasculaire aboutissant à la formation des vaisseaux sanguins.** Entre parenthèse sont indiqués les différents acteurs moléculaires impliqués dans chacune des étapes. **A.** Sélection de la Tip cell. **B.** Elongation des stalk cells et guidage de la Tip cell. **C.** Conformation en phalange quiescente., VE-cadherin= vascular endothelial cadherin, MMP= matrix metalloproteinase, VEGFR2= vascular endothelial growth factor receptor 2, DLL= delta like ligand 4, NRP1= neuropilin-1, HIF- $\alpha$ = hipoxia inducible factor., MT1-MMP= membrane-type 1 matrix metalloproteinase, PGC-1 $\alpha$ = Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha, VEGF= vascular endothelial growth factor, FGFs= fibroblaste growth factors, Ang-2= angiopoietine 2, CD34= CD34 antigen, PDGF-B= patelet derived growth factor B, Ang-1= angiopoietine 1, NRARP= notch-regulated ankyrin repeat protein, PIGF= placental growth factor, EGFL7= EGF-like domain-containing protein 7, SDF-1= stromal derived factor 1, TIMPs= Tissu inhibitors of metalloproteases, Pal-1= plasminogen activator inhibitor -1,PHD2= prolyl hydroxylase domain protein 2, Tie-2= tyrosine kinase with Ig and EGF homology domains-2, PDGFR- $\beta$ = platelet derived growth factor receptor  $\beta$

neuropiline-1 (NRP1) qui fait l'objet d'une présentation détaillée dans la suite de ce manuscrit, joue un rôle important dans cette étape clé. On trouve aussi les récepteurs du VEGF, les récepteurs NOTCH, DLL4 et JAGGED1 qui sont impliqués dans ce phénomène (**Figure 8B**). Les cellules voisines de la Tip cell vont assumer un rôle de suiveuse, les stalk cells, qui, en se divisant vont permettre l'allongement de la tige vasculaire en formation sous l'influence de plusieurs acteurs comme Notch, VEGFR-1, WNT, NRARP (Notch-Regulated Ankyrin Repeat Protein), PIGF (Placental Growth Factor), FGFs ou encore EGFL7 (Carmeliet and Jain, 2011).

Finalement pour que le vaisseau devienne fonctionnel il faut qu'il soit mature et stable (**Figure 8C**). Les cellules vont reprendre leur organisation en "phalange quiescente" (selon la terminologie Grecque rappelant la formation militaire serrée dite en phalange). Le PDGFB, l'angiopoïétine 1, le TGF $\beta$ , l'éphrine B2 et Notch vont préparer les cellules à un recouvrement par les péricytes. Les inhibiteurs de protéases, les TIMPs (Tissue Inhibitors of Metalloproteases) et les PAI-1 (Plasminogen Activator Inhibitor -1) déclenchent le dépôt de la membrane basale, les cellules endothéliales rétablissent leurs jonctions pour pouvoir assurer une distribution optimale du flux sanguin.

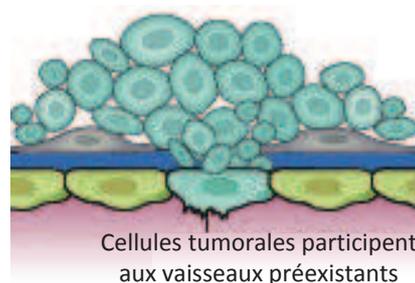
Dans les processus pathologiques et particulièrement dans le développement tumoral l'angiogenèse joue un rôle crucial. Pendant les premières phases du développement de la masse tumorale, les cellules malignes vont être alimentées par les vaisseaux présents dans le tissu sain et environnant. Elle se développe autour des vaisseaux et forme ce qu'on appelle des niches vasculaires tumorales. Il peut alors se mettre en place un mécanisme spécifique aux cellules tumorales appelé la cooption vasculaire au cours de laquelle les cellules tumorales vont détourner et s'approprier les vaisseaux préexistants sans induction d'angiogenèse (**Figure 9A**). Cependant, la croissance tumorale va devenir tellement rapide qu'à partir d'un volume d'environ 2-3 mm de diamètre, le réseau vasculaire n'est plus capable de subvenir aux besoins de la tumeur. De plus, on sait que l'oxygène ne peut pas diffuser à une distance supérieure à 150-200  $\mu$ m des capillaires (THOMLINSON and GRAY, 1955). Ceci, provoque une hypoxie dans le tissu tumoral et une induction importante du facteur d'hypoxie HIF-1 $\alpha$ . On assiste alors au *switch angiogenic* (induction d'angiogenèse), (Hanahan and Folkman, 1996). Il apparaît ainsi que les cellules tumorales utilisent les clés moléculaires du processus d'angiogenèse physiologique pour développer leur propre réseau vasculaire. Ces vaisseaux sont souvent décrits comme des vaisseaux tortueux, irréguliers, présentant une fine épaisseur de lame basale et une forte perméabilité. L'accroissement exponentiel de cette angiogenèse anarchique stimulée de toutes parts, induit des vaisseaux imparfaits avec une couverture péricytaire inachevée. De manière

**A. Co-option vasculaire**



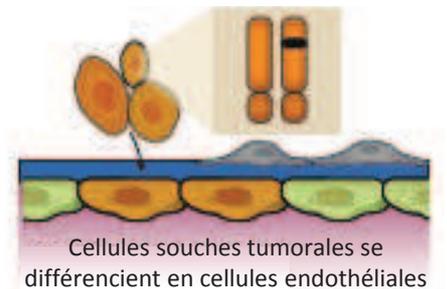
Cellules tumorales cooptent les vaisseaux préexistants

**B. Mimétisme vasculaire**



Cellules tumorales participent aux vaisseaux préexistants

**C. Transdifférenciation endothéliale**



Cellules souches tumorales se différencient en cellules endothéliales

**Figure 9: Mécanismes tumoraux de formation des vaisseaux sanguins.** **A.** Les cellules tumorales font de la co-option vasculaire, elles vont détourner le vaisseau préexistant. **B.** Les cellules tumorales font ce qu'on appelle du vascular mimicry. Elles miment les cellules endothéliales et participent à la formation de structures tubulaires vasculaires. **C.** La transdifférenciation des cellules souches tumorales consiste à changer de phénotype cellulaire en s'orientant vers un phénotype endothélial. Ce mécanisme permet l'implication de ces cellules dans la formation des vaisseaux. Adaptée de Carmeliet and Jain, 2011.

intéressante les cellules tumorales peuvent participer directement à la formation des vaisseaux sanguins en s'intégrant dans la paroi des vaisseaux (Chang et al., 2000b). D'autres études et plus particulièrement dans le gliome (El Hallani et al., 2010), (Ricci-Vitiani et al., 2010) ont par ailleurs démontré l'implication de cellules souches cancéreuses dans la formation de structures histologiques tubulaires mimant les structures vasculaires (*tubular vasculogenic mimicry* (**Figure 9B**)).

Aujourd'hui, un nouveau concept propose que les cellules souches de gliome participent à la formation des vaisseaux sanguins par un mécanisme de trans-différentiation permettant aux cellules tumorales d'adopter un phénotype endothélial (Soda et al., 2011), (**Figure 9C**). Ces cellules bordant les vaisseaux n'expriment pas le CD31 ou la VE-cadherin, marqueurs spécifiques des cellules endothéliales, mais le PDGFR $\beta$ , l' $\alpha$ SMA, l'EGFR et le VEGFR-2 qui sont plutôt des marqueurs des cellules murales (Scully et al., 2012).

## 5. Traitement du glioblastome

### 5.1. Traitement classique

Le traitement des glioblastomes consiste dans un premier temps à la résection de la tumeur en optimisant l'exérèse pour qu'elle soit la plus large possible afin de diminuer les risques de récurrence.

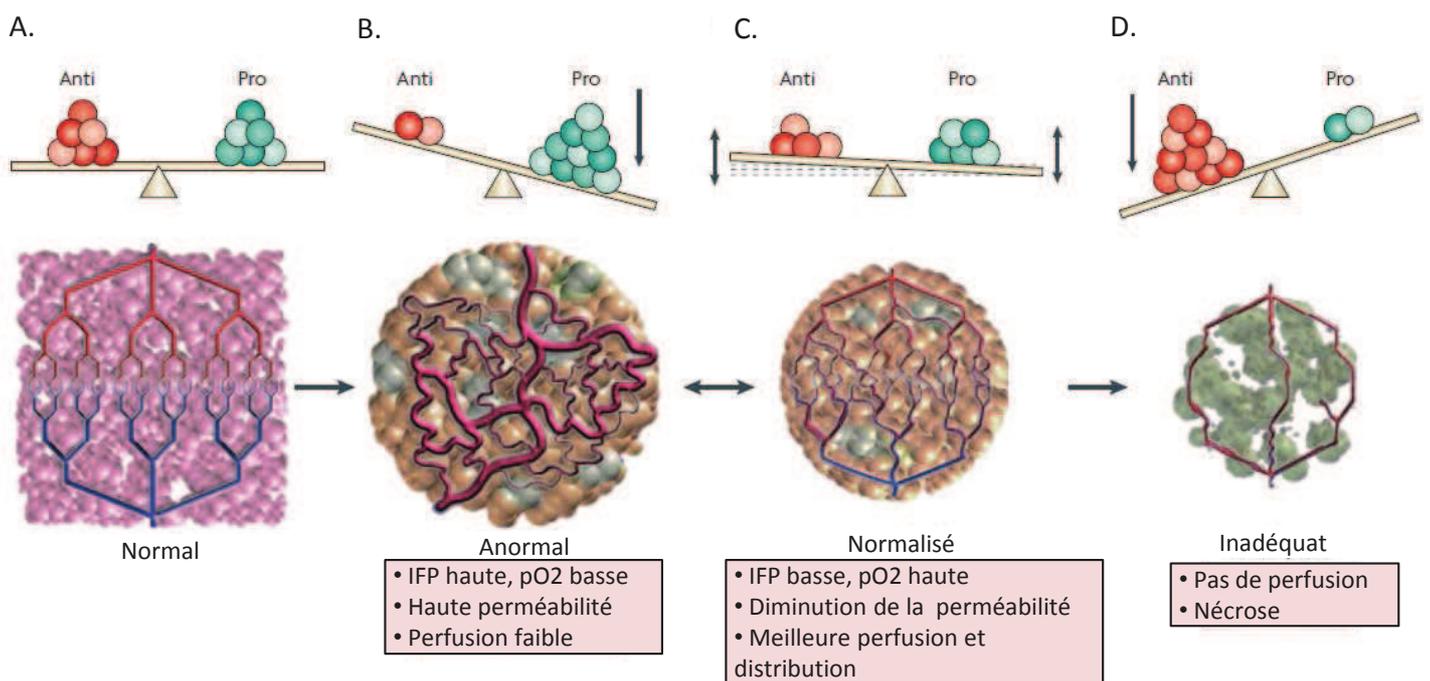
La chirurgie est toujours associée à une chimiothérapie qui peut prendre plusieurs formes. Il peut s'agir par exemple d'un implant biodégradable (le proliféprosan) imprégné de Carmustine (Gliadel® Waferss). La Carmustine est un agent alkylant qui bloque la réplication cellulaire en formant des liaisons covalentes avec la guanine de l'ADN en y fixant un groupement alkyl. L'implant peut être déposé directement dans la cavité chirurgicale comme une chimiothérapie locale. La médiane de survie des patients passe alors de 12 mois à 13,9 mois (Westphal et al., 2003). Le protocole de Stupp (Stupp et al., 2005) est le schéma standard pour les patients de moins de 70 ans. Il associe une radiothérapie (délivrée dans un volume tissulaire délimité tout en épargnant au maximum le tissu adjacent) à la dose de 60 Gy (Gray) et un traitement concomitant quotidien de Témzolomide (commercialisé sous le nom de Témodal) qui est lui aussi un agent alkylant. Ce premier cycle dure 42 jours, et une chimiothérapie adjuvante débute 4 semaines plus tard avec à nouveau un traitement au Témzolomide 5 jours par

mois par cycles de 28 jours. Cette combinaison a démontré une capacité d'augmenter de 3 mois la survie des patients (Stupp et al., 2005). Ces effets modestes n'empêchent généralement pas la récurrence au cours de laquelle certains patients peuvent à nouveau subir une résection et/ou une nouvelle cure de radiothérapie et/ou de chimiothérapie avec d'autres composés.

## 5.2. Traitements ciblés

Ces nouveaux traitements constituent sans doute l'avancée majeure de ces vingt dernières années en cancérologie. Les agents utilisés sont dans ce cas par définition actifs sur une ou plusieurs cibles biologiques clairement identifiées comme étant des acteurs initiateurs ou promoteurs de la tumorigenèse. Ce ciblage permet d'une part d'agir plus spécifiquement sur les cellules tumorales ou endothéliales exprimant fortement ces cibles mais surtout d'épargner les autres types cellulaires non impliqués dans la progression tumorale et donc d'atténuer la toxicité des traitements. Aujourd'hui ces thérapies ciblées peuvent être utilisées seules ou le plus souvent en association. Cette approche thérapeutique vise généralement à impacter les voies de signalisation impliquées dans la prolifération, la survie cellulaire, l'apoptose, la migration ou encore l'angiogenèse. Les inhibiteurs peuvent agir directement sur les ligands comme les différentes isoformes du VEGF, de l'angiopoïétine 2 ou le PlGF.

Les drogues, le plus souvent des anticorps monoclonaux, séquestrent ces ligands pour empêcher leur fixation sur leurs récepteurs respectifs et bloquent ainsi l'induction des voies de signalisation sous-jacentes. Le composé le plus connu aujourd'hui est sans doute le Bevacizumab (Avastin® commercialisé par les laboratoires Roche) qui est un anticorps monoclonal dirigé contre le VEGF-A. Dans certains cas c'est le domaine extracellulaire des récepteurs qui est ciblé par des molécules peptidiques ou des anticorps qui entrent directement en compétition avec le ligand sur le domaine de liaison. Par exemple, la première thérapie ciblée dans le cancer du sein est le Trastuzumab (Herceptine commercialisé par Genentech), un anticorps ciblant le récepteur HER2. Les domaines intracellulaires des récepteurs et plus particulièrement les domaines de type tyrosine kinases responsables de l'induction de la signalisation intracellulaire sont également des cibles de choix. Dans ce cas, les agents thérapeutiques sont souvent de petites molécules inhibitrices issues de chimiothèques variées. Le niveau de spécificité de ces molécules est variable puisque certaines

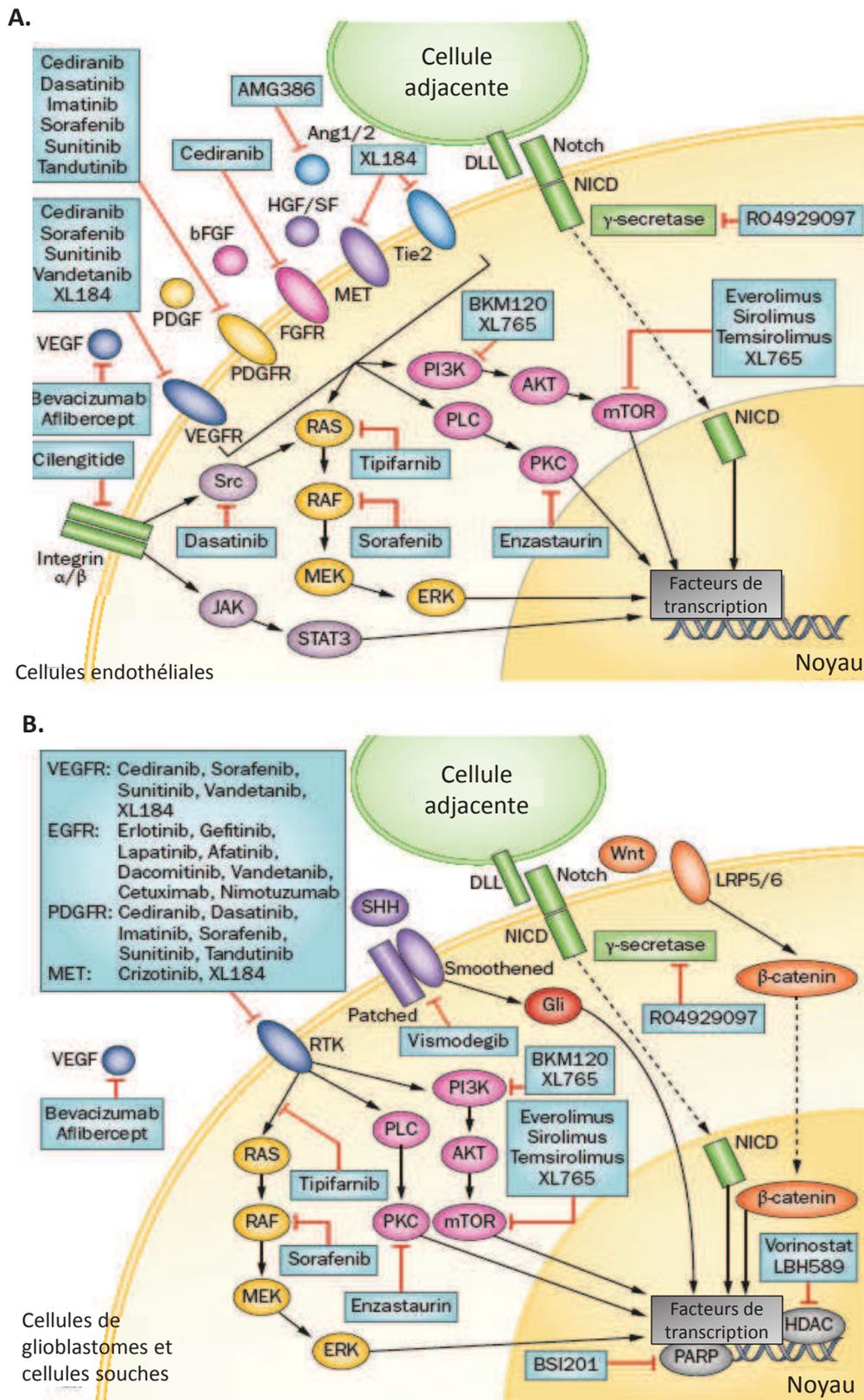


**Figure 10: Le concept de normalisation induit par les traitements anti-angiogéniques.**  
**A.** Réseau vasculaire normal: il y a une balance stable entre les facteurs pro- et anti-angiogéniques qui mènent à un réseau organisé avec de larges vaisseaux et un apport sanguin efficace. **B.** Les vaisseaux tumoraux sont anormaux: l'excès de facteurs pro-angiogéniques, principalement le VEGF, induit une désorganisation vasculaire avec des vaisseaux gigantesques et un dysfonctionnement des microvaisseaux. *Pression du fluide interstitiel (IFP), niveau d'oxygène dans le tissu (pO<sub>2</sub>)* **C.** La normalisation: ce phénomène est induit par les anti-angiogéniques qui vont rétablir la balance initiale, améliorer le réseau vasculaire et sa capacité de perfusion. **D.** Si les anti-angiogéniques sont trop efficaces, les vaisseaux régressent au point d'induire une hypoxie dans la tumeur et une diminution de la pénétration des drogues dans le tissu tumoral. Cela peut provoquer un échappement par d'autres voies angiogéniques non inhibées et au final une recrudescence de la tumeur. Adaptée de Jain, 2007.

interagissent avec un seul récepteur comme le Gefitinib qui cible spécifiquement l'EGFR alors que d'autres comme Lapatinib inhibent l'EGFR et HER2. Enfin, certaines molécules visent les protéines effectrices des cascades de signalisation intracellulaire comme PKC (Wick et al., 2010), mTOR (Galanis et al., 2005), Raf (Wilhelm et al., 2006), Ras (Norman, 2002) et bien d'autres encore.

### 5.3. Le cas des traitements anti-angiogéniques

Depuis la description de l'importance de l'angiogenèse dans la croissance tumorale par Folkman en 1971 (Folkman, 1971), beaucoup de travaux de recherche se sont axés sur le développement de médicaments anti-angiogéniques. Le concept postule que la privation des cellules tumorales en nutriments et oxygène en bloquant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins peut potentiellement diminuer le développement tumoral, voire asphyxier complètement la tumeur. La thérapie ciblée du VEGF est sans doute le meilleur exemple de l'efficacité remarquable de cette stratégie. Cependant, depuis une dizaine d'années, la description de phénomènes de résistance modère un peu l'intérêt de cette approche. En effet, le concept de normalisation des vaisseaux complique largement la compréhension des mécanismes d'action de ces composés (**Figure 10**). Le contrôle de la balance entre les facteurs pro-angiogéniques et les facteurs anti-angiogéniques permet dans les conditions physiologiques d'avoir un réseau vasculaire mature, organisé, hiérarchisé et quiescent. Au contraire, au cours de l'angiogenèse tumorale cette balance est déséquilibrée en faveur des facteurs pro-angiogéniques qui vont induire une prolifération vasculaire anarchique sans permettre une véritable maturation des vaisseaux dont la capacité de distribution du flux sanguin est médiocre. Cette situation favoriserait l'apparition de zones hypoxiques. L'hypoxie est connue pour favoriser le développement tumoral et la formation de métastases en induisant des instabilités génétiques, de l'inflammation et/ou une immunosuppression tout en favorisant la transition épithéliale-mésenchymateuse ou encore la résistance à la mort cellulaire par des altérations du métabolisme (Wilson and Hay, 2011), (Keith et al., 2012). De plus, l'hypoxie contribue à déséquilibrer la balance par la production encore plus importante de facteurs pro-angiogéniques aboutissant à une boucle constamment activatrice de l'angiogenèse tumorale. Les traitements anti-angiogéniques pourraient en fait contrecarrer ce déséquilibre de la balance et conduire finalement à la formation d'un réseau vasculaire normalisé, c'est-à-dire fonctionnel, avec une meilleure perfusion de la tumeur. Initialement bénéfique en évitant la prolifération vasculaire anarchique, ce



mécanisme favoriserait un effet rebond au cours duquel la croissance tumorale profiterait d'une meilleure qualité de perfusion.

Les traitements anti-angiogéniques sont en théorie particulièrement bien adaptés pour la prise en charge du glioblastome compte tenu du niveau de néo-angiogenèse très élevé ainsi que de la forte prolifération endothéliale (**Figure 11A**). Le Bevacizumab qui est, depuis 2004 utilisé aux Etats-Unis en association avec les médicaments de première ligne dans les cancers colorectaux, du poumon, du sein, du rein et de l'ovaire, n'est disponible pour le glioblastome que depuis 2009. En Europe il fait l'objet d'études cliniques de phase III dans le traitement du glioblastome en association avec le protocole de Stupp. D'autres molécules anti-angiogéniques comme par exemple le Sunitinib (bloquant le VEGFR-2, les PDGF-R, cKit et FLT-3) ou le Vatalanib (impactant principalement VEGFR-1/-2, mais aussi les PDGFRs et cKit) sont en essai clinique pour la récurrence du glioblastome.

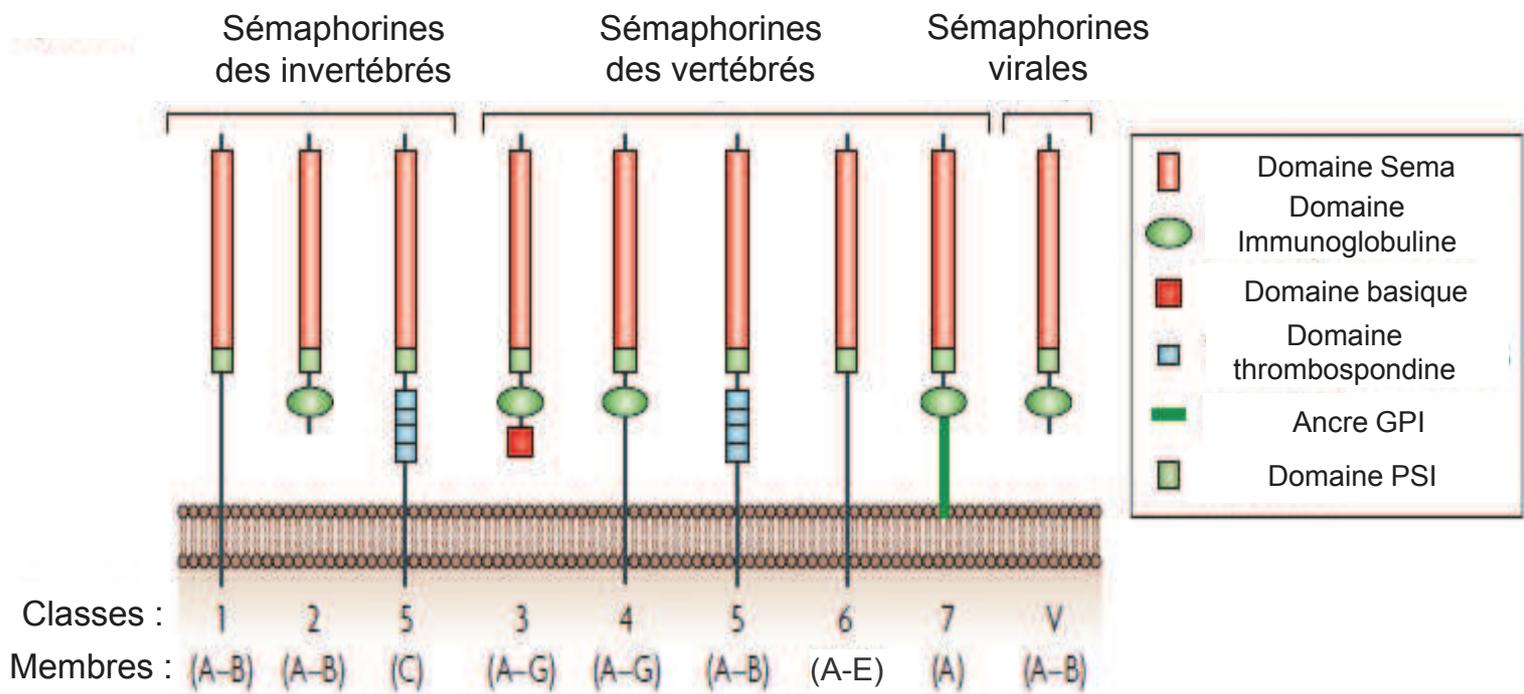
Les anti-angiogéniques ont montré une efficacité prometteuse mais la description de phénomènes de résistance ou d'échappement à ces traitements renforce le besoin de développer de nouveaux composés agissant sur de nouvelles cibles. En effet, des auteurs rapportent dans des modèles animaux de glioblastome des phénomènes de migration et d'invasion renforcées, une augmentation de la co-option vasculaire (Rubenstein et al., 2000), (Kunkel et al., 2001) ou encore une élévation de la vasculogenèse associée à une surexpression des facteurs angiogéniques autres que le VEGF : PDGF, PlGF, FGFb, TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor), les interleukines, les neuropilines, l'angiogénine, c-MET ou VEGFR-3 (Lucio-Eterovic et al., 2009) (di Tomaso et al., 2011).

Finalement, il ne faut pas négliger non plus le rôle des cellules souches de gliomes, au vu de leur capacité à participer à l'angiogenèse. La résistance observée pourrait également être reliée au phénomène de mimétisme vasculaire (*vascular mimicry*) et de trans-différenciation sans doute peu ou pas affecté par les antiangiogéniques classiques.

#### 5.4. Traitements ciblant les cellules souches tumorales

Même si la notion de cellules souches tumorales reste controversée, plusieurs travaux ont montré que ces cellules participent au phénomène de résistance à certaines chimiothérapies et radiothérapies (Liu et al., 2006), (Bao et al., 2006). Ces cellules constituent une sous-population particulière avec des propriétés uniques comme par exemple la vitesse de prolifération plus lente (parfois même proche de la quiescence) qui les rendraient moins vulnérables à la chimiothérapie et à la radiothérapie ciblant spécifiquement la division cellulaire. De nouveaux composés thérapeutiques comme RO4929097, un inhibiteur de la  $\gamma$ -secrétase impliquée dans la voie Notch ou le Vismodegib, une petite molécule ciblant la voie SHH sont en cours d'essais cliniques en association avec la chimiothérapie classique pour les glioblastomes en récurrence (**Figure 11B**).

Même si la lutte contre la prolifération vasculaire est considérée aujourd'hui comme la voie la plus prometteuse il ne faut pas pour autant négliger la prolifération et la dissémination des cellules tumorales. Ainsi, une stratégie thérapeutique idéale devrait pouvoir allier une action anti-angiogénique et un effet anti-tumoral direct y compris sur les cellules souches tumorales. Cette approche semble de plus en plus réaliste car de nombreuses cibles moléculaires sont exprimées sur l'ensemble de ces composantes cellulaires : cellules tumorales et cellules endothéliales. Le développement d'inhibiteurs de ces cibles permettrait un impact simultané sur les trois piliers de la tumorigénèse : la prolifération, la migration/invasion et l'angiogénèse. La suite de ce manuscrit est focalisée sur deux nouvelles cibles qui possèdent un potentiel thérapeutique intéressant : neuropiline-1 et plexine-A1.



**Figure 12: La famille des sémaphorines.** Description des caractéristiques structurales des différentes classes de sémaphorines. Les sémaphorines ont un large domaine Sema en N-terminal essentiel pour leurs signalisations. Elles possèdent un motif très conservé, le domaine PSI (Plexin, Semaphorin, Intégrin) qui présente des homologies avec le domaine N-terminal de l'intégrine  $\beta$ . Les sémaphorines de classe 3 possèdent un domaine basique très conservé. Les classes 4 à 6 sont des sémaphorines transmembranaires alors que la Sema 7 est accrochée à la membrane par une ancre GPI (glycosyl-phosphatidyl-inositol). La classe 5 se distingue par la présence de domaines thrombospondines répétés. Toutes les sémaphorines de vertébrés exceptées la classe 5 et 6 possèdent un domaine immunoglobuline. Adaptée de Neufeld and Kessler., 2008

## II. Le complexe neuropiline-plexine

La compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires de la progression tumorale est en progrès constant. De très nombreuses voies de signalisation impliquées dans le contrôle de la vie cellulaire normale sont dérégulées, inhibées ou absentes. La tendance actuelle de la recherche porte sur l'impact de la matrice extracellulaire dont la variation de composition impacte directement sur la progression tumorale (Lu et al., 2012). Parmi les facteurs moléculaires environnementaux de cette matrice, la famille des molécules de guidage (Nétrines, Ephrines, Sémaphorines) trouve sa place également dans le contrôle de la migration/prolifération des cellules tumorales (Mehlen et al., 2011), (Pasquale, 2010), (Tamagnone, 2012). Ici, je vais concentrer ma revue bibliographique sur le complexe neuropiline-plexine dont les mécanismes de régulation et d'activation/inhibition donnent une image archétypique des différentes fonctions de la famille des sémaphorines, un ensemble de molécules diffusibles ou membranaires impliquées dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques (Roth et al., 2009).

### 1. Un complexe de récepteurs à la croisée de nombreuses fonctions biologiques et pathologiques

#### 1.1 Ligands du complexe neuropiline-plexine

##### 1.1.1. Les sémaphorines

Les sémaphorines sont une famille de 29 protéines divisées en 8 classes (Goodman et al., 1999). Les classes 1 et 2 sont retrouvées chez les invertébrés, les classes 3 à 7 chez les vertébrés et la classe 8 chez les virus (**Figure 12**). Cette famille ne cesse de s'agrandir puisque encore dernièrement a été identifié un nouveau membre : la sémaphorine 6E (Taniguchi et al., 2011).

Les sémaphorines peuvent être sécrétées, c'est le cas des sémaphorines de classe 2, 3 et 8, transmembranaires comme les sémaphorines de classe 1, 4, 5, 6, ou liées à la membrane par une ancre GPI (Glycosyl Phosphatidyl Inositol) pour les sémaphorines de classe 7. Même si elles sont structurellement proches, chaque classe est caractérisée

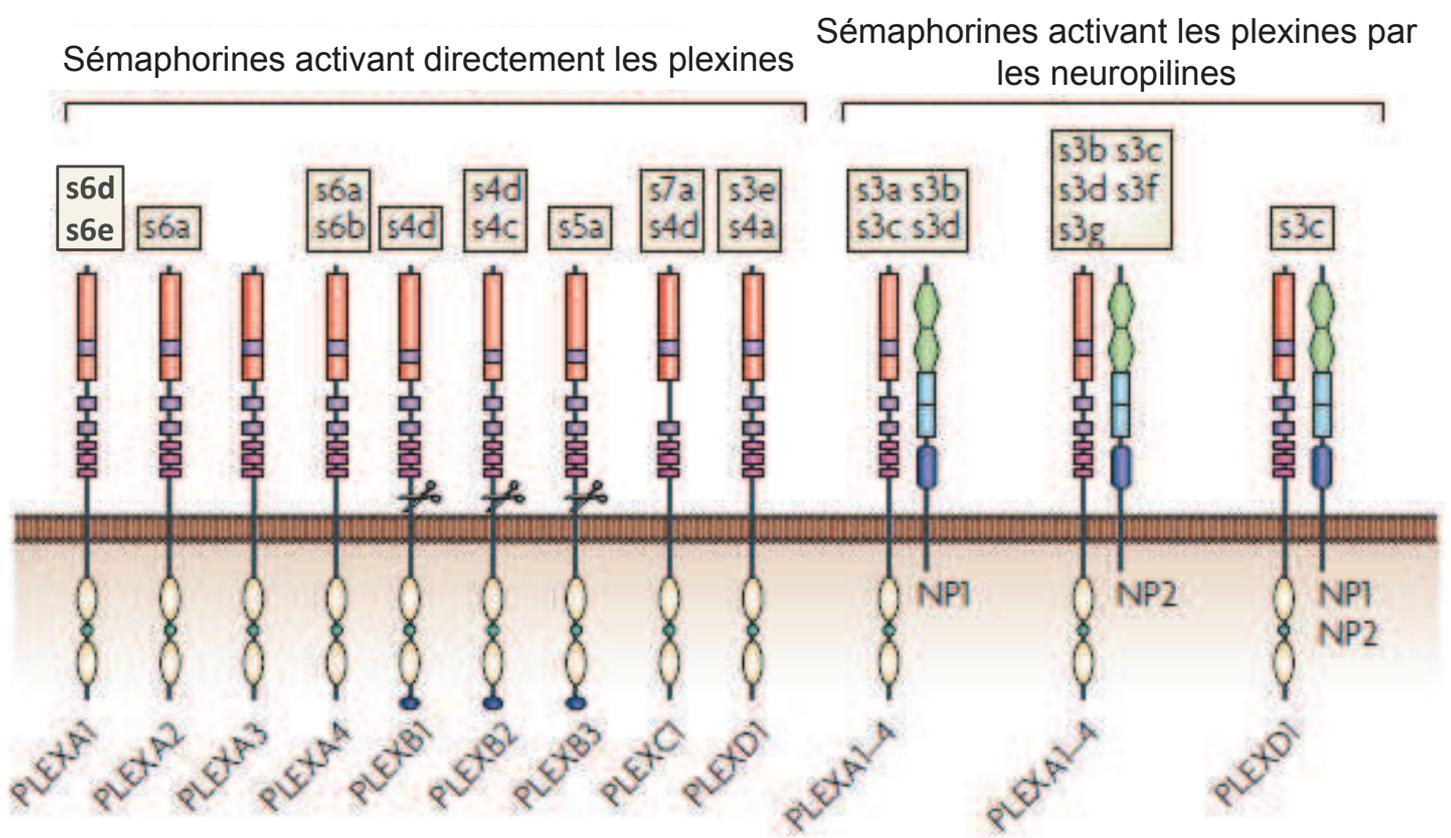


Figure 13: Les interactions des sémaphorines avec leurs récepteurs: les plexines et les neuropilines. Adaptée de Neufeld and Kessler, 2008

par un motif particulier. Les classes 2, 3, 4, 7 et 8 ont un domaine immunoglobuline, la classe 5 a une répétition de thrombospondine, la classe 3 contient également un domaine basique C-terminal qui est le site de clivage de la forme inactive. Elles ont toutes en commun, en position N-terminale, un domaine de 500 acides aminés que l'on appelle le domaine Sema. Ce domaine est essentiel pour l'activité de la sémaphorine car il détermine la spécificité d'interaction avec les différents récepteurs (Feiner et al., 1997), (Kolodkin et al., 1993). Les études de cristallographie de ce domaine Sema ont pu mettre en évidence une structure en hélice  $\beta$  qui permet la fixation sur les récepteurs (Antipenko et al., 2003), (Love et al., 2003), (Liu et al., 2010). Ce domaine Sema est retrouvé dans d'autres protéines comme MET, RON ou les plexines. La partie C-terminale définit les fonctions biologiques (Koppel et al., 1997).

Les sémaphorines sont pour la plupart des ligands diffusibles qui se fixent sur des récepteurs pour induire la signalisation intracellulaire. Au contraire, la Sema 4D est membranaire et doit être clivée pour agir alors que les sémaphorines des classes 1, 4 et 6 jouent un rôle de ligand et de récepteur en même temps, produisant une signalisation bi-directionnelle semblable à celle des éphrines (Holland et al., 1996). Les formes actives des classes 3 et 6 doivent nécessiter la formation d'un dimère pour pouvoir se fixer sur leur récepteur (Klostermann et al., 1998), (Janssen et al., 2010), (Liu et al., 2010), (Nogi et al., 2010).

De manière générale, les sémaphorines diffusibles sont des ligands des neuropilines alors que les sémaphorines membranaires peuvent se lier directement aux plexines (**Figure 13**). Il existe cependant des exceptions à cette règle puisque la Sema3E (sécrétée) peut se fixer directement sur plexine-D1 (PlexD1) pendant le développement cérébral (Chauvet et al., 2007) et l'angiogenèse (Gu et al., 2005).

Les sémaphorines de classe 6 interagissent préférentiellement avec les plexines de la famille A. La Sema6D se fixe sur plexine-A1 (PlexA1) dans la formation du système cardiovasculaire. La Sema6A peut se fixer sur la PlexA2 (Renaud et al., 2008) et également sur la PlexA4 (Rünker et al., 2008), (Matsuoka et al., 2011), (Okada and Tomooka, 2013). La Sema6B se lie également au deux récepteurs PlexA4 (Suto et al., 2005) et PlexA2 (Tawarayama et al., 2010). Les sémaphorines des classes 4 et 5 se lient aux plexines de la famille B. En effet, la Sema4D peut se fixer sur PlexB1 et jouer un rôle dans l'invasion (Giordano et al., 2002) ou la croissance axonale (Masuda et al., 2004) mais aussi sur la plexine-B2 qui est également le récepteur de la Sema4C (Maier et al., 2011) impliqué dans le développement du cervelet. La PlexB3 va quant à elle fixer la Sema5A pour jouer un rôle dans le développement axonal (Artigiani et al., 2004).

Neuropilines	Neuropiline 1	Neuropiline 2
Membres de la famille du VEGF	VEGF-A121 VEGF-A165 VEGF-B VEGF-C VEGF-D VEGF-E VEGF-F PlGF-2	VEGF-A121 VEGF-A145 VEGF-A165 VEGF-C VEGF-D PlGF-2

**Tableau 2: Différence de capacité à lier les membres de la famille du VEGF pour neuropilines 1 et 2.**

D'autres possibilités de liaisons existent puisque la Sema4D peut se fixer à PlexC1 dans les monocytes et les cellules dendritiques humaines (Chabbert-de Ponnat et al., 2005).

Il existe donc un grand nombre d'interactions possibles entre les différentes sémaphorines et le complexe neuropiline-plexine. Cette grande diversité de liaison est en accord avec les nombreuses fonctions décrites pour les sémaphorines.

### 1.1.2. Les membres de la famille du VEGF

La famille du VEGF est codée par 7 gènes différents assurant la production des VEGF-A jusqu'au VEGF-F et le PlGF (Cross et al., 2003), (Otrock et al., 2007). Le VEGF-A est le premier membre à avoir été découvert en 1989 (Ferrara and Henzel, 1989), (Gospodarowicz et al., 1989). Il est caractérisé comme un facteur de croissance angiogénique se fixant à l'héparine. Le VEGF-A subit un épissage alternatif pouvant donner au moins 7 isoformes (VEGF-A121, VEGF-A145, VEGF-A165, VEGF-A165b, VEGF-A183, VEGF-A189, VEGF-A206), (Houck et al., 1991), (Poltorak et al., 2000). Le VEGF-B est présent sous deux isoformes qui ont la capacité de s'hétérodimériser avec le VEGF-A (Olofsson et al., 1996a), (Olofsson et al., 1996b). Le VEGF-C et VEGF-D n'ont qu'une seule isoforme et subissent un clivage protéolytique en position N- et C-terminale générant une protéine mature formant un dimère non covalent (Joukov et al., 1996), (Stacker et al., 1999).

Le gène codant pour le VEGF-E fait partie du génome du parvovirus et existe sous 3 isoformes (Lyttle et al., 1994), (Meyer et al., 1999), (Wise et al., 1999). Le dernier membre de la famille, le VEGF-F, trouvé dans le venin de serpent, est formé par deux protéines proches du VEGF-165 (Yamazaki et al., 2005). Quant au PlGF, il a été démontré à ce jour 4 isoformes (Maglione et al., 1991), (Hauser and Weich, 1993), (Maglione et al., 1993), (Cao et al., 1997).

Neuropiline-1 (NRP1) est capable de lier le VEGF-A121 (Pan et al., 2007a), le VEGF-A165 (Soker et al., 1998), le VEGF-B (Makinen et al., 1999), le VEGF-C, le VEGF-D (Kärpänen et al., 2006), le VEGF-E (Wise et al., 1999), le VEGF-F (Yamazaki et al., 2005) et le PlGF-2 (Migdal et al., 1998) (**Tableau 2**). NRP2 peut lier le VEGF-A145, le VEGF-A165 (Gluzman-Poltorak et al., 2000), le VEGF-A121 (Shraga-Heled et al., 2007a), le VEGF-C, le VEGF-D (Kärpänen et al., 2006) et le PlGF-2 (Gluzman-Poltorak et al., 2000).

Ces spécificités d'interactions peuvent s'expliquer par des particularités structurales. Par exemple, le VEGF-A165 contient un domaine HBD, (Heparin Binding Domain) pour se fixer à la fois sur l'héparine et NRP1 (Soker et al., 1998), (Pan et al., 2007a). Les isoformes PIGFb et VEGF-B165 ont également un domaine de liaison à l'héparine et une séquence homologue à celle du VEGF-A165 contrôlant la liaison avec NRP1 (Migdal et al., 1998) (Mamluk et al., 2002) (Vander Kooi et al., 2007).

Contrairement aux sémaphorines, il n'y a pas à ce jour de description d'une liaison directe du VEGF aux plexines. Ainsi le lien fonctionnel entre le VEGF et les plexines passe nécessairement par la mise en jeu d'un corécepteur capable de lier le VEGF, vraisemblablement NRP1 et/ou les VEGFR.

### **1.1.3. Autres ligands**

Différentes études ont démontré la capacité de NRP1 à fixer d'autres ligands tel que le PDGF-BB (homodimère composé de deux Platelet-derived growth factor B) sur des cellules du muscle lisse aortique (Banerjee et al., 2006), ou sur des cellules souches mésenchymateuses (Dhar et al., 2010). Le TGF- $\beta$  qui contrôle la prolifération ou la différenciation dans différents types cellulaires comme les lymphocytes T, peut se lier à NRP1 (Glinka and Prud'homme, 2008). Neuropiline-1 a la capacité également d'interagir avec l'HGF (Sulpice et al., 2008) ou les FGFs (1, 2, 4, 7) sur les cellules endothéliales (West et al., 2005). De manière remarquable, neuropiline-1 est aussi impliquée dans des liaisons avec des molécules de la matrice comme la fibronectine (Yaqoob et al., 2012) ou la galectine (Hsieh et al., 2008).

## **1.2 Fonctions biologiques du complexe neuropiline-plexine**

### **1.2.1. Rôle au cours du développement du système nerveux**

Le complexe neuropiline-plexine et ses ligands sont impliqués dans de nombreux processus pendant le développement et la maturation du système nerveux. Leurs fonctions principales sont le contrôle de la migration neuronale et le guidage axonal mais on les retrouve aussi impliquées dans des processus de prolifération et de survie (Kolodkin and Tessier-Lavigne, 2011). Les premières descriptions du rôle fonctionnel de neuropiline concernent la fixation de Sema3A pour l'induction du collapsus du cône de

croissance dans des axones des ganglions sensoriels de poulet (Luo et al., 1993). Ce rôle inhibiteur a été montré sur les neurones sympathiques, moteurs, corticaux ou hippocampiques. L'étude presque systématique des autres membres de la famille des sémaphorines de classe 3 démontrent que les Sema3B, 3C et Sema3F agissent principalement sur les neurones sympathiques alors que la Sema3E agit seulement sur les neurones sensoriels (Raper, 2000). Cette différence de réponse aux sémaphorines peut s'expliquer en partie par la présence ou non de NRP2. En effet, le récepteur NRP2 est exprimé uniquement sur les neurones sympathiques contrairement à NRP1 qui est présent dans les neurones sympathiques et sensoriels. La Sema3A se lie à NRP1 avec une haute affinité alors que Sema3F lie préférentiellement NRP2 (Chen et al., 1997). La nature du complexe récepteur définit généralement la réponse biologique. La migration des interneurons de l'éminence ganglionnaire est contrôlée par une compétition entre Sema3A et Sema3C et la liaison avec NRP1, NRP2 ou NRP1/NRP2 (Marin et al., 2001). Les fonctions décrites dépassent le guidage axonal puisque la Sema3A peut également provoquer l'apoptose dans des neurones et des progéniteurs neuronaux (Gagliardini and Fankhauser, 1999), (Shirvan et al., 1999), (Bagnard et al., 2001), (Bagnard et al., 2004). Les rôles chez l'adulte sont moins décrits en raison d'une faible expression. Cependant, Sema3A et Sema3F persistent dans l'hippocampe où elles pourraient servir à guider les neurones granulaires nouvellement formés (Skutella and Nitsch, 2001), (Sahay et al., 2005). NRP1 est exprimée par les cellules souches neurales embryonnaires (Maurer et al., 2003), (Ara et al., 2010) et participe au guidage et à la différenciation de ces cellules (Schwarz et al., 2009), (Gualandris et al., 2009). De nombreuses associations avec les plexines montrent également comment ce complexe récepteur intervient pour ramifier, emballer, défasciculer ou élaguer les faisceaux d'axones, (Waimey and Cheng, 2006), (Bilimoria and Bonni, 2013). D'autres travaux décrivent la participation des plexines dans la formation des dendrites et des synapses (Shen and Cowan, 2010). Les membres de la famille des plexines-A sont largement engagés dans la mise place des frontières entre les différentes parties du système nerveux en séparant par exemple la partie centrale de la partie périphérique (Mauti et al., 2007) et en y contraignant la migration des neurones sympathiques ou moteurs (Bron et al., 2007), (Waimey et al., 2008). PlexA4 induit par exemple la répulsion de l'axone en réponse soit à la Sema3A soit aux Sema6A et 6B (Suto et al., 2005). En dehors du guidage axonal, PlexA3 est impliquée dans le bourgeonnement des connexions (Bagri et al., 2003) et avec la Sema3F dans la distribution des connexions le long de la moelle épinière (Tran et al., 2009). Il existe une spécificité remarquable entre les ligands sémaphorines, les neuropilines et les plexines. Par exemple, l'expression d'un dominant négatif du récepteur PlexA1 dans les neurones sensoriels bloque le

collapse du cône de croissance induit par la Sema3A (Takahashi et al., 1999). Cependant, la surexpression de la forme dominante négative de PlexA2 dans les mêmes neurones neutralise la réponse à Sema3A (Rohm et al., 2000a). Ceci démontre que la fixation de Sema3A à neuropiline est nécessaire mais pas suffisante pour induire les effets biologiques. Un autre exemple de l'importance de la nature du complexe récepteur formé est celui de PlexD1 au cours du développement des connexions entre les neurones moteurs et sensoriels (Pecho-Vrieseling et al., 2009). De façon intéressante les corécepteurs NRP1 et VEGFR-2 peuvent convertir la répulsion axonale induite par PlexD1 en attraction (Chauvet et al., 2007), (Bellon et al., 2010).

On retrouve également le complexe NRP1-PlexA1 dans les cellules gliales. En effet plusieurs études ont montré une augmentation de ces deux récepteurs sur la microglie suite à son activation (Fujita et al., 2001). Les neurones exprimeraient la Sema3A pour qu'elle joue un rôle neuroprotecteur en déclenchant l'apoptose des cellules microgliales activées par des lésions neuronales (Majed et al., 2006). Mais c'est surtout au niveau des oligodendrocytes que différentes études ont mis en avant un rôle dans la chimiorépulsion des oligodendrocytes pendant le développement (Sugimoto et al., 2001), (Spassky et al., 2002), (Tsai and Miller, 2002). Plus particulièrement dans le nerf optique, où la migration des précurseurs oligodendrocytaires venant du cerveau est guidée entre autre par la Sema3A qui intervient alors comme un signal répulsif (Spassky et al., 2002). Une augmentation de son expression locale est retrouvée dans différents modèles de démyélinisation et des échantillons de sclérose en plaques (Williams et al., 2007). Une autre étude rapporte la présence des récepteurs de Sema3A, NRP1 et PlexA1, sur les précurseurs oligodendrocytaires et indique que leur expression est également augmentée après démyélinisation. Des expériences de gain ou de perte de fonctions dans des modèles murins de démyélinisation, démontrent que la Sema3A est capable de bloquer le recrutement des précurseurs oligodendrocytaires aux sites de démyélinisation (Piaton et al., 2011). Mais malgré ce rôle inhibiteur, le recrutement des précurseurs oligodendrocytaires n'est généralement pas perturbé dans les modèles de lésion ou de sclérose en plaques (Wolswijk, 1998), (Wolswijk, 2002), (Chang et al., 2000a), (Chang et al., 2002), (Kuhlmann et al., 2008). Certaines études dévoilent que Sema3A serait capable d'induire une réduction réversible de la croissance des prolongements dans des cultures d'oligodendrocytes adultes (Ricard et al., 2000) et causerait une redirection des cônes de croissances des oligodendrocytes loin de la Sema3A (Cohen et al., 2003). Plus récemment, la Sema3A émerge également comme un inhibiteur de la différenciation des précurseurs oligodendrocytaires. L'évaluation des marqueurs d'oligodendrocytes plus matures comme O4 et MBP (Myelin Basic Protein)

sous Sema3A montre une inhibition réversible des précurseurs oligodendrocytaires de rat. L'inhibition est maintenue quand la Sema3A est présente dans le milieu, mais les cellules retrouvent leur capacité à se différencier une fois la Sema3A retirée (Syed et al., 2011).

Toutes ces données montrent à quel point, les sémaphorines et leurs récepteurs sont impliqués au cœur même des processus du développement du système nerveux mais également dans ses processus pathologiques.

### 1.2.2. Rôles dans le système cardiovasculaire

Les cellules endothéliales et les neurones forment ensemble un réseau étendu coordonné fonctionnellement et structurellement. Par exemple, l'activité des nerfs sympathiques régule la pression sanguine en modifiant la résistance vasculaire périphérique (Long et al., 2009). Ces deux systèmes partagent les mêmes récepteurs et molécules de guidage pendant le développement neural et cardiovasculaire.

Au niveau cellulaire, l'expression de NRP1 augmente la migration et la survie des cellules endothéliales *in vitro* (Favier et al., 2006), (Wang et al., 2003). De plus, NRP1 semble impliquée dans la perméabilité vasculaire induite par le VEGFR-2 (Becker et al., 2005). L'expression de NRP1 semble essentielle pour induire le bourgeonnement et la ramification des vaisseaux induits par le VEGF-A (Kawamura et al., 2008). NRP1 potentialise également l'activité de prolifération du FGF-2 mais le mécanisme reste à élucider (West et al., 2005). La lectine Gal1 peut aussi lier NRP1 dans les cellules endothéliales via son domaine de reconnaissance des carbohydrates. L'interaction Gal1/NRP1 potentialise la migration induite par le VEGF sur le VEGFR-2 par l'intermédiaire de la voie SAPK1 (stress-activated protein kinase1)/JNK (c-Jun N-terminal kinase). L'expression de Gal1 dans les cellules endothéliales associées aux tumeurs suit celle de NRP1 et participe à l'adhésion des cellules tumorales sur les cellules endothéliales (Hsieh et al., 2008).

NRP1 est également un acteur important dans le développement du système cardiaque et vasculaire. NRP1 est un récepteur des facteurs angiogéniques de la famille du VEGF incluant les VEGF A, B, C, E et le PlGF, et son expression est retrouvée préférentiellement sur les artères alors que NRP2 est exprimée sur les veines et les vaisseaux lymphatiques (Herzog et al., 2001), (Eichmann et al., 2005). L'importance de NRP1 dans le développement vasculaire est illustrée par la létalité embryonnaire (entre

le 10<sup>ième</sup> et le 12,5<sup>ième</sup> jour) observée chez les souris KO en raison d'importantes anomalies cardiaques et vasculaires (Kitsukawa et al., 1997), (Kawasaki et al., 1999). Le KO conditionnel spécifique des cellules endothéliales est aussi associé à de gros défauts cardiaques et vasculaires (Mukoyama et al., 2005). L'étude de souris transgéniques exprimant une version mutée de NRP1 capable de lier le VEGF, mais pas la Sema3A, démontre que cette dernière impacte le développement du système nerveux mais finalement peu le développement du système vasculaire avec seulement des malformations mineures des ventricules (Gu et al., 2003). Ce résultat est en accord avec les anomalies cardiaques relevées chez la souris KO Sema3A. Cependant, ces souris présentent un plexus vasculaire primitif et non mature avec des anomalies du remodelage vasculaire au niveau de la tête et du tronc (Serini et al., 2003). Ces travaux dévoilent par ailleurs une boucle autocrine de Sema3A par les cellules endothéliales qui diminueraient ainsi leur adhérence (dépendante des intégrines) à la matrice extracellulaire pour permettre un remodelage vasculaire. Le niveau d'expression de NRP1 semble crucial puisque la surexpression de NRP1 dans un modèle de souris transgénique est également létale entre le 12<sup>ième</sup> et le 15,5<sup>ième</sup> jour en provoquant des malformations cardiaques et une augmentation des vaisseaux sanguins et des capillaires dilatés et hémorragiques (Kitsukawa et al., 1995). L'existence d'une balance fonctionnelle entre Sema3A et VEGF initialement proposée par le groupe de Klagsbrun, (Miao et al., 1999a), (Soker et al., 1998) est aujourd'hui considérée comme une coopération entre les deux facteurs qui se lient sur des domaines spécifiques de NRP1 (Vieira et al., 2007), (Appleton et al., 2007). Dans tous les cas, NRP1 est considérée comme le corécepteur majeur du VEGFR-2 en raison de sa capacité à augmenter la liaison du VEGF sur le VEGFR-2 pour faciliter l'induction d'une signalisation pro-migratoire (Soker et al., 2002), (Mac Gabhann and Popel, 2005). Cet effet de NRP1 passe clairement par la liaison du VEGF-A au VEGFR-2 (Whitaker et al., 2001), (Shraga-Heled et al., 2007b). La question de l'existence d'un hétérodimère NRP1-VEGFR-2 préformé avant la liaison du ligand n'est toujours pas tranchée de façon formelle puisque certains groupes décrivent que le VEGF est l'inducteur de ce complexe (Soker et al., 2002), (Pan et al., 2007a), alors que d'autres observent une formation constitutive du dimère indépendante du VEGF (Whitaker et al., 2001), (Shraga-Heled et al., 2007b). Une étude récente sur des cellules endothéliales semble renforcer l'hypothèse que la formation du complexe est bien dépendante du VEGF (Herzog et al., 2011). Des délétions dans le motif PDZ du domaine C-terminal intracellulaire conduisent à une diminution de la co-immunoprécipitation de NRP1 et VEGFR-2, suggérant des interactions intracellulaires pour la formation de l'hétérodimère (Prahst et al., 2008).

L'implication de la famille des plexines est, elle aussi, de mieux en mieux documentée. Tous les récepteurs plexines sont par exemple exprimés dans certaines cellules épithéliales et endothéliales durant la formation du cœur (Toyofuku and Kikutani, 2007). Des études montrent d'ailleurs que Sema3C et PlexA2 contribuent au développement normal des arches aortiques et au partitionnement des voies d'éjections cardiaques (Brown et al., 2001) (Kodo et al., 2009). Les plexines pourraient participer à la régulation de ces processus en séquestrant les NRPs pour bloquer leur interaction avec les ligands libres comme les VEGFs. La compétition fonctionnelle entre Sema3E et le VEGF peut également créer une balance capable de contrôler le bourgeonnement des vaisseaux lors de la vascularisation de la rétine (Fukushima et al., 2011). De plus, la détection de l'expression des plexines est devenue une méthode pour caractériser les sous populations dans les îlots sanguins (des amas de cellules formant les prémices du plexus vasculaire constitué de précurseurs de cellules endothéliales entourées de précurseurs de cellules hématopoïétiques) avant la formation des vaisseaux chez le poulet (ségrégation entre cellules PlexA1 ou PlexA2 positives (Herzog et al., 2005) ou le poisson zèbre (groupes de cellules exprimant PlexB2 ou PlexD1),(Lamont et al., 2009). Le rôle de la plexine-A1 a été mis en avant comme le récepteur de la Sema6D dans le cadre d'une signalisation bidirectionnelle dans les cellules du myocarde (Toyofuku et al., 2004a). D'autres complexes de récepteurs associant PlexA1, VEGFR-2 et OTK ont également pu être mis en évidence dans les cardiomyocytes de poulet (Toyofuku et al., 2004b). De même, PlexD1 est exprimée dans les cellules vasculaires des vaisseaux en formation chez la souris (van der Zwaag et al., 2002), (Gitler et al., 2004), (Gu et al., 2005) et chez le poisson zèbre (Torres-Vázquez et al., 2004). De manière intéressante, les travaux de Gu (Gu et al., 2005) démontrent que la signalisation de Sema3E par PlexD1 contrôle le développement vasculaire indépendamment de NRP1. Cette découverte a largement contribué au renversement du dogme affirmant que les neuropilines sont absolument nécessaires pour la transduction du signal des sémaphorines solubles de classe 3. Le lien étroit entre sémaphorines et le VEGF est renforcé par la démonstration d'une modulation de l'expression de PlexD1 par le VEGF. L'augmentation de PlexD1 en réponse au VEGF conduit à la formation d'une boucle de rétroaction négative qui se solde par l'inhibition de la voie Notch/Dll4 du VEGFR2 en réponse au VEGF. Cette inhibition est la conséquence directe de la liaison accrue de Sema3C consécutive à l'accumulation de PlexD1 à la surface des cellules (Kim et al., 2011). Enfin, la signalisation Sema-PlexD1 régule la production d'une forme soluble du VEGFR-1 (sFlt1) qui exerce alors une fonction anti-angiogénique en neutralisant le VEGF (Zygmunt et al., 2011).

Plus récemment le groupe de G. Neufeld a montré que les plexines du groupe A avaient des fonctions pro-angiogéniques. En effet, ses travaux démontrent que l'inhibition par des Sh-RNA de plexine-A4 et plexine-A1 impacte la prolifération induite par le FGFb ou le VEGF sur les cellules endothéliales mais aussi leur capacité à former des structures en tube dans des tests d'angiogenèse in vitro. De plus, cette étude montre la formation de complexes stables entre PlexA4 et le VEGFR-2 et PlexA4 et les FGFRs (1 et 2) qui permettent d'augmenter la phosphorylation de ces récepteurs suite à l'activation par leurs ligands. Enfin, ce travail met en avant le rôle de la Sema6B qui serait aussi responsable des effets pro-prolifératifs sur les cellules endothéliales (Kigel et al., 2011).

L'ensemble de ces données montre que l'implication des complexes neuropilines-plexines dans le système vasculaire est très large et fait l'objet de régulations très fines basées sur des compétitions fonctionnelles entre ligands et/ou la formation de plateformes de signalisation.

### **1.2.3. Rôles dans le système osseux**

Le développement et la maintenance du système osseux partagent beaucoup de similarités avec le système nerveux ou cardiovasculaire sur le plan des mécanismes de la migration cellulaire, différenciation ou encore de l'organisation du tissu. On retrouve en outre le rôle des molécules de guidage dans l'infiltration osseuse par les nerfs ou les vaisseaux mais aussi dans les mécanismes de formation et de résorption osseuse. Les ostéoblastes sont les cellules qui synthétisent la partie non-minérale des os et qui participent également à la minéralisation de la matrice initialement formée. Ils expriment divers ligands (Sema3A) et récepteurs (NRP1, NRP2, PlexA1, PlexA2, PlexA3) et interagissent directement avec les ostéoclastes précurseurs qui expriment plutôt les récepteurs (Gomez et al., 2005). PlexA1 est retrouvée sur les ostéoclastes où elle s'associe à des corécepteurs tels que TREM2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) (protéine transmembranaire de la super famille des immunoglobulines) et DAP12 (DNAX activation protein) (adaptateur transmembranaire s'associant à TREM2 pour transduire son activation) pour contrôler l'homéostasie osseuse (Takegahara et al., 2006). Le polymorphisme du gène de PlexA2 est un marqueur de susceptibilité de l'ostéoporose, du risque de fracture et de la densité minérale des os (Hwang et al., 2006) illustrant ainsi toute l'importance des plexines dans ce système tissulaire.

D'ailleurs, PlexD1 semble impliquée dans la squelettogenèse axiale puisque son absence induit des anomalies du squelette (Kanda et al., 2007), (Zhang et al., 2009). La famille des sémaphorines de classe 3 est très impliquée dans la formation osseuse et sa maintenance en contrôlant l'induction de la prolifération ou de la mort des différents types cellulaires. Le KO Sema3A montre des défauts de formation des os et du cartilage (Gomez et al., 2005). Dans le cartilage, Sema3A bloque la migration des chondrocytes (Okubo et al., 2011). Récemment, il a aussi été montré que la Sema3A contrôle les ostéoblastes et les ostéoclastes pour favoriser la formation osseuse. Cette fonction est assurée par la liaison Sema3A à NRP1 qui inhibe la différenciation des ostéoclastes en séquestrant PlexA1 à distance de TREM2 (Hayashi et al., 2012). L'injection de Sema3A en intraveineux chez la souris augmente fortement le volume et la régénération osseuse. La Sema3B quant à elle réduit au contraire la densité osseuse et induit des anomalies du squelette de la souris (Sutton et al., 2008).

#### **1.2.4. Dans le système immunitaire**

Le déclenchement d'une réponse immunitaire repose sur un phénomène de migration cellulaire suivi d'interactions cellules-cellules. Après avoir rencontré un antigène, les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) comme les cellules dendritiques, voyagent à travers le système lymphatique ou vasculaire jusqu'à la présentation de cet antigène aux lymphocytes T. La région de contact entre la cellule dendritique et le lymphocyte T est appelée la synapse immunologique. Les sémaphorines, plexines et NRPs sont là encore largement impliquées dans toutes ces interactions, activations, et communications entre les cellules du système immunitaire.

Par exemple, PlexA1 est exprimée sur les cellules dendritiques et contribue à l'activation des lymphocytes T par son effet sur les réarrangements du cytosquelette (O'Connor and Ting, 2008), (Tran-Van et al., 2011). Cette fonction de PlexA1 requiert à nouveau la formation d'un complexe de récepteurs dans lequel on retrouve TREM2 et l'adaptateur de protéine DAP12 en réponse à Sema6D (Takegahara et al., 2006). PlexA1 est aussi importante pour l'entrée des cellules dendritiques dans le système lymphatique (Takamatsu et al., 2010). Les sémaphorines solubles de classe 3, les plexines de la famille A ainsi que les neuropilines vont aider à réguler la migration des thymocytes (progéniteurs des lymphocytes T) en développement (Lepelletier et al., 2007). La triade Sema3A/NRP1/PlexA4 régule négativement la réponse immunitaire en inhibant la migration des monocytes et lymphocytes B et en réduisant l'activation des

lymphocytes T (Yamamoto et al., 2008). De façon contradictoire à ces fonctions inhibitrices, les cellules du système immunitaire inné déficientes pour PlexA4 ont une production de cytokines inflammatoires défectueuse (Wen et al., 2010). D'autres études montrent l'implication de PlexD1 dans le contrôle de la migration des lymphocytes B mémoire (Holl et al., 2011) ou des thymocytes (Choi et al., 2008).

Il semblerait que la durée de l'interaction entre les lymphocytes Treg et l'antigène présenté par les CPA dépende de NRP1. De plus, bloquer NRP1 induit une diminution de ce temps d'interaction et augmente la réponse immunitaire médiée par les lymphocytes Treg (Sarris et al., 2008). Ceci montre que NRP1 augmente la régulation négative de la réponse immunitaire par l'activation des lymphocytes Treg, ce rôle est confirmé dans une étude avec le KO conditionnel de NRP1 (Solomon et al., 2011) dans laquelle les auteurs ont trouvé que l'absence de NRP1 dans les lymphocytes TCD4+ est associée i) à l'augmentation de lymphocytes T helper17 ii) à la diminution de la fonctionnalité des Treg et iii) avec la sévérité de l'EAE (Experimental Autoimmune Encephalomyelitis).

Neuropiline a été identifiée comme un marqueur d'identité des deux types de lymphocytes Treg. Les Treg naturels (produits très tôt dans le thymus) ont une forte expression de NRP1 alors que les Treg induits plus tard en périphérie ont une faible expression de NRP1 (Yadav et al., 2012), (Weiss et al., 2012). Le TGF- $\beta$  induirait une augmentation de l'expression de NRP1 alors que l'IL-6 préviendrait cette induction par le TGF- $\beta$ . L'inflammation locale dans différents organes périphériques (cerveau, poumon) provoquerait une augmentation de l'expression de NRP1 dans les lymphocytes Treg induits (Weiss et al., 2012). Une autre étude démontre dans plusieurs modèles murins de mélanome que l'extinction de l'expression de NRP1 dans les cellules Treg conduit à une diminution de la formation et de la progression tumorale. Cette action anti-tumorale est très dépendante d'une diminution de l'infiltration des lymphocytes Treg dans le site tumoral qui est contrôlé par l'attraction du VEGF produit par la tumeur (Hansen et al., 2012). Très récemment il a été montré que la stabilité et la fonction de ces lymphocytes Treg dans le mélanome seraient maintenues par un axe NRP1-Sema4A (Delgoffe et al., 2013). Ces rôles pléiotropiques du complexe neuropilines/plexines conduisent tout naturellement vers des processus pathologiques. Je vais ici illustrer cette implication dans les processus tumoraux.

Types de Tumeurs	Expression de NRP1	Corrélation	Références
Gliomes	Augmentée	Grade et mauvais pronostic	(Ding et al., 2000), (Osada et al., 2004)
Neuroblastomes	Augmentée	aucune	(Fakhari et al., 2002)
Carcinomes non à petites cellules du poumon	Augmentée	Grade et mauvais pronostic	(Lantuéjoul et al., 2003), (Kawakami et al 2002)
Adénocarcinomes du sein	Augmentée	Progression tumorale	(Stephenson et al., 2002), (Bachelder et al 2003), (Sorbello et al 2003)
Adénocarcinomes de la prostate	Augmentée	Agressivité et grade	(Latil et al., 2000), (Vanveldhuizen et al., 2003)
Adénocarcinomes du pancréas	Augmentée	Mauvais pronostic	(Fukahi et al., 2004), (Hansel et al., 2004), (Parikh et al., 2003)
Adénocarcinomes des ovaires	Augmentée	Grade et agressivité	(Osada et al., 2006), (Baba et al., 2007)
Adénocarcinomes du colon	Diminuée	Mauvais pronostic	(Parikh et al., 2004), (Kamiya et al., 2006)
Carcinomes nasopharyngés	Augmentée	Progression tumorale et mauvais pronostic	(Xu et al., 2013)
Cancers des voies gastro-intestinales	Augmentée	Invasion	(Hansel et al., 2004)
Leucémies myéloïdes aiguës	Augmentée	Mauvais pronostic	(Kreuter et al ., 2006)
Mélanomes malins	Augmentée	Progression tumorale	(Straume and Akslen., 2003)

**Tableau 3: Expression et corrélation de neuropiline-1 dans différents cancers.**

### 1.2.5. Implication dans les processus tumoraux

Le cancer est un processus complexe dont la multiplicité des étapes et des composantes est admirablement résumée par Hanahan et Weinberg dans une revue incontournable et inimitable (Hanahan and Weinberg, 2011). Naïvement, à l'énoncé de ces événements en cascades telles que la prolifération anarchique, l'augmentation de la survie, la migration cellulaire ou encore l'angiogenèse sans oublier les perturbations du système immunitaire, il est impossible de ne pas penser aux sémaphorines, neuropilines et plexines dont nous venons de voir les implications dans ces diverses fonctions biologiques.

D'ailleurs, NRP1 est exprimé dans un très grand nombre de lignées cellulaires tumorales dérivées de cancer de la prostate, du rein, de la vessie (Sanchez-Carbayo et al., 2003), du colon, du pancréas, des ovaires et du poumon mais également de glioblastomes, de neuroblastomes (Fakhari et al., 2002), de leucémies (Kreuter et al., 2006), (Piechnik et al., 2013) et de mélanomes (Straume and Akslen, 2003). De plus, son expression est retrouvée dans les cellules de biopsie de patients atteints par beaucoup de ces cancers (**Tableau 3**). Cette expression est corrélée à l'agressivité de la tumeur, au grade tumoral et finalement à un mauvais pronostic de survie. C'est le cas dans les tumeurs de la prostate (Latil et al., 2000), (Vanveldhuizen et al., 2003), du sein (Stephenson et al., 2002), du poumon (Lantuéjoul et al., 2003), des ovaires (Osada et al., 2006), (Baba et al., 2007), du colon (Parikh et al., 2004), pour les carcinomes nasopharyngés (Xu et al., 2013) et pour des tumeurs d'autres organes des voies gastro-intestinales (Hansel et al., 2004). Cette corrélation existe aussi dans les gliomes (Broholm and Laursen, 2004), (Ding et al., 2000), (Osada et al., 2004). Plus précisément, ces études utilisent différentes techniques comme l'immunodétection sur des lignées humaines ou tissus provenant de biopsies, l'extraction protéique ou la quantification de l'ARN. Elles montrent toutes que l'expression de NRP1 est retrouvée d'une part sur les astrocytes néoplasiques mais également sur les cellules endothéliales en prolifération de façon préférentielle dans les GBM (20 astrocytomes II vs 46 GBM). Elles démontrent donc une corrélation entre le niveau de NRP1 et la vascularisation du gliome. De plus, l'expression de NRP1 augmente avec le stade et l'agressivité du gliome et les patients avec une forte expression de NRP1 présentent un taux de survie plus faible, cette analyse est réalisée sur 37 échantillons de gliomes humains.

Les effets favorables à la progression tumorale sont souvent attribués à une augmentation de l'activation du VEGFR-2 en réponse au VEGF. Cependant certaines

tumeurs expriment NRP1 mais pas le VEGFR-2, ni le VEGFR-1 ce qui semble donc montrer un mécanisme indépendant des VEGFR. La surexpression de NRP1 stimule la progression tumorale par une potentialisation des effets de la voie HGF/Met ce qui favorise l'invasion des cellules tumorales (tumeurs du pancréas et gliomes) (Hu et al., 2007), (Matsushita et al., 2007). De plus, NRP1 en liant l'HGF peut induire une stimulation de la migration et de la prolifération des cellules endothéliales (Sulpice et al., 2008). Ceci est en accord avec l'une des premières démonstrations de l'effet de NRP1 dans l'angiogenèse tumorale dans le cas de carcinome de rat surexprimant NRP1. Ces cellules possèdent une capacité plus grande à lier le VEGF165 *in vitro*, une augmentation de la prolifération des cellules endothéliales, de la densité des micro-vaisseaux tumoraux, une capacité à stocker plus de VEGF *in vivo* associée à une diminution de l'apoptose des cellules endothéliales dans la tumeur (Miao et al., 2000). Des résultats similaires sont obtenus avec des greffes de cellules humaines d'adénocarcinome du colon surexprimant NRP1 (Parikh et al., 2004), mais également avec des cellules humaines de carcinome pancréatique surexprimant NRP1, qui présentent alors une augmentation constitutive de la voie de signalisation MAPK (Wey et al., 2005). Ces cellules sont moins susceptibles à un détachement induisant l'apoptose (l'anoikis) et montrent une chimiorésistance. Ces résultats suggèrent une voie importante VEGF-165/NRP1/VEGFR-2 augmentant la croissance tumorale. De façon similaire, la surexpression de NRP1 dans des cellules de glioblastome humain U87MG qui normalement ont un niveau relativement faible de ce récepteur, résulte en une accélération de la croissance tumorale et de l'angiogenèse par rapport aux tumeurs contrôles (Hu et al., 2007). Des résultats opposés sont obtenus en diminuant l'expression de NRP1 dans les cellules tumorales par des shRNA qui induisent une diminution des propriétés invasives des cellules de cancer du poumon et de la formation de nodules métastatiques *in vivo* (Hong et al., 2007).

L'intérêt de NRP1 comme cible thérapeutique a été démontré récemment par la production d'un anticorps anti-NRP1, dirigé contre le domaine b, qui réduit l'angiogenèse et possède des effets additifs avec les thérapies anti-VEGF pour la réduction de la croissance tumorale. Les vaisseaux qui se développent dans les tumeurs traitées avec des anti-VEGF montrent une association étroite avec les péricytes, contrairement aux tumeurs traitées avec les deux inhibiteurs qui ne présentent pas cette organisation. Il a été proposé que le blocage de NRP1 inhibe le remodelage vasculaire en maintenant les vaisseaux dans un état de dépendance envers le VEGF, ce qui les rendrait plus sensibles aux thérapies anti-VEGF (Pan et al., 2007b).

Le rôle des sémaphorines dans la progression des cancers est plus ambigu car certains travaux utilisent les sémaphorines comme anti-tumoraux (Casazza et al., 2011) alors que dans le cas des gliomes une boucle autocrine de Sema3A semble stimuler la dissémination des cellules tumorales, contribuant ainsi à l'aggravation de la tumeur (Bagci et al., 2009). PlexA2 est surexprimée dans les cancers du sein agressifs (Gabrovska et al., 2011) et dans les métastases du cancer de la prostate par rapport à la tumeur primaire (Tian et al., 2013). Une autre étude démontre que SOX4 régulerait positivement l'expression de la famille des Sema3 ainsi que ces récepteurs PlexAs et NRP et favoriserait la croissance tumorale dans les cancers de la prostate (Huang et al., 2012). Une analyse génétique a par ailleurs montré dans les mélanomes, l'amplification et la mutation de PlexA4 qui pourrait inactiver le récepteur et par conséquent augmenter la migration tumorale (Balakrishnan et al., 2009). Une étude rapporte que la Sema6D promeut la phosphorylation du VEGFR-2 de façon PlexA1 dépendante. Ce complexe induit une augmentation de la survie des cellules tumorales de mésothéliome malin en empêchant la mort cellulaire par anoikis (Catalano et al., 2009). Une autre étude récente démontre l'interaction de PlexA4 avec le VEGFR-2 et les FGFR-1 et 2 dans les cellules de glioblastome et les cellules endothéliales pour favoriser la progression tumorale et l'angiogenèse en activant ces récepteurs partenaires (Kigel et al., 2011). Il semble donc clair que le rôle réel des plexines et des sémaphorines de classe 3 dépende du type cellulaire et plus particulièrement du complexe de récepteurs présent à la membrane, permettant d'induire un signal positif ou négatif à partir d'un même ligand.

Finalement, le récepteur PlexD1 émerge dans le domaine de la recherche sur le cancer car il est surexprimé de façon ubiquitaire dans les tumeurs, les cellules malignes, mais pas dans la vascularisation mature normale (Roodink et al., 2005), (Roodink et al., 2009). En réalité la signalisation PlexD1 semble elle aussi plus complexe. En effet, l'extinction de l'expression de Sema3E, son ligand, ou directement de PlexD1 inhibe la dissémination de métastases mais pas leur croissance. De façon contradictoire, la Sema3E augmente la capacité d'invasion des cellules du cancer de la prostate mais inhibe la formation des vaisseaux sanguins impactant la croissance tumorale chez la souris (Blanc et al., 2011). Récemment deux voies de signalisation distinctes ont été mises à jour, a) l'une de façon paracrine, où la Sema 3E produite par les cellules tumorales va agir sur PlexD1 induisant une répulsion des cellules endothéliales, ce qui réduit la densité des vaisseaux et la croissance tumorale (Casazza et al., 2010), b) l'autre, via une association de PlexD1 avec HerB2 qui est responsable de la capacité d'invasion et de diffusion métastatique (Casazza et al., 2010).

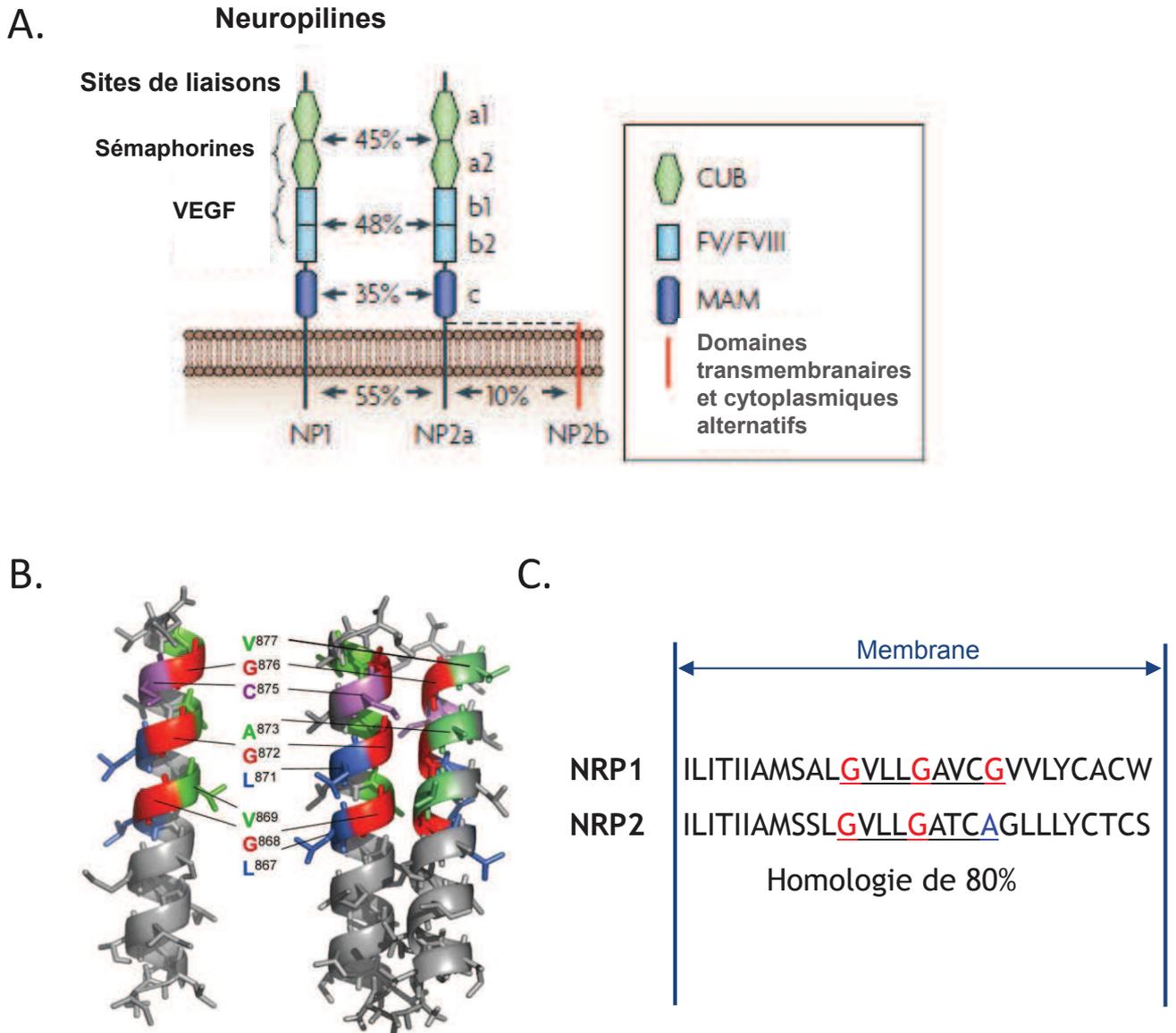
Toutes ces différences de fonctions résident dans la nature des ligands et de leurs propriétés de liaisons à des complexes de récepteurs. La prochaine partie détaille la structure de ces domaines et propose la vision actuelle de la nature des interactions entre neuropilines et plexines.

## **2. Présentation détaillée du complexe neuropiline-plexine**

### **2.1. Les neuropilines**

L'identification de neuropiline-1 (NRP1) remonte à 1987 grâce à un anticorps (A5) développé pour réagir contre les protéines du tectum (Takagi et al., 1987). Son nom est lié à l'expression de la neuropile où on lui confère initialement des propriétés d'adhérence pour les interactions axo-axonales (Satoda et al., 1995). Il faudra attendre dix ans après sa découverte pour identifier son rôle de récepteur membranaire de la sémaphorine sécrétée Sema3A (Kolodkin et al., 1997), (He and Tessier-Lavigne, 1997) et plus généralement des sémaphorines de classe 3 (Sema3B, Sema3C, Sema3E et Sema3F) (Chen et al., 1997), (Takahashi et al., 1998). Suite à la démonstration de son expression dans les cellules endothéliales et sa capacité à fixer le VEGF-A165 (Soker et al., 1998) plusieurs études ont prouvé que NRP1 est capable d'interagir avec les différentes isoformes du VEGF, le VEGF-A121 (Pan et al., 2007a), le VEGF -B (Makinen et al., 1999), les VEGF -C et -D (Kärpänen et al., 2006) et le VEGF-E (Wise et al., 1999) mais aussi avec des facteurs de croissance comme le PIGF (Migdal et al., 1998).

Il faut noter également l'existence de neuropiline-2 (NRP2) découverte également par les groupes de Corey Goodman et Marc Tessier-Lavigne (Chen et al., 1997), (Kolodkin et al., 1997). Cette neuropiline peut, elle aussi, fixer différentes sémaphorines de classe 3 mais avec des affinités variables. Ainsi, NRP2 fixe les sémaphorines 3C et 3B avec une affinité similaire à celle de NRP1 mais se lie avec la sémaphorine 3F avec une affinité dix fois supérieure (Chen et al., 1997). La fixation avec la sémaphorine 3A est considérée comme faible en raison d'une affinité de 30 à 50 fois inférieure à celle pour NRP1 (Takahashi et al., 1998). Comme pour NRP1, certains travaux montrent que NRP2 peut se lier au VEGF-A165 et 145, au VEGF-C et au PIGF-2 (Gluzman-Poltorak et al., 2000).



**Figure 14: Structure des neuropilines-1 et 2.** **A.** Les deux neuropilines sont des récepteurs transmembranaires. Elles contiennent deux domaines CUB (complement binding) (ou domaines a1 et a2), deux domaines homologues aux facteurs de coagulation V et VII (FV/FVIII) (ou domaines b1 et b2) et un domaine MAM (meprin/A5/ $\mu$ -phosphatase). Le site de liaison des sémaphorines est localisé sur le domaine a1/a2 alors que le site de liaison du VEGF est localisé sur le domaine b1/b2, les pourcentages indiquent l'homologie entre les différents domaines des neuropilines, adaptée de Neufeld and Kessler., 2008. **B.** Homodimérisation du domaine transmembranaire de NRP1, d'après Roth et al., 2008. **C.** Comparaison des séquences transmembranaires humaines de NRP1 et NRP2 contenant des motifs de type GxxxG.

### 2.1.1 Structure des neuropilines

La neuropiline-1 et la neuropiline-2 sont deux glycoprotéines d'environ 130 et 140 kDa, composées d'un long domaine extracellulaire (environ 840 résidus), d'un domaine transmembranaire court (25 résidus) et d'un petit domaine cytoplasmique (environ 40 résidus). Les deux récepteurs ne présentent que 44 % d'homologie de séquence (Chen et al., 1997) sur l'ensemble de la protéine mais affichent une homologie se rapprochant des 80 % pour leurs domaines transmembranaires (**Figure 14A**).

#### Le domaine extracellulaire

Le domaine extracellulaire est divisé en 5 parties (**Figure 14A**). On trouve à l'extrémité N-terminale le domaine A, constitué de deux domaines répétés a1 et a2 qui sont des homologues aux facteurs de liaison du complément C1r et C1s ou domaine CUB (complement binding protein homology). Le domaine B est lui aussi divisé en deux domaines répétés b1 et b2 homologues aux facteurs de coagulation V et VII (FV/VIII). Le domaine juxtamembranaire C ou MAM (meprin/A5/ $\mu$ -phosphatase) présente des homologies avec les domaines de la tyrosine phosphatase  $\mu$  et les méprines).

Les sémaphorines se lient par leur partie N-terminale sur le domaine A et par leur partie C-terminale sur le domaine A et B. Elles nécessitent donc une fixation sur les deux domaines en même temps. Les isoformes VEGFs interagissent préférentiellement avec le domaine B (Nakamura et al., 1998). Des mutations dans le domaine A induisent une perte de la fixation de la Sema 3A mais n'impactent pas la fixation du VEGF-165 (Gu et al., 2002). La nécessité pour les deux ligands de se lier au domaine B de NRP1 permet d'expliquer la compétition fonctionnelle qui existe entre ces deux ligands (Miao et al., 1999b).

Le domaine B est essentiel et suffisant pour la fixation du VEGF-165, le PIGF et le VEGF-C, (Mamluk et al., 2002), (Gu et al., 2002), (Kärpänen et al., 2006). Il est aussi le site de fixation de l'héparine qui, lorsqu'elle est présente, augmente la fixation du VEGF-165 et du PIGF à NRP1 (Mamluk et al., 2002). Le site de fixation de l'héparine est un motif de résidus basiques continus sur b1 et b2 (Vander Kooi et al., 2007). Des données de cristallographie viennent confirmer ces observations d'interactions entre les sémaphorines et NRP1 (Appleton et al., 2007).

Le domaine MAM n'est pas un site de fixation mais il est considéré comme un site d'hétéro ou d'homodimérisation du récepteur. En effet, de nombreuses versions mutantes du récepteur, montrent que les ligands peuvent toujours se fixer en son

absence mais que la fonction biologique de Sema3A est perdue. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation démontrent que l'absence de ce domaine bloque l'oligomérisation du récepteur (Nakamura et al., 1998), (Giger et al., 1998) (Renzi et al., 1999). Néanmoins, une oligomérisation résiduelle est toujours présente en l'absence du domaine C (Nakamura et al., 1998). En fait, cette homodimérisation résiduelle pourrait largement s'expliquer par le fait que les auteurs ont remplacé les domaines transmembranaires et cytoplasmiques de NRP1 par des domaines chimères contenant des motifs de dimérisation semblables à ceux présents dans le domaine transmembranaire.

### Le domaine transmembranaire de neuropiline-1

Ce domaine est composé de vingt-cinq acides aminés (**Figure 14B, C**). Les travaux cités précédemment sur les mutants n'ont pu montrer aucun rôle particulier du domaine transmembranaire de NRP1, à par celui d'ancrage à la membrane. Le remplacement du domaine transmembranaire et intracellulaire de NRP1 par ceux de NRP2 ou L1CAM n'affecte pas la signalisation Sema3A (Nakamura et al., 1998). Ce remplacement n'affecte pas ses propriétés d'interaction avec ses ligands (Chen et al., 1997). Les travaux du laboratoire ont montré l'importance du segment transmembranaire dans l'oligomérisation de NRP1 en raison de la présence d'une séquence de type GxxxGxxxG (Roth et al., 2008). Cette découverte place le domaine transmembranaire au cœur des mécanismes qui contrôlent la dimérisation de NRP1, une étape essentielle pour le déclenchement des voies de signalisation associées à ses fonctions biologiques.

### Le domaine intracellulaire

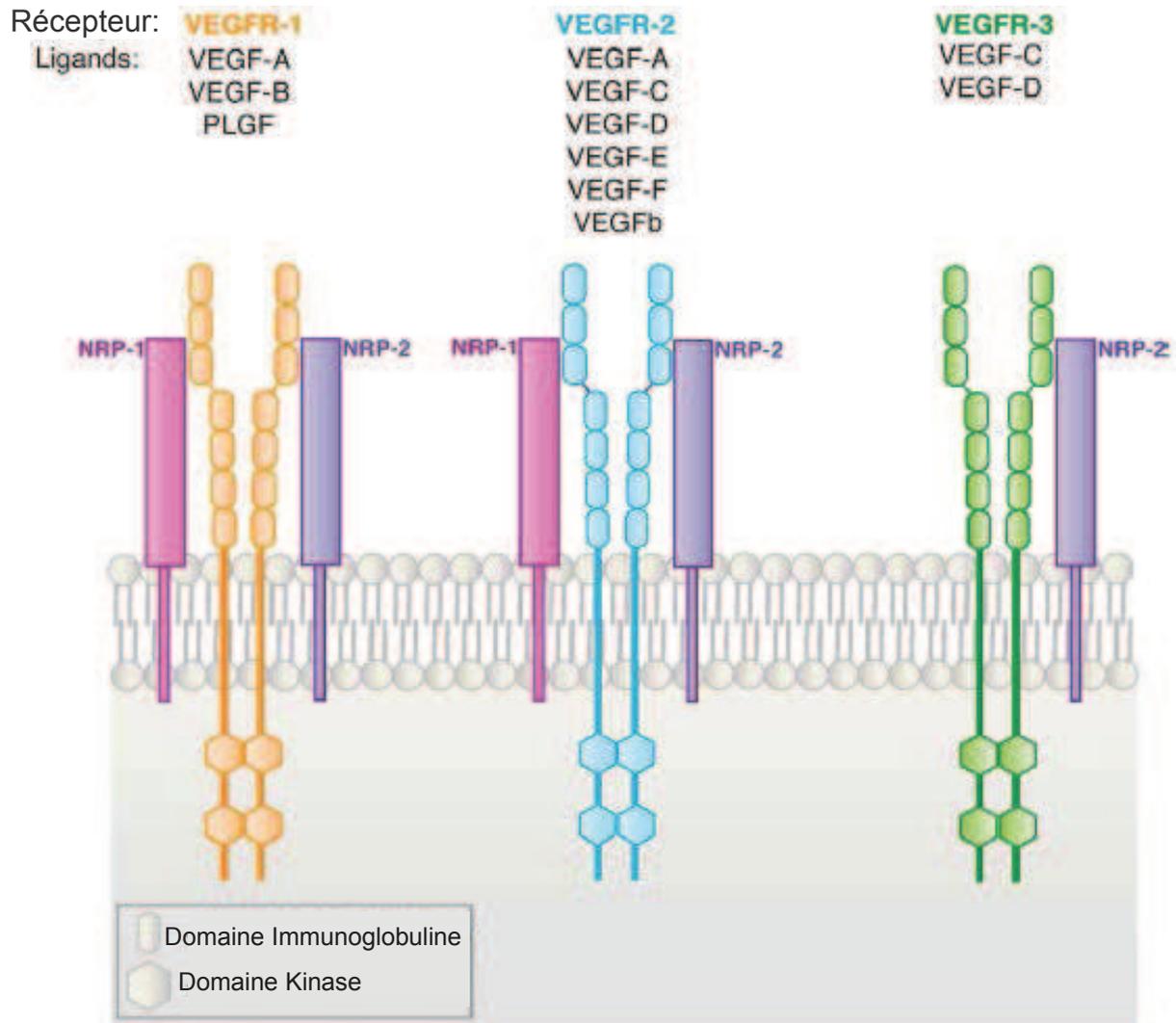
Le domaine intracellulaire est composé d'une quarantaine de résidus, et ce domaine n'a pas de motif de signalisation identifié à ce jour et il n'est pas nécessaire ni pour la fixation du ligand ni pour la transduction du signal (Chen et al., 1997) (Nakamura et al., 1998). Ainsi, NRP1 doit s'associer avec un autre récepteur pour déclencher une voie de signalisation. Cependant, une étude basée sur la production de protéines chimériques composées de la partie extracellulaire de l'EGFR et de la partie intracellulaire de NRP1 a pu montrer l'existence d'une transduction de signaux indépendants des autres domaines du récepteur. Cette signalisation semblerait passer par le motif C-terminal SEA (S : sérine, E : acide glutamique, A : alanine) (Wang et al., 2003). Ces trois acides aminés SEA sont très conservés du Xénope à l'homme et auraient la capacité d'interagir avec le domaine PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) central de la protéine NIP (Cai and Reed, 1999). Les protéines adaptatrices contenant des domaines PDZ pourraient donc connecter le domaine cytoplasmique de NRP1 avec des molécules intracellulaires de

signalisation. D'ailleurs, l'une de ces protéines GIPC (impliqués dans le recyclage de récepteur par endocytose), (De Vries et al., 1998) intervient dans le recyclage de NRP1 et de VEGFR-2 (Ballmer-Hofer et al., 2011). Cette même protéine contribuerait à l'activation de la voie de survie Akt par le complexe VEGF/NRP1 dans les cellules endothéliales (Wang et al., 2007). Le KO GIPC présente des défauts d'organisation des vaisseaux inter-segmentaux et dorsaux chez le poisson zèbre (Wang et al., 2006) qui ressemble au phénotype observé chez le KO NRP1. L'absence sélective du domaine cytoplasmique de NRP1 chez la souris ne perturbe pas la vasculogénèse et l'angiogénèse mais impacte la différenciation artère veine dans la rétine (Fantin et al., 2011), bloque le trafic du VEGFR-2 ainsi que la signalisation ERK induisant la formation des artères (Lanahan et al., 2013). D'autres protéines cytosoliques comme FlnA (Filamin-A, protéine d'adhérence focale) impliquée dans la migration des cellules endothéliales (Seerapu et al., 2013) et la synectine requise pour le branchement artériel indépendant du complexe VEGF-165/VEGFR-2 (Gao et al., 2000), (Chittenden et al., 2006) interagissent également avec le domaine cytoplasmique de NRP1.

### 2.1.2 Données génétiques

Chez l'homme, le gène codant pour NRP1 est situé sur le locus 12 du bras court du chromosome 10 (10p12). Il est composé de 19 exons et 16 introns, d'une longueur approximative de 157 kb. Chez la souris le locus est sur le chromosome 8 (Rossignol et al., 1999), (Rossignol et al., 2000), (Lander et al., 2001). On trouve quatre isoformes solubles de NRP1: s11NRP1, s12NRP1, S11NRP1, S12NRP1 (Gagnon et al., 2000), (Rossignol et al., 2000) (Cackowski et al., 2004). Chez le poisson zèbre, il a été démontré la présence de deux gènes codant pour NRP1, NRP1a et NRP1b (Yu et al., 2004) (Bovenkamp et al., 2004) ainsi qu'une forme soluble NRP1b(s) (Bovenkamp et al., 2004).

Le gène codant NRP2 est situé sur le locus 34 du bras long du chromosome 2 (2p34). Il est composé de 23 exons et 16 introns d'une longueur de 115 kb (Lander et al., 2001; Rossignol et al., 1999). Il y a un exon supplémentaire, le 16b, situé dans l'exon 15 qui peut être excisé en deux isoformes alternatives, NRP2a et NRP2b, qui vont elles-mêmes donner quatre formes alternatives, NRP2a(17), NRP2a(22), NRP2b(0) et NRP2(5). Une forme soluble a également été caractérisée (sNRP2, (Rossignol et al., 2000). Chez le poisson zèbre on trouve également deux gènes pour NRP2, *nrp2a* et *nrp2b* (Yu et al., 2004) (Bovenkamp et al., 2004).



**Figure 15: Structure des VEGFRs et leurs interactions avec les neuropilines.** Le VEGFR-1 est représenté en orange, le VEGFR-2 en bleu et le VEGFR-3 en vert. Neuropiline-1 (NRP1) est représenté en rouge et neuropiline-2 (NRP2) en violet. D'après Patel-Hett S and D'Amore PA., 2012.

## 2.2. Identification des partenaires de signalisation des neuropilines

Comme discuté précédemment, NRP1 doit dans la plupart des cas s'associer à un corécepteur pour déclencher une voie de signalisation. Au cours des dix dernières années de très nombreux partenaires de signalisation ont été décrits.

### 2.2.1. Les plexines

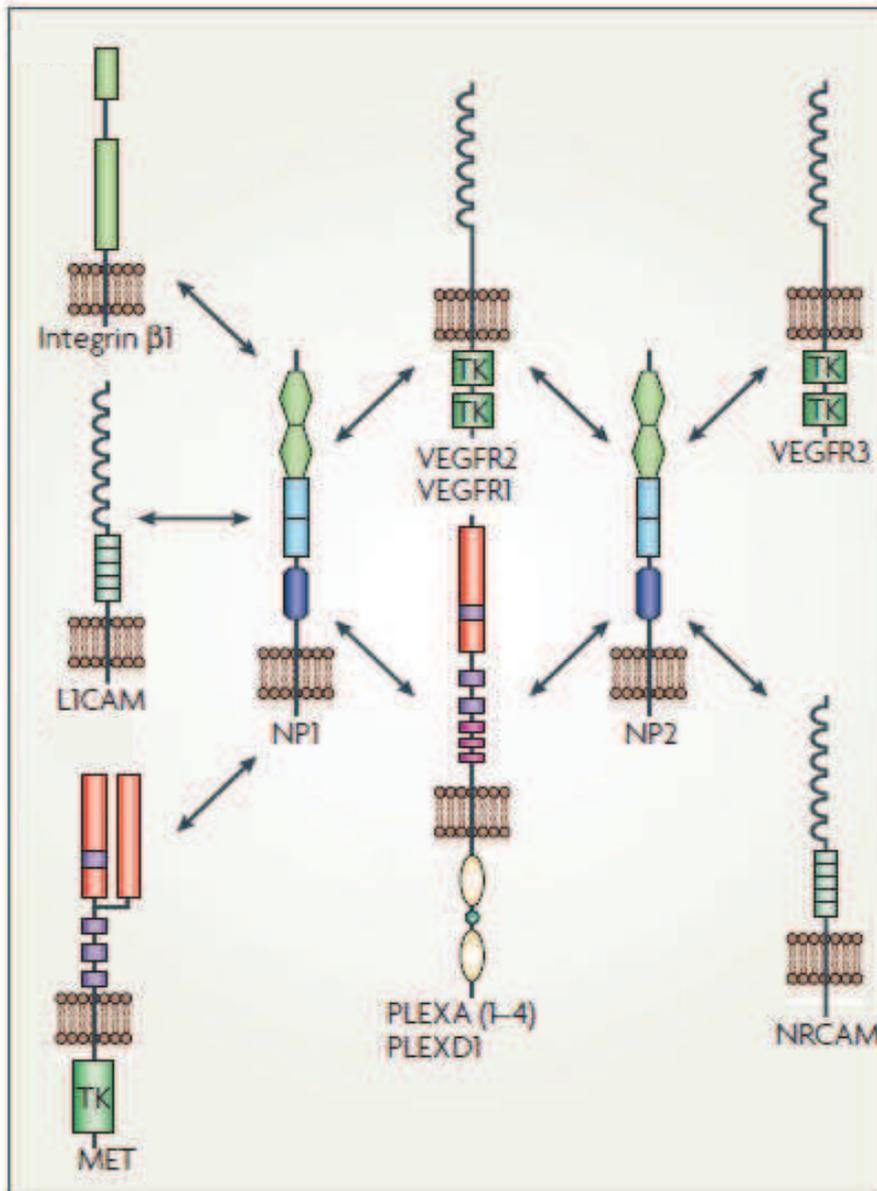
Les plexines sont les récepteurs associés avec les neuropilines des sémaphorines de classe 3. Il s'agit essentiellement des plexines-A1-A4 ainsi que la plexine-D1 qui peuvent former des complexes multimériques NRP1. Le cas des plexines fait l'objet d'une présentation détaillée dans la suite du manuscrit (voir paragraphe II.2.4.).

### 2.2.2. Les VEGFRs

Les trois récepteurs du VEGF, le VEGFR-1 (Flt-1), le VEGFR-2 (KDR/Flk-1) et le VEGFR-3 (Flt-4) peuvent s'associer aux NRPs (**Figure 15**)

Le récepteur VEGFR-1 peut interagir avec une forte affinité avec NRP1 (Fuh et al., 2000), cette interaction inhibe la fixation du VEGF-A165 sur NRP1. Le VEGFR-1 peut donc être considéré comme un régulateur négatif de l'angiogenèse en diminuant l'effet facilitateur de NRP1 sur la signalisation du VEGFR-2. Par ailleurs, la répulsion induite par Sema3A sur des cellules de médulloblastome nécessite un couplage entre NRP1 et le VEGFR-1 (Bagnard et al., 2001) induisant une modulation de l'activité de la voie des MAP kinases ERK1/2 et p38 (Bagnard et al., 2004).

Le VEGF-A165 a une affinité augmentée pour le VEGFR-2 en présence de NRP1. L'inhibition de l'interaction de NRP1 avec le VEGF-A165 réduit la liaison du VEGF avec le VEGFR-2 et bloque ainsi ses fonctions biologiques (Soker et al., 1998). De manière intéressante, il n'est possible de co-immunoprécipiter VEGFR-2 et NRP1 qu'en présence du VEGF-A165 qui apparaît donc nécessaire pour l'induction de la formation de ce complexe (Soker et al., 2002), (Neufeld et al., 2002). Ceci n'est pas le cas pour le VEGF-121 qui n'est pas capable de former ce complexe malgré sa fixation sur le VEGFR-2 pour lequel il n'induit que peu d'effet biologique (Whitaker et al., 2001). Neuropiline-2 peut également interagir avec le VEGFR-1 (Gluzman-Poltorak et al., 2000) ou avec le VEGFR-2 et le VEGFR-3 pour induire la survie et la migration cellulaire



**Figure 16: Interactions principales des neuropilines avec leurs co-récepteurs.** Les récepteurs qui forment des complexes avec neuropiline-1 (NRP1) sont les vascular endothelial growth factor récepteurs 1 et 2 (VEGFR-1 et -2), le récepteur tyrosine kinase de l'Hépatocyte growth factor MET, le récepteur d'adhésion L1CAM, l'intégrine β1 et les plexines A1, A2, A3, A4 et D1. Neuropiline-2 quant à lui interagit avec les 3 VEGFRs, les plexines et le récepteur d'adhésion NRCAM. Adaptée de Neufeld and Kessler., 2008

(Favier et al., 2006). Le VEGF-A et le VEGF-C favorisent l'interaction NRP2-VEGFR-2 (Favier et al., 2006). Enfin, il existe un processus de co-internalisation de NRP2 et VEGFR-3 dans des vésicules d'endocytose induites par la fixation du VEGF-C et du VEGF-D sur le VEGFR-3 (Kärpänen et al., 2006).

### 2.2.3. Les molécules d'adhérence

L1-CAM et Nr-CAM sont des glycoprotéines de la superfamille des molécules d'adhérence cellulaire. Ces protéines transmembranaires contiennent 6 domaines immunoglobuline et 5 domaines de type fibronectine III (Schachner, 1991).

L1-CAM a des fonctions d'adhérence cellulaire mais elle est aussi impliquée dans la croissance neuritique (Brümmendorf and Rathjen, 1996). Des études d'interaction mettent en évidence la formation d'un complexe entre NRP1 et L1-CAM par leurs domaines extracellulaires, et ce, indépendamment de la présence de Sema3A (**Figure 16**). Cette interaction est impliquée dans le guidage axonal en convertissant les effets inhibiteurs de Sema3A en effets promoteurs de la croissance (Castellani et al., 2000). Là encore, la signalisation engendrée par ce complexe est la voie des MAP Kinases. L1-CAM et NRP1 sont co-internalisées après l'activation du complexe par Sema3A (Castellani et al., 2004). Nr-CAM, quant à elle, peut interagir avec NRP2 pour participer au complexe récepteur de Sema3B et Sema3F (Falk et al., 2005).

### 2.2.4. Autres récepteurs

Beaucoup d'autres interactions de NRP1 ont été décrites. Par exemple, dans les cellules tumorales, l'interaction du TGF- $\beta$ R-I ainsi que du TGF- $\beta$ R-II avec NRP1 augmente l'activité du TGF- $\beta$  (Glinka and Prud'homme, 2008). De même, l'interaction de C-MET avec NRP1 potentialise l'activité du HGF (Matsushita et al., 2007), (Sulpice et al., 2008). NRP1 peut former également un complexe avec un homodimère de PDGFR $\alpha$  dans des cellules mésenchymateuses (Ball et al., 2010). Le FGFR1 (West et al., 2005), le transporteur de Glucose GLUT-1 (Ghez et al., 2006) peuvent se lier à NRP1. Dans le cas de GLUT-1, l'interaction avec NRP1 participe à l'entrée du virus HTLV-1 (Human T-cell lymphotropic virus type 1) dans les cellules. NRP1 et l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$  s'associent par la partie cytoplasmique dans des cellules endothéliales (Valdembri et al., 2009) ou dans

le contexte tumoral (Yaqoob et al., 2012). Enfin, une nouvelle interaction extracellulaire entre l'EGFR et NRP1 amplifie les voies de signalisation de l'EGF (Rizzolio et al., 2012).

Il existe donc un très grand nombre de partenaires de signalisation pour NRP1. Il est aujourd'hui très difficile d'établir une hiérarchie de ces interactions dont la description repose essentiellement sur des approches biochimiques qui ne sont pas toujours bien couplées avec les effets biologiques sous-jacents.

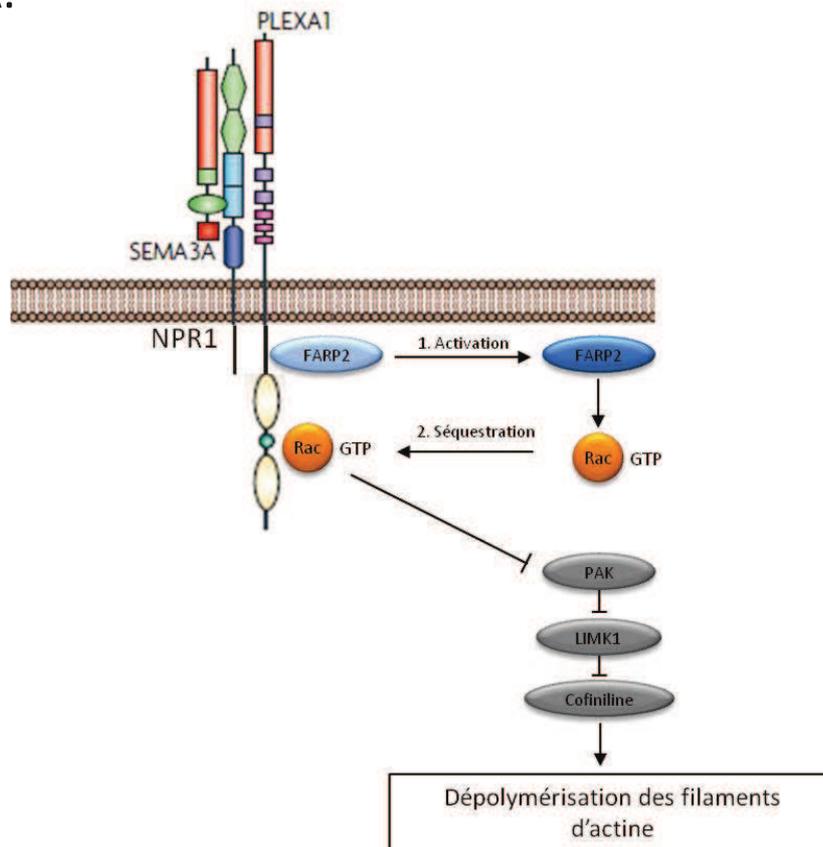
### **2.3. La signalisation de neuropiline-1**

Comme discuté précédemment, l'essentiel de la signalisation intracellulaire de NRP1 passe par le recrutement de co-récepteurs offrant ainsi un large spectre de voies de signalisation compatibles avec la diversité des fonctions associées à ce récepteur.

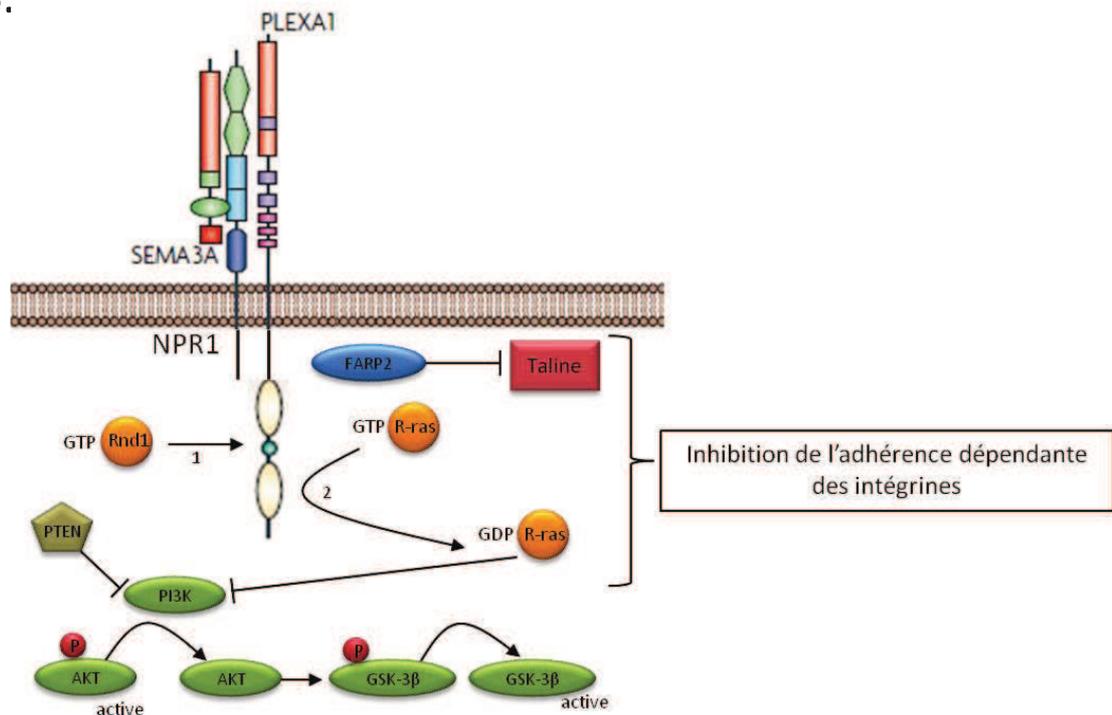
#### **2.3.1 Voies intracellulaires induites par la plexine-A1**

Les plexines peuvent interagir directement avec la famille des petites GTPases Rho et Ras. Les protéines Rho et Ras induisent un signal de type on/off en fonction de l'état de phosphorylation du GDP (guanosine diphosphate) vers le GTP (guanosine triphosphate). Cette activation est sous le contrôle de protéines régulatrices comme les GAPs (GTPase-activating proteins) qui catalysent l'hydrolyse du GTP en GDP et les GEFs (guanine exchange factors) qui participent à l'activation en facilitant l'échange du GDP pour le GTP (Vetter and Wittinghofer, 2001), (Bos et al., 2007). Dans la famille des petites GTPases, Rho, Rac1, Cdc42 et RhoA, sont directement impliquées dans le remodelage du cytosquelette d'actine et sont par conséquent très importantes pour la motilité et le maintien de la morphologie des cellules (Hall, 1998). La sous-classe Rnd fait aussi partie de la famille des protéines Rho et joue un rôle spécial dans l'hydrolyse des GTPases. On considère qu'elles sont constitutivement activées et que leur fonction est contrôlée en grande partie par leur niveau d'expression et leur localisation cellulaire

A.



B.

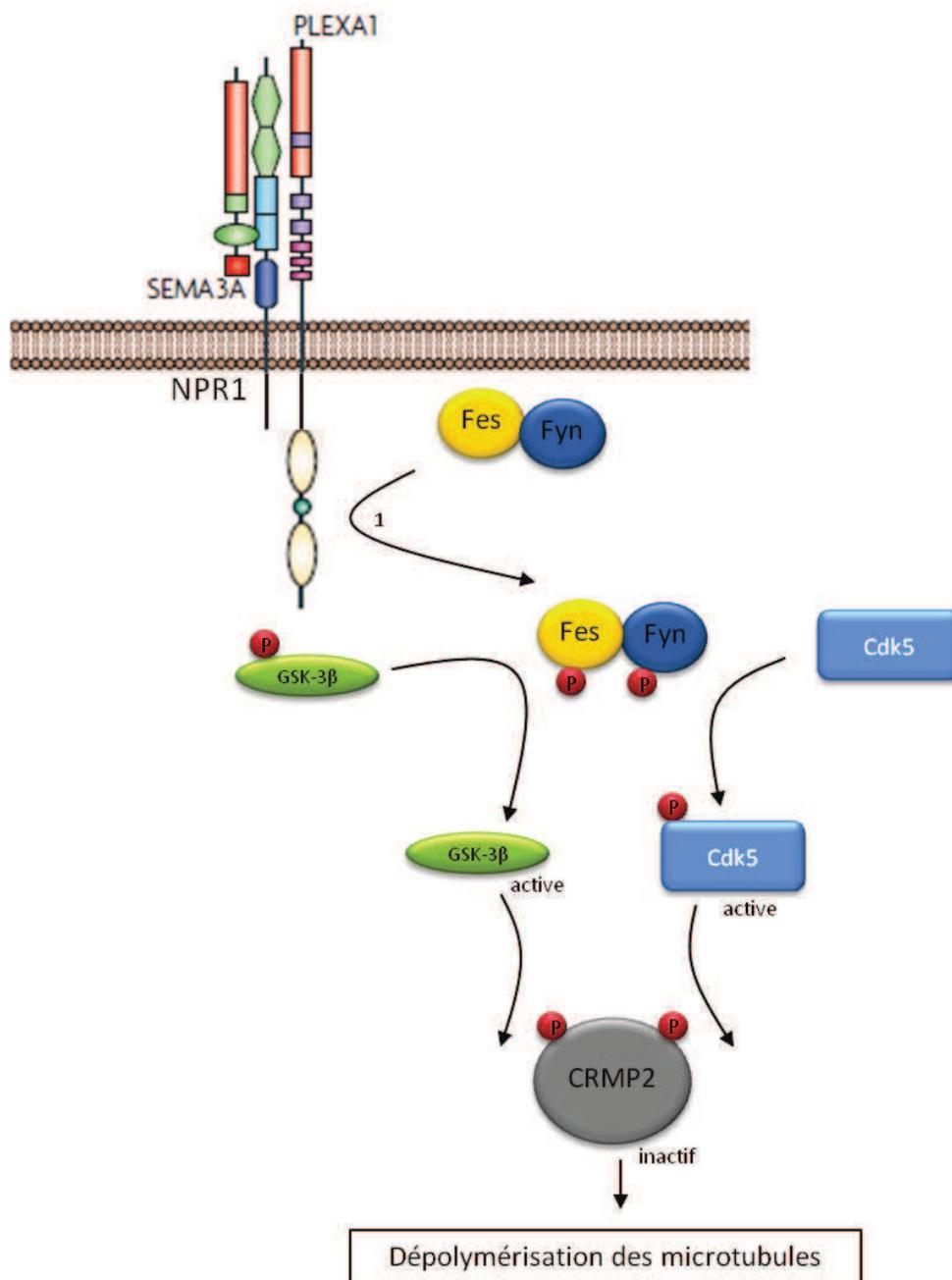


**Figure 17: Voies de signalisation de plexine-A1 induite par Sema3A.** **A.** Description de la voie de signalisation de la sémaphorine 3A impliquant la cofiline. Après fixation du ligand, plexine-A1 change de conformation et libère FARP2 (1) qui peut alors activer la rho GTPase RAC-1. Le site V1 intracytoplasmique de plexine disponible peut séquestrer RAC-1 (2), ce qui inhibe l'activation de PAK et de LIMK aboutissant à une déphosphorylation de la cofiline. La cofiline est alors incapable de se lier à l'actine. **B.** Description de la voie de signalisation de R-ras. Rnd1 se fixe au domaine V1 suite au changement de conformation (1), cela augmente l'activité GAP des domaines c1 et c2 de la plexine qui sont capables d'hydrolyser R-ras (2). L'inactivation de R-ras et l'inactivation de la Taline par FARP2 vont induire une inhibition de l'adhésion contrôlée par les intégrines. L'inactivation de R-ras et la présence PTEN vont participer à la déphosphorylation de PI3K, conduisant à l'activation de GSK3-β par l'intermédiaire de l'inhibition de AKT.

(Chardin, 2006). La présence de Rnd1 est essentielle pour beaucoup de processus comme le désassemblage des filaments d'actine et la perte d'adhérence cellulaire (Nobes et al., 1998), elles promeuvent également la croissance et la ramification des dendrites et des neurites dans les neurones (Ishikawa et al., 2006). Rnd1 est connu comme un activateur de RhoGAP p190 mais aussi comme inhibiteur de RhoA. Rac-1 et RhoA ont une action antagoniste puisqu'elles induisent respectivement la croissance et la rétraction des neurites.

En l'absence de ligand, PlexA1 est en interaction avec FARP2, une protéine GEF activatrice des GTPases. La fixation de Sema3A sur NRP1 induit une dissociation de PlexA1 et FARP2 qui devient alors active et capable d'activer Rac-1 à son tour (Kozma et al., 1997), (**Figure 17A**). Rac-1GTP est alors séquestrée par le domaine intracellulaire C1 de PlexA1 ce qui déclenche une cascade intracellulaire qui conduit à i) une diminution de l'activité de PAK (p21 activated kinase) ii) une inactivation de la kinase LIMK et iii) une déphosphorylation de la cofiline qui devient inactive et perd alors sa capacité de liaison à l'actine (Heasman and Ridley, 2008). Cette cascade conduit finalement à la dépolymérisation des filaments d'actine, favorisant par exemple le collapsus du cône de croissance axonal (Aizawa et al., 2001). Ce jeu d'interactions est en fait plus complexe puisqu'en parallèle du détachement de FARP2 et PlexA1, la GTPase Rnd1-GTP peut se fixer sur la région V de la plexine. Cette fixation va activer l'effet GAP de PlexA1 qui peut alors inactiver R-ras et entraîner ainsi une diminution de l'adhérence cellulaire dépendante des intégrines (Oinuma et al., 2004), (Toyofuku et al., 2005) (**Figure 17B**). L'inactivation de Ras induit l'inhibition de PI3K qui provoque alors une déphosphorylation de Akt et de GSK-3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase 3 $\beta$ ), (Chadborn et al., 2006). PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) semble aussi recruté lors de l'induction du collapse par la Sema3A et il participerait à l'inhibition de la voie PI3K/Akt (Chadborn et al., 2006).

Les CRMP (collapsin response mediator protein) sont des phosphoprotéines cytosoliques constituant une famille de molécules impliquées dans la signalisation induite par les sémaphorines. Elles sont très exprimées pendant le développement du système nerveux et ont un rôle essentiel dans le guidage axonal (Goshima et al., 1995). Il existe 5 protéines différentes chez les mammifères. Les CRMP interagissent fortement les unes avec les autres, elles sont constituées d'une région activatrice en position N-terminale et d'une région régulatrice en position C-terminale. Elles sont sous forme d'hétéro-tétramères (Wang and Strittmatter, 1997). A la suite de la liaison de Sema3A



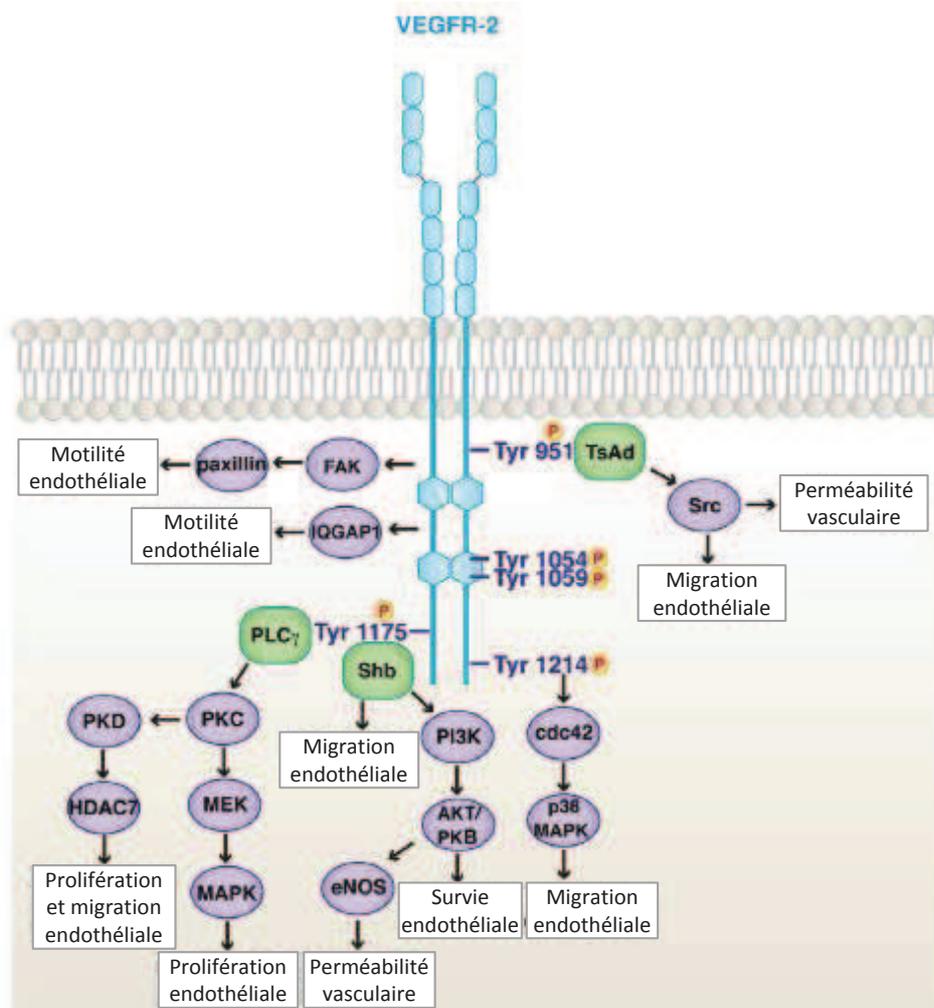
**Figure 18: Voies de signalisation de plexine-A1 induite par Sema3A.** Description de la voie de signalisation Sema 3A impliquant CRMP2. L'activité GAP des domaines c1 et c2 de plexine active en les phosphorylant les protéines kinases Fes et Fyn (1). Elles induisent alors l'activation de GSK-3 $\beta$  (déphosphorylation) et de Cdk5 (phosphorylation) qui vont alors phosphoryler CRMP2. CRMP2 est ainsi inactif et incapable de lier la tubuline, ce qui aboutit à une dépolymérisation des microtubules.

sur NRP1, PlexA1 active Fyn et Fes qui peuvent à leur tour activer Cdk5 par phosphorylation et GSK-3  $\beta$  par dé-phosphorylation. Cdk5 est alors capable de phosphoryler CRMP2 au niveau de sa sérine 522 (Brown et al., 2004), (Uchida et al., 2005) (**Figure 18**). Cette première phosphorylation autorise la phosphorylation d'autres sites comme les résidus Thr509, Thr514 et Ser518 de CRMP2. La phosphorylation de CRMP2 par les Rho-kinases réduit sa capacité de liaison aux microtubules favorisant ainsi le collapsus axonal (Arimura et al., 2005). Les CRMPs peuvent être également impliquées dans des phénomènes d'endocytose grâce à une interaction avec la protéine lors de l'endocytose de L1CAM (Nishimura et al., 2003).

### 2.3.2 Voies intracellulaires induites par les VEGFRs

L'activation du VEGFR-2 par ses ligands induit une forte autophosphorylation qui active plusieurs voies de signalisation intracellulaires débouchant sur une stimulation de la migration, de la différenciation, de la prolifération et de la survie des cellules endothéliales. Le VEGFR-2 possède différents sites d'autophosphorylation avec des résidus régulant l'activité intrinsèque de la kinase ou d'autres fonctionnant comme des sites de fixation de molécules de signalisation (**Figure 19**). La phosphorylation des sites Tyr1054 et Tyr1059 est requise pour une activation maximale du VEGFR-2 (Kendall et al., 1999). La Tyr1175 agit comme un site de liaison activant la phospholipase C-gamma (PLC- $\gamma$ ) qui active la voie des MAPK (ras/raf/MEK/ERK) via la PKC pour promouvoir la prolifération des cellules endothéliales (Takahashi et al., 2001). Le détail de l'activation de PLC- $\gamma$  montre une libération de calcium pour l'activation la voie de la PKC qui active les facteurs de transcription NFAT et EGR-1 au cours de la réponse (Hofer and Schweighofer, 2007), (Mechtcheriakova et al., 1999). La PKC active également la PKD (protein kinase D) qui peut alors phosphoryler HDAC7, une histone déacétylase responsable de la prolifération et de la migration des cellules endothéliales (Wang et al., 2008). Shb (Scr homology 2 and  $\beta$  cell) une molécule adaptatrice du PI3K (Phosphatidylinositol 3 kinase) va également interagir avec la Tyr1175 et promouvoir la migration des cellules endothéliales (Holmqvist et al., 2004). L'activation de PI3K va elle-même activer la voie Akt/PKB qui induit la survie des cellules endothéliales (Dayanir et al., 2001), (Fujio and Walsh, 1999), (Olsson et al., 2006) et la perméabilité vasculaire à travers l'activation de eNOS (endothelial nitric oxide synthase), (Fukumura et al., 2001).

La phosphorylation du résidu Tyr1214 favorise la migration des cellules endothéliales par l'activation d'un remodelage du cytosquelette contrôlé par Cdc42 ou p38 MAPK (Lamallice et al., 2004). La Tyr951 est un site de liaison pour le TsAd (T-cell



**Figure 19: Voies de signalisation du VEGFR-2.** Description des différentes voies intracellulaires induites suite à la fixation du ligand sur le VEGFR-2. La phosphorylation de la tyrosine 951 (Tyr) est responsable de la perméabilité vasculaire et de la migration des cellules endothéliales. La Tyr 1175 est, par l'intermédiaire de plusieurs voies, responsables de la prolifération, la migration, la perméabilité vasculaire et de la survie des cellules endothéliales. La Tyr 1214 est impliquée dans la migration endothéliale. Les Tyr 1054 et 1059 sont essentielles afin d'assurer l'activité maximale du récepteur. La motilité des cellules endothéliales est induite par FAK et IQGAP1. (Adaptée de Patel-Hett and D'Amore, 2011)

specific adaptator) qui va alors s'associer avec Src pour stimuler la migration des cellules endothéliales et la perméabilité vasculaire (Matsumoto et al., 2005). Src peut également, en activant Rac, induire une perméabilité vasculaire (Gavard and Gutkind, 2006). L'activation du VEGFR-2 induit une activation de FAK (focal adhesion kinase), de paxillin et de IQGAP (IQ containing GTPase activation protein) (Qi and Claesson-Welsh, 2001), (Taylor et al., 2002) qui sont d'autres facteurs moléculaires également impliqués dans la régulation de la motilité endothéliale.

La signalisation intracellulaire induite par le VEGFR-1 repose également sur la phosphorylation de résidus tyrosine. La PLC- $\gamma$  peut interagir par exemple avec la Tyr1169 du VEGFR-1 (Sawano et al., 1997). Il existe par ailleurs 4 sites de liaison pour des protéines ayant un domaine SH2 (Src hology-2, protéines se liant sur des résidus tyrosine phosphorylés) (Ito et al., 1998). La mutation des Rho-GTPases Cdc42 et Rac-1 induit une inhibition de l'effet antiprolifératif du VEGFR-1.

Le VEGFR-2 induit une signalisation de façon indépendante de NRP1 comme le montrent différentes approches expérimentales pour inhiber sélectivement la liaison de NRP1 avec VEGFR-2. Qu'il s'agisse de cellules n'exprimant pas NRP1 (Waltenberger et al., 1994), de traitements avec des anticorps spécifiques bloquant NRP1 (Pan et al., 2007a), de peptides antagonistes spécifiques de NRP1 (Jia et al., 2006), (Evans et al., 2011) ou de siRNA ciblant NRP1 (Herzog et al., 2011), toutes ces études confirment que le VEGFR-2 possède une activité de signalisation sans NRP1. NRP1 est donc au mieux responsable de la potentialisation de l'activité du VEGFR-2 (Pan et al., 2007a). Cette action facilitatrice pourrait également être la conséquence d'une augmentation de la stabilité du VEGFR-2 à la membrane cellulaire (Holmes and Zachary, 2008). De plus, NRP1 a été identifiée comme un médiateur de la phosphorylation de p130<sup>Cas</sup> induite par le VEGF, une protéine adaptatrice qui joue un rôle clé dans la régulation des filaments d'actine et la migration cellulaire (Evans et al., 2011). p130<sup>Cas</sup> est associée avec plusieurs molécules de signalisation comme FAK (focal adhesion kinase) et Pyk2. Bien que le VEGF soit capable de stimuler la phosphorylation de FAK, il a été montré que l'extinction de FAK n'affecte pas la phosphorylation de p130<sup>Cas</sup> alors que l'extinction de Py2k réduit significativement celle-ci (Evans et al., 2011). L'extinction de NRP1 n'affecte pas la phosphorylation de FAK à son site majeur Tyr397, mais affecte la phosphorylation sur la Tyr407 comme le mutant du site b1 (Herzog et al., 2011), un site normalement régulé par Pyk2. Ceci suggère que la sélectivité de NRP1 pour la Tyr407 pourrait conduire à un contrôle fin de la migration des cellules endothéliales via la voie Pyk2/p130<sup>Cas</sup>.

## 2.4. NRP1 est une cible thérapeutique validée

NRP1 est une cible thérapeutique de choix dans le cancer en raison du lien entre son niveau d'expression, l'agressivité et l'angiogénèse tumorale.

La première stratégie de blocage de NRP1 consiste à cibler les domaines extracellulaires de liaison avec le VEGF-165. Genentech a développé des anticorps dirigés contre soit le domaine a1/a2 (site de liaison de la Sema3A), soit contre le domaine b1/b2 (site de liaison du VEGF-165) (Liang et al., 2007), (Pan et al., 2007b). Ces études montrent que les anticorps, sont capables respectivement d'inhiber spécifiquement l'induction du collapsus induit par Sema3A ou de bloquer la migration des cellules endothéliales induite par le VEGF. De plus, ces anticorps montrent une capacité d'impacter l'angiogénèse et le remodelage vasculaire dans différents modèles. Ils sont également capables d'améliorer l'efficacité d'un traitement anti-VEGF dans un modèle de greffe hétérotopique de cellules cancéreuses du poumon. L'anticorps MNRP1685A est entré en essai clinique de phase I pour tester son efficacité pour le traitement de tumeurs solides seul ou en combinaison avec bevacizumab ou paclitaxel (inhibiteur de mitose). Il apparaît que cet anticorps seul, n'induit pas d'effet toxique (seulement une déplétion plaquettaire transitoire) (Darbonne et al, 2011). Lorsqu'il est associé à une autre drogue l'incidence élevée de protéinurie compromet son utilisation (Weekes et al, 2011).

D'autres équipes ont développé des peptides spécifiques ou des peptidomimétiques bicycliques qui inhibent la liaison VEGF165-NRP1 et possèdent ainsi des effets anti-angiogéniques. Soker en 1997 a été le premier à développer un peptide ATWLPPR mimant l'exon 7 du VEGF-165, capable de se fixer spécifiquement sur le site b1/b2 de NRP1 et de bloquer ainsi les effets du VEGF. Plus récemment, une autre étude démontre le potentiel inhibiteur de ce peptide dans la croissance tumorale et l'angiogénèse *in vivo* tout en n'ayant pas d'impact sur la prolifération des cellules tumorales dans la tumeur (Starzec et al., 2006). Ce même peptide a par la suite été optimisé, pour une utilisation à visée thérapeutique, avec un ajout d'un agent photosensible permettant une thérapie photodynamique impactant la vascularisation tumorale (Tirand et al., 2006), (Tirand et al., 2007), (Thomas et al., 2009). Une forme

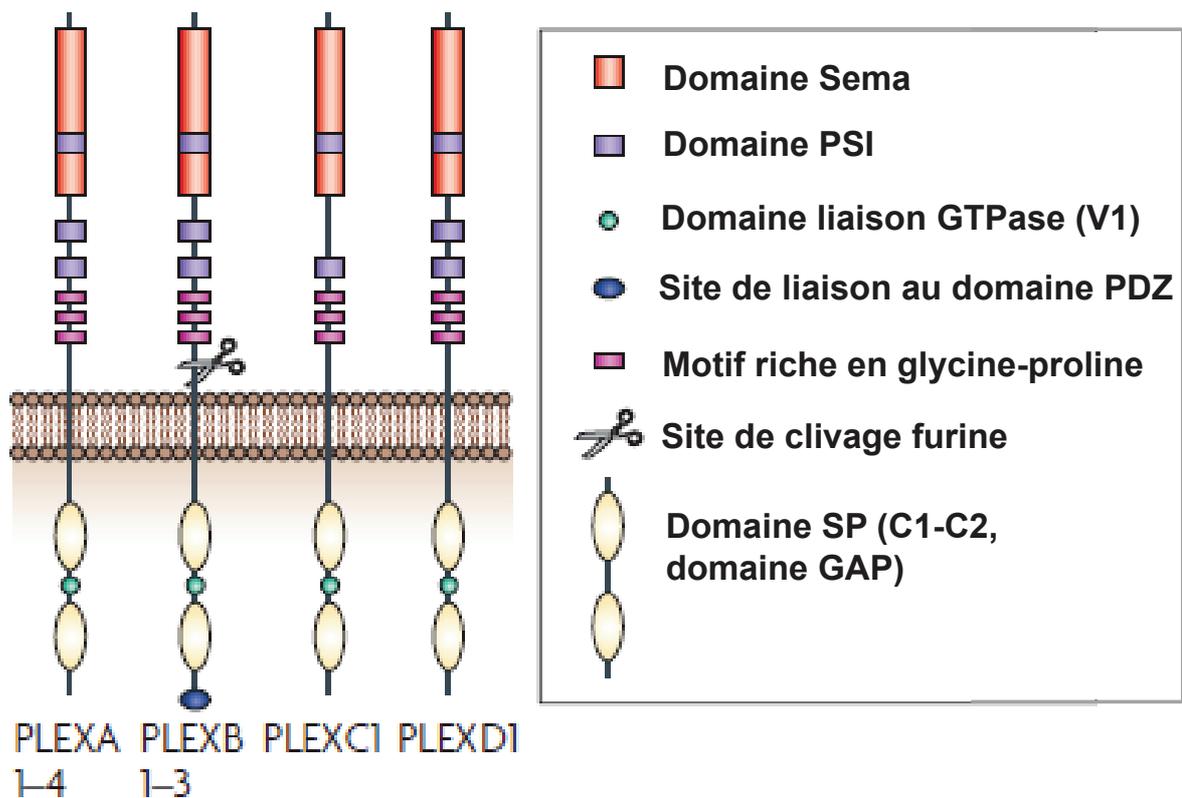
couplée du peptide à une chaîne grasse palmitoylée (ajout d'un acide palmitique permettant un ancrage à la membrane) permet l'intégration à la membrane de liposomes chargés avec un agent cytotoxique afin de les cibler vers les cellules humaines du cancer du sein avec une forte expression de NRP1 (Slimani et al., 2006).

Giordano et collaborateur ont identifié un peptidomimétique bicyclique capable de lier NRP1 et VEGFR-1 (Giordano et al., 2005). Ce peptide a par la suite été optimisé par la méthode de rétro-conversion des aminoacides qui implique une substitution des aminoacides D- en L- et des inversions de séquence pour générer un peptidomimétique D- (LPA). Ce peptide montre une résistance à la protéolyse et également une activité anti-angiogénique dans différents modèles de cancer. Un autre peptide bicyclique de 28 acides aminés le EG3287, qui correspond au segment C-terminal du VEGF165, bloque l'interaction VEGF165-NRP1 (Jia et al., 2006). A partir de ces travaux, une petite molécule non peptidique est actuellement développée pour cibler la poche d'interaction du domaine b1. Ce composé provoque une diminution de l'activité du VEGFR-2 ainsi qu'une réduction de la liaison sur NRP1, un blocage de la migration *in vitro* et une augmentation de l'apoptose dans les cellules tumorales (Jarvis et al., 2010).

De façon intéressante un oligonucléotide synthétique (G18) est capable de se lier à la partie intracellulaire de NRP1 et induit son internalisation, réduisant ainsi l'angiogénèse (Narazaki et al., 2010).

Les travaux du groupe de Ruoslati proposent quant à eux l'utilisation de peptides courts CendR qui présentent des résidus basiques (Arg ou Lys) à l'extrémité C-terminale et sont internalisés de façon dépendante de NRP1 (Teesalu et al., 2009). C'est pourquoi aujourd'hui certaines équipes utilisent NRP1 comme une porte d'entrée dans les tumeurs, grâce à sa forte expression dans les cellules tumorales. Ces peptides CendR peuvent alors être fusionnés avec par exemple une séquence inductrice d'apoptose et arborer ainsi un effet anti-tumoral (Karjalainen et al., 2011). Cette approche est en plein développement et permet d'utiliser ces peptides pour cibler la tumeur et augmenter la pénétration du traitement.

On voit bien que différentes stratégies ont été développées pour inhiber NRP1. De manière remarquable une étude plus globale utilisant des simulations par ordinateur a été réalisée pour prédire l'efficacité *in vivo* de différentes stratégies thérapeutiques ciblant l'angiogénèse tumorale par l'inhibition de NRP1 (Mac Gabhann and Popel, 2006). Les stratégies évaluées consistaient soit à inhiber l'expression de la protéine, soit à bloquer la liaison du VEGF-165 à la NRP1, ou encore la liaison NRP1-VEGFR-2.



**Figure 20: Structure des plexines.** Les neuf plexines des vertébrés sont divisées en quatre familles, la famille A comprend 4 membres, la famille B 3 membres et les familles C et D seulement 1 membre. Les plexines sont des récepteurs transmembranaires qui se distinguent par leur domaine cytoplasmique contenant un domaine GTPase activating protein (GAP). La partie extracellulaire a la particularité d'avoir un domaine Sema, un domaine PSI (Plexin, Semaphorin, Integrin) et des motifs riches en glycine et proline. Ces éléments sont également retrouvés sur les récepteurs tyrosine kinase de la famille MET. (Adaptée de Neufeld and Kessler., 2008)

D'après cette analyse, la méthode la plus efficace serait de cibler l'interaction VEGFR-2-NRP1 pour impacter de manière forte la signalisation VEGF.

## 2.5. Les plexines

### 2.5.1 La famille des plexines

La première démonstration de l'interaction entre une plexine et une sémaphorine date de 1998 dans un modèle d'activation de lymphocyte B par une sémaphorine d'origine virale (A39R) (Comeau et al., 1998). Cette plexine est appelée VESPR et correspond actuellement à la plexine-C1. La même année, la découverte de la capacité de la plexine-A à lier les sémaphorines 1a et 1b chez la drosophile confirme le rôle des plexines comme récepteurs des sémaphorines transmembranaires et associées aux NRPs pour les sémaphorines de classe 3 (Tamagnone et al., 1999). Seule Sema3E peut se fixer directement sur une plexine sans association avec une NRP (Gu et al., 2005). Les plexines sont réparties en 4 familles (A à D) (Tamagnone et al., 1999). La classe A comprend 4 membres (PlexA1 à PlexA4), la classe B comprend 3 membres (PlexB1 à PlexB3), les classes C et D n'ont qu'un seul membre PlexC1 et PlexD1. Une forme alternative de la PlexB1, en conséquence d'un épissage alternatif, a aussi été identifiée (Maestrini et al., 1996).

### 2.5.2 Structures

Les plexines sont des récepteurs transmembranaires d'environ 240 kda, composés de 3 domaines différents (**Figure 20**). A l'extrémité N-terminale extracellulaire se trouve le domaine Sema, semblable à celui trouvé chez les sémaphorines mais suffisamment éloigné d'un point de vue phylogénétique pour les considérer comme des familles de protéines différentes. Le domaine Sema est suivi de répétitions de domaines PSI (Plexin, Semaphorin, Integrin) encore appelées MRS (Met Related Sequences) en raison de leur homologie de séquences avec ces différents domaines. D'autres répétitions de domaines de type immunoglobuline (Ig-like, IPT ou TIG) riches en glycine-proline suivent. Les plexines de classe B possèdent un site de clivage enzymatique, de

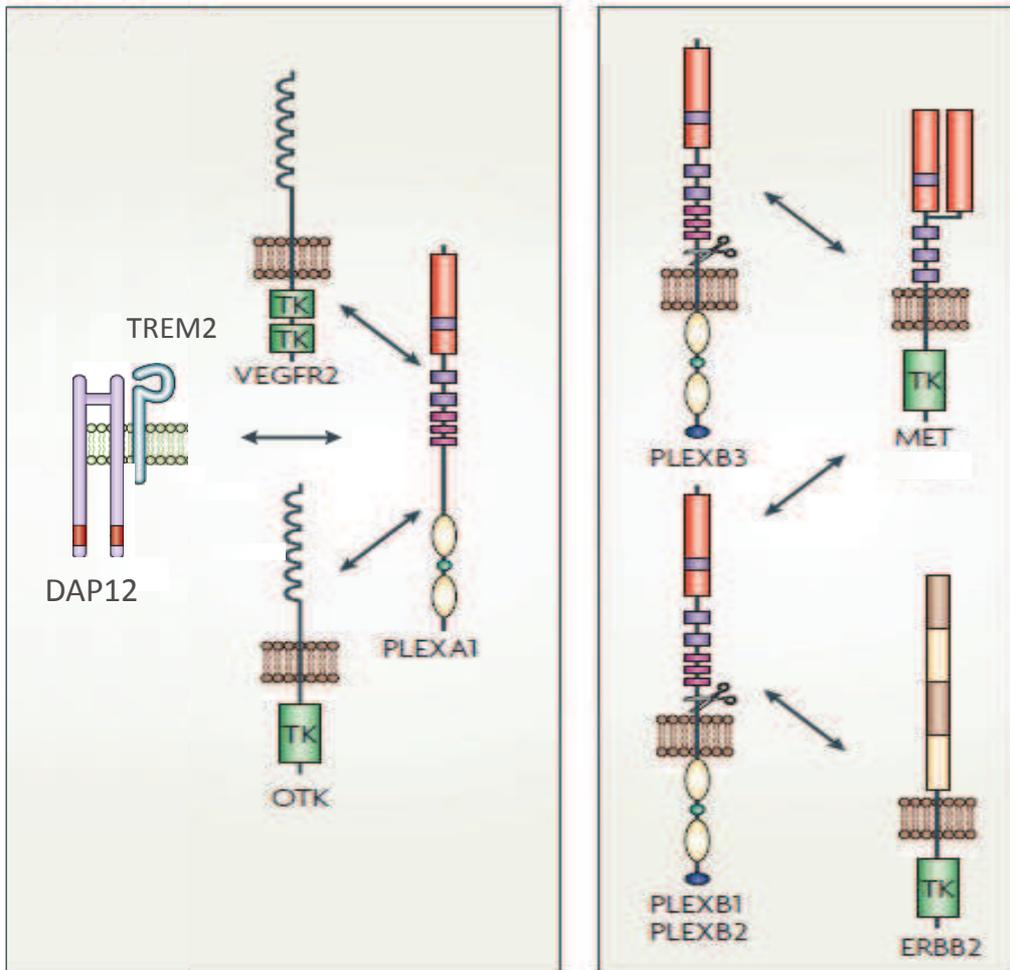
type furine, permettant un clivage protéolytique à la membrane induisant la formation de récepteurs hétérodimères et d'augmenter la fixation du ligand (Artigiani et al., 2003).

Le domaine transmembranaire est composé d'une vingtaine d'acides aminés. Il présente de très nombreux motifs de type GxxxG comme nous le verrons dans la partie suivante de ce manuscrit.

Le partie intra-cytoplasmique est composée d'un domaine SP (Sex Plexin) d'environ 600 acides aminés (aussi appelé domaine C1 et C2) très conservé entre les différentes espèces. On y trouve aussi un domaine variable V1 situé entre les domaines C1 et C2. Ces domaines C1 et C2 ont des similarités avec les domaines à activité GAP (GTPase activation protein) (Rohm et al., 2000b). Le rôle de ces domaines est d'inhiber l'activation des Rho GTPases et de R-Ras. Le domaine V1 est aussi capable de fixer les Rho GTPases. On trouve chez les vertébrés une séquence de 3 acides aminés hydrophobes (KRK pour PlexA1 ou RRK pour PlexB) qui joue un rôle dans la liaison avec les GEF (Guanine-nucleotide exchange factor) comme FARP2 pour PlexA1 et PDZRho GEF ou LARG (Leukemia associated Rho GEF) pour PlexB1 (Rohm et al., 2000b), (Hu et al., 2001), (Oinuma et al., 2004). Ce domaine intracytoplasmique contient également plusieurs paires d'acides aminés hydrophobes qui sont capables d'induire l'internalisation et la délocalisation des récepteurs par des voies endosomales et lysosomales permettant la régulation négative des plexines (Sandoval and Bakke, 1994), (Trusolino and Comoglio, 2002). Ce domaine ne possède que quelques sites de phosphorylation mais pas de site catalytique comme les récepteurs Tyrosine Kinase (Tamagnone et al., 1999).

Les plexines ont la capacité de s'hétérodimériser. PlexA1 et PlexB1 peuvent interagir par leurs domaines cytoplasmiques, ou avec la PlexB2 mais pas avec les plexines-A2 et A3 (Artigiani et al., 2003) (Usui et al., 2003). Elles peuvent aussi dans certains cas s'homodimériser. C'est le cas par exemple de la plexine-A2 pour fixer un dimère de Sema6A (Nogi et al., 2010), de la plexine-B1 par son domaine intracytoplasmique (Tong et al., 2007) et des plexines-A pour le dimère de Sema3A lié à NRP1 (Janssen et al., 2012). Ces interactions engagent généralement les domaines extracellulaires comme c'est le cas pour l'interaction PlexA1-NRP1, qui passe par le domaine Sema (Takahashi and Strittmatter, 2001).

Plexine-A1 présente une particularité fonctionnelle liée à une conformation repliée du domaine Sema qui provoque l'inhibition du récepteur (Takahashi and Strittmatter, 2001). Ceci serait le cas également pour plexine-A3 (He et al., 2009) et plexine-B1.



**Figure 21: Interactions des plexines avec leurs co-récepteurs.** Plexine-A1 est capable de former des complexes avec le vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR-2), le récepteur Off-track (OTK) et le complexe TREM2 et DAP12. Plexines-B1 et B2 peuvent s'associer au récepteur ERBB2 de la famille de l'EGFR et au récepteur de l'Hepatocyte growth factor MET. Le récepteur MET interagit également avec plexine-B3. (Adaptée de Neufeld and Kessler., 2008)

La fixation du ligand (sur le corécepteur associé) pourrait lever cette auto-inhibition en déclenchant l'ouverture de ce repliement (Antipenko et al., 2003).

## 2.6. Les partenaires des plexines

### 2.6.1 Les neuropilines

Elles forment avec les plexines (A1, A2, A3, A4 ou D1) des complexes de récepteurs pour la signalisation des sémaphorines de classe 3. Ces interactions sont décrites dans la partie II.2.

### 2.6.2 Les récepteurs à activité tyrosine kinase

De manière surprenante, même si les plexines possèdent une activité intracellulaire de signalisation elles interagissent avec d'autres récepteurs et particulièrement des récepteurs tyrosine kinase (**Figure 21**). Ainsi, le récepteur OTK (Off-track) peut se lier à PlexA1 pour transduire la signalisation de Sema1A (Winberg et al., 2001) chez les invertébrés ou de Sema6D chez les vertébrés (Toyofuku et al., 2004b). De même, VEGFR-2 peut être un corécepteur des plexines. En effet, Sema6D induirait un signal négatif par l'intermédiaire du complexe l'OTK-PlexA1, ou un signal positif provoquant la migration des cellules endothéliales par un complexe PlexA1-VEGFR-2, démontrant à nouveau, un rôle bifonctionnel pour une sémaphorine en fonction de la nature du complexe récepteur formé (Toyofuku et al., 2004a). Cette association de récepteurs a été confirmée dans des cellules mésenchymateuses malignes dont la survie est augmentée par la liaison de Sema6D (Catalano et al., 2009). De même, plexine-A4 interagit avec le VEGFR-2 dans les cellules endothéliales pour augmenter la phosphorylation induite par le VEGF (Kigel et al., 2011). Le récepteur PlexD1 forme également un complexe avec NRP1 et VEGFR-2 pour induire la signalisation de la Sema3E dans les cellules du front de migration vasculaire (tip cells) de la rétine.

Le récepteur MET est le récepteur de l'HGF (Hepatocyte Growth Factor). Il a un domaine sémaphorine et des domaines répétés de type immunoglobuline (IPT) dans sa partie extracellulaire comme c'est le cas pour les plexines. MET et plexine-B1 forment un complexe conduisant là encore à l'augmentation de l'activation de MET dans les

cellules épithéliales en réponse à Sema4D (Giordano et al., 2002). Ce type de réponse est véritablement dépendante du type cellulaire puisque l'activation de plexine-B1 inhibe la signalisation de MET dans des cellules tumorales de mélanome (Stevens et al., 2010).

Le récepteur ErbB-2 qui est un membre de la famille des EGFR, est lui aussi un corécepteur de PlexB1 pour la signalisation de Sema4D. En effet, la liaison de Sema4D induit une phosphorylation simultanée des deux récepteurs pour déclencher le collapsus des cônes de croissance (Swiercz et al., 2004). Mais l'activation de PlexB1 par la Sema4D semble induire des effets différents ou même opposés. Puisque Sema4D peut avoir un effet pro-migratoire avec activation de RhoA si PlexB1 est associé avec ErbB-2 ou un impact anti-migratoire avec inactivation de RhoA dans le cas d'association avec Met (Swiercz et al., 2008). Une étude récente montre également une interaction entre ErbB-2 et PlexD1 dans la signalisation Sema3E (Casazza et al., 2010).

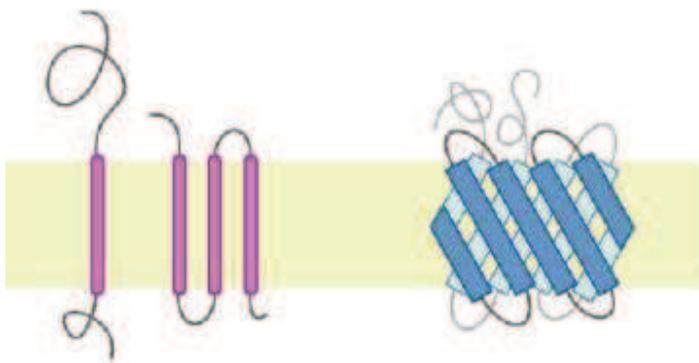
Les récepteurs TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) et DAP-12 sont exprimés dans le système immunitaire et plus exactement dans les macrophages, les cellules de la microglie et les cellules de la moelle osseuse. TREM-2 est une protéine transmembranaire faisant partie de la famille des immunoglobulines. DAP-12 (DNAX Activation Protein) est également une protéine transmembranaire qui possède un motif particulier ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motif) dans sa partie intracellulaire lui permettant d'interagir avec des protéines kinase intracellulaires comme par exemple Src ou Syk. DAP-12 peut interagir par son motif ITAM pour transduire les signaux de TREM-2. Ces deux récepteurs peuvent former un complexe avec plexine-A1 pour la signalisation de Sema6D conduisant à l'augmentation de production d'interleukines par les cellules dendritiques et les ostéoblastes (Takegahara et al., 2006).

Enfin, certaines publications mettent en avant l'existence d'interactions entre les plexines et des récepteurs de molécules de guidage comme Robo1 (récepteur de Slit) (Hernández-Miranda et al., 2011) ou DCC (récepteur des nétrines) ou encore de p75NTR (Schor, 2005).

L'ensemble de ces données montre que les neuropilines et les plexines sont au cœur d'une plateforme de signalisation très complexe qui fait intervenir de très nombreux corécepteurs, eux-mêmes capables de déclencher des voies de signalisation très diverses. Après cette décennie d'identification des partenaires, il apparaît

nécessaire de développer des recherches dans le but de mieux comprendre la hiérarchie de ces interactions. La plupart des laboratoires s'intéressent tout naturellement au rôle des domaines extracellulaires et intracellulaires dans ces processus pour des raisons essentiellement historiques. Ici, je vais au contraire me focaliser sur la présentation des domaines transmembranaires qui prennent de plus en plus une importance capitale dans le contrôle de l'oligomérisation des récepteurs.

## Protéines bi- ou poly-topiques

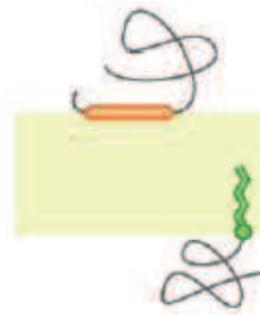


A. Hélices  $\alpha$   
transmembranaires

B. Tonneaux  $\beta$   
transmembranaires

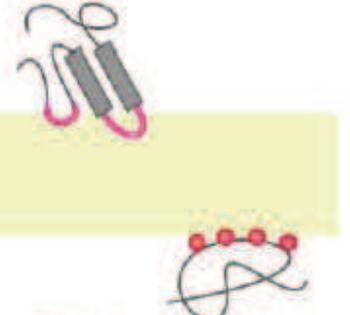
## Protéines monotopiques

C. Hélice  $\alpha$  parallèle



E. Lipidation

D. Boucle hydrophobe



F. Fixation  
électrostatique

**Figure 22: Classification selon la topologie des protéines membranaires.**  
Adaptée d'un cours de Céline Raguénès-Nicol, Université de Rennes, 2007

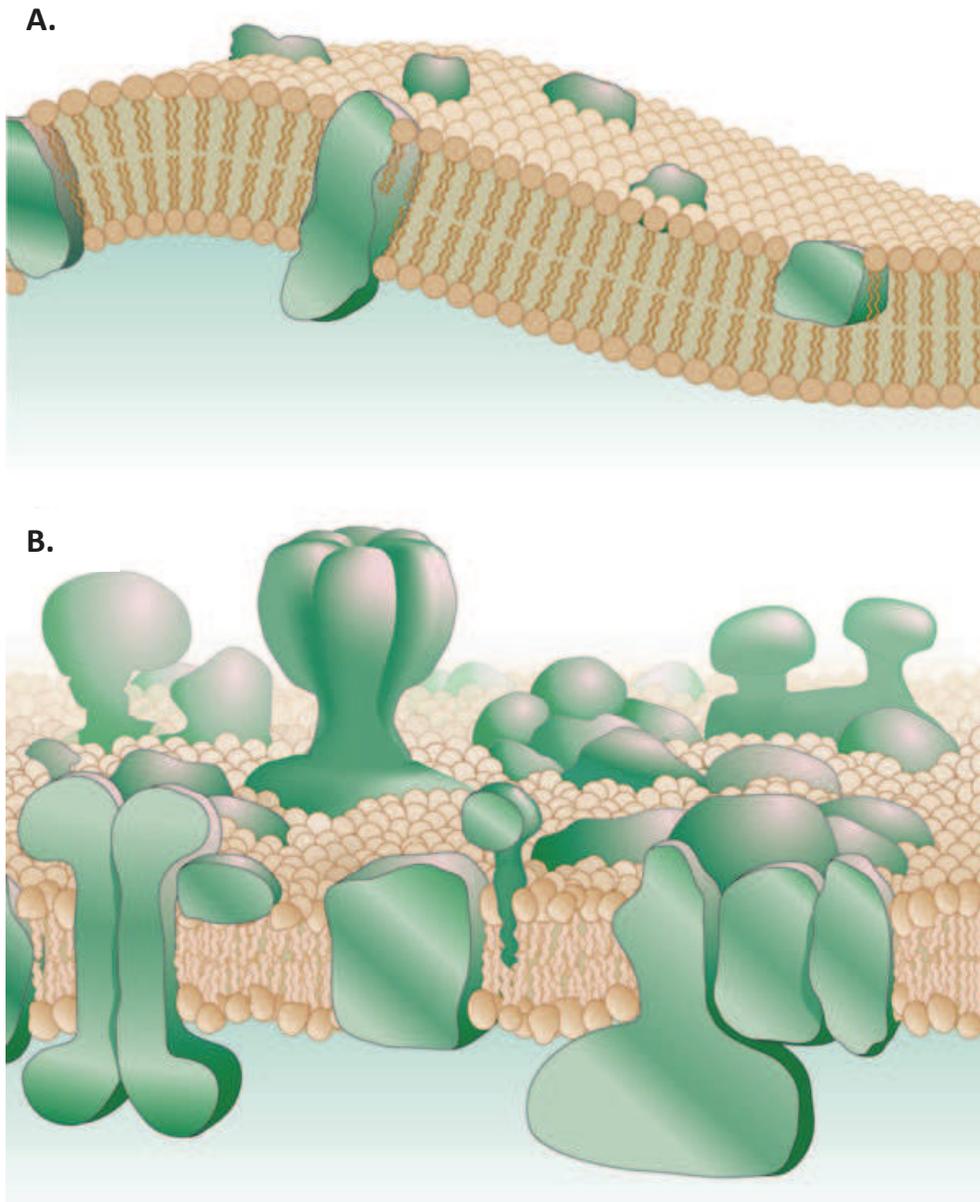
### III. Interactions entre domaines transmembranaires

#### 1. Les protéines membranaires et la membrane cellulaire

Chez les eucaryotes et les procaryotes, les protéines membranaires représentent plus de 25 à 30 % de toutes les protéines (Stevens and Arkin, 2000), (Fagerberg et al., 2010). Ceci reflète bien l'importance de ces protéines qui en plus correspondent au moins à 50 % des cibles thérapeutiques identifiées. La première mise en évidence de la structure d'une protéine membranaire date de 1975, il s'agit de la bactériorhodopsine décrite comme un paquet de tiges hélicoïdales traversant la membrane (Henderson and Unwin, 1975). Des études ultérieures ont confirmé cette structure des domaines membranaires qui sont constitués principalement d'hélices  $\alpha$ .

On peut classer les protéines membranaires selon différents critères (**Figure 22**). Le premier critère se base sur la topologie de la protéine par rapport à la membrane et propose l'existence de protéines monotopiques ou bi-/ poly-topiques. Les protéines monotopiques sont en contact avec un seul des deux compartiments membranaires et les protéines bi-/ poly-topiques sont les protéines qui sont en contact avec les deux compartiments délimités par la membrane. Ces protéines membranaires comprennent un à 20 segments transmembranaires en hélices  $\alpha$ , alors que d'autres protéines adoptent des conformations en tonneaux  $\beta$  composés de 8 à 22 feuillets (ou brins)  $\beta$  (Schulz, 2002).

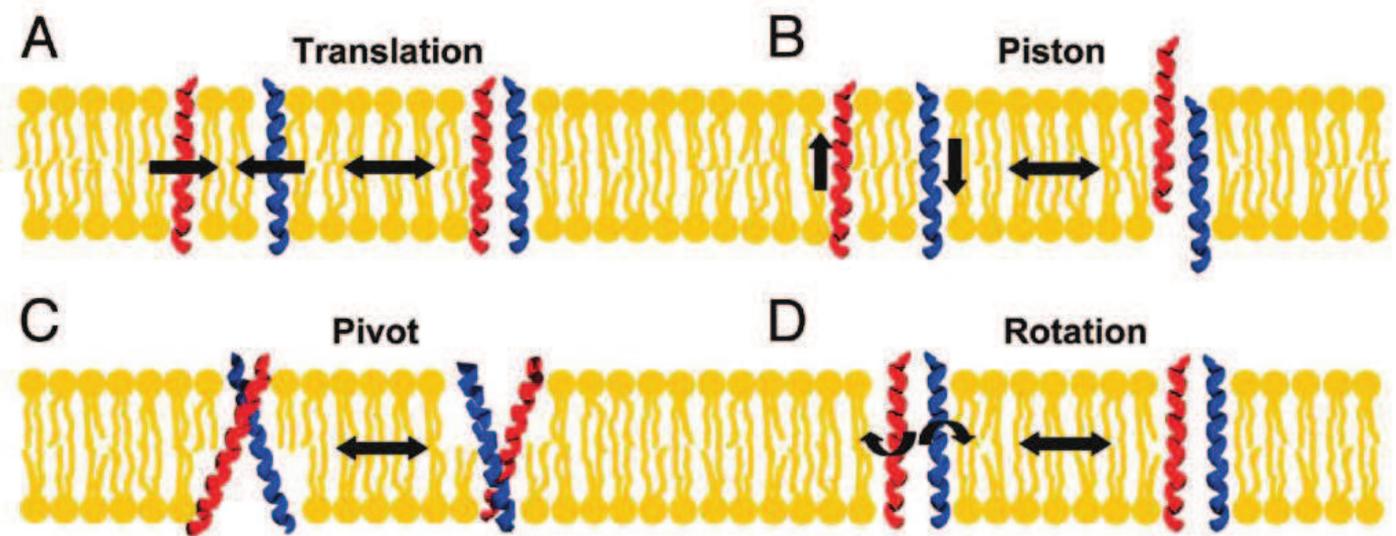
Le deuxième critère consiste à les regrouper selon leurs propriétés biophysiques et plus particulièrement selon la force nécessaire pour les extraire des membranes. On parle alors de protéines intrinsèques qui sont des protéines mono ou polytopiques avec une capacité d'interagir fermement avec la membrane et qui nécessite l'utilisation d'un solvant hydrophobe ou d'un détergent pour les extraire. Les protéines extrinsèques quant à elles sont seulement associées à la membrane directement sur les têtes lipidiques ou sur des protéines membranaires et sont des protéines monotopiques. Toutes ces protéines ont des rôles divers et variés en tant que récepteurs, canaux ioniques, transporteurs, jonctions entre les cellules, enzymes, transmission de la signalisation intracellulaire ou encore dans la conversion d'énergie (Hedin et al., 2011).



**Figure 23: Evolution de la vision de la membrane plasmique. A.** La membrane plasmique représentée selon le modèle de la mosaïque fluide décrit par Singer et Nicholson en 1972. **B.** Nouvelle représentation de la membrane plasmique, considéré plus comme une mosaïque. Adaptée de Engelman, 2005.

Ces protéines sont donc en étroite association avec la membrane plasmique qui au-delà de former une véritable barrière physique entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire constitue avant tout un couloir d'échanges et d'interactions. La communication entre ces deux compartiments est donc intimement liée à la nature des protéines membranaires. La vision classique de la structure des membranes biologiques remonte à 1972, grâce aux travaux de Singer et Nicholson qui ont formalisé le concept de la mosaïque fluide (Singer and Nicholson, 1972) (**Figure 23A**). Ce modèle décrit la bicouche lipidique comme une mer de lipides homogènes renfermant peu de protéines. Saffman et Delbrück ont alors décrit la possibilité de diffusion dans la membrane comme dans un fluide continu en deux dimensions (Saffman and Delbrück, 1975). Aujourd'hui, ce modèle s'est complexifié en prenant en compte l'importance des interactions protéines-protéines et protéines-lipides, le nombre important de protéines membranaires, les différences de taille et les différences de composition de la membrane pour aboutir à un autre modèle qui la considère plus comme une mosaïque que comme un espace fluide (Engelman, 2005) (**Figure S23B**). La vision actuelle propose ainsi l'existence d'une véritable compartimentalisation de la membrane (Sako and Kusumi, 1994) qui semble être ubiquitaire chez les cellules de mammifères. Cette caractéristique apparaît essentielle pour ancrer une protéine à un endroit précis de la membrane afin de déclencher une voie de signalisation. Dès lors, le cytosquelette et les protéines arrimées à la membrane vont constituer les "parois" de ces compartiments membranaires (Sheetz et al., 1980), (Sheetz and Alhanaty, 1983), (Edidin et al., 1991). Cette régionalisation des protéines membranaires peut être associée à la notion de radeaux lipidiques qui contribuent à compartimentaliser les processus biologiques. En fait, on peut considérer ces radeaux lipidiques comme des domaines où certains composants membranaires résident de façon préférentielle et de façon très dynamique (Michel and Bakovic, 2007), (Lindner and Naim, 2009), (Lingwood and Simons, 2010).

La promiscuité des protéines transmembranaires favorise le regroupement et la formation de complexes protéiques (Grasberger et al., 1986). Ces interactions peuvent se faire entre autres par le biais d'interactions intramembranaires très dynamiques (Bechinger, 2008), (Matthews et al., 2006), (Langosch and Arkin, 2009).

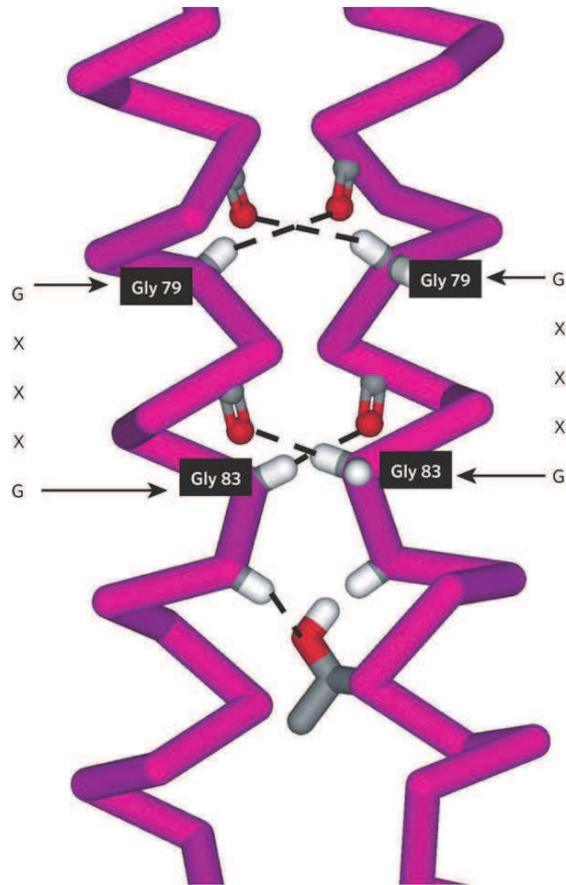


**Figure 24: Dynamique des interactions entre hélices transmembranaires.** **A.** La translation latérale: les hélices peuvent former des interactions transitoires dans la membrane induisant des interactions des domaines intra- et extracellulaires des deux récepteurs. **B.** Le piston: les hélices interagissent par des mouvements perpendiculaires au plan de la membrane pouvant également provoquer des interactions entre les domaines intra- et extracellulaires des récepteurs. **C.** Le mouvement de pivot induit un changement d'angle de croisement des hélices impliquant une réorientation des autres domaines du récepteur. **D.** La rotation parallèle: les deux domaines transmembranaires tournent autour de l'axe de l'hélice pour interagir induisant un positionnement différents des domaines extra-membranaires. Adaptée de (Cymer & Schneider, 2010).

## 2. Interactions entre segments transmembranaires

La première démonstration d'interactions entre segments transmembranaires provient de l'étude de la biogenèse et de l'insertion des protéines membranaires. Le modèle « à deux étapes » ("Two stage model ") décrit par Popot et Engelman en 1990 (Popot and Engelman, 1990) pose les bases de ces interactions. Comme son nom l'indique ce modèle se déroule en deux étapes distinctes, la première consiste en la formation et l'insertion d'hélices  $\alpha$  dans la membrane de façon indépendante les unes des autres suivie par une seconde étape d'interactions hélice-hélice intramembranaires pour former des protéines plus complexes et fonctionnelles. Ce modèle peut être complété par une troisième étape qui permet la formation d'une structure quaternaire grâce aux interactions avec d'autres protéines ou par des repliements de boucles extramembranaires (Engelman et al., 2003).

Dans ce modèle, l'association latérale des hélices transmembranaires dans la membrane est donc la deuxième étape de l'assemblage des protéines membranaires. La dimérisation des hélices transmembranaires est l'exemple le plus simple de ce qu'est l'association latérale qui peut ainsi jouer un rôle dans la signalisation intracellulaire à l'issue de l'association des deux protéines. Ce processus d'association latérale induit la formation de dimères actifs ou inactifs qui peuvent également conduire à des structures oligomériques fonctionnelles (Cebecauer et al., 2010). Aujourd'hui, il est évident que les interactions stables ou transitoires entre les protéines sont bien plus nombreuses qu'initialement imaginé. Ces complexes de protéines peuvent présenter une large gamme de stabilité et former des réseaux très coordonnés contrôlant divers processus biologiques. Toutes ces découvertes ont progressivement modifié la vision des hélices transmembranaires qui ne sont plus aujourd'hui considérées comme de simples domaines d'ancrage à la membrane mais plutôt comme des acteurs à part entière des interactions protéine-protéine et par conséquent, des fonctions qui y sont associées. Les interactions intramembranaires possèdent une grande spécificité pour l'assemblage de complexes protéiques membranaires stables. Les interactions peuvent être réversibles et sont régulées par des facteurs extérieurs pour permettre les changements de conformation dynamiques indispensables au déclenchement des processus biologiques (Matthews et al., 2006), (Bechinger, 2008), (Langosch and Arkin, 2009). Ainsi, la dynamique de ces interactions entre hélices se fait selon quatre grands types de mouvement (**Figure 24 A-D**) qui sont i) la translation latérale ii) le piston iii) le mouvement de pivot ou iiiii) la rotation parallèle à la membrane. (Matthews et al., 2006), (Langosch and Arkin, 2009). L'ensemble de ces mouvements offre une variété



**Figure 25: Liaisons hydrogène dans le dimère transmembranaire de la GPA.** La séquence GxxxG est mise en évidence avec les deux glycines clefs de l'interface. Le réseau de liaisons hydrogènes C-H entre les carbones du squelette et l'hydrogène des glycines sont montré en pointillé. Les atomes de carbone sont représentés en gris, les atomes d'oxygène en rouge et les atomes d'hydrogène en blanc. D'après Bowie et al., 2005

importante de mécanismes de modulation des interactions membranaires entre récepteurs.

En parallèle de ces travaux, plusieurs laboratoires ont démarré des recherches sur l'identité des séquences impliquées dans les interactions membranaires.

Le prototype est sans nul doute celui de la glycophorine A (GPA), une protéine de la membrane des érythrocytes. En effet, cette protéine bitopique homodimérise par ses segments transmembranaires et sa structure déterminée par résonance magnétique nucléaire (RMN) a dévoilé une interface d'interaction étroite entre les deux hélices droites (Smith and Bormann, 1995), (MacKenzie et al., 1997), (Smith et al., 2001). Quelques années auparavant, des analyses biochimiques ont montré que l'hélice transmembranaire de la GPA humaine était capable de former un dimère robuste in vivo et in vitro (Bormann et al., 1989). L'interaction entre les hélices transmembranaires a été étudiée avec attention par des analyses mutationnelles qui ont permis de déterminer un motif d'acides aminés clef pour la dimérisation, le motif: 75LlxxGVxxGVxxT87 (Lemmon et al., 1992). Le cœur de l'interface d'interaction de la GPA est identifié comme la séquence GxxxG qui permet un rapprochement maximal des deux hélices. Les forces de Van der Waals et des liaisons hydrogènes entre acides aminés voisins favorisent et stabilisent le dimère (Senes et al., 2004), (Bowie, 2005) (**Figure 25**). Les deux résidus G provoquent un vide sur la surface d'une hélice, qui dans ce cas, est comblé par les chaînes latérales des V adjacentes de l'autre hélice. Cet emboîtement de type "trou-bosse" apparaît comme le mécanisme prépondérant de facilitation des interactions hélices-hélices (Langosch and Heringa, 1998).

La nature apolaire des hélices transmembranaires favorise les interactions de Van der Waals, c'est-à-dire des interactions dipolaires à courte distance entre les atomes. Les liaisons hydrogènes sont la deuxième force impliquée dans ces interactions avec un rôle de stabilisation des dimères d'hélices. Il existe des liaisons hydrogènes fortes, bien moins nombreuses que les liaisons hydrogènes plus faibles de type C $\alpha$ -H - -O (Doyle and Wallace, 1998). Le carbone (C) est un donneur faible de liaison hydrogène mais lorsqu'il est lié à un groupe électro-négatif dans un squelette peptidique, il est considéré comme actif et par conséquent sa liaison avec l'atome d'hydrogène devient plus polaire (Javadpour et al., 1999). De plus, ces interactions hydrogènes augmentent encore lorsque le donneur et l'accepteur sont proches l'un de l'autre (Senes et al., 2001).

Par ailleurs, il faut noter que les chaînes latérales des acides aminés participent également à l'interaction hélice-hélice. Les acides aminés avec une chaîne polaire sont peu présents dans les hélices transmembranaires comparé aux protéines solubles (<5 et 22 % des résidus respectivement). Dans ces cas peu fréquents ils peuvent alors établir des interactions polaires. Par exemple, les sérines (S) ont la capacité de favoriser ces interactions (Adamian and Liang, 2001). Les acides aminés très polaires comme l'asparagine (N) (Choma et al., 2000), l'acide aspartique (D), la glutamine (Q), et l'acide glutamique (E) ont la capacité d'induire des interactions de type hydrogène à eux seuls (Zhou et al., 2001), (Gratkowski et al., 2001), (Zhou et al., 2000). La position de ces acides aminés est importante puisqu'ils peuvent directement participer à la dimérisation s'ils sont proches du motif d'interaction en établissant une liaison hydrogène stabilisant d'autant l'interaction (Dawson et al., 2003).

### 3. Les motifs de dimérisation

Le motif GxxxG et ses variations, est le motif le mieux caractérisé à ce jour et sans doute le plus fréquent dans les domaines transmembranaires (Curran and Engelman, 2003), (Senes et al., 2004). Il est évidemment présent dans la glycopherine A mais plus généralement sa fréquence d'apparition dans les domaines transmembranaires dépasse d'environ 32 % celle des motifs avec des résidus aléatoires (Senes et al., 2000). Il est également plus fréquent dans les domaines transmembranaires que dans les autres domaines protéiques et il montre une conservation très importante entre les espèces et les familles de protéines (Arkin and Brunger, 1998), (Russ and Engelman, 2000), (Liu et al., 2002). Le motif GxxxG permet de rapprocher les hélices par les deux glycines qui sont des petits acides aminés et donc induisent peu d'encombrement stérique. Cette distance minimale permet la mise en place des interactions de Van der Waals ainsi que des liaisons hydrogènes. De même, le motif Sm-xxx-Sm, est proposé comme un motif général d'interaction des hélices transmembranaires, Sm correspondant à des petits résidus comme la glycine (G), l'alanine (A), la sérine (S) ou la thréonine (T).

Le GxxxG doit cependant être considéré comme le cadre de l'interaction dont la force d'interaction semble être fortement contrôlée par les acides aminés au voisinage direct du motif. La spécificité des interactions hélice-hélice requiert un motif étendu au moins à deux petits acides aminés sur une distance de quatre acides aminés (soit

environ un tour d'hélice) (Schneider and Engelman, 2004a), (Doura et al., 2004), (Melnik et al., 2004).

La répétition de motifs GxxxG définit un motif de type "glycine zipper" qui participe généralement à la formation d'hétérodimères en favorisant les interactions droites entre les hélices (Kim et al., 2005). Il existe également des "leucine zipper" qui favorisent fortement la dimérisation comme c'est le cas dans les protéines solubles. Dans ce cas il s'agit de répétitions de sept acides aminés continus qui peuvent être des leucines (L), des isoleucines (I) ou des valines (V) (O'Shea et al., 1991), (Ruan et al., 2004).

Enfin, certains motifs impliquent des résidus polaires comme la sérine ou la thréonine. Ces motifs de type SxxSSxxT et SxxxSSxxT perdent leur capacité d'interaction en cas de mutation du résidu sérine ou thréonine par un résidu apolaire (Dawson et al., 2002). Cependant, ces résidus ne sont pas suffisants pour la dimérisation et là encore, les acides aminés environnants sont mis en jeu pour l'établissement et la stabilisation des interactions.

Ainsi, la compréhension des interactions entre hélices membranaires passe par l'analyse du code régissant les contacts entre acide aminés afin d'autoriser des interactions de manière spécifique et dynamique.

## **4. Mise en évidence de l'importance biologique des domaines transmembranaires**

L'implication des domaines transmembranaires et de leurs interactions dans la fonction des protéines est de plus en plus évidente. En particulier dans le cas des récepteurs, ces interactions sont cruciales pour la formation des plateformes de signalisation en contribuant à l'oligomérisation. Cette implication majeure concerne la plupart des grandes familles de récepteurs membranaires.

### **4.1. Importance du segment transmembranaire pour les récepteurs à activité tyrosine kinase**

Les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) sont une famille de 58 membres répartis en 20 sous-familles. Une étude récente a mis en évidence que tous les RTK humains ont une tendance naturelle à former des oligomères et que tous leurs domaines

transmembranaires possèdent également des caractéristiques intrinsèques pour former des structures dimériques dans les membranes (Finger et al., 2009). La dimérisation des monomères de RTK est généralement induite par la fixation du ligand provoquant par la suite une autophosphorylation des résidus tyrosine du domaine intracellulaire capable à son tour d'activer la signalisation intracellulaire.

Le premier RTK identifié comme ayant un motif transmembranaire impliqué dans sa dimérisation est le récepteur Neu de la famille des ErbB chez la souris (Bargmann et al., 1986). Il est décrit comme un proto-oncogène en raison d'une seule mutation transformant une valine (V) en acide glutamique (E) dans son segment transmembranaire. Cette mutation favorise une activation constitutive du récepteur par l'induction d'une forte dimérisation stabilisée par des liaisons hydrogènes des chaînes latérales de l'acide glutamique (Bargmann and Weinberg, 1988), (Smith et al., 1996). Une étude plus récente a dévoilé que la mutation induirait un blocage du changement conformationnel nécessaire pour passer de l'état actif à l'état inactif conduisant ainsi à une activation constitutive permanente (Beevers et al., 2010). De plus, une autre étude démontre que le domaine transmembranaire muté présente une orientation anormale qui induit la fixation du domaine juxtamembranaire intracellulaire à la membrane (Matsushita et al., 2013).

Dans la même famille, chez l'humain, tous les membres (ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4) connus interagissent soit en homodimères (Mendrola et al., 2002) soit en hétérodimères (Sharpe et al., 2002). Les séquences transmembranaires de ces récepteurs sont impliquées dans la formation de ces complexes. On retrouve d'ailleurs deux motifs GxxxG dans les domaines transmembranaires d'ErbB1 et ErbB2 (Fleishman et al., 2002), (Escher et al., 2009), (Cymer and Schneider, 2010). La structure de la conformation active du segment transmembranaire (TM) d'ErbB2 a été résolue par spectroscopie RMN (Bocharov et al., 2008a). La formation du dimère ErbB2-ErbB2 met en jeu, un chevauchement de motifs GxxxG (motif glycine zipper) stabilisé par des motifs d'acides aminés polaires TxxxSxxxG induisant des liaisons hydrogènes. Certains des résidus impliqués dans l'homodimérisation semblent aussi impliqués dans l'hétérodimérisation avec ErbB1 mais le motif d'hétérodimérisation est globalement différent de celui de l'homodimérisation (Gerber et al., 2004), (Mineev et al., 2010).

Beaucoup d'autres RTK ont été analysés. La structure du récepteur, EphA1, récepteur des éphrines, a été également résolue et montre un rôle crucial du domaine transmembranaire dans la formation d'un dimère (Bocharov et al., 2008b). Ce motif présente une glycine zipper AxxxGxxxG et des interactions électrostatiques dans la

partie N-terminale. La structure d'EphA2 contient quant à elle un motif LxxxGxxAxxxVxxL impliqué dans son homodimérisation (Bocharov et al., 2010).

Les domaines transmembranaires des quatre FGFR interagissent également pour former des dimères (Webster and Donoghue, 1996), (Neilson and Friesel, 1996), (Iwamoto et al., 2005). Des mutations de ces domaines transmembranaires induisent des activations anormales des récepteurs qui conduisent à diverses pathologies. En effet, la mutation du segment TM de FGFR1 est associée à une forme de dysplasie ostéoglophonique (désordre du développement du squelette en particulier de la face et du crâne) (White et al., 2005), celle du FGFR2 est associée au syndrome de Beare Stevenson, une maladie génétique à transmission autosomique dominante qui se caractérise par des anomalies de la peau et la fusion prématurée des os du crâne, (Przylepa et al., 1996), la mutation du segment TM du FGR3 est retrouvée dans des pathologies comme l'achondroplasie (Bonaventure et al., 1996) ou le syndrome de Grouzon (Meyers et al., 1995), (Webster and Donoghue, 1997). Dans le cas du FGFR4, comme pour Neu, la mutation du TM provoque une activation constante associée avec la progression tumorale (Bange et al., 2002).

La liste des RTK ayant des interactions par leur domaine transmembranaire ne cesse de s'allonger démontrant l'importance du rôle des TM dans la formation des complexes de récepteurs. En effet, en plus du récepteur de l'insuline (Cheatham et al., 1993), (Gardin et al., 1999), c'est le cas également du PDGFR (Lai et al., 2005), (Freeman-Cook et al., 2005), (Talbert-Slagle et al., 2009), (Oates et al., 2010), (Muhle-Goll et al., 2012), (Petti et al., 2013), de RET (Kjaer et al., 2006), (Colombo-Benkmann et al., 2008), (Benej et al., 2013) ou encore du VEGFR-2 ou le domaine TM intervient dans son homodimérisation (Dosch and Ballmer-Hofer, 2010).

## **4.2. Les récepteurs couplés aux protéines G (RCPG)**

Les RCPG représentent la plus grande famille des récepteurs membranaires avec plus de 800 membres. Ils ont une structure type avec 7 segments transmembranaires composés de 7 à 22 acides aminés et entre ces segments des boucles intra et extracellulaires. Le domaine transmembranaire numéro 1 est le plus près de la partie N-terminale et le 7 est vers la partie C-terminale de la protéine. Ils peuvent être activés par différents stimuli tels que des ions, des photons, des stimuli

sensoriels, des molécules endogènes (acides aminés, lipides, nucléosides, nucléotides), des molécules exogènes (nicotine), des chimiokines, des protéines (hormones glycoprotéiques). La fixation du ligand induit un changement conformationnel du récepteur qui est alors capable d'interagir avec un complexe intracellulaire de protéines G trimériques ( $G\alpha$ ,  $G\beta$  et  $G\gamma$ ). Cette interaction provoque la dissociation du complexe de protéine G en deux, la sous unité  $G\alpha$  se dissocie du complexe et son GDP est remplacé par le GTP, une forme active qui permet la mise en route des effecteurs intracellulaires de la signalisation.

Les RCPG peuvent également former des dimères ou des complexes pour être fonctionnels. La partie extracellulaire du récepteur est impliquée dans ces interactions mais il a été montré que les hélices transmembranaires y jouent aussi un rôle. Par exemple, le domaine transmembranaire du récepteur de l'adénosine A2A est capable d'homodimériser et pourrait participer à la dimérisation du récepteur (Thévenin et al., 2005). Le récepteur adrénergique  $\beta 1$  présente deux interfaces de dimérisation impliquant d'une part les domaines transmembranaires 1 et 2 et d'autre part les résidus du TM4 et TM5 (Huang et al., 2013). Les domaines transmembranaires des RCPG contiennent de très nombreux motifs GxxxG, leur implication dans les interactions inter-hélices est peu documentée mais la présence d'un motif GxxxG contribuant à l'oligomérisation a été montré pour la première fois chez la levure dans le TM1 du RCPG Step2 (Overton et al., 2003). Cependant, il existe des interfaces (il n'y a pas de motif précisément décrit mais seulement l'implication plus fréquente de certains acides aminés) réparties sur les différentes hélices parallèles comme par exemple pour la rhodopsine (Kota et al., 2006), le récepteur de la dopamine D2 (Guo et al., 2003), (Guo et al., 2005), (Guo et al., 2008), ou encore le dimère du récepteur 5HT2C (Mancia et al., 2008). Ainsi, les règles d'interactions entre segments TM de mieux en mieux documentées pour les récepteurs bitopiques pourraient éventuellement s'appliquer aux RCPG.

### **4.3. Les récepteurs des molécules de la matrice extracellulaire**

La famille des intégrines est exprimée de façon ubiquitaire et est impliquée dans différents processus comme l'adhérence, la migration et la différenciation cellulaire (Hynes, 2002). Les intégrines sont des récepteurs dimériques avec un large domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et pour la plupart avec une petite partie

cytosolique. Leur activation passe par la formation d'un dimère avec une sous-unité  $\alpha$  et une sous-unité  $\beta$ . Il existe 8 sous-unités  $\alpha$  et environ 16 sous-unités  $\beta$  qui peuvent former 22 hétérodimères différents arborant des fonctions biologiques diverses.

Une étude détaillée des différents domaines transmembranaires des intégrines ( $\alpha 2$ ,  $\alpha 11b$ ,  $\alpha 4$ ,  $\beta 1$ ,  $\beta 3$  et  $\beta 7$ ) a montré que ces segments ont tous la capacité de former des hétérodimères et même certains homodimères (Schneider and Engelman, 2004b). Cette étude propose d'ailleurs que les domaines transmembranaires des intégrines sont des modulateurs des complexes hétérodimériques ou homodimériques mis en place. En fait, contrairement à la vision historique qui considérait la formation du dimère pour l'activation de l'intégrine, il semblerait que les domaines transmembranaires maintiennent le dimère d'intégrine dans une conformation de faible affinité pour son ligand (Luo and Springer, 2006) et qu'une séparation des deux hélices des sous-unités est nécessaire pour permettre l'activation du récepteur (Zhu et al., 2007), (Lau et al., 2009).

L'implication des segments transmembranaires est documentée pour d'autres récepteurs comme la famille des syndecans (1, 2, 3 et 4) (Dews and Mackenzie, 2007), la protéine de la myéline PO (dont la mutation du segment TM semble causer la maladie de Charcot-Marie-Tooth, (Plotkowski et al., 2007) ou encore pour la protéine du protéolipide (PLP) de la myéline interagissant par son domaine TM4 (Ng and Deber, 2010). De même, des mutations des segments TM des cadhérines E ou N induisent une perte d'adhérence cellulaire (Huber et al., 1999), (Yonekura et al., 2006). Enfin, des travaux montrent l'implication des segments TM de la synaptobrevine-2 (Roy et al., 2004), (Bowen et al., 2002), (Bowen and Brunger, 2006), ou du complexe SNARE qui sont impliqués dans la fusion des vésicules d'exocytose avec la membrane (Fdez et al., 2010).

#### **4.4. Les récepteurs des cytokines**

Le récepteur de l'érythropoïétine, l'EpoR, est une protéine bitopique présente sous forme d'homodimère. Sa fonction est de stimuler la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques. Des premières études font apparaître que cette homodimérisation se fait par l'interaction entre les deux TM des monomères (Constantinescu et al., 2001), (Kubatzky et al., 2001). Quelques années plus tard, il est

démontré que le motif d'interaction de ces hélices serait une Leucine Zipper (Ruan et al., 2004). Les récepteurs humains et murins ne diffèrent que de trois acides aminés mais ces changements minimes induisent des différences dans les capacités de dimérisation (Ebie and Fleming, 2007).

Le récepteur PLR-R de la prolactine peut être cité comme un autre exemple de récepteur de cytokine qui nécessite une dimérisation de son domaine transmembranaire pour être fonctionnel (Gadd and Clevenger, 2006). Là encore, la liste est de plus en plus grande puisque la protéine de l'APP (amyloid precursor protein), l'inducteur d'apoptose Bnip3 (Sulistijo and Mackenzie, 2009), le récepteur Tar de l'aspartate (Sal-Man et al., 2004), l'APH-1 du complexe  $\gamma$ -secrétase ou les Toll like receptors (Godfroy et al., 2012) engagent également leurs domaines TM pour la formation de complexes oligomériques.

## 5. Peptides transmembranaires comme agents thérapeutiques potentiels

Depuis l'insuline, premier peptide thérapeutique largement utilisé, de plus en plus de peptides non transmembranaires sont développés à des fins thérapeutiques (Arkin and Wells, 2004). Cet engouement croissant ne concerne cependant pas ou peu les peptides ciblant les domaines transmembranaires.

La première démonstration de cette possibilité date de 1997 et concerne les récepteurs des lymphocytes T, les (Manolios et al., 1997). Ces récepteurs sont composés de 8 sous-unités transmembranaires. On trouve l'unité principale de reconnaissance de l'antigène, un hétérodimère ( $\alpha$ - $\beta$ ) lié par des ponts disulfures qui interagit avec 4 chaînes invariantes de CD3 (Cluster de Différenciation 3) formant 1 homo (CD3  $\zeta$ - $\zeta$ ) et 2 hétérodimères, (CD3 $\epsilon\delta$  et CD3  $\epsilon\gamma$ ). La formation de ce complexe TCR est impliquée dans l'activation des lymphocytes T lors de la réponse immunitaire cellulaire. Le domaine transmembranaire de la chaîne  $\alpha$  est très conservé entre les espèces et semble responsable de l'interaction stable entre les chaînes  $\alpha$  et les chaînes CD3  $\delta$  et  $\epsilon$  (Manolios et al., 1990). Un peptide mimant le domaine transmembranaire de TCR- $\alpha$ , est capable *in vitro* de diminuer l'activation des lymphocytes T comme le montre la réduction de la production d'interleukine-2. De manière intéressante, l'administration *in vivo* de ce peptide réduit les signes cliniques de l'inflammation dans 3 modèles de maladie induites par les lymphocytes T comme l'arthrite induite par des adjuvants, la névrite allergique expérimentale et le diabète induit par la cyclophosphamide. Cet effet

immunosuppresseur a par la suite été utilisé pour traiter des maladies de la peau induites par les lymphocytes T (Göllner et al., 2000). Ce peptide a été par la suite amélioré avec un énantiomère (image miroir) de la forme D- qui montre une efficacité similaire à la forme L- mais comme on pouvait s'y attendre, une meilleure résistance à la dégradation (Gerber et al., 2005). Des modifications des caractères hydrophobes ont également été réalisées et améliorent son efficacité *in vitro* et *in vivo* (Amon et al., 2006).

D'autres études se penchent sur le rôle des domaines transmembranaires des protéines qui forment les complexes autorisant l'entrée des virus dans les cellules par la fusion de la capsid virale avec la membrane (Dubay et al., 1992), (Ciczora et al., 2007), (Kim et al., 2009), (Montero et al., 2012). Ces travaux montrent également le potentiel thérapeutique du blocage des interactions entre segments transmembranaires de ces protéines de fusion qui empêche l'entrée des virus dans la cellule (Bloch et al., 2007), (Porotto et al., 2010), (Boenzli et al., 2011), (Si et al., 2012).

Une autre application montante concerne les récepteurs de multi-résistances aux médicaments (SMRs, Small Multidrug Resistance proteins). Cette famille de protéines membranaires confère aux bactéries une résistance à un large éventail de composés toxiques (y compris les antibiotiques) en les retirant des cellules, elle possède 4 domaines transmembranaires. L'utilisation d'un peptide ciblant le domaine transmembranaire 4 de SMR rend les bactéries sensibles à l'antibiotique auquel elles étaient résistantes (Poulsen and Deber, 2012). L'induction de l'expression dans des cellules, de différents peptides transmembranaires visant les 12 domaines transmembranaires du transporteur hOAT1 (Human organic anion transporter1) démontre que seul le peptide ciblant le domaine 6 est capable de bloquer l'homodimérisation du transporteur (Duan et al., 2011).

Dans le cadre de la mouvance croissante des travaux de modélisation/simulation moléculaires le groupe d'Hubert Yin présente des travaux intéressants sur les intégrines. Les modélisations effectuées permettent le design de peptides ou des petites molécules capables de cibler le domaine transmembranaire des intégrines de manière spécifique (Yin et al., 2007). Ces peptides virtuels appelés CHAMP (computed helical anti-membrane protein) sont créés sur la base d'un algorithme de repositionnement des chaînes latérales. Les premiers peptides CHAMP modélisés sont dirigés contre les dimères d'intégrines  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  et  $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ . Ils ont la capacité d'interagir spécifiquement avec le domaine transmembranaire de leur cible malgré l'homologie très forte entre l' $\alpha\text{IIb}$  et l' $\alpha\text{v}$ . Ces peptides peuvent activer leur complexe cible, l' $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  qui induit normalement une

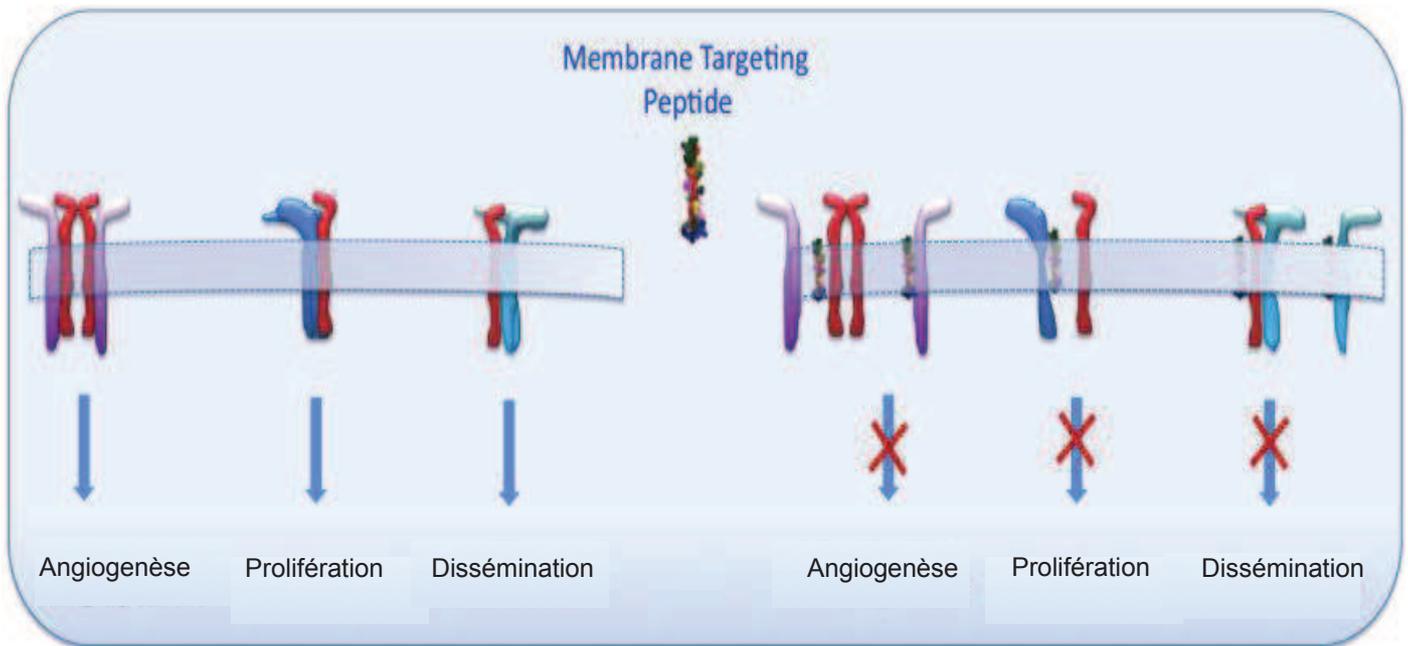
agrégation plaquettaire. La production de peptides CHAMP confirme les effets biologiques attendus comme le montre l'analyse de l'interaction du peptide CHAMP $\alpha$ IIb avec l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 dans des micelles de détergents et des bicouches de phospholipides (Caputo et al., 2008), (Grygielska et al., 2009). Plus récemment, ce groupe a proposé une autre méthode de modélisation de peptide transmembranaire basée cette fois sur des formes peptidiques en feuillet  $\beta$  qui restent cependant capables de cibler l'intégrine  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 pour induire son activation (Shandler et al., 2011).

## 6. Notre stratégie peptidique

Mon laboratoire d'accueil travaille historiquement sur une stratégie peptidique utilisant des peptides synthétiques mimant le domaine transmembranaire des récepteurs ciblés.

Les tous premiers travaux portaient sur l'inhibition de l'EGFR et ErbB2 par des vecteurs d'expression codant pour les domaines transmembranaires de ces récepteurs mais aussi directement par des petits peptides hydrophobes correspondant à ces séquences (Bennasroune et al., 2004). Cette approche pionnière concernait deux types cellulaires : les cellules de cancer de la peau A431 surexprimant l'EGFR et les cellules SK-OV3 de cancer de l'ovaire surexprimant ErbB2. Dans les deux cas, les peptides s'incorporaient à la surface membranaire des cellules et étaient capables d'impacter la phosphorylation du récepteur ciblé ainsi que les voies de signalisation sous-jacentes comme la voie ERK. L'étude d'un récepteur chimérique de l'insuline dans lequel le segment transmembranaire était remplacé soit par le domaine TM de l'EGFR soit par celui d'ErbB2 dans des cellules CHO a permis de démontrer la spécificité d'interaction des peptides avec leurs cibles (Bennasroune et al., 2005).

A partir de ces travaux, le laboratoire a étendu cette stratégie à d'autres récepteurs nécessitant une dimérisation pour être actifs. C'est ainsi que l'équipe a étudié dans quelle mesure le segment TM de neuropiline-1 pouvait contribuer à la formation du dimère de NRP1, une étape essentielle au déclenchement des nombreuses fonctions biologiques associées à ce récepteur. Le choix de cette nouvelle cible découlait naturellement des études précédentes qui ont largement contribué à la mise en évidence des fonctions de NRP1 grâce à la formation de complexes de récepteurs associant par exemple le VEGFR-1 (Bagnard et al., 2001), (Bagnard et al., 2004) ou les plexines (Püschel, 2002). L'identification d'un motif de type GxxxG dans le domaine



**Figure 26: Stratégie peptidique du laboratoire utilisant des peptides synthétiques (MTP) mimant le domaine transmembranaire des récepteurs ciblés.**

transmembranaire de NRP1 a stimulé un ensemble d'expériences de double hybride (le système ToxLuc), de FRET (avec des versions de peptides TM couplés au pyrène et à la coumarine) ou d'essais in vitro sur différents types cellulaires qui ont démontré que NRP1 est capable d'homodimériser par son domaine transmembranaire (Roth et al., 2008). L'utilisation d'un peptide synthétique mimant le domaine transmembranaire de NRP1 (MTP-NRP1) est capable de bloquer, à de très faible concentration (dès  $10^{-12}$ M), le collapsus des axones des neurones corticaux ou des cellules COS exprimant NRP1 et PlexA1 en réponse à Sema3A. Ce peptide MTP-NRP1 bloque la formation d'oligomères de NRP1 tout en ayant un impact réduit sur la liaison des ligands Sema3A ou VEGF sur NRP1 conservée à plus de 50 %.

Il s'agissait là de l'une des toutes premières validations de la possibilité d'utiliser des peptides de synthèse mimant les segments TM à des fins de blocage d'un récepteur. A partir de là, l'équipe a recherché l'intérêt thérapeutique de ce type de peptide. Compte tenu du rôle de NRP1 dans la prolifération, la migration cellulaire et l'angiogenèse, les travaux se sont portés vers le traitement du gliome, une tumeur cérébrale particulièrement agressive associée à une surexpression de NRP1. Les résultats et implications conceptuelles de cette étude sont présentés dans la première partie des résultats de cette thèse puisque j'ai participé à ces travaux. A ma connaissance, il s'agit sans nul doute de la première validation préclinique d'un peptide TM utilisable comme agent anti-cancéreux (**Figure 26**).

## Objectifs de la thèse :

Comme nous venons de le voir, les domaines transmembranaires des récepteurs n'ont plus juste une simple fonction d'ancrage mais sont de plus en plus associés à un réel rôle fonctionnel. Les travaux de mon laboratoire d'accueil avaient démontrés l'importance du domaine transmembranaire de NRP1 dans sa dimérisation (Roth et al., 2008). Ces travaux ont également abouti à la mise au point d'un peptide hydrophobe ciblant le domaine transmembranaire de NRP1 qui a montré une capacité d'inhibition des fonctions du récepteur. Une autre publication de l'équipe à laquelle j'ai participé a confirmé l'efficacité de ce peptide comme agent inhibiteur de l'angiogenèse et de la croissance du gliome (Nasarre et al., 2010).

- Dans ce contexte, mon travail de thèse a été dans un premier temps de poursuivre la validation préclinique de ce composé MTP-NRP1 pour augmenter les connaissances mécanistiques et fonctionnelles particulièrement dans l'angiogenèse.

-Le deuxième objectif consistait à optimiser MTP-NRP1 en déterminant la séquence minimale efficace capable de reproduire ses effets inhibiteurs.

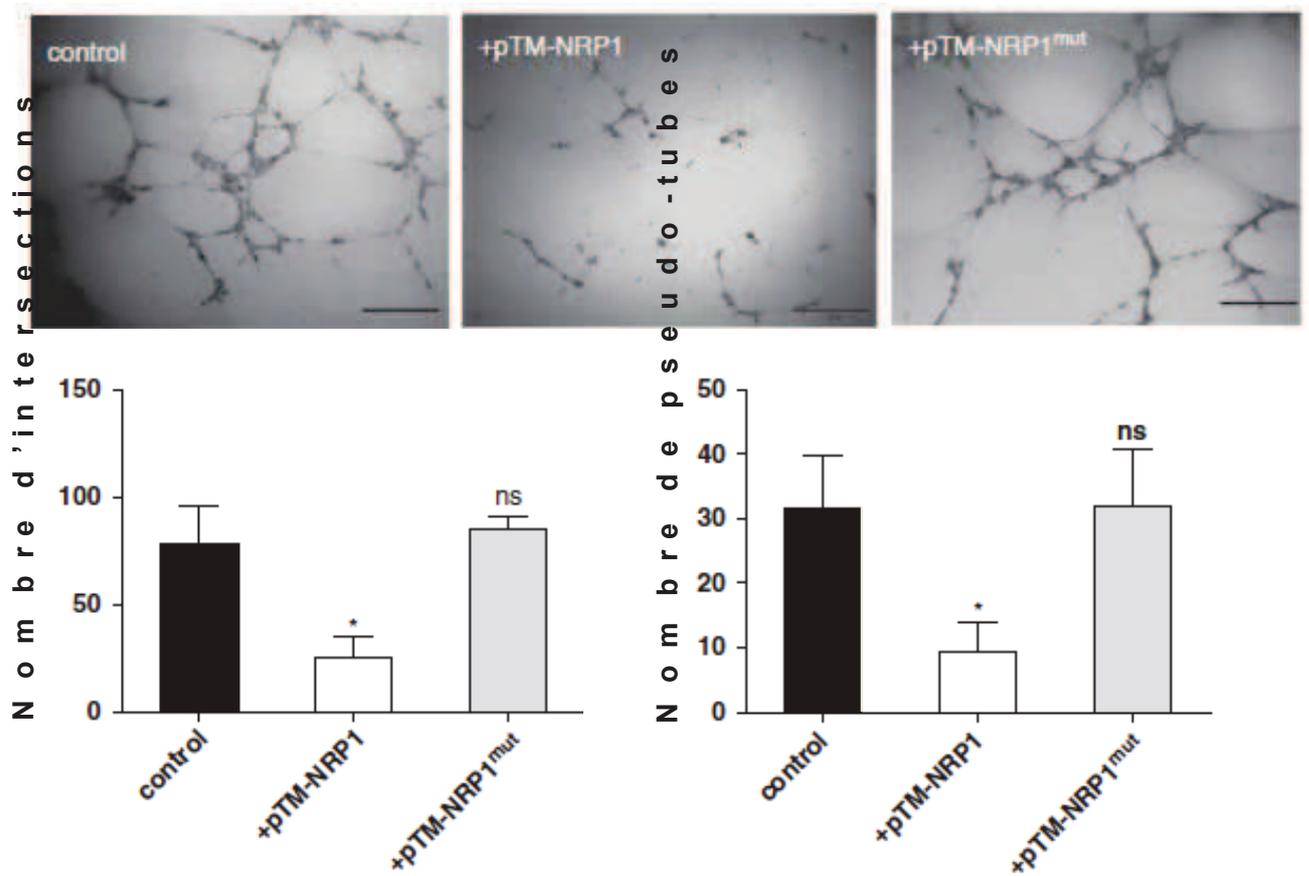
-Le troisième objectif, qui s'avère être le plus conséquent, consistait à élargir la stratégie peptidique vers d'autres récepteurs, en l'occurrence le récepteur plexine-A1. Ce récepteur est présenté dans la littérature comme le partenaire privilégié de NRP1 dans la signalisation Sema3A. Il dévoilait également des motifs d'interactions de type GxxxG nous permettant de faire l'hypothèse d'une implication fonctionnelle de son domaine transmembranaire.

# RESULTATS

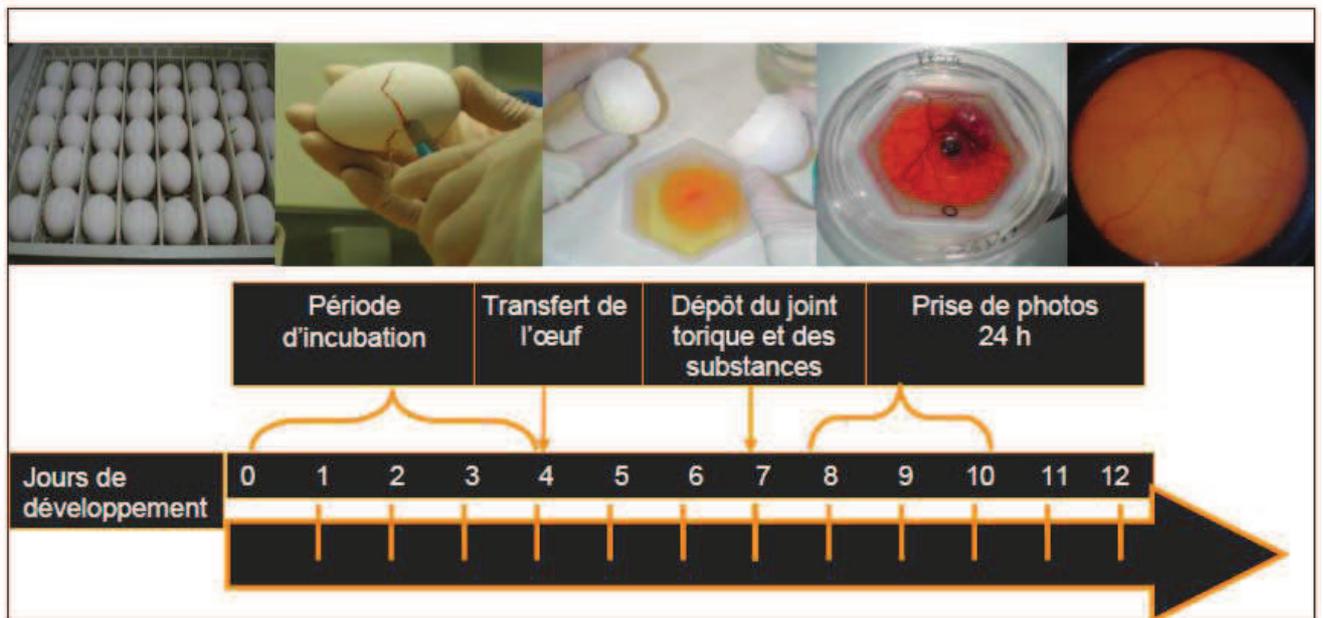
Les résultats sont divisés en trois parties pour illustrer l'utilisation de peptides transmembranaires comme agents thérapeutiques. La première partie concerne l'étude initiale du peptide NRP1 (MTP-NRP1) et la démonstration de sa capacité inhibitrice des fonctions du récepteur NRP1 dans plusieurs modèles *in vitro* et *in vivo* sur des cellules tumorales et endothéliales. La deuxième partie continue l'exploration du potentiel thérapeutique du MTP-NRP1 et se penche sur le développement de peptides courts pour déterminer le motif minimal nécessaire au blocage des fonctions biologiques de NRP1. Finalement, la troisième partie concerne l'essentiel de ce travail de thèse et porte sur l'extension de cette stratégie peptidique vers un autre récepteur : Plexine-A1.

## Partie I :

Contribution à l'étude de l'impact de l'inhibition du domaine transmembranaire de neuropiline-1 sur l'angiogenèse et la croissance des gliomes



**Figure 27: Test d'angiogenèse in vitro avec des HUVEC.** Les cellules se développent sur du matrigel pendant 4-6 h en présence ou non de peptide à  $10^{-7}M$ . La quantification consiste à mesurer le nombre d'intersections et le nombre de pseudo tubes. pTM-NRP1: MTP-NRP1, pTM-NRP1<sup>mut</sup>: MTP-NRP1 muté (Mann et Whitney test; \*P<0,0 5, ns: non significatif)



**Figure 28: Protocole mis en place du test d'angiogenèse de la membrane chorioallantoïque de l'embryon de poulet (CAM).**

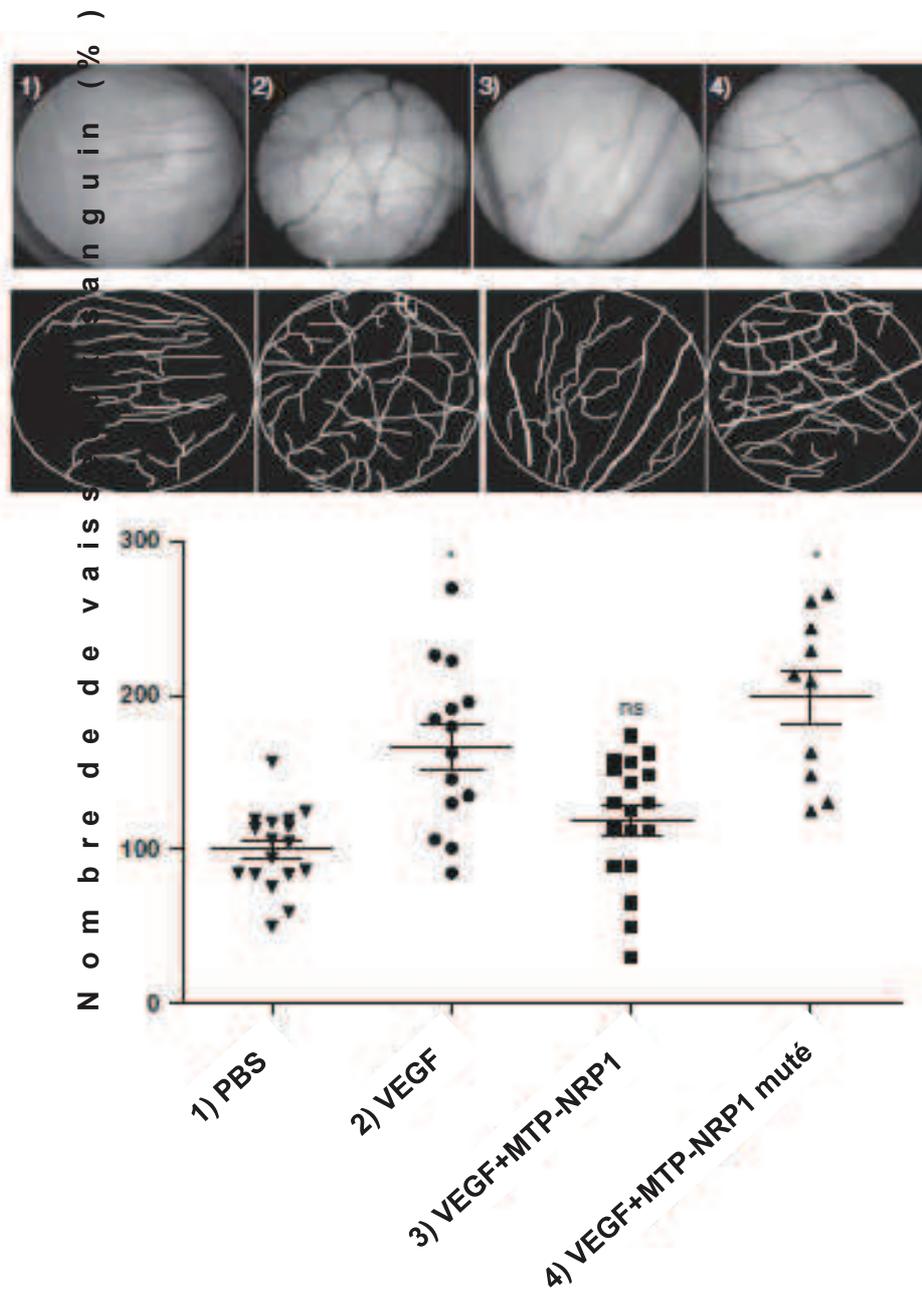
# I. Contribution à l'étude de l'impact de l'inhibition du domaine transmembranaire de neuropiline-1 sur l'angiogenèse et la croissance des gliomes

## 1. Objectifs et résumé des résultats

La première démonstration des effets inhibiteurs des peptides ciblant le segment transmembranaire de NRP1 a fait l'objet d'une thèse par Mlle Lise Roth et les résultats sont publiés dans la Revue Molecular Biology of the Cell (Roth et al., 2008). A partir de ces travaux, l'équipe a recherché l'intérêt thérapeutique de ce peptide (MTP-NRP1) comme agent thérapeutique appliqué à l'inhibition de la progression du glioblastome. Comme nous l'avons vu dans l'introduction générale, ce choix s'imposait naturellement compte tenu de l'implication de NRP1 dans la progression du glioblastome à la fois par une modulation de la prolifération cellulaire, de la migration et de l'angiogenèse tumorale.

Cet article, publié en 2010 dans la revue Oncogene montre que MTP-NRP1 offre des perspectives intéressantes pour un développement thérapeutique puisque l'administration intrapéritonéale et/ou sous cutanée du peptide ralentit la croissance de lignées de gliomes murines ou humaines. Cet effet passe majoritairement par une action anti-angiogénique. Dans cet article, j'ai réalisé les tests d'angiogenèse in vitro et in vivo qui contribuent, avec l'analyse histologique des tumeurs, à la démonstration de cet effet anti-angiogénique du peptide.

Le premier test que j'ai développé et utilisé consiste à cultiver des cellules endothéliales humaines (HUVECs) sur une couche mince de matrigel, un polymère de laminine et de collagène IV contenant un ensemble de facteurs pro-angiogéniques dont le bFGF et l'EGF. Dans les conditions contrôles, les cellules forment un réseau dense et complexe composé de structures tubulaires donnant l'image d'un nid d'abeille après 4 à 6 heures de culture avec un ensemencement de 7500 cellules (**Figure 27**). L'ajout du MTP-NRP1 à la concentration de  $10^{-7}$  M réduit significativement la formation de ce réseau comme le montre la diminution significative du nombre d'intersections de -66 % ( $p < 0,05$ ) ainsi que la réduction du nombre de structures tubulaires (-70 %) ( $p < 0,05$ ). Une version inactive mutante du peptide MTP-NRP1 dans laquelle les 3 glycines du motif GxxxG sont remplacées par des valines, ne modifie pas ces deux paramètres.



**Figure 29: Test d'angiogenèse in vivo de la CAM.**

Dans les différentes conditions le nombre de vaisseaux quantifiés est normalisé en % par rapport au contrôle, considéré comme 100%. Les photographies et les représentations en caméra lucida correspondantes sont obtenues après incubation avec les différents composants. 20  $\mu$ l de 1) PBS, 2) VEGF 20  $\mu$ g/ml, 3) VEGF 20  $\mu$ g/ml+ MTP-NRP1  $10^{-7}$ M, 4) VEGF 20 $\mu$ g/ml + MTP-NRP1 muté  $10^{-7}$ M, (test Mann et Whitney; \*P<0,05, ns: non significatif)

Afin de vérifier l'effet anti-angiogénique de MTP-NRP1 *in vivo*, j'ai également mis en place au laboratoire le modèle d'angiogenèse de la membrane chorioallantoïdienne de l'embryon de poulet (la CAM). Ce modèle permet le criblage de molécules tout en permettant une observation précise de la croissance des vaisseaux sanguins. Le passage à une autre espèce n'est pas un problème pour étudier le peptide MTP-NRP1 car la séquence transmembranaire de NRP1 est conservée à 100 % chez toutes les espèces animales. Les œufs fécondés utilisés proviennent d'un élevage de poule LegHorn et sont collectés le jour de la ponte pour minimiser les différences de taille des embryons. Le protocole validé comporte une période d'incubation des œufs pendant 4 jours à 37°C afin de poursuivre le développement embryonnaire jusqu'au déclenchement de l'angiogenèse (**Figure 28**). Au 4<sup>ème</sup> jour, les embryons sont transférés en dehors de leur coquille dans une nacelle qui sert de support pour continuer le développement, cette nacelle en plastic est déposée dans une grande boîte de pétri conservée à 37°C. Après 3 jours d'incubation supplémentaire, la membrane chorioallantoïque est richement vascularisée. Il est alors possible de déposer près des larges vaisseaux en développement, des joints toriques qui servent de réservoirs pour les différentes substances à tester : 20 µl de solutions de PBS, de VEGF à 20 µg/ml, ou de peptide MTP-NRP1 10<sup>-7</sup> M, de MTP-NRP1 muté 10<sup>-7</sup> M ou différentes combinaisons. Après 24h d'incubation les zones traitées sont prises en photos avant de procéder à la quantification des vaisseaux formés dans la surface du joint torique après un traitement numérique de l'image.

Dans les conditions contrôles, on observe une angiogenèse physiologique qui se traduit par la ramification des vaisseaux. Le nombre de vaisseaux est normalisé pour chaque essai (**Figure 29**). En présence de VEGF (20 µg/ml), on observe une angiogenèse marquée avec un nombre de vaisseaux augmenté de +67 % (n=14) par rapport au contrôle. Par contre l'addition de MTP-NRP1 empêche l'angiogenèse induite par le VEGF (-48 %/VEGF, p<0,05) (n=18) alors que de manière intéressante le MTP-NRP1 muté n'impacte pas l'effet du VEGF (99 %) (n=10). L'ensemble de ces résultats montre que MTP-NRP1 est capable d'inhiber l'angiogenèse *in vitro* et l'angiogenèse induite par le VEGF *in vivo*.

ORIGINAL ARTICLE

## Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth *in vivo*

C Nasarre<sup>1</sup>, M Roth<sup>1</sup>, L Jacob<sup>1</sup>, L Roth<sup>1</sup>, E Koncina<sup>1</sup>, A Thien<sup>1</sup>, G Labourdette<sup>1</sup>, P Poulet<sup>2</sup>, P Hubert<sup>3</sup>, G Crémel<sup>1</sup>, G Roussel<sup>1</sup>, D Aunis<sup>1</sup> and D Bagnard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>INSERM U575, Physiopathologie du Système Nerveux, Strasbourg, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Neuroimagerie et Neurosciences Cognitives, Institut de Physique Biologique, Strasbourg, France and <sup>3</sup>LISM, CNRS UPR 9027, Marseille, France

**Angiogenesis in glioblastoma is largely dependent on vascular endothelial growth factor (VEGF) signalling. Consistently, the VEGF coreceptor NRP1 promotes angiogenesis and tumour growth in gliomas. Here, we provide data showing that an innovative peptidic tool targeting the transmembrane domain of NRP1 efficiently blocks rat and human glioma growth *in vivo*. We show both *in vivo* and *in vitro* that the antitumour effect results from the anti-proliferative, anti-migratory and anti-angiogenic properties of the compound. The proposed NRP1 antagonizing peptide is therefore a promising novel class of anti-angiogenic drugs that might prolong glioma patient survival. Our results finally show for the first time that the transmembrane domain of important signalling receptors can be antagonized *in vivo* thereby providing a new avenue towards the development of atypical antagonists with strong therapeutic potential.**

*Oncogene* (2010) 29, 2381–2392; doi:10.1038/onc.2010.9; published online 8 February 2010

**Keywords:** neuropilin; glioma; angiogenesis; peptide; tumour growth

### Introduction

Glioblastoma multiform (glioma, grade IV astrocytoma) is one of the most severe and frequent brain tumours. The median survival time of patients is not exceeding 15 months due to the lack of efficient treatments. The highly invasive phenotype of tumour cells is associated to formation of new blood vessels favouring tumour growth (Jain *et al.*, 2007). Recent preclinical and clinical data suggest that anti-angiogenic strategies may be useful to fight glioma development (Jain *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009). To address the need of new strategies to interfere with glioma growth by inhibition of neovascularization, we tested a peptide-based inhibition of neuropilin-1 (NRP1). This trans-

membrane protein, initially described for its role during nervous system development (Bagri and Tessier-Lavigne, 2002), is a positive modulator of vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) and is thereby a crucial fine-tuning element of angiogenesis (Jocic and Staton, 1993; Hong *et al.*, 2007). Moreover, consistent with several descriptions of its importance in tumorigenesis and tumour progression (Guttman-Raviv *et al.*, 2006), NRP1 promotes human glioma progression (Hu *et al.*, 2007). Hence, recent data show that VEGF blockade upregulates inflammatory pathways and NRP1, thereby presenting NRP1 as a potential target for improving anti-VEGF therapy (Xu *et al.*, 2009). Our previous work showed that the transmembrane domain of NRP1 contains a GxxxG dimerizing motif required to trigger efficient signalling (Roth *et al.*, 2008). Genetic or peptide-based inhibition of the transmembrane domain appeared sufficient to block NRP1 oligomerization and subsequent biological functions. Here, we found in models of orthotopic and heterotopic brain tumours that synthetic peptides targeting the transmembrane domain of NRP1 (pTM-NRP1) inhibit rat and human glioma growth *in vivo*. This antitumour effect relates to the inhibition of VEGF-dependent cell migration and cell proliferation, and to anti-angiogenic effect of the peptide as shown *in situ* by the reduction of microvessels density and neoangiogenesis (Taguchi *et al.*, 2004; Uzzan *et al.*, 2004) both in rat and in human glioma. We confirmed this action mechanism by using an *in vitro* and *in vivo* angiogenesis assay. Overall, our data not only show that the use of peptides antagonizing NRP1 is a very potent therapeutic strategy to treat glioma, but also exemplify that the transmembrane domain of proteins is an outstanding target to design innovative drugs.

### Results

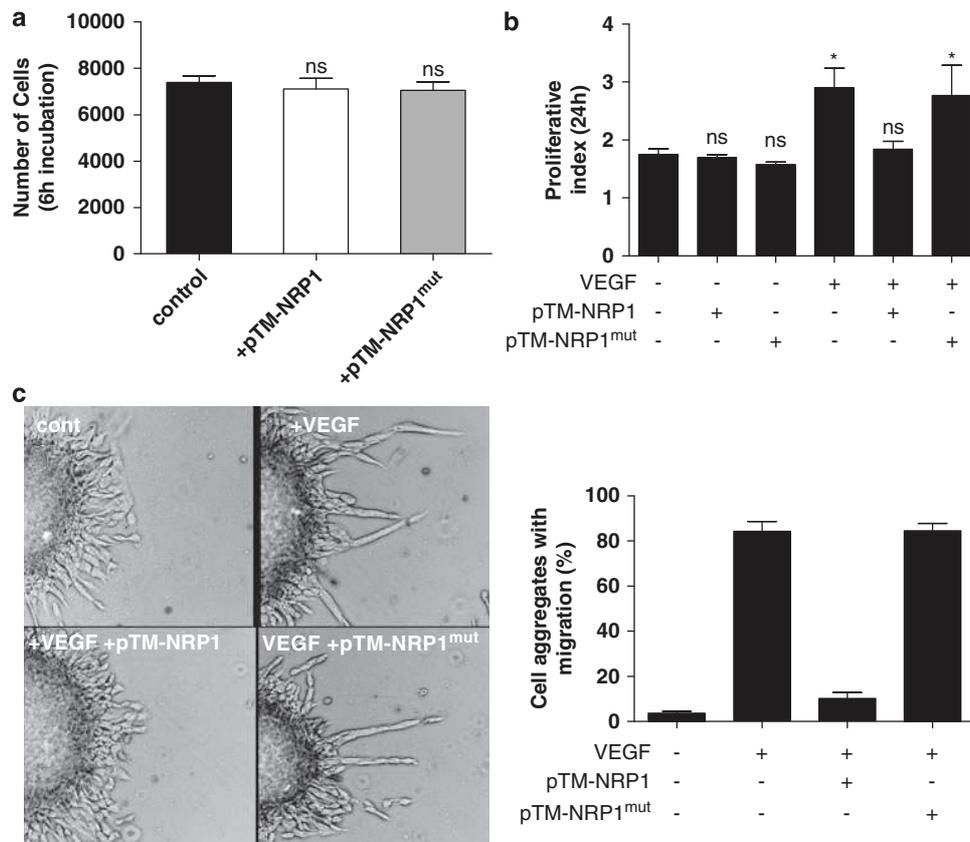
#### *pTM-NRP1 is an anti-angiogenic agent*

Considering the important function of NRP1 in angiogenesis, we evaluated both *in vitro* and *in vivo* how addition of pTM-NRP1 would interfere with blood vessel formation. This hypothesis was supported by our previous results showing that pTM-NRP1 reduced VEGF165 binding to NRP1 (Roth *et al.*, 2008). First,

Correspondence: Dr D Bagnard, INSERM U682, De l'homéostasie tissulaire au cancer et à l'inflammation, 3 Avenue Molière, Strasbourg 67200, France.

E-mail: dominique.bagnard@inserm.u-strasbg.fr

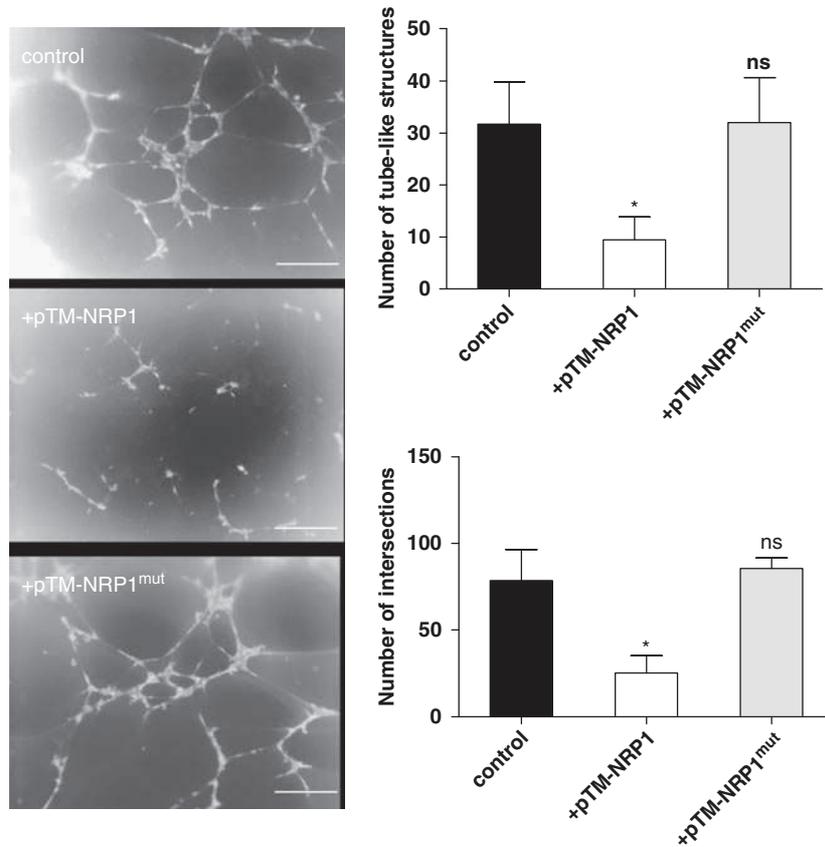
Received 24 August 2009; revised 19 December 2009; accepted 3 January 2010; published online 8 February 2010



**Figure 1** Inhibition of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) proliferation and migration. MTT assay performed at 6 h incubation revealed no acute toxicity of the TM peptides (a). Vascular endothelial growth factor 165 (VEGF165)-induced HUVEC was blocked by pTM-NRP1 but not by pTM-NRP1<sup>mut</sup> (b). VEGF165-induced migration of HUVEC cells from microaggregates grown in chicken plasma was blocked by pTM-NRP1 but not by pTM-NRP1<sup>mut</sup> (c).

we verified that pTM-NRP1 had no acute toxic effect on human umbilical vein endothelial cells (HUVEC cells; PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) grown 6 h in the presence of the peptides as seen in Figure 1a. Second, we monitored cell proliferation using MTT assay after 24 h incubation. This approach revealed that pTM-NRP1 or pTM-NRP1<sup>mut</sup> (an inactive control peptide in which the three glycines of the dimerizing motif have been replaced by three valines) (Roth *et al.*, 2008) had no effect on HUVEC cells proliferation in control culture conditions (low serum, low VEGF). However, pTM-NRP1 but not pTM-NRP1<sup>mut</sup> prevented VEGF-induced HUVEC cells proliferation (Figure 1b). We next examined the migration of HUVEC cells grown in a 3D matrix composed of chicken plasma coagulated with thrombin. This substrate allowed cells to migrate from microaggregates of HUVEC cells incubated with or without VEGF and peptides. As seen in Figure 1c, HUVEC cells formed chains of migrating cells on addition of 100 ng/ml VEGF165. Interestingly, this VEGF165-induced migration was abolished in cells treated with pTM-NRP1 but not in the case of pTM-NRP1<sup>mut</sup> treatment. Consistently, the anti-angiogenic effect of pTM-NRP1 was revealed in the matrigel assay

(Matrigel; Millipore, Molsheim, France) favouring tube formation. In our hands, we observed a dense network of endothelial cells forming tube-like structures within 4–6 h (Figure 2). Interestingly, the addition of pTM-NRP1 inhibited tube formation. The use of various concentrations of the peptide revealed a significant effect from  $10^{-8}$  M reaching a maximal inhibition with  $10^{-7}$  M (data not shown). Quantitative analysis of this anti-angiogenic effect performed by counting number of tubes or network complexity (number of branch points or intersections) showed a threefold reduction of angiogenesis in the presence of pTM-NRP1. In all cases, pTM-NRP1<sup>mut</sup> had no effect on tube formation (see Figure 2). Hence, we confirmed the anti-angiogenic effect of pTM-NRP1 using the *in vivo* CAM (chick chorioallantoic membrane) assay. In this case, the addition of 20  $\mu$ g/ml VEGF165 induced blood vessels formation and sprouting. Strikingly, VEGF165-induced blood vessels formation was abolished in the presence of pTM-NRP1 but not in the case of pTM-NRP1<sup>mut</sup> treatment (Figure 3). Altogether, these results showed that pTM-NRP1 inhibits VEGF-induced endothelial cells proliferation and migration and subsequent pro-angiogenic effects.

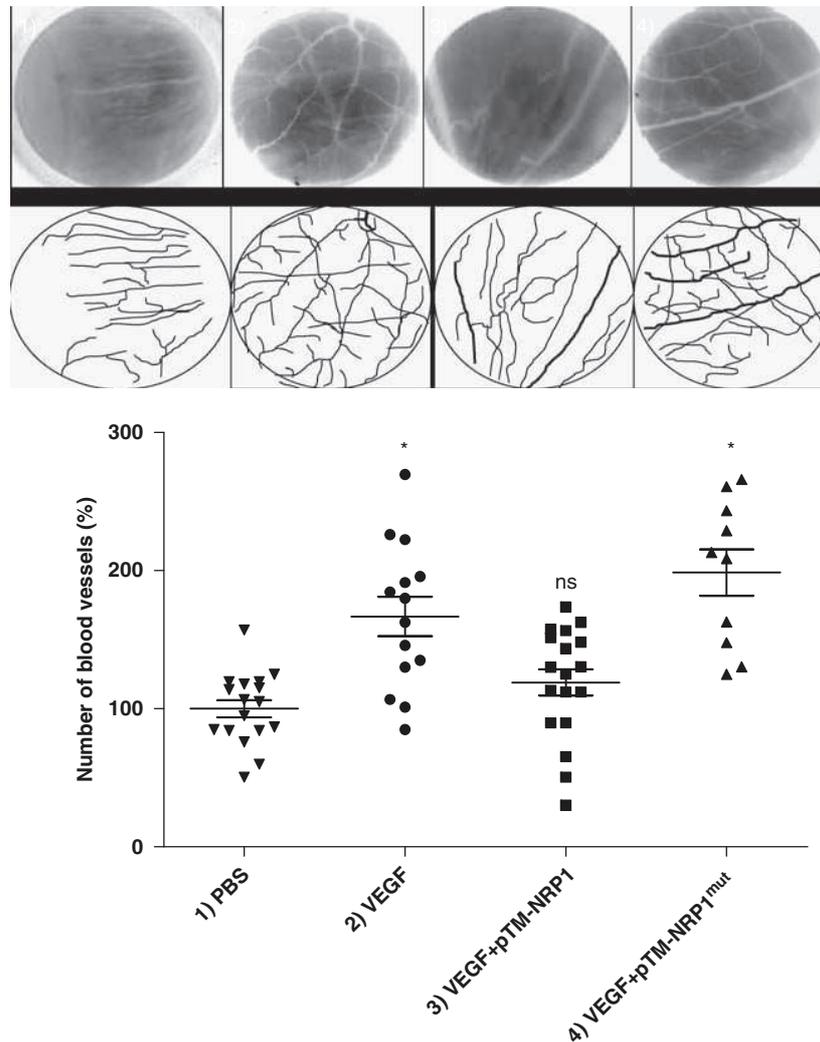


**Figure 2** pTM-NRP1 blocks *in vitro* angiogenesis. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were grown for 4–6 h on matrigel to allow tube-like structure formation in the presence or not of TM peptide. Quantification of angiogenesis was performed by counting number of tube-like structures or number of intersections. Phase-contrast images obtained using a microscope (Leica, Nanterre, France). Scale bar = 100  $\mu$ m. \* $P < 0.05$ .

*pTM-NRP1 stably integrates tumour cell membranes and blocks NRP1 function*

We next evaluated how pTM-NRP1 could be used as a therapeutic treatment in cancer. First, we focused on the rat glioma model C6 cell line (American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) CCL-107) recapitulating characteristic features of human glioma (Wang *et al.*, 2001; Grobbsen *et al.*, 2002). We verified that our clone of C6 cells expressed significant levels of NRP1 using both RT-PCR and immunocytochemistry (Figure 4a). Moreover, we determined that pTM-NRP1 integrates the membrane of C6 cells within 1 h using a biotinylated version of the peptide revealed with rhodamine-conjugated streptavidin (Figure 4b). These control experiments also showed that significant amount of pTM-NRP1 is still detectable at the membrane after 24 h incubation. Long-term analysis of pTM-NRP1 membrane incorporation using confocal microscopy revealed cell-surface clearance of peptide after 96 h (data not shown). Consistent with our previous description of the action mechanism of the peptide (Roth *et al.*, 2008), we found in C6 cells that pTM-NRP1 altered oligomerization of NRP1 on addition of Sema3A (Figure 5a), a semaphorin involved in glioma migration (Nassarre *et al.*, 2009) and shown to promote glioma

dispersal through an autocrine mechanism (Bagci *et al.*, 2009). Moreover, although not inducing acute toxicity in C6 cells (see Figure 5b), the addition of pTM-NRP1 induced a significant reduction of cell proliferation ( $-32\%$ ,  $P < 0.05$ , Figure 5c). Interestingly, the reduction of the proliferative capacity of C6 cells when blocking the transmembrane domain of NRP1 was confirmed in flow cytometry analysis performed with C6 cells stably expressing a dominant-negative form of NRP1 (Roth *et al.*, 2008) that also caused a significant reduction ( $-26.5\%$ ,  $P < 0.05$ ) of C6 cells proliferation (see Supplementary Figure 2). Hence, similar to what we obtained with HUVEC cells, we found that VEGF165-induced C6 migration was abolished by pTM-NRP1 but not by pTM-NRP1<sup>mut</sup>. Indeed, we rarely observed cells exiting microaggregate in the absence of VEGF treatment ( $< 3\%$  of the aggregates over a total of 182 cases) after 24 h culture. The observed migrating chains in the presence of VEGF (in 93% of tumour aggregates,  $n = 180$ ) mimicked what is frequently observed for invasive cells or migrating progenitors in the brain (Garcia-Verdugo *et al.*, 1998). The addition of pTM-NRP1 in the culture medium suppressed VEGF-dependent C6 cells migration (2% of aggregates presenting chains of migration,  $n = 161$ , Figure 4c)



**Figure 3** pTM-NRP1 blocks *in vivo* angiogenesis. The CAM (chick chorioallantoic membrane) assay served to evaluate anti-angiogenic properties of pTM-NRP1 *in vivo*. Microphotographs and corresponding camera lucida drawing were obtained after 24h incubation with phosphate-buffered saline (PBS) (1), VEGF165 (2), VEGF165 + pTM-NRP1 (3) or VEGF165 + pTM-NRP1<sup>mut</sup> (4). The number of blood vessel in the region incubated with different solutions served to quantify the angiogenic effects. \* $P < 0.05$ .

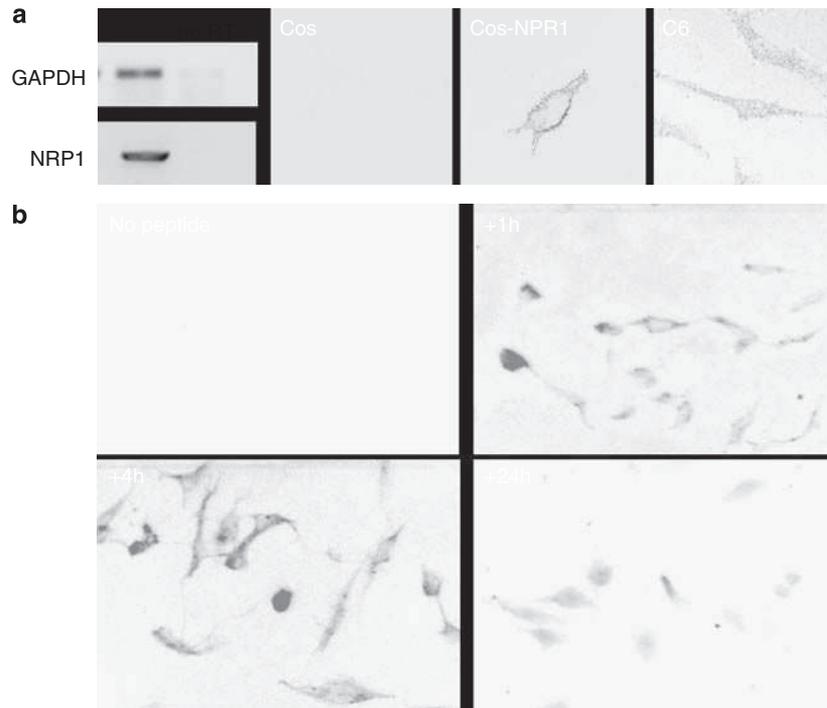
whereas pTM-NRP1<sup>mut</sup> did not prevent VEGF-induced chain formation (96% of aggregates presenting chains of migration,  $n = 179$ , Figure 5d).

Thus, pTM-NRP1 is able to block Sema3A- and VEGF-related NRP1 functions in C6 cells. This resulted in decreased proliferation and migration of the C6 tumour cells.

#### *pTM-NRP1 prevents glioma growth in vivo*

We further explored the therapeutic potential of pTM-NRP1 in a model of orthotopic brain tumour (Grobben *et al.*, 2002). We stained C6 cells with PKH26 (Sigma, Saint Quentin Fallavier, France) to easily determine tumour extent and cell dissemination by fluorescent examination of brain slices (see Supplementary Figure 1). We standardized our conditions to have comparable tumours 8 days after injections. For treatments, cells

were incubated with the active peptides (pTM-NRP1  $10^{-8}$  M) before tumour cell transplantation for at least 2 h on ice in culture medium. We transplanted  $10^6$  cells per animal using a stereotaxic frame to implant the tumour cells in the striatum. In control conditions, we obtained large tumours often giving rise to secondary tumours developing at a distance of the injection site. This shows the highly invasive behaviour of these tumour cells often seen migrating along the corpus callosum (see Supplementary Figure 1; Grobben *et al.*, 2002). We used magnetic resonance imaging (MRI) to analyze tumour progression in control (three cases) and pTM-NRP1 (three cases) treated animals. As seen in Figure 6a, after 8 days, the growth of pTM-NRP1-treated C6 cells was dramatically reduced compared to control cells being almost not detectable in certain cases with MRI. To confirm these data, we extended the analysis to increase the number of cases and we included an additional



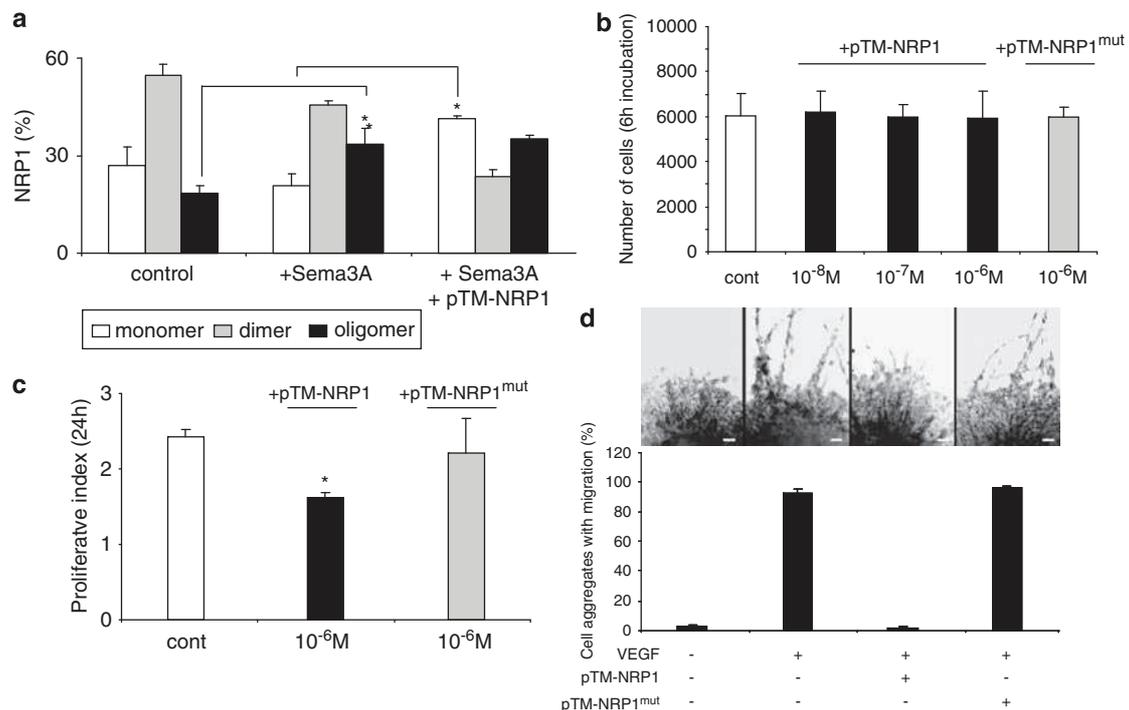
**Figure 4** Expression of neuropilin-1 (NRP1) in C6 cells and incorporation of pTM-NRP1. (a) NRP1 expression in C6 cells was confirmed by either RT-PCR or immunocytochemistry. The specificity of the immunostaining is shown with COS cells (not expressing NRP1, negative control) and COS-NRP1 (transfected COS stably expressing NRP1, positive control). (b) Time-lapse sequence showing the incorporation of a biotinylated version of pTM-NRP1 peptide revealed with Streptavidin-Cy3. Note the persistence of peptide in the membrane after 24 h incubation.

control group of animals receiving cells preincubated with the mutated inactive version of NRP1 peptide (pTM-NRP1<sup>mut</sup>  $10^{-8}$  M). The histological analysis of the brains confirmed that blocking NRP1 with pTM-NRP1 (12 cases) inhibits tumour growth (up to  $-80\%$ ) in a remarkably reproducible manner (12 out of 12 cases). In control experiments (no treatment of the cells, 12 cases or incubation with pTM-NRP1<sup>mut</sup>, 7 cases), C6 cells developed large tumours with secondary implantations often lying at the ventricle border (see Figure 6b). This reduction of tumour growth can be related to the inhibition of cell proliferation and cell migration observed *in vitro*.

#### Local and intraperitoneal administration of pTM-NRP1 inhibits glioma growth *in vivo*

At this point, our data supported the use of pTM-NRP1 as a novel pharmacological agent to treat glioma. However, because tumour cells were preincubated with the peptide before intracranial transplantations, we had to verify the therapeutic potential in predeveloped tumours. We therefore decided to perform local injections of the peptides directly in the tumour surrounding. Unfortunately, we failed to perform this experiment in tumours implanted into the brain due to numerous animal deaths on additional injections and poor diffusion of the peptide from the injection point. Thus, we decided to use a heterotopic brain tumour model

consisting in the graft of the tumour cells in the flank of athymic nude mice (Kelland, 2004). This allowed us to perform multiple injections of the peptide around developing tumours and allowed the use of a human glioma cell line. In fact, the transmembrane domain of NRP1 is 100% conserved in mouse, rat or human. This, besides pointing out the importance of this domain from a phylogenetic point of view, allowed us to use the same peptidic tool, targeting both the human tumour cells and the host blood vessels. We choose the glioma cell line U373MG expressing high level of NRP1 (Hu *et al.*, 2007) (data not shown). To this end, we transplanted U373MG cells in mice and checked for tumour apparition after few days. We usually obtained visible tumours under the skin of animals within 4 days. At this point, we randomized mice in two groups receiving subcutaneous injections of phosphate-buffered saline (PBS) or  $10^{-7}$  M pTM-NRP1 in PBS for a period of 10 days. To further characterize evolution of individual tumours, we estimated tumour volume in blind condition every day (volume =  $(a^2 \times b)/2$ ,  $a < b$ ) (Hu *et al.*, 2007) using a calliper on subcutaneous administration of first dose of treatments (PBS or  $10^{-7}$  M pTM-NRP1). As depicted in Figure 7a, the growth rate (final volume/initial volume) of U373MG tumours reached 7.9-folds in control conditions while not exceeding 3.6-folds in animals receiving daily local administration of pTM-NRP1 (Figure 7a). Consistently, the determination of final tumour weight confirmed



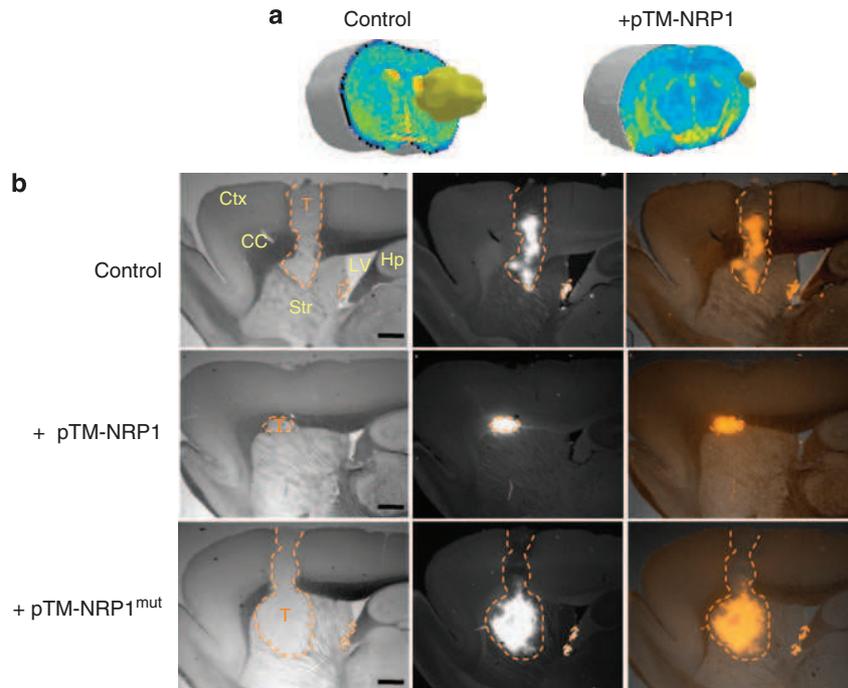
**Figure 5** Functional effects of pTM-NRP1 on C6 glioma cells. (a) Sucrose gradient analysis of neuropilin-1 (NRP1) oligomerization (11). As previously shown for other cell types, pTM-NRP1 prevents NRP1 oligomerization on ligand binding (Sema3A). (\* $P < 0.05$ , three independent experiments). (b) MTT assay served to determine the lack of cell toxicity of the peptide (number of cells obtained in six different culture wells per condition from three independent experiments). (c) The MTT assay also served to determine the proliferative index (number of cells at 24 h/number of cells at 6 h) of the cells after 24 h incubation with peptides (six different culture wells per condition from three independent experiments). (d) C6 cells migration assay. Microaggregates of C6 cells are grown in a 3D matrix. Addition of pTM-NRP1 blocks VEGF165-induced cell migration.

the significant reduction of tumour growth ( $1.7 \pm 1.1$  g in control  $n = 19$  versus  $0.9 \pm 0.7$  g in pTM-NRP1-receiving group  $n = 20$ ,  $P < 0.001$ , Figure 7b). Control experiments conducted with C6 wild-type cells and C6 cells stably expressing a full-length NRP1 mutated in its transmembrane domain also showed a reduction of glioma growth when inhibiting the transmembrane domain of NRP1 (see Supplementary Figure 3). Strikingly, we observed during U373 tumour resection a dramatic reduction of tumour perfusion in treated animals (see Figure 7c). Although numerous and large blood vessels colonized the tumours in control conditions, rare and small vessels were seen in pTM-NRP1-treated animals. To further analyze the reduction of blood vessels formation in treated tumours, we performed histological analysis of tumour samples (from smallest, medium and largest tumours of the two groups). Quantification of blood vessels using isolectin-B4 revealed a sixfold reduction of blood vessels number in animals receiving pTM-NRP1 ( $16.4 \pm 6.5$  vessel per  $\text{mm}^2$  in control tumours versus  $2.6 \pm 1.5$  vessels per  $\text{mm}^2$  in pTM-NRP1-treated tumours,  $P < 0.05$ ). Similar results were obtained using CD31 (endothelial cells) or CD34 (neovascularization) (Goldbrunner *et al.*, 2000) as blood vessel markers (Figure 8). Thus, the antitumour effect of pTM-NRP1 in human glioma can also be correlated to antiangiogenic effect.

Hence, we decided to test whether intraperitoneal (IP) injection of pTM-NRP1 might induce similar therapeutic effect. As a first step, we monitored the distribution of a rhodamine-conjugated peptide (Rhod-pTM-NRP1) using a live *in vivo* imaging system (Berthold, Thoiry, France). As seen in Figure 9a, we observed a large distribution of the peptide 15 min after injection. The tumour mass was clearly stained whereas low level of staining could be monitored in the brain. Interestingly, the histological examination of tumours from animals receiving IP injections of Rhod-pTM-NRP1 confirmed the distribution of the peptide in the tumour mass. A close examination showed staining of intratumour blood vessels accompanied by diffusion of the peptide in the surrounding tissue (Figure 9b). This result therefore suggested that IP treatment could be used in the model of human glioma xenografts previously used for local administration of the peptide. Indeed, as depicted in Figure 9c, daily IP injections induced a 50% reduction of the tumour mass comparable to the effect obtained with local injection.

## Discussion

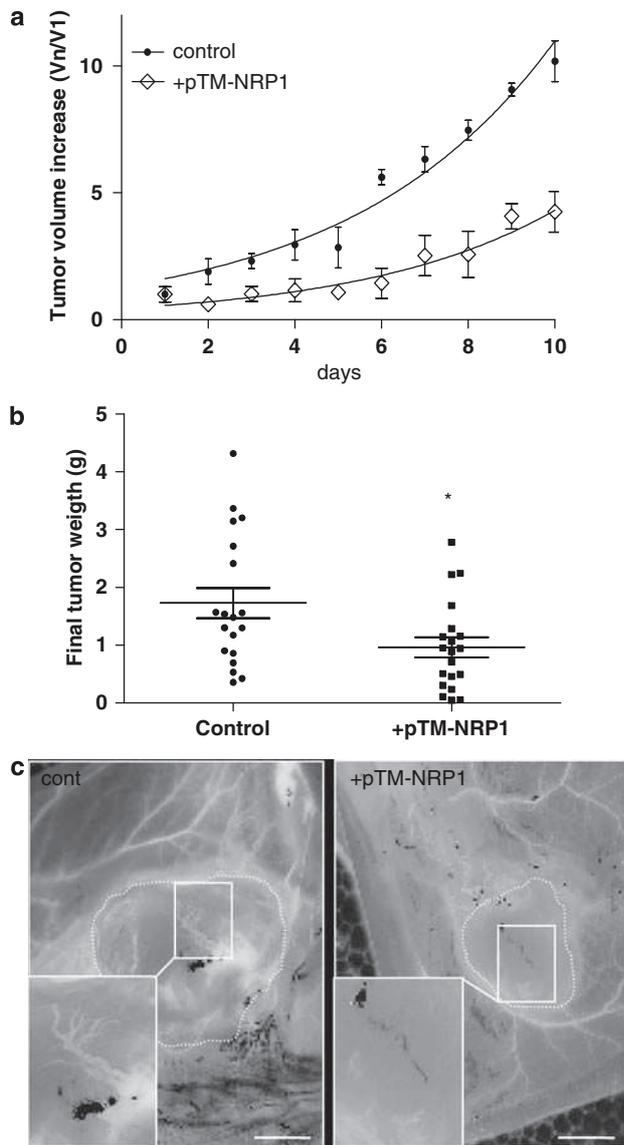
As a conclusion, our data show that antagonizing the transmembrane domain of NRP1 is an outstanding strategy to inhibit tumour growth *in vivo*. In the case of



**Figure 6** pTM-NRP1 inhibits tumour development *in vivo*. (a) 3D reconstruction of tumour bulks obtained from magnetic resonance imaging (MRI; -4.7 T) pictures of control (case 1 out of 3) and pTM-NRP1-treated animals (case 1 out of 3). Note the reduction of the tumour volume in case of the treated animals. (b) Histological analysis of brains. Tumour cells were stained before transplantation with a red fluorescent marker (PKH26). Note the reduction of tumour size and the lack of secondary tumours in pTM-NRP1-treated animals. Sagittal view, images were taken using a microscope (Leica) equipped with fluorescence light (left, bright field; middle, red fluorescence; right, overlay). (T, tumour bulk; Ctx, cortex; LV, lateral ventricle; Str, striatum; CC, corpus callosum; Hp, hippocampus).

glioma, the observed reduction of tumour progression relates to the inhibition of VEGF-related proliferative and migratory promoting effects and defaults of neoangiogenesis. We have shown the anti-angiogenic property of pTM-NRP1 in two different models (matrigel assay and CAM assay). In all cases, we show that lack of tube formation or vessel formation and sprouting is not due to acute toxicity but due to the inhibition of endothelial cells proliferation and migration in response to VEGF. Moreover, pTM-NRP1 directly induces reduction of tumour cell proliferation and migration. These inhibitions can be correlated to the interference of NRP1 oligomerization as previously described (Roth *et al.*, 2008). Interestingly, the addition of pTM-NRP1 before tumour cells transplantation reduced the growth capacity of glioma into the brain. This is reflected by a strong reduction of the tumour bulk and lack of tumour cell dissemination. A recent study shows that Sema3A stimulates glioma cells dispersal by an autocrine mechanism (Bagci *et al.*, 2009). Thus, it is tempting to speculate that the observed reduction of tumour growth and dissemination in the presence of pTM-NRP1 is the consequence of the inhibition of this mechanism. Strikingly, pTM-NRP1 can also be used to reduce the growth of well-developed tumours. Our data show that pTM-NRP1 can target both the tumour cells and host blood vessels when administrated locally (subcutaneously) or intraperitoneally thereby decreasing tumour expansion. The increas-

ing importance of NRP1 during physiological and pathological angiogenesis recently stimulated the design of various strategies to modulate NRP1 functions. Function-blocking antibodies showed successful application to inhibit tumour growth and vascular remodelling (Gamse *et al.*, 2002; Hong *et al.*, 2007). Peptide-based strategies have already been proposed by other groups to interfere with VEGF-A/NRP1 (Barr *et al.*, 2005; Slimani *et al.*, 2006; Starzec *et al.*, 2006; Tirand *et al.*, 2006) or Sema/NRP1 interactions (Williams *et al.*, 2005). Bicyclic peptide mimetic (Giordano *et al.*, 2005; Jia *et al.*, 2006) or synthetic inhibitor (Bedjeguelal *et al.*, 2006) showed promising results. However, the peptide used in this study is targeting a very particular domain, the transmembrane domain of NRP1. This domain has been ignored so far because of the lack of efficient tools allowing detailed analysis of this hydrophobic environment. Although initially described for glycophorin-A (Lemmon *et al.*, 1992), the function of the transmembrane domain is nowadays a growing field of interest because within this particular domain, the targeted motif has crucial implications in diverse pathological situations as shown by the consequence of various point mutations of the TM domain of c-neu receptor (Bargmann and Weinberg, 1988; Weiner *et al.*, 1989), FGFR3 receptor (Meyers *et al.*, 1995; Webster and Donoghue, 1996; Orian-Rousseau and Ponta, 2008), FGFR2 (Forbes *et al.*, 2002) or RET (Tessitore *et al.*, 1999). In all cases, the effects relate to the GxxxG motif



**Figure 7** Local administration of pTM-NRP1 inhibits human glioma growth. **(a)** Heterotopic xenografts of U373MG human glioma cells. Visible tumours were obtained 3–4 days after transplantation. At this point, we performed daily subcutaneous injections of phosphate-buffered saline (PBS) (control) or pTM-NRP1 ( $10^{-7}$  M). The experiment was stopped after 10 days treatment on decision of the veterinary in charge of the animal facility based on too strong diminution of grooming, general mobility and loss of body weight in the group of control animals. Tumour growth was monitored in blind conditions every day using a calliper. The graph represents the daily average tumour volume from 19 control and 20 treated tumours. **(b)** Box plot representation. Results represent tumour weight determined immediately after resection of the tumours. In each box the dark lozenge is showing the mean, the vertical bar the median. Statistical analysis confirmed the significance of the measured reduction of tumour weight ( $*P < 0.05$ ). **(c)** Microphotograph showing the reduced perfusion of treated tumours.

(or equivalent small amino-acid-xxx-small amino-acid motif) that is supposed to drive the dimerization of the transmembrane domains (Senes *et al.*, 2004). This has been clearly shown for APP (Kienlen-Campard *et al.*,

2008) or NRP1 (Roth *et al.*, 2008). We believe that blockade of NRP1 transmembrane domain provides an exquisite therapeutic tool because the biological effects of NRP1 are significantly blocked at picomolar dosage of the peptide (Roth *et al.*, 2008) with a total inhibition of the biological functions of NRP1 obtained at  $10^{-7}$  M. This peptide possesses natural targeting properties due to its biophysical characteristics (hydrophobic) that allow rapid integration to the targeted cell membrane. Moreover, this peptide showed no toxicity for various cell types in culture (including hepatocytes, data not shown) and exhibits a very low immunogenicity profile together with good stability (up to 48 h at the membrane, low sensitivity to proteases when reaching the membrane) compatible with *in vivo* use and sustained efficacy. More importantly, this peptide acts at the level of endothelial cells to prevent angiogenesis but also inhibits tumour cell proliferation and migration thereby interfering with the three key events favouring tumour growth. Future investigations, together with blood–brain barrier crossing evaluation, will address various strategies devoted to ensure efficient systemic delivery of the peptides for future clinical evaluation. Although 30–50% of the drugs are currently targeting G-protein-coupled receptors, the use of pharmacological agents interfering with the TM domain of bitopic receptors may represent a major advance towards the design of new classes of efficient therapeutic agents for cancer treatment (Bennasroune *et al.*, 2004) or other pathological areas such as neurodegenerative disorders (Marchesi, 2005). To our knowledge, pTM-NRP1 is the first drug of this kind that shows a therapeutic potential.

## Materials and methods

### Cell lines

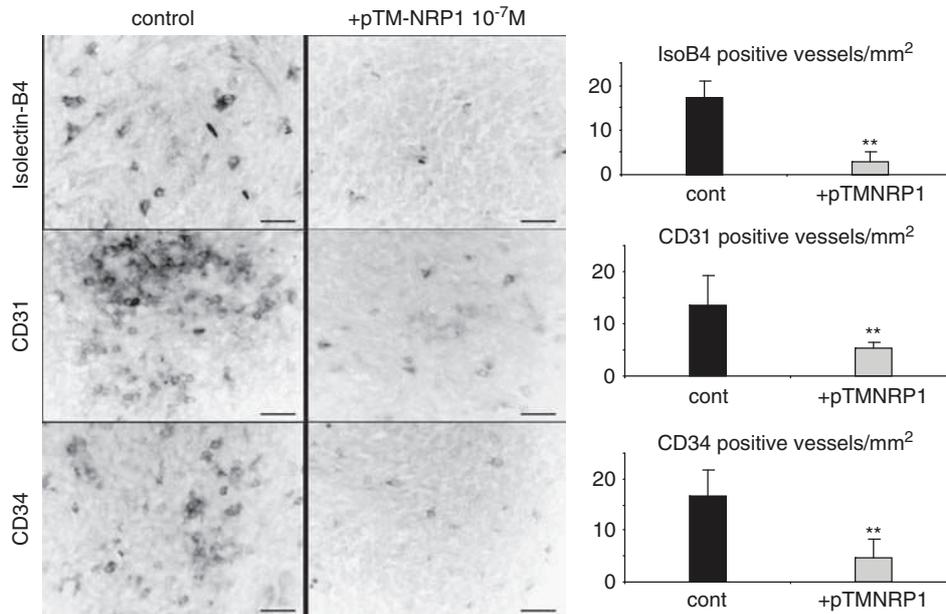
Cells were grown in a 5%  $\text{CO}_2$  atmosphere, at 37 °C. C6 cells (ATCC CCL-107) come from rat glioblastoma. They were grown in modified Eagle's medium (Fisher Scientific, Illkirch, France) with 10% fetal calf serum (SVF; Interchim, Montluçon, France), glutamine 0.5 mM (Fisher Scientific) and antibiotics: 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma). Human glioma cell line U373MG (our collection) was cultured in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum.

### Peptides

Peptides have been synthesized within the Neurosciences IFR37's proteomic facility by Mr B Guérold, by automatic peptide synthesis (Fmoc chemistry; Applied System, Courtaboeuf, France), and have been analysed by mass spectrometry. One peptide is the transmembrane sequence of NRP1: ILITIIAMSALGVLLGAVCGVVLYRKR (TM peptide). In the second one, glycines have been replaced by valines: ILITIIAMSALVLLVAVCVVLYRKR (mutated TM peptide) (Roth *et al.*, 2008). Peptides purity estimated by RP-HPLC (Beckman, Roissy, France) is more than 90%.

### Magnetic resonance imaging

MRI acquisitions were performed with a 4.7 T, 20 cm system. The magnet and gradient coils are from Magnex Scientific



**Figure 8** Anti-angiogenic effect of pTM-NRP1 *in vivo*. Histological analysis of tumours. We used isolectin-B4, CD31 and CD34 to stain blood vessels in the tumour bulk. All three markers allowed us to visualize hot spots composed of several blood vessels. We determined number of blood vessels per mm<sup>2</sup> by counting vessels from all hot spots present on three different slices (randomly chosen) from three different tumours (reflecting the smallest, medium and largest tumours of the two groups). Scale bar = 100  $\mu$ m. \*\* $P < 0.001$ .

Ltd. (Oxon, UK) and the MR spectrometer from SMIS Ltd. (now MR Solutions Ltd., Guildford, UK). We used a fast spin-echo imaging sequence consisting of 15 contiguous coronal slices acquisition with a 3.8 s repetition time. Four echoes were recorded with a 40 ms spin-echo time and a 80 ms effective echo time, the second echo being located at the centre of K space. The slice thickness was 1 mm, and the field of view 40  $\times$  40 mm<sup>2</sup> with a data matrix 256  $\times$  256, leading to a resolution of 156  $\mu$ m. The number of acquisition for each profile was fixed to 2. The resulted acquisition time was approximately 8 min.

#### *In vitro assays (proliferation, migration and angiogenesis)*

C6 or HUVEC cell aggregates were prepared as previously described (Nassarre *et al.*, 2005) to be grown in the 3D matrix (plasma clot) and treated with VEGF165 (100 ng/ml; R&D, Lille, France). For the proliferation and cell death assay, the cells were incubated at a known density in 60 mm dishes (Dutscher, Brumath, France) (100  $\times$  10<sup>3</sup> cells). MTT (Promega, Charbonnière-les-Bains, France) and tube-like formation assay (*in vitro* angiogenesis assay; Chemicon) were performed using manufacturer's instructions. Oligomerization assays were performed as previously described (Roth *et al.*, 2008). RT-PCR were performed at 30 cycles, T<sub>m</sub> = 58 °C using NRP1 sense 5'-ACAGTGGCACAGGTGATGAC-3' and NRP1 anti-sense 5'-TCCAGGGCAGATAGGTTTC-3' primers.

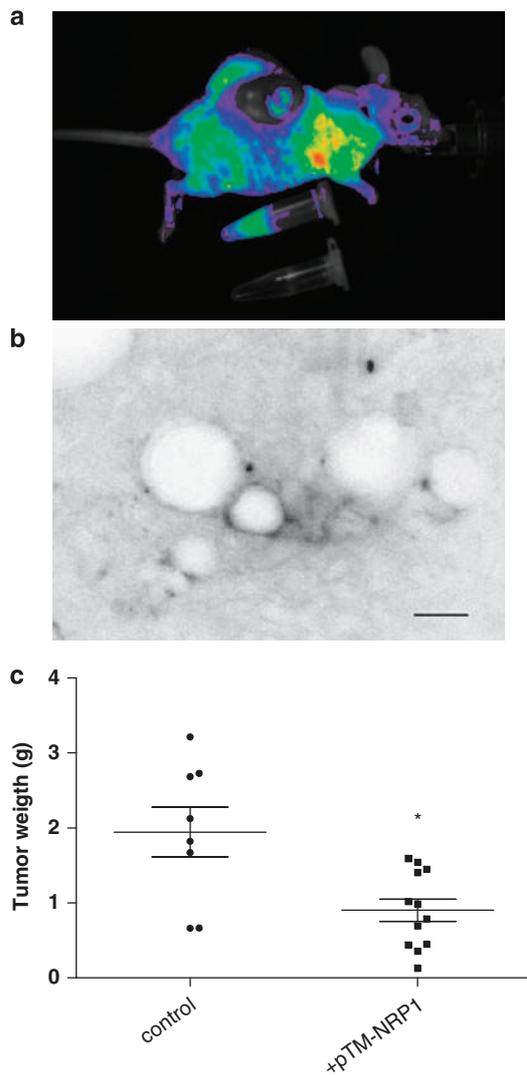
#### *Chick embryo chorioallantoic membrane assay*

The CAM assay was performed using Leghorn embryonated eggs. After 4 days incubation, the embryos were transfer to a Petri dish. The CAMs were grown for additional 4 days before deposition of reservoirs in a region containing one large vessel. Reservoirs were filled with 20  $\mu$ l solution of PBS, pTM-NRP1 (10<sup>-7</sup> M), pTM-NRP1<sup>mut</sup> (10<sup>-7</sup> M), VEGF165 (20  $\mu$ g/ml) or combinations of these factors. After 24h incubation, micro-

photographs were taken for quantification of vessel growth. Camera lucida drawing was systematically performed to allow better counting of new blood vessels and sprouting; the entire analysis being performed in blind conditions.

#### *In vivo assays (orthotopic and heterotopic xenografts)*

We conducted all *in vivo* experiments under the supervision and control of the veterinary in charge of the animal facility of the Centre for Neurochemistry (IFR37, Strasbourg) in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NRC, 1996) and the European Directive 86/609. C6 cells (ATCC CCL-107) were stained before transplantation using PKH26 and according to manufacturer's instructions (Sigma). Cells were incubated with peptides (pTM-NRP1 10<sup>-8</sup> M or pTM-NRP1<sup>mut</sup> 10<sup>-8</sup> M) before injections for at least 2 h on ice in culture medium (composed of modified Eagle's medium with 5000 U/ml penicillin, 5 mg/ml streptomycin, 200 mM L-glutamine and 10% fetal calf serum). Rats (Janvier, France), all males weighing 250–350 g, were anesthetized by IP injection of a mixture of tiletamine-zolazepam (50  $\mu$ l/100 g) (Zoletil 100; Virbac, Carros, France), and xylazine (50  $\mu$ l/100 g) (Rompun 2%; Bayer, Puteaux, France). Cell suspensions were implanted using a stereotaxic set up at the depth of 5 mm, 1 mm anterior to the bregma and 3 mm lateral corresponding to the anterior striatum with a 10  $\mu$ l Hamilton syringe. After injection, the needle was kept in place for 5 min, then slowly removed at 0.5 mm/15 s. The scalp incision was closed with stainless steel wound clips and the animals allowed recovering under a heat lamp before they are returned to their cage. All injections were performed in the left striatum. After a survival period of 8 days, the animals were killed by a lethal IP injection of pentobarbital before transcardiac perfusion with a prerinse of 100 ml PBS followed by 500 ml of 2% formaldehyde. Heterotopic tumours were produced by injecting 10<sup>6</sup> cells in the flank of pathogen-free



**Figure 9** Intra-peritoneal administration of pTM-NRP1 inhibits human glioma growth. (a) Distribution of rhodamine-conjugated pTM-NRP1 15 min after IP injection shown by *in vivo* live imaging. The intensity of staining is indicated with a color code (blue = low to red = high). The two Eppendorf tubes seen on the picture show the test solution (Rhod-pTM-NRP1 in PBS) and a control solution (PBS). Note that the tumour mass seen at the dorsal part of the mouse is stained with the peptide. (b) Histological examination of tumours from animals receiving Rhod-pTM-NRP1. Note that intratumoural blood vessels and adjacent tissue are stained with the peptide. (c) Daily intra-peritoneal (IP) injection of pTM-NRP1 is able to reduce the growth of well-developed tumours (U373MG human cell line) implanted into the flank of nude mice up to 50% (\* $P < 0.05$ ).

BALB/c nu/nu mice (Charles River Laboratories, L'Arbresle, France) maintained in individual cages. For that, the mice, all males or all females, were anesthetized in a Plexiglas box flushed with oxygen containing 3% isoflurane, and then maintained anesthetized by 2% isoflurane inhalation using a facial mask. The cell suspension was taken into a 1 ml syringe and transplanted in the flanks of the mouse subcutaneously (100  $\mu$ l,  $10^6$  cells). Live imaging of fluorescent peptide distribution was performed using the NightOwl bioimager

(Berthold) equipped with dedicated anaesthesia chamber and appropriate filters for fluorescence detection.

#### Histology and immunocytochemistry

The brains were postfixed during 2 h at 4 °C and sagittal sections (70  $\mu$ m) were prepared on a vibratome. One group of sections was mounted in PBS-glycerol (v/v) for microscopic observation, and another one was treated for immunostaining. Ectopic tumours were embedded in PEG before immunoreactions as previously described (Klosen *et al.*, 1993). Sections were first incubated in PBS containing 5% calf normal serum for 15 min at room temperature to block nonspecific binding sites. A second incubation was performed for 1 h at room temperature and then overnight at 4 °C with appropriate primary antibodies (anti-mouse CD34 or anti-mouse CD31; Clinisciences s.a.s, Montrouge, France) or 30 min at room temperature for Isolectin-B4 (FL-1201; Biovalley, Meaux, France) staining. The sections were washed six times during 5 min in PBS, and were then incubated with secondary antibody coupled to Alexa-488 (1:500; Interchim) for 3 h at room temperature. Sections were washed six times during 5 min in PBS and were finally mounted in PBS-glycerol (v/v) before microscopic analysis. In case of IP injections of Rhod-pTM-NRP1, tumours were collected 20 min after injections, fixed and sliced for direct observation of slices using appropriate epifluorescence microscope.

#### Statistics

We performed two independent samples comparison using Student's *t*-test for  $n > 30$  and Mann-Whitney analysis for  $n < 30$  for quantitative data (number of cells, tumour weight, number of vessels, number of branch points). Normal distribution of the values was checked using GraphPad software (Curri, Strasbourg). We performed  $\chi^2$ -analysis for qualitative data (presence or not of chains of cell migration). A minimum of three independent experiments was performed for *in vitro* assays (proliferation, migration and angiogenesis). The number of animals used for *in vivo* analysis takes into account ethical reasons. Sample size calculation was determined by postulating an effect size of  $-20\%$  (d, differences between two means of tumour volume) given an allocation ratio of one (similar-sized population) and using continuity correction (Uitenbroek, 1997). We used power = 0.8 and  $\alpha = 0.05$ . Thus, the data presented are from one experiment for MRI acquisition composed of three controls and three treated rats (Figure 1a), three independent experiments composed of three experimental groups of animals for histological analysis of orthotopic brain tumours (giving a total of 12 control, 12 pTM-NRP1- and 7 pTM-NRP1<sup>mut</sup>-treated rats, Figure 1b); one experiment composed of two groups of 10 mice (giving a total of 19 heterotopic control tumours and 20 heterotopic-treated tumours for U373MG cells, Figure 7; one dead animal at day 6 was excluded from control group). In all experiments, animals were randomized before treatment delivery that was performed in blind conditions. The experiment performed with U373MG cells has been stopped after 10 days treatment by decision of the veterinary in charge of the animal facility due to serious impairment of living conditions of the mice of one of the two groups (retrospectively identified as the control group).

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## Acknowledgements

We thank Dr Sophie Reibel-Foisset and Mr Nicolas Lethenet for excellent assistance with *in vivo* experiments and animal

## References

- Bagci T, Wu JK, Pfannl R, Ilag LL, Jay DG. (2009). Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. *Oncogene* **28**: 3537–3550.
- Bagri A, Tessier-Lavigne M. (2002). Neuropilins as semaphorin receptors: *in vivo* functions in neuronal cell migration and axon guidance. *Adv Exp Med Biol* **515**: 13–31.
- Bargmann CI, Weinberg RA. (1988). Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion. *EMBO J* **7**: 2043–2052.
- Barr MP, Byrne AM, Duffy AM, Condrion CM, Devocelle M, Harriott P *et al*. (2005). A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF(165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells. *Br J Cancer* **92**: 328–333.
- Bedjgueal K, Bienayme H, Dumoulin A, Poigny S, Schmitt P, Tam E. (2006). Discovery of protein-protein binding disruptors using multi-component condensations small molecules. *Bioorg Med Chem Lett* **16**: 3998–4001.
- Bennasroune A, Gardin A, Aunis D, Cremel G, Hubert P. (2004). Tyrosine kinase receptors as attractive targets of cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol* **50**: 23–38.
- Forbes LV, Gale RE, Pizzey A, Pouwels K, Nathwani A, Linch DC. (2002). An activating mutation in the transmembrane domain of the granulocyte colony-stimulating factor receptor in patients with acute myeloid leukemia. *Oncogene* **21**: 5981–5989.
- Gamse JT, Shen YC, Thisse C, Thisse B, Raymond PA, Halpern ME *et al*. (2002). Otx5 regulates genes that show circadian expression in the zebrafish pineal complex. *Nat Genet* **30**: 117–121.
- Garcia-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A. (1998). Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* **36**: 234–248.
- Giordano RJ, Anobom CD, Cardo-Vila M, Kalil J, Valente AP, Pasqualini R *et al*. (2005). Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. *Chem Biol* **12**: 1075–1083.
- Goldbrunner RH, Wagner S, Roosen K, Tonn JC. (2000). Models for assessment of angiogenesis in gliomas. *J Neurooncol* **50**: 53–62.
- Grobben B, De Deyn PP, Slegers H. (2002). Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion. *Cell Tissue Res* **310**: 257–270.
- Guttmann-Raviv N, Kessler O, Shraga-Heled N, Lange T, Herzog Y, Neufeld G. (2006). The neuropilins and their role in tumorigenesis and tumor progression. *Cancer Lett* **231**: 1–11.
- Hong TM, Chen YL, Wu YY, Yuan A, Chao YC, Chung YC *et al*. (2007). Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin Cancer Res* **13**: 4759–4768.
- Hu B, Guo P, Bar-Joseph I, Imanishi Y, Jarzynka MJ, Bogler O *et al*. (2007). Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene* **26**: 5577–5586.
- Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat Rev Neurosci* **8**: 610–622.
- Jain RK, Duda DG, Clark JW, Loeffler JS. (2006). Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. *Nat Clin Pract Oncol* **3**: 24–40.
- Jia H, Bagherzadeh A, Hartzoulakis B, Jarvis A, Lohr M, Shaikh S *et al*. (2006). Characterization of a bicyclic peptide neuropilin-1 (NP-1) antagonist (EG3287) reveals importance of vascular endothelial growth factor exon 8 for NP-1 binding and role of NP-1 in KDR signaling. *J Biol Chem* **281**: 13493–13502.
- Jocic Z, Staton RD. (1993). Reduplication after right middle cerebral artery infarction. *Brain Cogn* **23**: 222–230.
- Kelland LR. (2004). Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. *Eur J Cancer* **40**: 827–836.
- Kienlen-Campard P, Tasiaux B, Van Hees J, Li M, Huysseune S, Sato T *et al*. (2008). Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GxxxG motifs. *J Biol Chem* **283**: 7733–7744.
- Klosen P, Maessen X, van den Bosch de Aguilar P. (1993). PEG embedding for immunocytochemistry: application to the analysis of immunoreactivity loss during histological processing. *J Histochem Cytochem* **41**: 455–463.
- Lemmon MA, Flanagan JM, Treutlein HR, Zhang J, Engelman DM. (1992). Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices. *Biochemistry* **31**: 12719–12725.
- Marchesi VT. (2005). An alternative interpretation of the amyloid Abeta hypothesis with regard to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 9093–9098.
- Meyers GA, Orlow SJ, Munro IR, Przylepa KA, Jabs EW. (1995). Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with *Acanthosis nigricans*. *Nat Genet* **11**: 462–464.
- Nasarre C, Koncina E, Labourdette G, Cremel G, Roussel G, Aunis D *et al*. (2009). Neuropilin-2 acts as a modulator of SEMA3A-dependent glioma cell migration. *Cell Adh Migr* **3**: 383–389.
- Nasarre P, Kusy S, Constantin B, Castellani V, Drabkin HA, Bagnard D *et al*. (2005). Semaphorin SEMA3F has a repulsing activity on breast cancer cells and inhibits E-cadherin-mediated cell adhesion. *Neoplasia* **7**: 180–189.
- Orian-Rousseau V, Ponta H. (2008). Adhesion proteins meet receptors: a common theme? *Adv Cancer Res* **101**: 63–92.
- Roth L, Nasarre C, Dirrig-Grosch S, Aunis D, Cremel G, Hubert P *et al*. (2008). Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Mol Biol Cell* **19**: 646–654.
- Senes A, Engel DE, DeGrado WF. (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr Opin Struct Biol* **14**: 465–479.
- Slimani H, Guenin E, Briane D, Coudert R, Charnaux N, Starzec A *et al*. (2006). Lipopeptide-based liposomes for DNA delivery into cells expressing neuropilin-1. *J Drug Target* **14**: 694–706.
- Starzec A, Vassy R, Martin A, Lecouvey M, Di Benedetto M, Crepin M *et al*. (2006). Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci* **79**: 2370–2381.
- Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H *et al*. (2004). Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* **114**: 330–338.
- Tessitore A, Sinisi AA, Pasquali D, Cardone M, Vitale D, Bellastella A *et al*. (1999). A novel case of multiple endocrine neoplasia type 2A associated with two de novo mutations of the RET protooncogene. *J Clin Endocrinol Metab* **84**: 3522–3527.
- Tirand L, Frochot C, Vanderesse R, Thomas N, Trinquet E, Pinel S *et al*. (2006). A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* **111**: 153–164.
- Uitenbroek DG. (1997). *Binomial SISA*. <http://www.quantitativeskills.com/sisa/distributions/binomial.htm>.

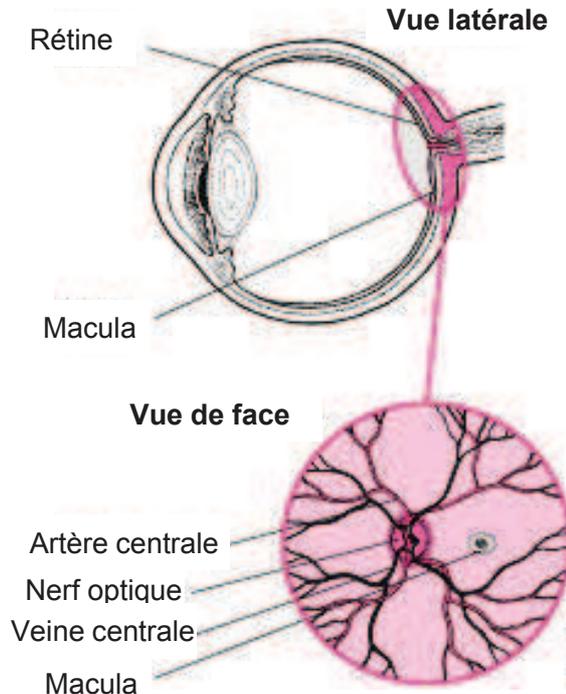
- Uzzan B, Nicolas P, Cucherat M, Perret GY. (2004). Microvessel density as a prognostic factor in women with breast cancer: a systematic review of the literature and meta-analysis. *Cancer Res* **64**: 2941–2955.
- Wang AC, Dai X, Luu B, Conrad DJ. (2001). Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma regulates airway epithelial cell activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**: 688–693.
- Webster MK, Donoghue DJ. (1996). Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J* **15**: 520–527.
- Weiner DB, Liu J, Cohen JA, Williams WV, Greene MI. (1989). A point mutation in the neu oncogene mimics ligand induction of receptor aggregation. *Nature* **339**: 230–231.
- Williams G, Eickholt BJ, Maison P, Prinjha R, Walsh FS, Doherty P. (2005). A complementary peptide approach applied to the design of novel semaphorin/neuropilin antagonists. *J Neurochem* **92**: 1180–1190.
- Xu L, Duda DG, di Tomaso E, Ancukiewicz M, Chung DC, Lauwers GY. *et al.* (2009). Direct evidence that bevacizumab, an anti-VEGF antibody, up-regulates SDF1alpha, CXCR4, CXCL6, and neuropilin 1 in tumors from patients with rectal cancer. *Cancer Res* **69**: 7905–7910.

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

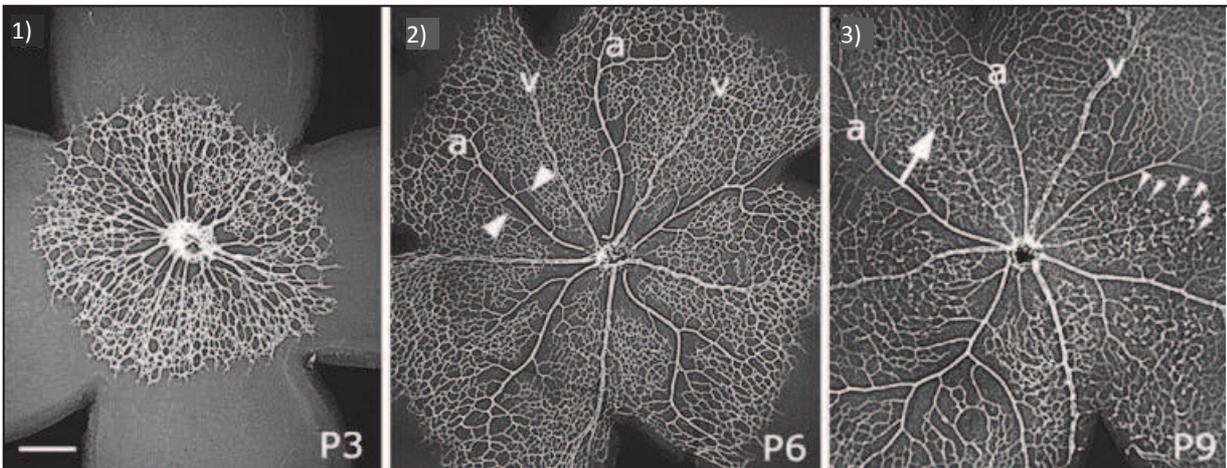
## Partie II :

Poursuite de la validation préclinique du peptide MTP-NRP1 et détermination du motif minimal nécessaire pour induire les effets inhibiteurs

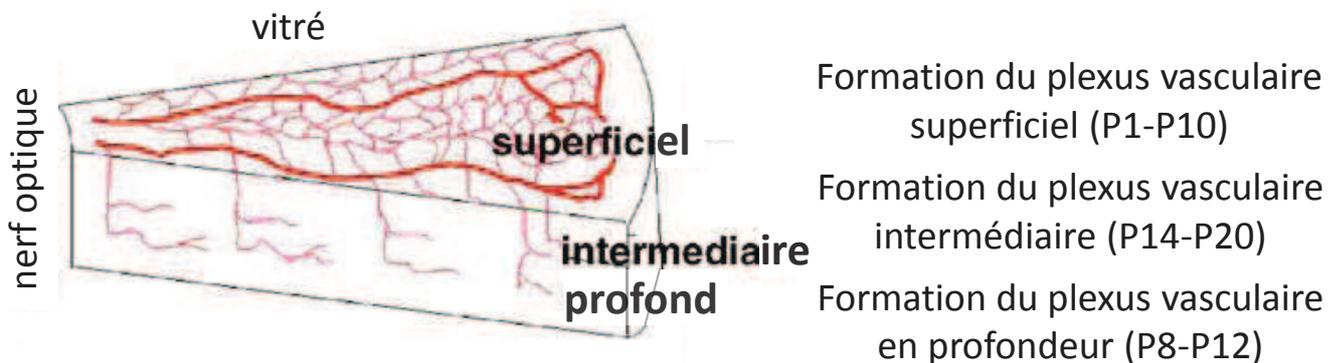
A.



B.



C.



**Figure 30: L'angiogenèse de la rétine de souris.** A. Schémas en vue latérale et en vue de face représentatifs de la rétine de souris. B. Développement du réseau vasculaire superficiel marqué avec de l'isolectine B4 FITC, le plexus en formation est relativement uniforme 3 jours après la naissance (P3), 1). Il s'étend et se remodele à P6, début de la différenciation artères (a) veines (v), 2). Puis à P9 le réseau vasculaire devient un vrai réseau avec une claire distinction entre artères et veines, 3). d'après Fruttiger, 2007. C. Schéma représentant l'épaisseur de la rétine et la formation des différents plexus, d'après Dorelle et Friedlander, 2006.



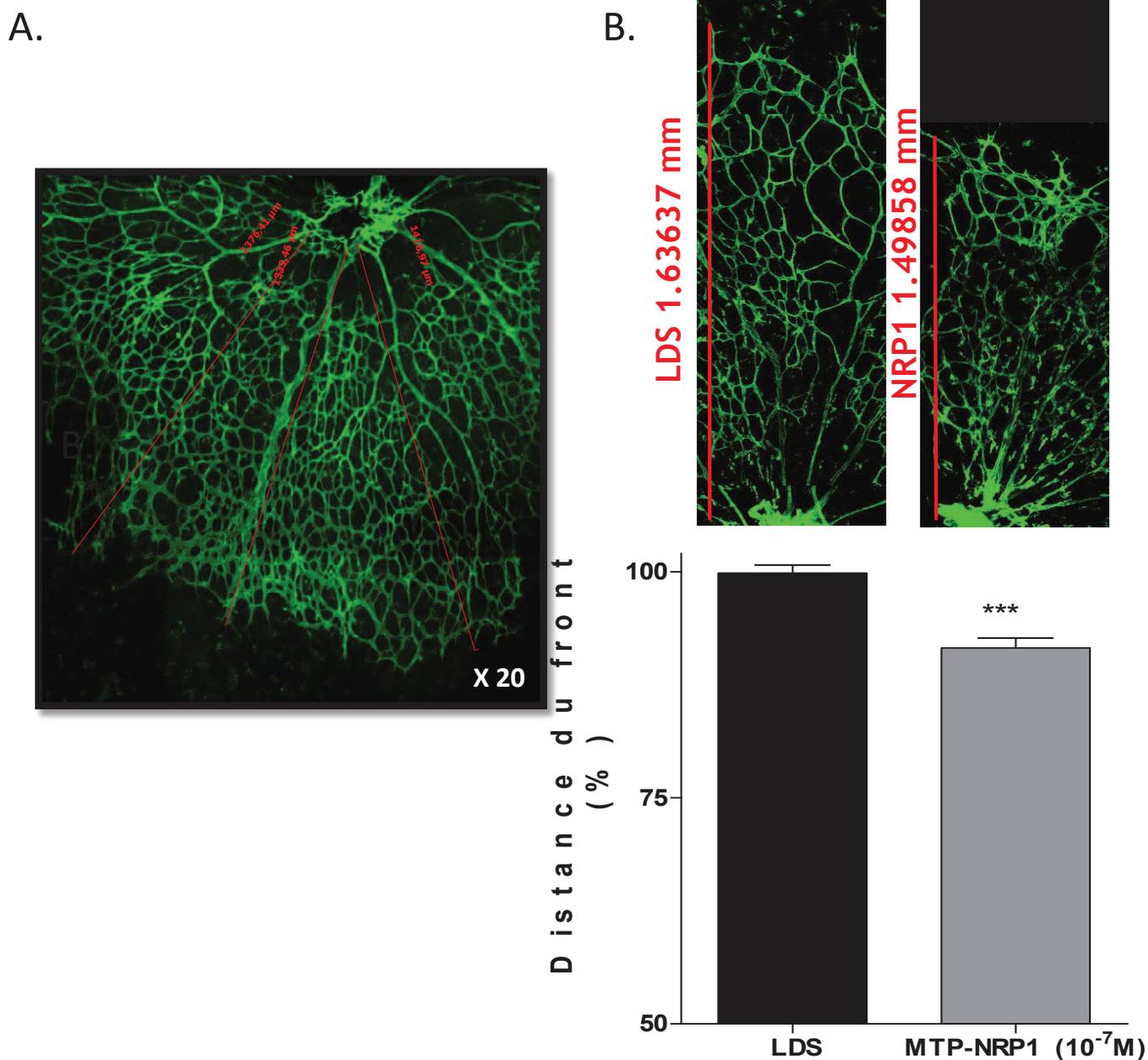
## II. Poursuite de la validation préclinique du peptide MTP-NRP1 et détermination du motif minimal nécessaire pour induire les effets inhibiteurs

### 1. Confirmation de l'effet anti-angiogénique du peptide MTP-NRP1

Les résultats présentés dans la publication mettent donc en avant le potentiel thérapeutique du peptide MTP-NRP1 pour le traitement du gliome, particulièrement en raison de son effet anti-angiogénique validé dans deux essais et retrouvé à l'échelle histologique dans les tumeurs traitées montrant un effondrement des marqueurs de vaisseaux CD31, CD34 et isolectin-B4. Pour valider définitivement cet effet anti-angiogénique, j'ai décidé de tester le peptide dans le modèle *in vivo* de l'angiogenèse de la rétine de souris. Ce modèle est en effet souvent présenté comme un modèle de référence en raison de la très bonne reproductibilité des phénomènes vasculaires mesurés. Afin d'utiliser ce modèle dans les meilleurs délais, j'ai rejoint le laboratoire du Dr Anne Eichmann au Collège de France pour apprendre les gestes techniques avec les meilleurs spécialistes de ce modèle. Cette formation m'a permis de mettre rapidement en place au laboratoire ce nouveau modèle.

L'angiogenèse de la rétine se déroule en trois phases après la naissance. (**Figure 30**). La première est l'émergence des vaisseaux sanguins en développement au niveau du nerf optique, au centre de la rétine. Ces vaisseaux continuent alors leur développement en parcourant la surface de la rétine pour y former un plexus vasculaire superficiel (entre P1 et P10). La deuxième phase est l'élaboration d'un autre plexus vasculaire mais cette fois dans la profondeur même du tissu de la rétine (entre P8 et P12). Enfin, la troisième et dernière phase est l'extension et la création à partir des vaisseaux préexistants d'un plexus vasculaire intermédiaire dans la partie médiane de l'épaisseur de la rétine (entre P14 et P20) pour permettre une perfusion optimale du tissu rétinien.

Nous avons choisi de nous intéresser à la première phase de cette angiogenèse qui permet d'avoir une vision du réseau vasculaire en développement sur un seul plan et non dans la profondeur du tissu. Il est ainsi plus aisé de quantifier l'efficacité d'une drogue anti-angiogénique pendant cette fenêtre de temps (**Figure 31**). Dans le protocole retenu, les souriceaux sont traités à partir de P2 et reçoivent pendant 3 jours (P2-P3-P4)



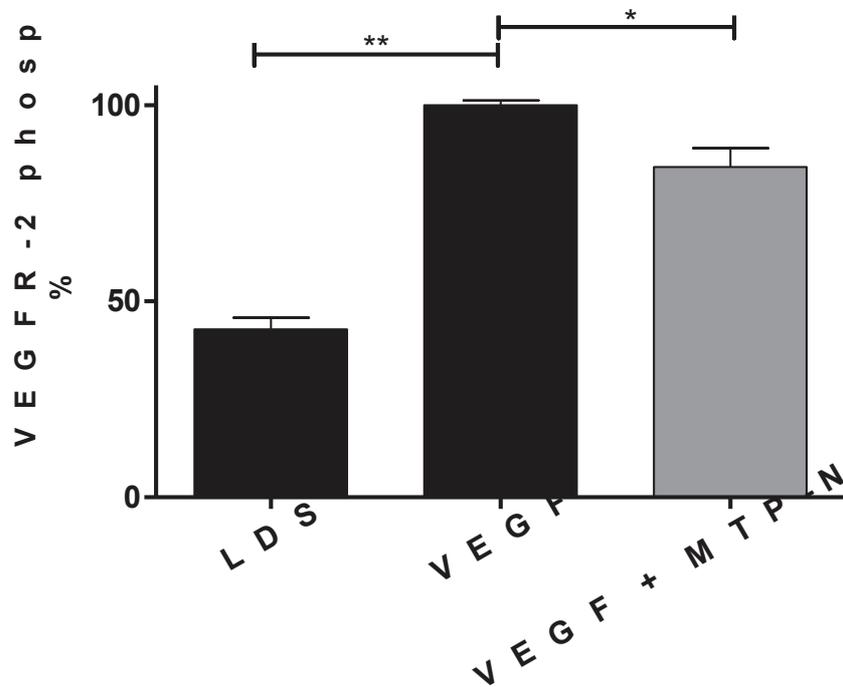
**Figure 32: Impact du MTP-NRP1 dans le test d'angiogenèse de la rétine de souris.**

**A.** Illustration des distances (lignes rouges) mesurées entre le nerf optique et le front de migration du réseau vasculaire marqué avec l'IB4 FITC (vert). **B.** Graphique représentant les distances du front de migration normalisé en % dans les différentes conditions, contrôle (LDS 72  $\mu$ M) et traitée avec MTP-NRP1 à  $10^{-7}$ M. 20 rétines provenant de 3 portées indépendantes ont été quantifiées par condition. L'erreur type est représentée. (Mann et Whitney test; \*\*\* $P < 0.0001$ ).

une injection sous-cutanée de 100 µl d'une solution de PBS contenant soit le véhicule du peptide (le LDS, Lithium Dodecyl Sulfate à 72 µM) pour le groupe contrôle, soit le peptide MTP-NRP1 (à la concentration de  $10^{-7}$  M), pour le groupe traité. Au cinquième jour postnatal, les yeux sont prélevés et fixés au formaldéhyde 4 % pendant 1 heure sur la glace. Puis ils sont disséqués sous la loupe binoculaire afin de prélever les rétines. Les rétines sont alors marquées avec de l'isolectine B4 couplée au FITC (isothiocyanate de fluorescéine) au 1/100<sup>ième</sup>. L'isolectine B4 est une lectine qui reconnaît spécifiquement les carbohydrates de la surface des cellules endothéliales. L'incubation peut se faire à température ambiante pendant 1h 30 ou préférentiellement toute la nuit à 4°C. Les rétines sont finalement coupées en croix pour pouvoir les monter à plat entre lame et lamelle dans un milieu de montage liquide (Vectashield Vector labs). Des acquisitions mosaïques sont réalisées au microscope Zeiss Imager Z2 équipé d'une caméra Zeiss AxioCam noir et blanc et des filtres appropriés (Ex : 485 nm, Em : 520 nm). L'acquisition d'une mosaïque d'images permet la reconstruction de la surface entière de la rétine pour une observation globale du réseau vasculaire.

Pour confirmer le potentiel anti-angiogénique du peptide MTP-NRP1, j'ai répété ce test d'angiogenèse sur 3 portées indépendantes ayant conduit à l'analyse de 22 rétines pour la condition contrôle et 21 rétines pour le groupe recevant MTP-NRP1. Sur chaque rétine, un ensemble de 6 à 8 mesures de la distance entre le nerf optique et le front de migration vasculaire permet d'obtenir une valeur quantitative robuste de l'angiogenèse (**Figure 32A**). Les distances sont normalisées par rapport à la moyenne des contrôles de chaque portée, considérée comme 100 %, afin de mettre en commun les résultats obtenus pour les différentes portées (cette normalisation permet de s'affranchir des différences d'avancement du développement entre les portées). Les résultats montrent une diminution significative de - 8,42 % ( $p < 0.0001$ ) de la distance du front de migration vasculaire dans le groupe traité avec le peptide MTP-NRP1 par rapport à la condition contrôle (**Figure 32B**). Cette réduction pourrait sembler modeste mais dans ce même modèle, un anticorps anti-VEGF (Roche) produit une inhibition de 28 % à la concentration de 40 mg/kg (Benedito et al., 2012), soit 25 000 fois plus concentré que le peptide MTP-NRP1. Ainsi, ce modèle de la vascularisation rétinienne permet de renforcer l'intérêt thérapeutique du peptide MTP-NRP1 en identifiant un effet anti-angiogénique d'amplitude similaire à celui décrit pour des composés anti-angiogéniques déjà utilisés en clinique.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction (partie II.2.2.), le récepteur NRP1 interagit avec le VEGFR-2 par l'intermédiaire de son domaine extracellulaire, pour faciliter l'activation du VEGFR-2 en présence de VEGF. Cette activation du VEGFR-2



**Figure 33: Impact du MTP-NRP1 sur la phosphorylation du VEGFR-2.** La phosphorylation du VEGFR-2 (Tyr1175) est mesurée par la technique sandwich ELISA sur des cellules HUVEC traitées avec du LDS à 72  $\mu$ M pendant 1h, soit du VEGF à 100 ng/ml pendant 10 min soit d'abord avec le MTP-NRP1 à  $10^{-7}$ M pendant 1h puis du VEGF à 100 ng/ml pendant 10 min. L'erreur type est représentée. (Mann et Whitney test; \*\* $P < 0.001$  ; \* $P < 0.05$ ).

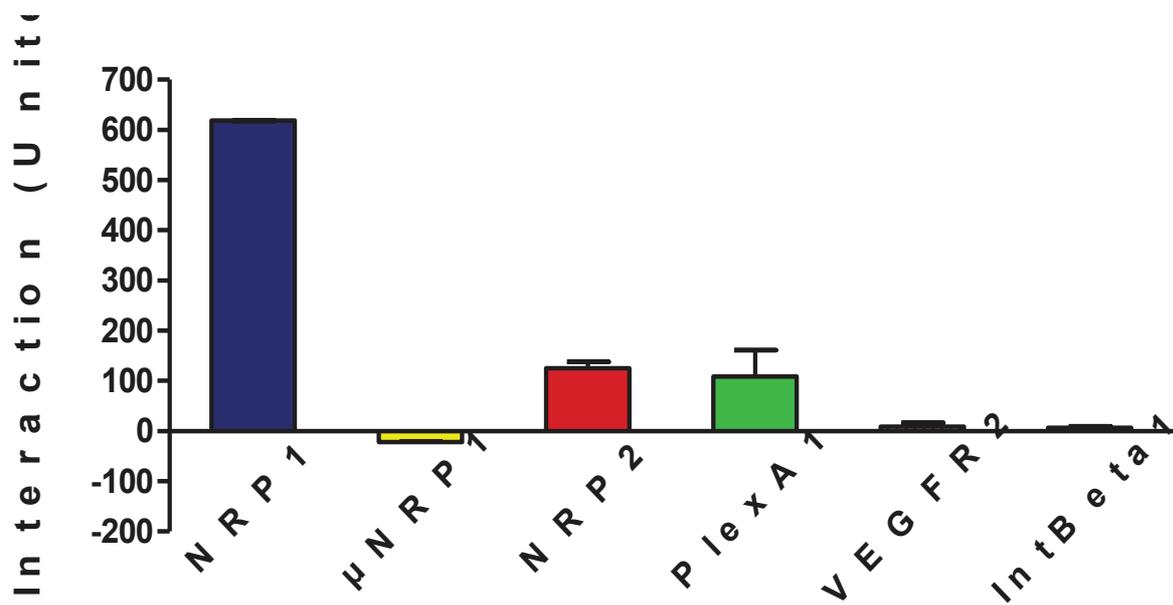
m'a donné la possibilité de vérifier les effets anti-angiogéniques du peptide MTP-NRP1 à un niveau biochimique. Ainsi, j'ai recherché l'activité du VEGFR-2 dans des cellules endothéliales humaines (les HUVECs) en mesurant la phosphorylation de la Tyr1175 impliquée dans la migration et la prolifération endothéliale (Wang et al., 2008) grâce à un système de sandwich ELISA. Les valeurs de phosphorylation présentées dans la **Figure 33** sont normalisées par rapport à la condition VEGF (considérée comme 100 % dans chaque expérience) et sont exprimées en % par rapport à cette condition. Les cellules sont cultivées dans un milieu sans sérum pendant une nuit et traitées avec le LDS (72  $\mu$ M) pendant 1 heure et malgré tout, nous pouvons observer une faible phosphorylation du récepteur qui correspond au niveau basal d'activation. Lorsque les cellules sont stimulées avec du VEGF-A à la concentration de 100 ng/ml pendant 10 minutes la phosphorylation du VEGFR-2 augmente de 57.21 % ( $p < 0,001$ ) par rapport à la condition contrôle. Les cellules prétraitées 1 heure avec le MTP-NRP1 à  $10^{-7}$  M puis stimulées avec le VEGF à 100 ng/ml pendant 10 minutes montrent une diminution significative de 15,82 % ( $p < 0,05$ ) de la phosphorylation du VEGFR-2 par rapport à la condition du VEGF seul.

Là encore, même si cette diminution semble faible, la comparaison avec l'anticorps anti-NRP1 développé par Genentech montre un effet similaire du peptide puisque l'anticorps induit une diminution significative de la phosphorylation du VEGFR-2 de 24 % à 10  $\mu$ g/ml (Pan et al., 2007).

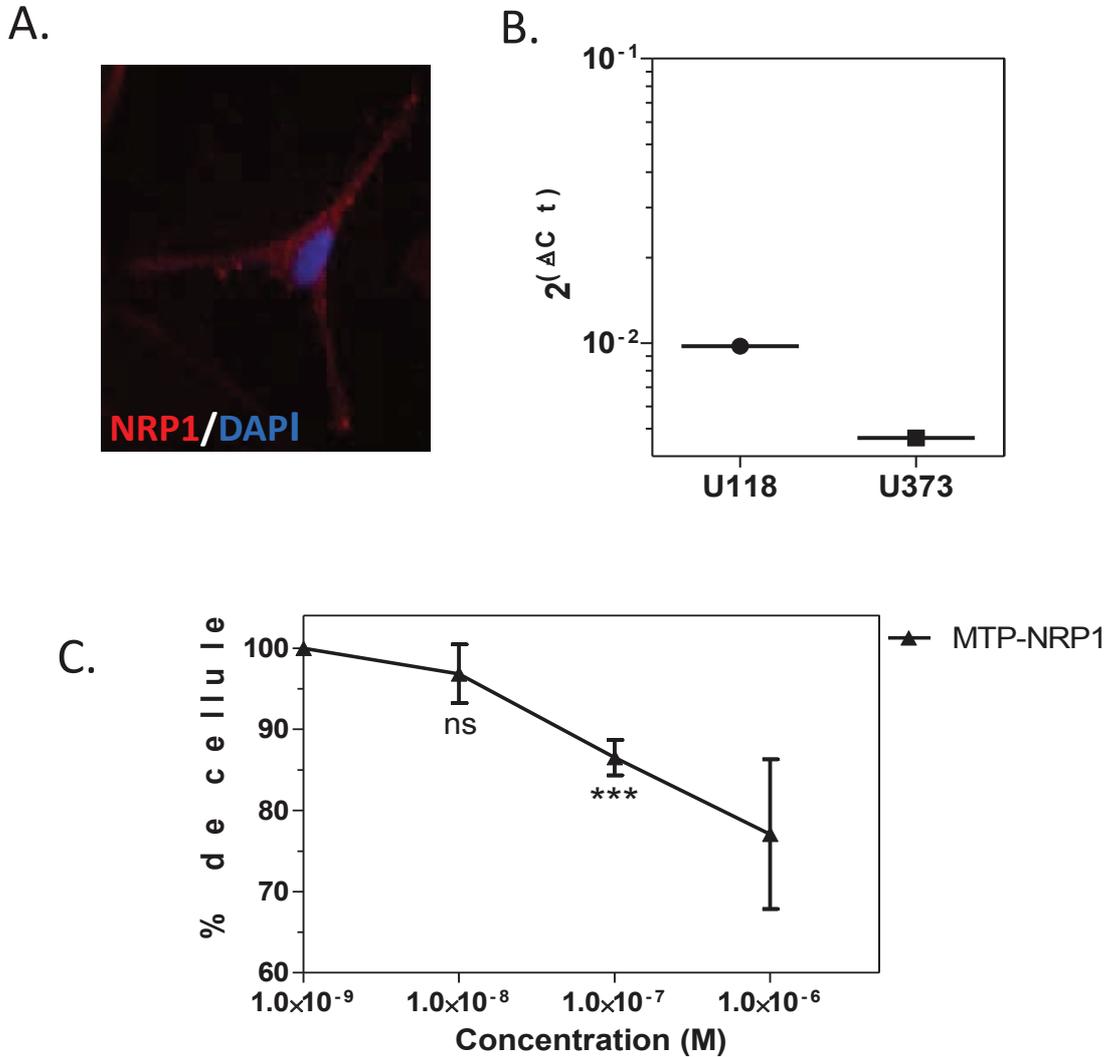
Ainsi, cette partie du travail montre que l'effet anti-angiogénique de NRP1 passe par une diminution de la phosphorylation du VEGFR-2 en réponse au VEGF.

## 2. Analyse de la capacité de MTP-NRP1 à interférer avec les plateformes de signalisation

Le MTP-NRP1 a déjà montré qu'il avait une spécificité d'interaction dans une expérience de FRET *in tubulo* puisqu'il ne dimérisait qu'avec lui-même et pas avec le domaine transmembranaire de la Glycophorine A, possédant elle aussi un motif GxxxG, ni avec la version mutée du domaine transmembranaire de NRP1 où nous avons remplacé les glycines par des valines du motif GxxxGxxxG (Roth et al., 2008). Mais quand est-il pour les autres partenaires potentiels de NRP1 ? Pour répondre à cette question, une expérience de Biacore a été réalisée. Nous avons fixé sur la puce le peptide MTP-NRP1 et les différents domaines transmembranaires correspondant aux



**Figure 34: Mesure en Biacore de l'interaction de MTP-NRP1 avec les domaines transmembranaires d'autres partenaires.** La mesure des interactions est donnée en unité de résonance RU, NRP1: domaine transmembranaire de NRP1,  $\mu$ NRP1: domaine transmembranaire muté de NRP1, NRP2: domaine transmembranaire de NRP2, PlexA1: domaine transmembranaire de PlexA1, VEGFR-2: domaine transmembranaire de VEGFR-2, IntBeta1: domaine transmembranaire de l'intégrine  $\beta$ 1.



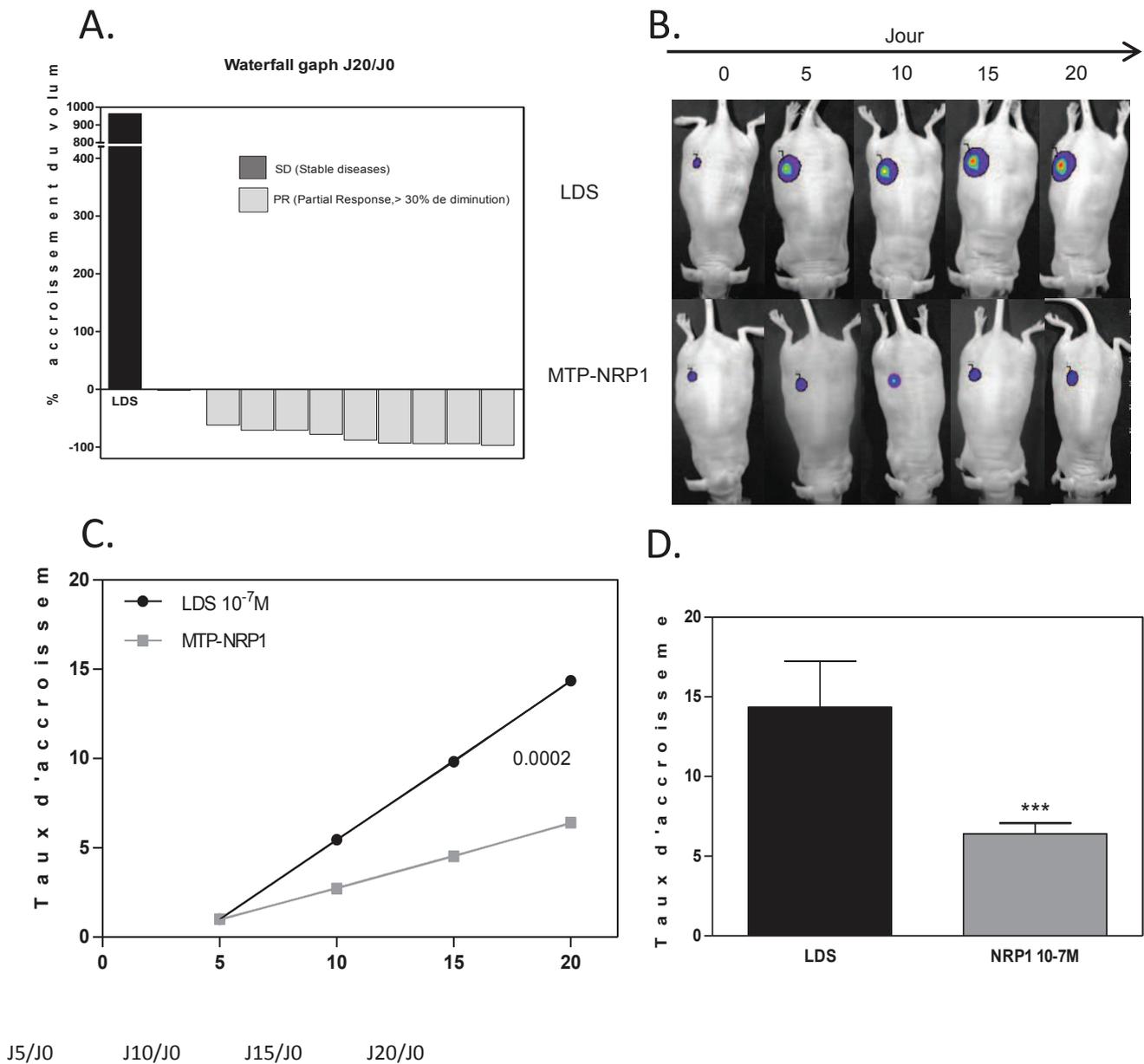
**Figure 35: Validation de l'expression de NRP1 sur les cellules U118 MG et de l'impact de MTP-NRP1 sur leur prolifération. A.** Immunomarquage de NRP1 (en rouge) sur une cellule U118 MG, le marquage du noyau au DAPI est en bleu. **B.** Comparaison de la quantité d'ARN messager de NRP1 exprimé en  $2^{(-\Delta Ct)}$  entre les cellules U118 MG et U373 MG. **C.** Test de prolifération MTT; le pourcentage donné est calculé par rapport à la quantité de cellules dans la condition LDS équivalente. (Mann et Whitney test; \*\*\*P<0,001)

autres récepteurs sont passés dans le système pour mesurer leur capacité d'interaction. Nous pouvons observer une très forte homodimérisation NRP1-NRP1 (**Figure 34**). Cette interaction est complètement abolie lorsque l'on présente la version mutée de NRP1 à la séquence native de NRP1. Nous pouvons noter une interaction d'environ 20 % avec le domaine transmembranaire de NRP2 et d'environ 17,6 % avec la séquence du domaine transmembranaire de PlexA1. Par contre, aucune interaction n'est observée avec les domaines transmembranaires du VEGFR-2 et de l'intégrine  $\beta$ 1. Ces résultats montrent une certaine spécificité d'interaction du MTP-NRP1 puisqu'il interagit avec ses partenaires privilégiés NRP2 et PlexA1 mais pas avec le VEGFR-2 et l'intégrine  $\beta$ 1.

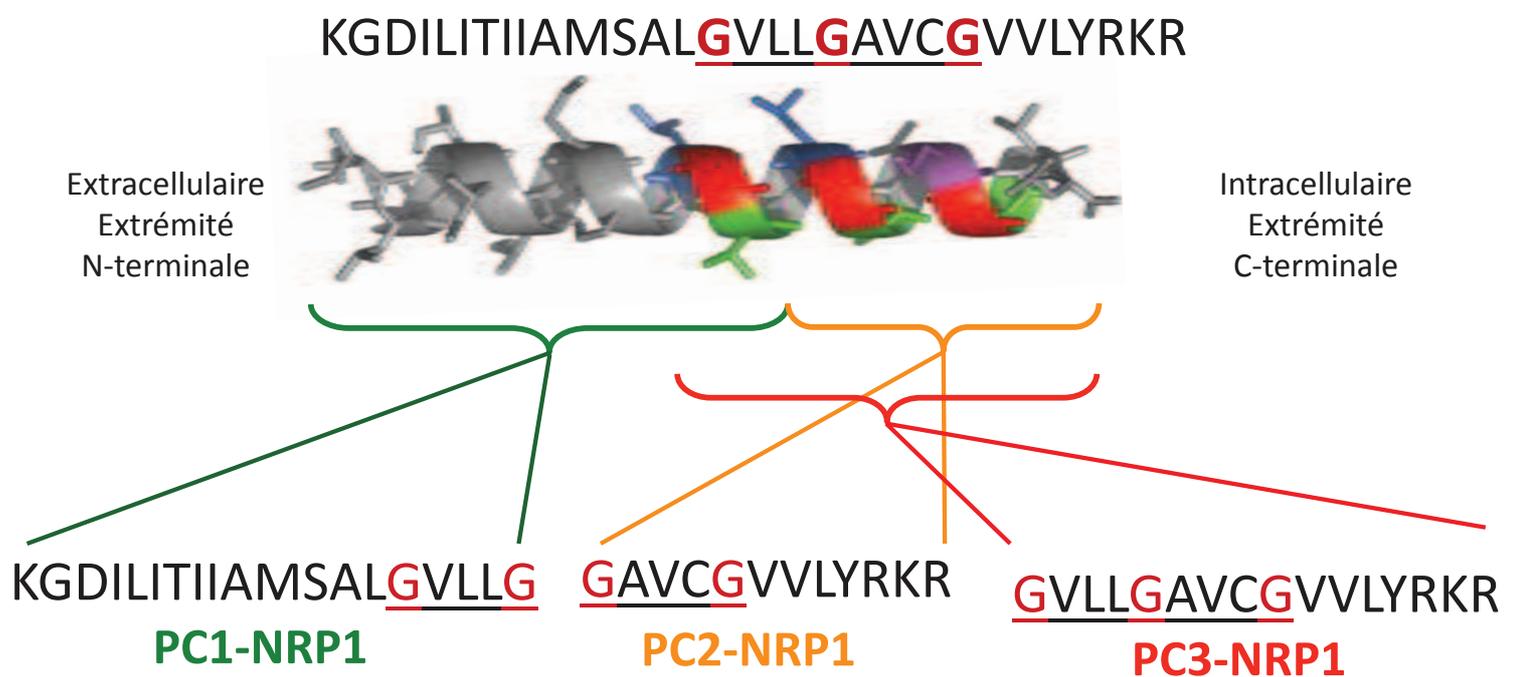
### 3. Validation des effets anti-tumoraux de MTP-NRP1 sur une seconde lignée de glioblastome humain.

MTP-NRP1 est capable d'inhiber la prolifération, la migration et la croissance tumorale *in vivo* d'une lignée de glioblastome de rat, la lignée C6 et d'une lignée de glioblastome humain, la lignée U373MG (Nasarre et al., 2010). Dans le cadre de la validation préclinique du peptide, il apparaissait nécessaire de vérifier cet effet anti-tumoral sur une deuxième lignée de gliome. Le choix s'est porté sur la lignée U118MG exprimant fortement NRP1. En effet, nous avons vérifié l'expression de NRP1 par immunocytochimie et RT-QPCR (**Figure 35A et 35B**) et il apparaît que l'expression de NRP1 soit presque deux fois supérieure dans les U118MG par rapport aux U373MG. *In vitro*, un test MTT montre que la prolifération des cellules U118MG est significativement réduite à partir d'une concentration de peptide de  $10^{-7}$  M ( $p < 0,0001$ ) pour atteindre un maximum de -22,92 % à la concentration de  $10^{-6}$  M (**Figure 35C**).

Pour la validation *in vivo*, j'ai utilisé un modèle de greffes hétérotopiques sous-cutanées des cellules U118MG-Luc. Ces cellules sont modifiées par transfection pour exprimer le gène de la luciférase permettant de produire de la lumière en présence de luciférine. Ce clone particulier permet le suivi de la croissance tumorale par imagerie de bioluminescence sur l'animal entier. Le protocole retenu ici prévoyait un traitement des souris tous les jours pendant 20 jours à partir du jour où les tumeurs atteignaient un volume de  $100 \text{ mm}^3$ . Les traitements sont effectués par injections intrapéritonéales d'une solution de 100  $\mu$ l de PBS contenant soit le véhicule (le LDS à 72  $\mu$ M), soit le peptide MTP-NRP1 ( $10^{-7}$  M). Les résultats présentés dans la **Figure 36A** montrent un ralentissement de la croissance tumorale dans le groupe traité. La représentation selon le mode de graphe en cascade (illustrant la variation d'accroissement du volume tumoral



**Figure 36: Impact du MTP-NRP1 sur la croissance tumorale d'un modèle de greffes hétérotopiques sous-cutanées de cellules U118 MG.** **A.** Graphique en cascade représentant la variation (%) de l'accroissement du volume tumoral pour chaque souris du groupe traité MTP-NRP1 par rapport à la moyenne de l'accroissement du groupe contrôle. **B.** Images de bioluminescence représentatives de l'évolution de la croissance tumorale dans les deux groupes, acquisition tous les 5 jours. **C.** Graphique représentant le taux d'accroissement cumulé des deux groupes étudiés entre J0 et J5, entre J0 et J10, entre J0 et J15 et entre J0 et J20. **D.** Représentation du taux d'accroissement cumulé au temps final entre J0 et J20, n=10 dans chaque groupe. (Mann et Whitney test \*\*\*P<0,0001)



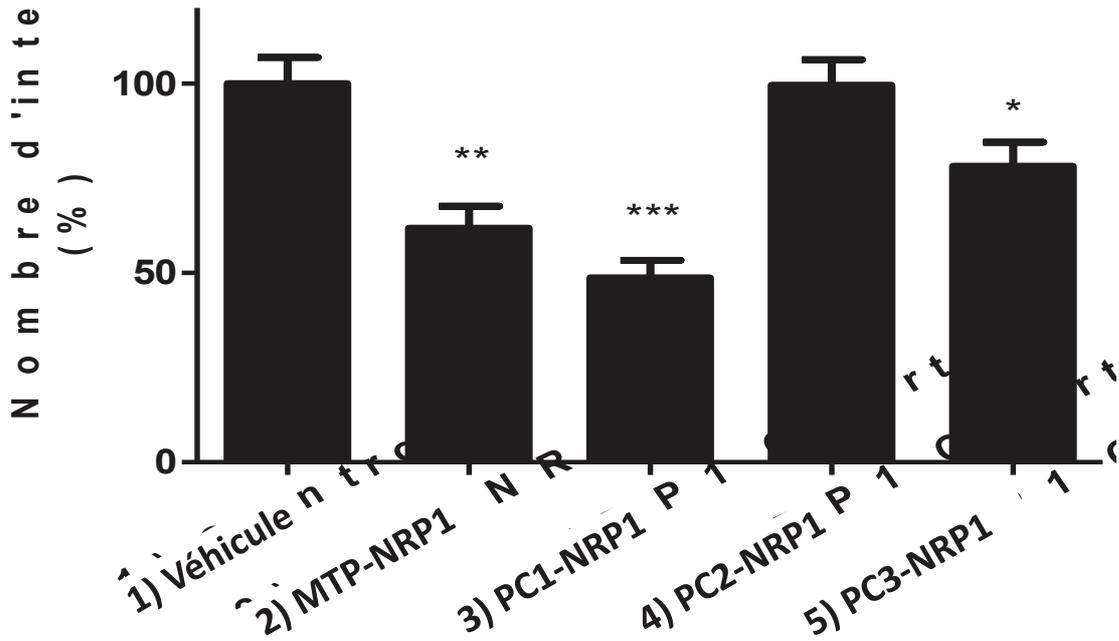
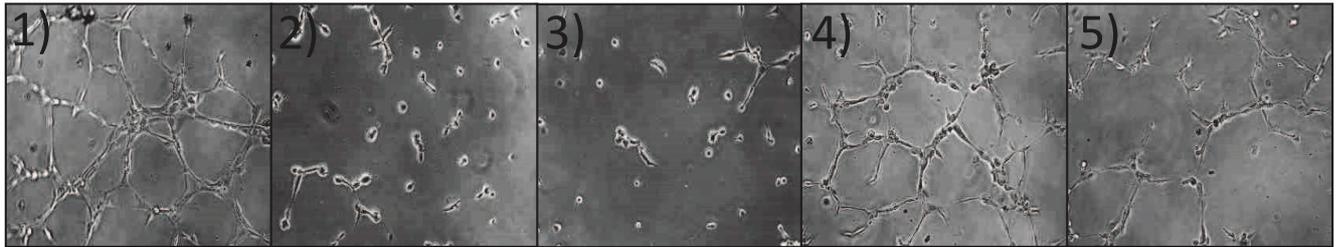
**Figure 37: Séquences des peptides courts comparés à la séquence du MTP-NRP1.**  
 Peptide court 1 : PC1-NRP1, peptide court 2 : PC2-NRP1, peptide court 3 : PC3-NRP1

entre le 14<sup>ème</sup> et le 21<sup>ème</sup> jour de traitement pour chaque souris du groupe traité par rapport à la moyenne de l'accroissement tumoral du groupe contrôle), 10 % des animaux ne montrent pas d'évolution (catégorie Stable Disease, SD, selon les critères RECIST) et 90 % en réponse partielle (catégorie Partial Response PR, selon les critères RECIST). Nous pouvons voir que le taux d'accroissement cumulé au court du temps dans le groupe traité MTP-NRP1 diffère de celui du groupe contrôle, les pentes des deux droites sont significativement différentes ( $p < 0,0002$ ) (**Figure 36C**). De plus, si nous regardons le taux d'accroissement cumulé au temps final (J20/J0), nous pouvons observer une différence significative ( $p < 0,05$ ). Il diminue de 14,366 dans le groupe contrôle (n=10) à 6,404 dans le groupe traité avec MTP-NRP1 (n=10) (**Figure 36D**). Ces nouveaux résultats viennent conforter l'efficacité du MTP-NRP1 aussi bien sur la prolifération cellulaire tumorale *in vitro* que sur la croissance tumorale *in vivo*.

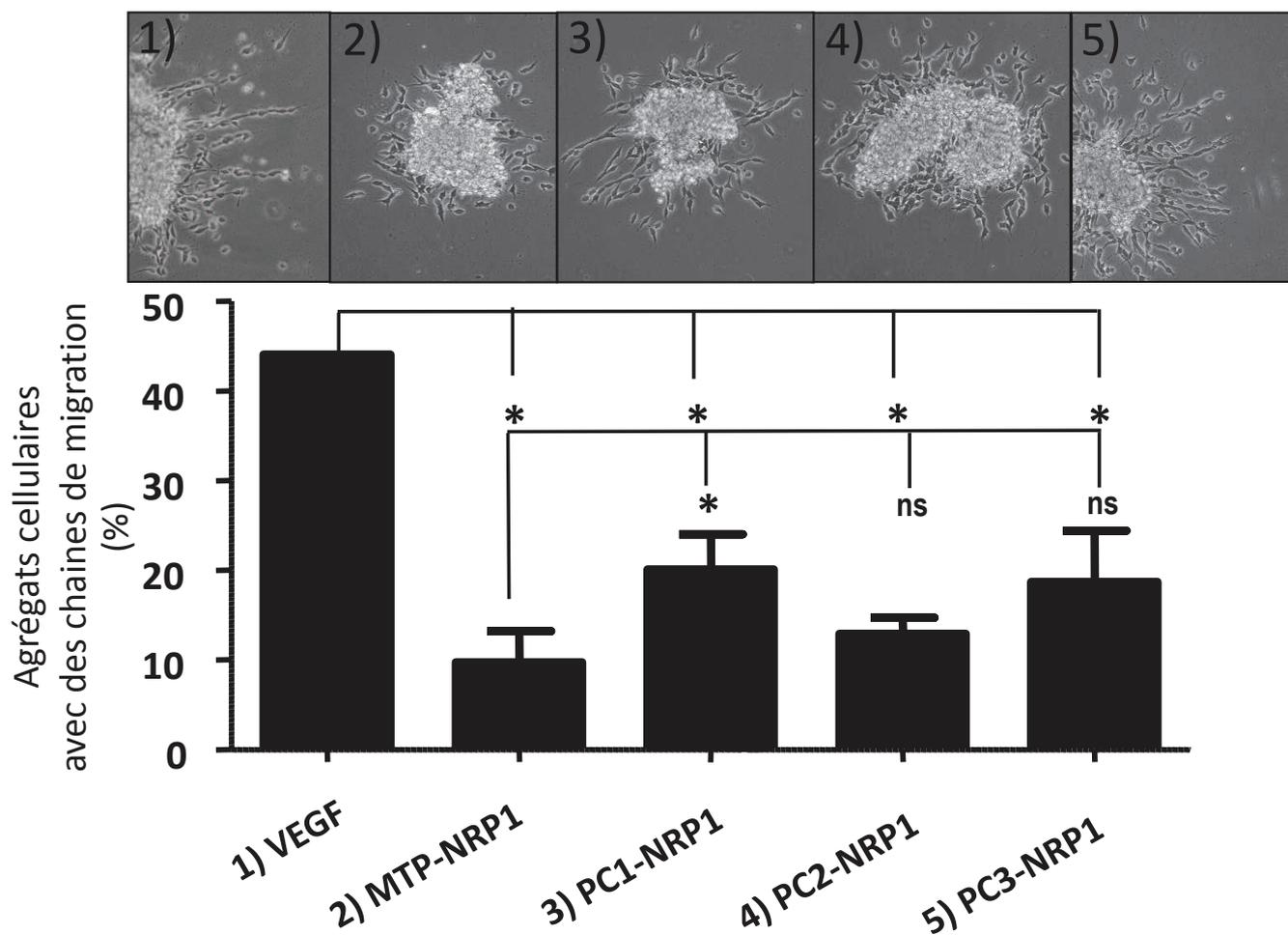
#### 4. Identification du motif minimal responsable de l'effet inhibiteur du peptide

L'une des étapes de la validation préclinique d'un composé thérapeutique concerne l'identification de la forme optimale du produit. Dans le cas d'un peptide, il s'agit naturellement de la longueur minimale de peptide conservant l'effet attendu. Au-delà d'apporter des informations intéressantes sur le mécanisme d'action (site de blocage, importance relative des acides aminés du segment transmembranaire), cette étape pourrait faciliter la production industrielle du composé pour une utilisation en clinique. Ainsi, nous avons décidé de produire un ensemble de trois peptides courts dont les séquences recouvrent différentes parties du domaine transmembranaire de NRP1 (**Figure 37**). Le premier peptide court (PC1-NRP1) recouvre la partie N-terminale du domaine transmembranaire et contient le premier motif GxxxG. Le deuxième peptide court (PC2-NRP1) recouvre la partie C-terminale du domaine transmembranaire avec le deuxième motif GxxxG alors que le troisième peptide court (PC3-NRP1) reprend la partie C-terminale du domaine transmembranaire mais avec les deux motifs GxxxG.

Ces trois peptides ont fait l'objet d'une série de tests *in vitro* afin de rechercher leur activité biologique.



**Figure 38: Test d'angiogenèse in vitro avec des cellules HUVEC sur une matrice de matrigel.** Dans les différentes conditions le nombre d'intersections est normalisé en % par rapport au contrôle. Mann et Whitney test; \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,001$ ; \*\*\* $P < 0,0001$  )



**Figure 39: Test de migration sur des cellules U373 MG.**

Les micro-agrégats de U373 MG se développent dans une matrice 3D de plasma coagulé. Le pourcentage indique le nombre d'agrégats positifs présentant des chaînes de migration. Dans toutes les conditions, les agrégats sont stimulés avec du VEGF à 100 ng/ml. (test khi-deux \*P<0,05, ns: non significatif)

#### 4.1. Mesure des effets anti-angiogéniques : test de culture des cellules HUVECs sur matrigel.

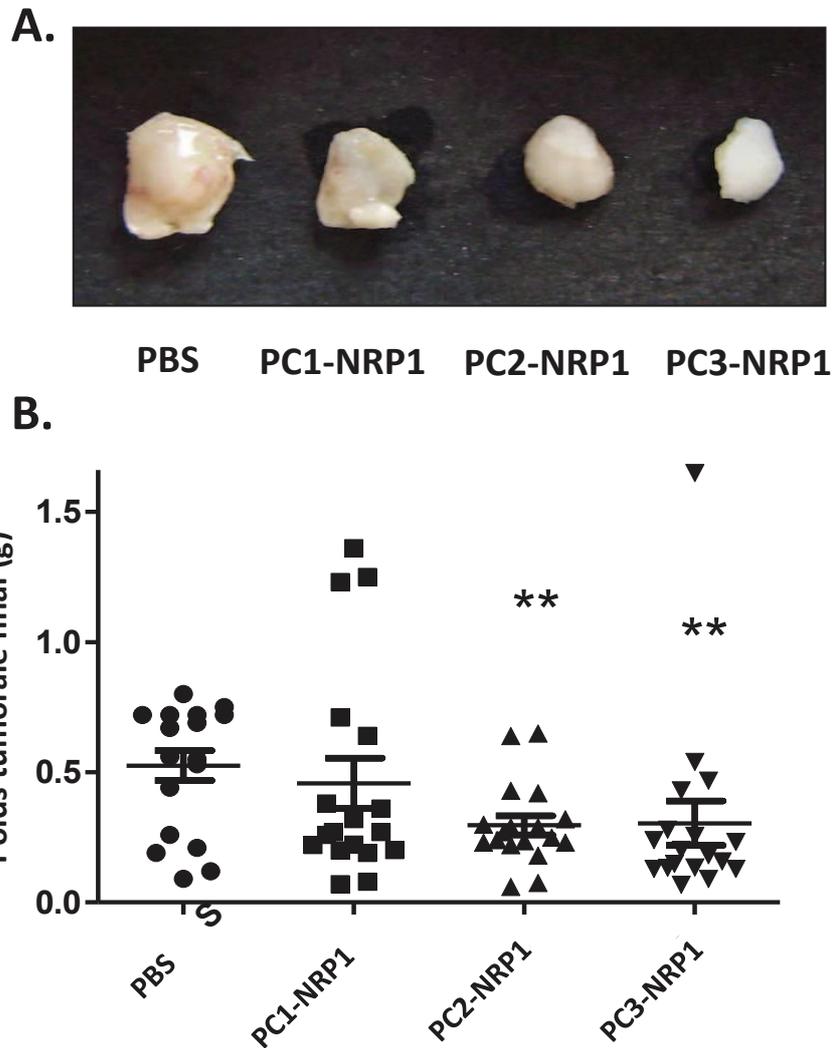
Dans cette expérience, le traitement avec MTP-NRP1 entier induit une diminution significative de 38.13 % par rapport au contrôle ( $p < 0,001$ ) du nombre d'intersections (**Figure 38**). L'ajout du peptide PC1-NRP1 provoque une diminution significative de 51.23 % ( $p < 0,0001$ ) du nombre d'intersections, le peptide PC2-NRP1 n'a au contraire aucun effet anti-angiogénique alors que le peptide PC3-NRP1 montre une légère diminution significative de 21.63 % ( $p < 0,05$ ) du nombre d'intersections par rapport au contrôle. Dans cet essai, il semble que seul le MTP-NRP1 court 1 (PC1-NRP1) ait une capacité d'inhibition de l'angiogenèse similaire au MTP-NRP1 entier.

#### 4.2. Mesure des effets anti-migratoires des peptides courts

Pour vérifier l'impact des peptides courts sur la migration des cellules tumorales j'ai utilisé le test d'agrégats de cellules U373MG cultivées en présence ou non du VEGF pendant 12h dans une matrice 3D de plasma de poulet coagulé. Les agrégats sont alors considérés comme « positifs » lorsque ceux-ci présentent des chaînes de migration cellulaire en réponse au VEGF, et « négatifs » en absence de chaînes de migration. Dans la condition contrôle, la stimulation avec du VEGF 100 ng/ml fait apparaître 45 % des agrégats positifs (**Figure 39**). Le peptide MTP-NRP1 entier réduit significativement cette proportion d'agrégats positifs à 10 % ( $p < 0,05$ ). De manière surprenante, les trois peptides courts diminuent également significativement ( $p < 0,05$ ), le pourcentage d'agrégats positifs passe de 45 % à 20 % pour le PC1-NRP1, à 15 % pour le PC2-NRP1 et à 18 % pour le PC3-NRP1. Mais seul le PC1-NRP1 a un impact réduit par rapport au MTP-NRP1 entier ( $p < 0,05$ ). Tous les peptides courts semblent impacter la migration des cellules tumorales mais le peptide court 1 paraît perdre un peu d'efficacité par rapport au MTP-NRP1 entier.

#### 4.3. Mesure des effets anti-tumoraux in vivo

Finalement, j'ai réutilisé le modèle de greffes sous-cutanées hétérotopiques de cellules U373MG dans la souris « nude » pour évaluer l'impact des peptides courts sur la croissance tumorale. Dans cette expérience, le poids final des tumeurs est mesuré à la fin d'une période de 10 jours de traitements par voie intrapéritonéale (**Figure 40A et 40B**). Le poids moyen des tumeurs du groupe contrôle est de 0,53 g ( $n=18$ ), celui du



**Figure 40: Impact des peptides courts sur un modèle de greffes sous-cutanées hétérotopiques de cellules U373MG. A.** Photos représentatives de la moyenne de chaque condition. **B.** Graphique des poids finaux des tumeurs selon les différents traitements. (Mann et Whitney test  $**P < 0,001$ )

groupe traité avec le PC1-NRP1 est de 0,46 g (n=18), une différence non significative entre ces deux groupes. Par contre, le poids moyen des tumeurs du groupe PC2-NRP1 est significativement réduit à 0,296 g (n=18) (p=0,0090). De même celui des tumeurs du groupe PC3-NRP1 est lui aussi significativement réduit à 0,304 g (n=18) (p=0,0041). Par conséquent au moins deux des peptides courts présentent un effet anti-tumoral in vivo.

### Partie III :

L'inhibition de Plexine-A1 par un peptide ciblant son domaine transmembranaire réduit le développement tumoral et l'angiogenèse associée dans le glioblastome

### **III. L'inhibition de Plexine-A1 par un peptide ciblant son domaine transmembranaire réduit le développement tumoral et l'angiogenèse associée dans le glioblastome**

Résumé :

Le glioblastome est une tumeur cérébrale très infiltrante, avec une angiogenèse massive. Les patients présentent une médiane de survie très courte de 15 mois malgré l'utilisation de chimiothérapie. Dans ce contexte, nous démontrons que l'augmentation de l'expression de Plexine-A1 est corrélée avec l'agressivité des gliomes et avec le mauvais pronostic des glioblastomes. Nos résultats décrivent pour la première fois la capacité du domaine transmembranaire de Plexine-A1 à former des homodimères mais surtout des hétérodimères avec Neuropilin-1, Plexine-A4, Plexine-A3 et Plexine-A2. A partir de ces résultats nous avons développé un peptide inhibiteur, MTP-PlexA1, mimant le domaine transmembranaire de Plexine-A1 afin de bloquer ses fonctions biologiques. MTP-PlexA1 induit une diminution des interactions entre NRP1-PlexA1 et PlexA1-PlexA4. Ce peptide est capable d'impacter les voies de signalisation directes de Plexine-A1 comme Rac1 et indirectes comme AKT et la phosphorylation du VEGFR-2. Nous décrivons la présence du récepteur Plexine-A1 sur les vaisseaux sanguins de biopsies de patients atteints de GBM. Cette expression est confirmée sur les vaisseaux en développement dans le parenchyme cérébral mais n'est pas retrouvée dans le cerveau adulte. Il semble donc que Plexine-A1 joue un rôle dans l'angiogenèse, un rôle confirmé par la capacité de MTP-PlexA1 d'inhiber la formation de pseudo tubes in vitro, de bloquer la migration des cellules endothéliales et de réduire le développement de vaisseaux sanguins dans le test in vivo de la membrane chorio-allantoïque de l'embryon de poulet. De plus, MTP-PlexA1 impacte la prolifération tumorale de cellules de GBM humain (U373MG, U118MG), bloque leur migration dans une matrice 3D in vitro. De façon intéressante, ce peptide montre une grande efficacité pour réduire la croissance tumorale sur des modèles de greffes hétérotopiques de U373MG et de U118MG. L'analyse histologique des tumeurs, à l'aide des marqueurs PH3 et CD31, confirme l'effet anti-prolifératif et anti-angiogénique du peptide in vivo. Les cellules souches de glioblastome sont une composante importante de la résistance aux traitements et de la récurrence. Nous décrivons également pour la première fois la forte expression du récepteur Plexine-A1 sur ces cellules souches (NCH644). MTP-PlexA1 est capable de réduire la formation de sphère (inhibition du potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches tumorales) in vitro et empêche la formation de tumeurs à partir de cellules

souches tumorales NCH644 greffées en sous cutané chez la souris nude. En conclusion, cette étude démontre que Plexine-A1 est un marqueur diagnostique et pronostique des GBM et que son expression sur les différentes composantes cellulaires en fait une cible thérapeutique de premier choix. La stratégie peptidique consistant à cibler son domaine transmembranaire montre une inhibition de son oligomérisation et par conséquent un blocage de la prolifération, de la migration, de l'angiogenèse et des cellules souches tumorales. Ces résultats présentent MTP-PlexA1 comme un bon candidat médicament pour le traitement des GBM.

# **Inhibition of Plexin-A1-mediated brain tumor growth and tumor-associated angiogenesis using transmembrane domain targeting peptide**

Laurent Jacob, Paul Sawma\*, Norbert Garnier\*, Lionel Meyer\*, Justine Fritz\*, Thomas Hussenet, Caroline Spenlé, Aurore Fernandez, Nadège Baumlin, Gertraud Orend, Pierre Kehrli, Guy Roussel, Gérard Crémel, Monique Genest, Pierre Hubert and Dominique Bagnard

## Introduction

Glioblastoma is a devastating brain tumor subtype with poor prognosis (Holland, 2001), (Ohgaki and Kleihues, 2005), (Grossman et al., 2010). Very infiltrative and highly vascularized, these tumors are also composed of multi-clonal cell types with various migratory and proliferative properties reflecting a very heterogeneous genetic profile. This obvious cellular complexity is certainly a key determinant of the observed resistance to all of the currently available therapeutic strategies including, surgery, radiotherapy and chemotherapy (Bonavia et al., 2011), (Binda et al., 2012). The most significant recent progress grounds into the development of targeted therapies intended to inhibit tumor growth by blocking specific pathways including various receptor tyrosine kinases (Sliwkowski and Mellman, 2013) or attacking tumor vascularization (Norden et al., 2009), (Reardon et al., 2011). However, the clinical outcome remains poor and the overall survival of patients is only modestly improved (Roodink and Leenders, 2010), (Bottsford-Miller et al., 2012), (Welti et al., 2013). Hence, there is a crucial need in identifying new therapeutic targets and to develop efficient inhibitors of these targets. Such inhibitors have to meet the extraordinary demanding criteria of being as safe as possible to avoid potential severe side effects in the patient, they have to exhibit optimal bio distribution profile including the ability to cross the blood brain barrier and would also have to affect resistance mechanisms developed by genetically altered tumor cells exhibiting redundant and/or compensatory signaling pathways. This ongoing quest is exemplified by the dozen of compounds, be them small molecules or antibodies, administrated alone or now in combination to better fight with glioblastoma yet ineluctable progression because of such resistance mechanism (Lima et al., 2013). To address this very challenging question we are taking advantage of one important requirement for signal transduction of receptor tyrosine kinases (RTK) and other membrane receptors which is dimerization or oligomerization. In particular, we are focusing on the role of the transmembrane domain of single-pass transmembrane proteins because the function of this domain is nowadays not restricted to receptor membrane anchoring but rather do actively participate in the regulation of signal transduction (Li and Hristova, 2010), (Hubert et al., 2010). Indeed, the importance of transmembrane domain interactions (TMD) have been described for many RTK including the ErbB family (Cymer and Schneider, 2010) and other cell surface receptors such as the integrins (Ulmer, 2010), the amyloid precursor protein APP (Khalifa et al., 2010) or the T-cell antigen receptor (Manolios et al., 2010). Thus, targeting

TMD interactions represents a unique alternative strategy to classical drug design usually targeting the extracellular or intracellular domains of bitopic receptors. In this context, we showed that the TMD of Neuropilin-1 is crucial for the dimerization and oligomerization of this receptor (Roth et al., 2008) controlling a wide range of biological functions (Bagci et al., 2009). Strikingly, a synthetic peptide mimicking the TMD of NRP1 (MTP-NRP1) acts as a potent inhibitor by antagonizing dimerization. NRP1 is expressed in glioblastoma and promotes autocrine Sema3A-dependent dispersion of tumor cells (Bagci et al., 2009) and autocrine VEGF-mediated glioma stem cells survival (Hamerlik et al., 2012). Consistently, we found that MTP-NRP1 impaired tumor cell migration and angiogenesis both in vitro and in vivo thereby reducing brain tumor growth (Nasarre et al., 2010). This strongly strengthens the idea that the TMD may represent a novel source of therapeutic target (Sigalov, 2010) and that small TMD-interfering peptides may represent a new class of therapeutic agents (Hubert et al., 2010). Most of the work conducted so far on the role of TMD interactions focused on homo-dimerization. However, the case of integrin signaling clearly demonstrates the importance of TMD hetero-interactions (Ulmer, 2010) and fully justifies the search of antagonists interfering with the hetero-dimerization capacity of key signaling receptors. Based on our initial success with MTP-NRP1 we decided to further explore the possibility of antagonizing signaling partners of Neuropilin-1 in order to develop a battery of small peptides designed to interfere with hetero association of NRP1 with important cancer associated receptors with the ultimate goal of fighting with tumor resistance by blocking compensatory mechanisms.

Here, we report that Plexin-A1, one of the numerous known signaling partner of NRP1 (Tamagnone et al., 1999), (Rohm et al., 2000) is in fact a prognostic marker for glioblastoma patient survival. Using computer simulation and a two-hybrid like system (BACTH) we were able to show that NRP1/Plexin-A1 TMDs do interact with each other. Synthetic transmembrane peptide mimicking the TMD of Plexin-A1 (MTP-PlexA1) reduced glioblastoma cell proliferation and blocked VEGF-induced tumor cells dissemination. This effect is the direct consequence of the disruption of NRP1/Plexin-A1 heterodimer and inhibition of Plexin-A1 Rho-GTPase activity. Hence, the preclinical in vivo validation of MTP-PlexA1 revealed a pro-angiogenic activity of Plexin-A1 explaining part of the global antitumor activity of the peptide. Overall, this study identifies Plexin-A1 as a novel biomarker of glioblastoma severity and as a novel therapeutic target for which we have developed a specific inhibitor.

## Results

### **Plexin-A1 is a prognostic marker of glioblastoma**

NRP1 is clearly associated to glioblastoma growth and correlates with tumor aggressiveness (Broholm and Laursen, 2004), (Ding et al., 2000), (Osada et al., 2004). However, NRP1 lacks signaling activity and requires association with signaling partners to trigger its biological functions (Prud'homme and Glinka, 2012). In search for important signaling partners that could explain the role of NRP1 in glioblastoma growth we focused on known interacting receptors. Among them, Plexin-A1 rapidly emerged because it is the first signaling receptor identified for NRP1 and several studies demonstrated the interaction between the two receptors (Tamagnone et al., 1999), (Takahashi et al., 1999), (Rohm et al., 2000). This interaction is known to trigger growth cone collapse in neurons and our previous study implicated Plexin-A1 in the control of Semaphorin-dependent glioma cell migration (Nassar et al., 2010). To address whether this interaction may have relevant implication for the treatment of glioblastoma patients we performed data mining of the Rembrandt and TCGA repository collections (Madhavan et al., 2009), (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008) (Figure 1A, 1B). Our analysis of the two independent data sets of respectively 187 and 499 glioblastoma showed that patients expressing higher level of Plexin-A1 had a reduced probability of survival when compared to patients expressing lower level of Plexin-A1 ( $p=0.041$  in the Rembrandt collection and  $p=0.005$  in the TCGA collection log-rank test). To explore further the prognostic value of Plexin-A1 we performed tissue micro-array (US Biomax) analysis on a total of 295 biopsies of patients with astrocytoma (Figure 1C). The quantitative analysis of Plexin-A1 expression revealed a correlation between the grade of the glioma and the level of expression of the receptor. Indeed, the lowest level was found in low grade (Astrocytoma grade I) glioma while high grade glioma (Glioblastoma) exhibited the highest expression. Grade II and grade III astrocytoma showed similar levels of Plexin-A1 being intermediate to grade I and IV (Figure 1D). Strikingly, the overexpression of Plexin-A1 in glioblastoma patients was confirmed at the transcriptional level using RT-QPCR analysis that revealed 0.91 to 12.68 fold increase of Plexin-A1 in our own collection of 8 patient's biopsies (Figure 1E). While identifying Plexin-A1 as a prognostic/diagnostic marker, this analysis also flagged Plexin-A1 as an ideal signaling partner of NRP1 in the context of glioblastoma growth.

## **Molecular simulations exemplifies Plexin-A1 and NRP1 TMD interactions**

Our drug design strategy relies on the synthesis of antagonist peptides of the transmembrane domain of receptors involved in glioma growth. Thus, target selection depends on the demonstration of the existence of TMD interactions. The two simulations of NRP1 and PlexA1 TM domains, performed in a DOPC bilayer model, led to the association of the TM domains after their diffusion within the membrane model. Strikingly, the time required for the formation of the TMD1 NRP1-TMD2 NRP1 homodimer is not exceeding 5  $\mu\text{s}$  (Figure 2A top). The two TM domains associated in right handed interactions with a crossing angle of  $-32^\circ$  on average. The contact map (Figure 2A bottom) showed symmetric and well-defined interacting motif M12xxxG16xxxG20 with closest distances around 0.5 nm. One  $\mu\text{s}$  later TMD3 PlexA1 approached TMD1 NRP1-TMD2 NRP1 homodimer to form a stable trimer until the end of the simulation (18  $\mu\text{s}$ ) (Figure 2B and 2C top). The crossing angles were  $+33^\circ$  and  $+4^\circ$  on average for the heterodimers TMD2 NRP1-TMD3 PlexA1 and TMD1 NRP1-TMD3 PlexA1 respectively. The TMD2 NRP1-TMD3 PlexA1 contact map exhibited the key interfacial residues A11 and A14 for TMD2 NRP1 and G9 for TMD3 PlexA1 (closest distances around 0.5 nm) (Figure 2B bottom). Lower contacts, with closest distances around 0.7 nm, were observed between TMD1 NRP1 (V22 and V26) and TMD3 PlexA1 (V20 and A23) (Figure 2C bottom). A representative conformation of this trimer is shown on Figure 3A. When simulating the association of TMD1 NRP1-TMD2 PlexA1-TMD3 PlexA1 interaction we very quickly (about 1  $\mu\text{s}$ ) observed the formation of a TMD1 NRP1-TMD2 PlexA1 heterodimer (Figure 2D top). The two TMD associated in right handed interactions with a crossing angle of  $-33^\circ$  on average. From 26  $\mu\text{s}$  the TMD3 PlexA1 monomer diffused within the membrane and then joined the TMD1 NRP1-TMD2 PlexA1 heterodimer to form a stable trimer until the end of the simulation (40  $\mu\text{s}$ ) (Figure 2E and 2F top). The TMD1 NRP1-TMD3 PlexA1 heterodimer and TMD2 PlexA1-TMD3 PlexA1 homodimer associated in right handed interactions with crossing angles equal to  $-36^\circ$  and  $-45^\circ$  respectively. The contact maps exhibited the interacting motif M12xxxG16xxxG20 for TMD1 NRP1 and the key residues G11, G15 and L19 for TMD2 PlexA1 and TMD3 PlexA1. A representative conformation of this trimer is shown on Figure 3B. Hence, a large simulation scenario implicating 3 NRP1 TMD and 3 Plexin-A1 TMD showed that interactions are highly dynamic and allow transitions from hetero-dimers to trimeric complexes eventually interacting with each other (Figure 2G). Thus, adding a synthetic peptide mimicking the TMD of Plexin-A1

would compete with naturally occurring TMD interactions thereby leading to signal transduction alteration.

### **Plexin-A1 TMD exhibit specific interactions**

To further explore the TMD interactions of Plexin-A1 we used a bacterial two-hybrid like system allowing for the systematic analysis of TMD interactions (Sawma et al., under revision). TMD sequences of Plexin-A1 and various potential interacting partners including NRP1 and all other members of the Plexin-A family were co-expressed in the bacteria to define the hierarchy of the interactions. This experience confirmed computer simulations as demonstrated by a significant interaction between NRP1 and Plexin-A1 TMD (Figure 4A). The systematic analysis confirmed the weak but significant homo-dimerization capacity of Plexin-A1 and also revealed positive interactions with the TMD of Plexin-A4 but very modestly with Plexin-A2 and Plexin-A3. Additional constructions encoding the TMD of Plexin-B1, cMET, VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, GPA, HER2 or Integrin Beta 1 showed no significant interaction with Plexin-A1 TMD while all of these receptors contain GxxxG-like motifs (Figure 4B).

A Surface Plasmon Resonance (SPR, Biacore) analysis was also conducted with a synthetic Plexin-A1 peptide immobilized on the chip. This allowed us to confirm BACTH observations because Plexin-A1 TMD mimetic peptide significantly interacted with NRP1 (chosen as a positive interaction from the BACTH assay) but not with VEGFR-2 (chosen as a negative interaction from the BACTH assay) (Figure 4C). It is important to mention here that all other interactions can't be easily tested because the production of peptides mimicking the TMD is extremely difficult because of the hydrophobic nature of the peptides rendering complex synthesis and purification. Thus efforts were concentrated on TMD peptides for which we had experience of successful synthesis.

### **MTP-PlexA1 disrupts dimerization of Plexin-A1 with its coreceptors**

As previously mentioned, the core strategy is to antagonize receptor dimerization and/or oligomerization of membrane receptors by adding interfering peptides competing with natural TMD for interactions. Hence, to demonstrate that MTP-PlexA1 is able to alter receptor

complex formation we performed an in situ proximity ligation assay (Duo-link system, Sigma-Aldrich) (Sundqvist et al., 2013). As seen in figure 5A, we observed numerous Neuropilin-1/Plexin-A1 complexes at the cell surface in control conditions. However, the addition of MTP-PlexA1 induced a 29 % reduction of the number of Neuropilin-1/Plexin-A1 complexes. Moreover, we found that Semaphorin-3A-induced co-immunoprecipitation of Plexin-A1 or NRP1 was significantly reduced in the presence of MTP-PlexA1 (Figure 5B). The addition of the peptide also blocked the co-immunoprecipitation of Plexin-A4 in response to VEGF (Figure 5C). Hence, altogether these results demonstrate that MTP-PlexA1 is able to disrupt or prevent oligomerization of Plexin-A1 in resting conditions or in response to various ligands.

### **MTP-PlexA1 blocks the signaling capacity of Plexin-A1**

Plexin-A1 is a Rho-GTPase activating protein. Consistently, it has been shown that in response to Semaphorin-3A, the Rho-GTPase Rac1 is activated and sequestered to the membrane (Turner et al., 2004), (Hota and Buck, 2012). Here, using an ELISA-based assay (R&D) we were able to show that MTP-PlexA1 significantly inhibited Semaphorin-3A-induced Rac1 activity while not affecting this Rho-GTPase activity in the absence of ligand (Figure 6A). Moreover, it has been shown that Semaphorin-3A inhibits Akt phosphorylation through the binding of Rnd1 to Plexin-A1. Our data show that Semaphorin-3A-induced inhibition of Akt phosphorylation is blocked by the addition of MTP-PlexA1 (Figure 6B). Previous study suggested a pro-angiogenic effect of Plexin-A1 (Kigel et al., 2011). Indeed, when measuring the phosphorylation of VEGFR-2 using an ELISA assay we also found that MTP-PlexA1 significantly reduced VEGF-induced phosphorylation of VEGFR-2 (Figure 6C). Hence, MTP-PlexA1 is able to antagonize major signaling pathways of the Plexin-A1 receptor.

### **MTP-PlexA1 inhibits the pro-angiogenic activity of Plexin-A1**

As previously mentioned, recent work highlighted the potential angiogenic role of Plexin-A1 (Kigel et al., 2011). We also report here that MTP-PlexA1 impacts VEGF-mediated VEGFR-2 phosphorylation. Strikingly, we also observed Plexin-A1 positive blood vessels in the tissue array of glioblastoma samples (Figure 7A). Interestingly, blood vessels in control normal brain tissue were not expressing Plexin-A1. Additional experiments performed in the mouse

brain showed that only embryonic developing but not adult mature blood vessels exhibited Plexin-A1 positive immunocytochemical signal (see supplementary figure 1). These data suggested a role of Plexin-A1 during normal and pathological angiogenesis. To confirm this hypothesis we first performed a pseudo-tube formation assay with HUVEC cells grown on matrigel. Indeed, we found that the addition of MTP-PlexA1 significantly blocked tube-like structures intersections (-68%,  $p= 0,0087$ ) (Figure 7B). This inhibition of VEGF-induced HUVEC cell migration was confirmed in a live monitoring trans-well assay (-63%,  $p= 0,0002$ ; X-Celligence system, ACEA Biosciences, (Tisato et al., 2012), (Daouti et al., 2008) (Figure 7C). Moreover, 3D migration assay with HMEC spheroids grown in plasma clot showed that VEGF-induced cell migration was abolished when adding the Plexin-A1 inhibitory peptide (Figure 7D). Hence, to further validate this pro-angiogenic activity of Plexin-A1 we also analyzed the vascular development of the chorio-allantoic membrane of chick embryo. In this assay we confirmed the expression of Plexin-A1 in developing blood vessels (Figure 8A) and we also showed that local deposition of MTP-PlexA1 significantly inhibited VEGF-induced vascular growth and complexity (Figure 8B, 8C). Altogether, these results confirmed the pro-angiogenic effect of Plexin-A1 and demonstrated that this effect can be fully antagonized when using MTP-PlexA1.

### **MTP-PlexA1 inhibit tumor growth**

To address the biological consequence of MTP-PlexA1-mediated Plexin-A1 inhibition in tumor cells we first performed MTT proliferation assays. We found a dose-dependent reduction of glioblastoma U373MG cells reaching a maximal effect at  $10^{-7}$ M (-25%,  $p< 0.0001$ , Mann Whitney test) (Figure 9A). Because Plexin-A1 is involved in cell migration we also performed a 3D migration assay. U373MG cells were grown as cell aggregates (micro tumor-like spheroids) for 24h in plasma clot with or without VEGF. Under these conditions, VEGF (100 ng/ml) induced tumor cell migration that formed cell chains invading the 3D substrate as previously described (Nasarre et al., 2010). Strikingly, VEGF-induced cell migration was abolished when adding to the culture MTP-PlexA1 at  $10^{-7}$  M (Figure 9B). Hence, while confirming the proliferative and pro-migratory functions of Plexin-A1 this part of the study exemplified the therapeutic potential of MTP-PlexA1 because this peptide would be able to block two major mechanisms of tumor progression. Indeed, when grafting U373MG cells in the flank of nude mice to produce tumors we found that the daily

intraperitoneal administration of MTP-PlexA1 (at a concentration of  $10^{-7}$ M) significantly reduced final tumor weight (-44 %,  $p=0,0044$ ) (Figure 9D). A waterfall plot of best response using RECIST criteria showed that 100 % of mice responded to the treatment with 37,5 % SD (Stable Disease) and 62,5% PR (Partial Response) (Figure 9C). To further validate the anti-tumoral activity of MTP-PlexA1 we repeated the xenograft experiments with another glioma cell line genetically modified to express the luciferase reporter gene (U118MG-Luc). As for U373MG cells, the addition of MTP-PlexA1 to U118MG-Luc cells reduced proliferation in a dose dependent manner (Figure 10A). Cells were then grafted subcutaneously and tumor growth was monitored every 5 days for a total period of 20 days of tumor growth. As seen in figure 10B showing representative examples of each experimental group, U118MG-Luc formed large tumors continuously growing in control conditions while tumor growth was dramatically slowed down in the animals receiving injections of the therapeutic peptide every day. The quantitative analysis of the cumulated luminescent signal acquired all along the protocol confirmed the strong reduction of tumor development translating into a marked 75 % reduction of the averaged luminescent signal at end point (14,37 AU (Arbitrary Unit) in control versus 3,549 AU in MTP-PlexA1 receiving group;  $p<0,0001$ ) (Figure 10C, 10D). The waterfall graph of best response also showed that 2 out of 10 mice did not respond to the treatment. However, responses were strong for 8 out of 10 mice with some responses close to 100 %, all of them being at least PR (Partial Response) (Figure 10E). In order to clarify the mechanism by which MTP-PlexA1 is exerting tumor growth inhibition we collected tumors and sliced them for histological analysis. We found that the number of proliferative cells determined by counting PH3 positive cells on the whole surface of 5 slices per tumor was 47,5 % decreased in treated animals compared to the control group (5,252 cells versus 3,292 cells) (Figure 11A, 11B). Moreover, when determining on the same number of slices the total surface of blood vessel using CD31 immunostaining we also found an 11.5 % reduction of tumor-associated blood vessels in the animal group receiving MTP-PlexA1 (Figure 11C, 11D). Hence, this part of the study demonstrated that the inhibition of tumor growth *in vivo* can be explained by an anti-proliferative and an anti-angiogenic effect of MTP-PlexA1 mirroring the results obtained with *in vitro* assays.

## **MTP-PlexA1 inhibits cancer stem cells-dependent tumor growth**

Mounting evidence identified the crucial role of cancer stem cells in the initiation or relapse of tumors (Rosen and Jordan, 2009), (Visvader and Lindeman, 2012), (Yu et al., 2012). This is particularly the case for glioma (Pallini et al., 2011), (Chen et al., 2012). Thus, we decided to evaluate to what extent MTP-PlexA1 would affect glioma stem cell (GSC) growth. To this end, we used the NCH644 human cell line derived from a patient biopsy (Campos et al., 2010). As seen in figure 12A, GSC expresses Plexin-A1 that co-localizes with the stem cell marker nestin. Moreover, Q-PCR analysis revealed that NCH644 cells exhibited strong overexpression of PlexinA1 when compared to the level in normal brain (22.5fold) or grade II astrocytoma (23.2 fold) (Figure 12B). We next performed a sphere forming assay in which cells were plated into 96-well plates at a very low density (30 cells per well) to monitor production of clones from individual cells growing in the form of non-adherent gliomaspheres. In control conditions we observed an averaged number of 2.85 $\pm$  1.99 spheres per 30 cells after 4 days culture. Strikingly, the addition of MTP-PlexA1 at a concentration of 10<sup>-9</sup>M induced a 33.7% reduction of the number of spheres (1.89 $\pm$  1.375 spheres per 30) thereby demonstrating the capacity of the peptide to inhibit GSC growth (Figure 12C). To address whether this inhibitory effect would impede tumor development in vivo we performed a xenografting experiment. NCH644 GCS were grafted in the flank of nude mice in a way to obtain two bilateral tumors made of cells without treatment or cells pre-incubated with MTP-PlexA1. This was done using a fluorescent version of the NCH644-ch cell line (NCH644-cherry) allowing live monitoring of tumor apparition (Figure 12D). We chose to monitor tumor development over a 5 days period of time as a compromise to reach the size of detectable tumors while conserving significant inhibitory activity of MTP-PlexA1 (at least for the first three days as previously shown for equivalent membrane targeting peptides (Nasarre et al., 2010)). With control cells we observed the development of 14 tumors out of the 20 grafted mice (Figure 12E). However, GCS pre-incubated with the peptides only rarely give rise to detectable tumors (5 out of 20 mice). Hence, the inhibition of Plexin-A1 in GSC using MTP-PlexA1 impaired tumor engrafting and development.

## **Discussion**

This study was designed to analyze the role of the interplay between Neuropilin-1 and Plexin-A1 in the context of glioblastoma growth. We found that Plexin-A1 may be a novel biomarker of glioma severity and we were able to characterize an angiogenic function for this receptor. We identified the transmembrane domain of Plexin-A1 as a key regulator of dimerization thereby controlling related biological functions such as cell proliferation, migration or angiogenesis. Moreover, we developed an antagonist peptide blocking the association of Plexin-A1 with its co-receptors. Hence, this peptide turns out to be a very efficient therapeutic tool reducing glioblastoma growth and cancer stem cell-mediated tumor development *in vivo*. While confirming that targeting the transmembrane domain of membrane receptors offers a credible alternative to current drug design, this study identifies novel functions for Plexin-A1 with fundamental and clinical relevance.

The development of biomarkers in the field of GBM is facing several challenges. Indeed, the identification of suitable markers is complicated by the short range of patient survival, the great heterogeneity of GBM as well as an incomplete understanding of the pathophysiology of GBM. For examples, the IDH1 mutation appears to be a prognostic marker (with better outcome) for GBM (Sanson et al., 2009) and EGFR amplification is frequent in GBM (25 % to 33 %, (Aldape et al., 2004). Although the prognosis value is still under debate (Liu et al., 2005), (Heimberger et al., 2005), the MGMT methylation is also considered as a prognostic tool and a predictive marker of drug efficacy since it is correlated with a better response to alkylating agents such as temozolomide (Hegi et al., 2005). Thus, there is a crucial need of novel biomarkers to better diagnose, stratify patients and predict their response to available treatments. Here, we found that the expression of Plexin-A1 correlated with the grade of glioma defining three groups with low (grade I), medium (Grade II/III) and high Plexin-A1 (Grade IV). This highest expression in subsets of glioblastoma also translated into significant reduction of patient survival thereby defining Plexin-A1 expression level as a diagnostic and prognostic marker. The prognostic value of Plexin-A1 has already been described for patient with pancreatic tumors (Müller et al., 2007). Thus, it will be interesting to expand in a more systematic way the analysis of Plexin-A1 expression in various cancer types. In the present study, a striking feature of Plexin-A1 expression was the staining of tumor associated blood

vessels in patient biopsies similarly to gastric cancer where Plexin-A1 is associated with microvessel density (Zhao et al., 2007). Intriguingly, we failed to detect Plexin-A1 in blood vessels in human normal brain or in adult mouse brain. The expression of Plexin-A1 in blood vessels was restricted to phases of developmental angiogenesis or tumor angiogenesis. Thus, because angiogenesis is a marker of cancer severity (Nussenbaum and Herman, 2010) and more precisely of glioma severity (Jain et al., 2007), the prognostic value of Plexin-A1 may also reflect this expression in tumor-associated blood vessels. Both in vitro and in vivo assays showed in the present study the clear pro-angiogenic role of Plexin-A1. This is consistent with previous work that showed inhibition of tube formation by HUVEC cells knocked-down for Plexin-A1 (Kigel et al., 2011). Because no study reports the direct binding of VEGF to Plexin-A1, Plexin-A1-mediated endothelial cell migration and blood vessel formation requires the involvement of VEGF binding partners such as NRP1 or VEGFR-2. We however cannot exclude that additional pro-angiogenic ligands such as PDGF, FGF, TGF  $\beta$ 1, that have been shown to be linked to NRP1 (Ball et al., 2010), (West et al., 2005), (Glinka and Prud'homme, 2008), may also recruit Plexin-A1 directly or indirectly through the formation of specific receptor complexes. Indeed, coarse grain simulation revealed the dynamic association of NRP1 and Plexin-A1 TMDs being capable of homodimerization, heterodimerization, oligomerization and/or transitions from one status to the other. The role of TMD in the association and stabilization of membrane anchored receptor is becoming well-described. This is indeed clearly demonstrated for several families of receptors including TLR (Manolios et al., 2010), integrins (Ulmer, 2010) or tyrosine kinase (He and Hristova, 2012). Very recently, it has been shown that the activation of EGFR requires an N-terminal interaction between the transmembrane helices (Arkhipov et al., 2013), (Endres et al., 2013). Thus, TMD are crucial regulators of receptor activity. The contact maps we created from simulations revealed the existence of multiple potential interfaces with unexpected amino acids (such as the G11xxxG15xxxL19) favoring the different types of interactions between NRP1 and Plexin-A1 with adapted crossing angles. Interestingly, Plexin-A1 TMD contains long series of 6 glycines (G9, G11-G15) generating two GxxxG like motifs being on different faces of the helix therefore creating at least two sites for interactions. This is again showing the diversity of interactions that can be produced when considering the whole transmembrane domain as an interface with several faces. However, we also found that these TMD interactions are very specific because PlexB1, c-MET, VEGFR-1,-2,-3, HER-2, Integrin  $\beta$ 1 TMD exhibited no significant interaction with PlexA1 TMD. Thus, the existence of a GxxxG motif is not sufficient to trigger interaction. Rather, the whole sequence is defining the specificity of

interactions. This is consistent with the need for Plexin-A1 to associate with different receptors to trigger biological functions. The use of membrane targeting peptides mimicking the transmembrane domains appears as a very efficient tool to dissect membrane receptor interactions. We initially described this strategy for NRP1 in various cellular models (Roth et al., 2008), (Nasarre et al., 2010). Here, we showed using proximity ligation assay and co-immunoprecipitation assays that the interference of the TMD of PlexA1 with a peptide mimicking the natural sequence of this domain destabilized the interaction capacity of the receptor with NRP1 or Plexin-A4. This was sufficient to silence direct (Rac-1 activity) or indirect (Akt and VEGFR2 phosphorylation) signaling pathways of Plexin-A1 in response to Sema3A or VEGF. Consistently, Plexin-A1-dependent cell proliferation or cell migration was strongly impaired. This is relevant in the context of brain tumor because a Sema3A autocrine loop is implicated in glioma cell dissemination (bagci model) and VEGF is extremely important for tumor cell survival and in the process of tumor angiogenesis (Roskoski, 2007). These findings led us to evaluate the therapeutic potential of MTP-PlexA1 in models of glioma growth in vivo. We implanted tumor cells subcutaneously to produce tumor that can be monitored using a caliper or live imaging to evaluate the anti-tumor effect following the RECIST criteria (Eisenhauer et al., 2009). We found in the two different protocols that most of the mice responded to the treatment (100% with the U373MG and 80% with the U118MG cell lines). This translated into either reduction of final tumor weight or cumulated fluorescence signal. In the second protocol tumors were resected and immediately processed for immunostaining in order to determine the proliferative activity and the angiogenic status of the tumors. Both analyses revealed that MTP-PlexA1 inhibited tumor cell proliferation and tumor angiogenesis consistently with in vitro results. The most striking result was obtained when using a third patient-derived glioma cell line enriched with cancer stem cells (NCH644, (Campos et al., 2010). Besides the high level of Plexin-A1 expression in glioma stem cells, we also found that MTP-PlexA1 inhibited sphere formation. This is indicating that blocking Plexin-A1 directly inhibited stem cell renewal capability. Additionally, NCH644 cells pre-incubated with MTP-PlexA1 were not able to produce tumors in vivo. Knowing the importance of cancer stem cells in the initiation of tumor growth (Rosen and Jordan, 2009) this result identified Plexin-A1 as a target to deplete glioma stem cells. This is to our knowledge one if not the first demonstration of such a promising therapeutic approach.

In conclusion, we had identified Plexin-A1 as a diagnostic and prognostic marker of glioblastoma. We also confirmed the pro-angiogenic activity of this receptor that is also

involved in tumor cell proliferation and migration. Furthermore we demonstrated that the transmembrane domain of this receptor regulate Plexin-A1 oligomerization and can be antagonized by a peptide mimicking the native sequence. Hence, this peptide appears as a good drug candidate slowing down glioblastoma growth and preventing tumor initiation when added to cancer stem cells.

## **Material and methods**

### ***Cell Culture***

U373 MG (08061901) and U118 MG are human glioblastoma cell lines obtained from the ECACC and the ATCC respectively. Cells are grown at 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO) supplemented with 10 % of serum and 5 % of fetal calf serum (FCS) (GIBCO), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin (Sigma). HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell) provided from PromoCell (C-12200) and HMEC-1 (Human Microvascular Endothelial Cell-1) provided from Dr Ellen van Obberghen-Schilling (Institute of Biology Valrose, Nice) are grown in the Endothelial Cell Growth Medium Kit (C-22110) supplemented with Fetal Calf Serum at 0.02 ml/ml, Endothelial Cell Growth Supplement 0.004 ml/ml, Epidermal Growth Factor (recombinant human) 0.1 ng/ml, Basic Fibroblast Growth Factor (recombinant human) 1 ng/ml, Heparin 90 µg/ml, Hydrocortisone 1 µg / ml. The NCH644 GSC is from a collection of GSC lines established from patient glioblastoma multiforme biopsies and was kindly provided by Christel Herold-Mende (University of Heidelberg, Heidelberg, Germany). These cells form spheres and are cultured in neurobasal-A medium (Gibco) with 2% of B27 neural supplement (Gibco), 2mM of L-glutamine (Gibco), 1% of Penicillin-Streptomycin (Sigma) and 20 ng/ml of each hEGF (Strahtmman AG) and bFGF (Millipore).

### ***Peptide***

Peptide was synthesized and purified by Peptide Specialty Laboratories GmbH by automatic peptide synthesis (Fmoc chemistry). The peptide corresponding to the TM sequence of Plexin-A1: TLPAIVGIGGGGLLLLLVIVAVLIAYKRK (in one-letter code, amino acid T<sup>1240</sup> to K<sup>1268</sup> according to Uniprot entry P70206) is referred as MTP-PlexA1. Peptides purity estimated by RP-HPLC was more than 90% according to manufacturer indication.

### ***Tissue Array***

Slides of human brain gliomas tissue arrays were obtained from US Biomax (BS17016a /GL2083a /GL806b /GL803a/CNS801). For immunocytochemical detection of Plexin A1, the paraffin sections (5 µm thickness) were de-waxed and rehydrated through 100 % Toluene (2 washes of 15 minutes) then 100 % alcohol (2 washes of 15 minutes), 95 % alcohol, 90 % alcohol, 70 % alcohol and water (1 wash 10 minutes respectively) then an antigen retrieval step was done in sodium citrate buffer (10 mM, pH=6, Sigma #CO759) 2x 10 min in the microwave. After incubation with blocking solution (PBS + 5 % FCS) for 20 minutes, the primary anti-Plexin-A1 antibody (Abcam, rabbit, ab32960-100) was added to the sections in blocking solution at 4°C overnight at a dilution of 1/100. An extensive washing was then completed (3x5 min in PBS) before incubation with the secondary antibody (Goat anti-rabbit, Vector Laboratories, #PI-1000) at a dilution of 1/200 in PBS for 1 hour at room temperature. The tissue was rinsed with PBS (3x5 minutes) and then the endogenous peroxidases were blocked with 1 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution (Sigma, #H1009) in methanol solution during 20 minutes. This later solution was washed out and amplification of the signal was achieved using the ABC peroxidase solution (Elit Vectastain kit, PK-6100). DAB was finally added (kit from

Vector laboratories). Lastly sections were dehydrated in 70 % alcohol, 90 % alcohol, 95 % alcohol, 100 % alcohol with rapid dips in each bath before final wash in toluene for 5 minutes and mounting in Eukitt (Sigma, #03989).

### ***Glioblastoma Biopsies***

Samples from patients diagnosed with glioblastoma were provided by the Neurosurgery service of Hautepierre hospital at Strasbourg. Total RNA was extracted after cell dissociation of human GBM surgical specimens immediately after resection. RNA of grade II Astrocytoma were purchased from Clinisciences (CR562205). To analyze the RNA level of Plexin-A1, RNA was extracted with TriReagent solution according to manufacturer's instruction (Molecular Research Center Inc., Euromedex). RNA was treated with DNase I (Invitrogen) and reverse transcribed using the High Capacity cDNA RT Kit (Life Technologies). Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (RTQ-PCR) was performed using the TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies) using the 7500 Real time PCR System (Life Technologies) following the manufacturer's protocol. TaqMan PlexA1 probe (Hs.432329) was used to quantify human PlexA1 mRNA. Samples were analyzed using 2 µl cDNA. All data were normalized to the GAPDH human reference gene using TaqMAN GAPDH probe (Hs99999905). The calculation of PlexA1 RNA quantity in the glioblastoma biopsies was effectuated as the following:  $\Delta ct(GBMx) = ct(PlexA1) - ct(GAPDH)$ , mRNA quantity =  $2^{-(\Delta ct(GB PlexA1))}$ . Each value was normalized by the  $2^{-(\Delta ct(Astrocytome II PlexA1))}$ .

### ***Retrospective Analysis of Plexin-A1 Expression in Human Gliomas***

For the "TCGA dataset" (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008), (Network, 2013), data were downloaded from the TCGA data portal (<https://tcga-data.nci.nih.gov/tcga/tcgaHome2.jsp>; NCI, USA). RMA normalized gene expression profiles measured with Affymetrix U133A arrays were used. Clinical annotations were available for 499 patients to perform KaplanMeier survival analyses.

For the "Rembrandt dataset" (Madhavan et al., 2009), data (raw CEL files, Affymetrix HG-U133\_Plus\_2 arrays) were downloaded from caArray (<https://caintegrator.nci.nih.gov/caintegrator/workspace.action>; NCI, USA) for 226 GBM and 28 controls. Raw data were RMA normalized using the Expression Console software (Affymetrix). In each cohort, GBM patients were stratified using the median value of *Plxna1* expression as a cutoff, using the *Plxna1* 221538\_s\_at probe set. GBM with a *Plxna1* expression above the median of expression in the cohort were assigned to the "highest *Plxna1*" group and conversely those with a *Plxna1* expression below the median to the "lowest *Plxna1*" group. A Kaplan-Meier survival analysis was then performed using the log-rank test to assess the significance of survival differences between the two groups (GraphPad Prism).

### ***Modeling of TM Interaction and MTP-PlexA1***

Coarse-grained molecular dynamics (CG-MD) simulations were used to investigate the dynamics of the association of several NRP1 and PLXA1 TM domains when embedded in a DOPC (1,2-di-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) lipid bilayer. The GROMACS software package (version 4.5.4) (Van Der Spoel et al., 2005), (Hess et al 2008) was used. The TM peptides, the lipids and the water CG particles were described with the MARTINI force-field version 2.1 (Marrink and Mark, 2004), (Marrink et al., 2007), (Monticelli et al., 2008). Images were created using the VMD software (Humphrey et al., 1996), (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd/>). A detailed procedure of the system setup and analysis is provided in supplementary method 1.

### ***Estimation Plexin-A1 dimerization (BACTH Method)***

A bacterial two-hybrid system based on the recombination of adenylate cyclase CyaA from *Bordetella pertussis* was used to measure both homo- and heterodimerization propensities of transmembrane domains of interest. The BACTH pKTN25 and pUT18 plasmids encoding for hybrid proteins containing a signal sequence followed by the different TMDs of interest and the T25 and T18 fragments of adenylate cyclase. Double transformation in BTH101 (*cya-*) *E. coli* cells, cell growth and induction, and beta-Galactosidase assay in 96-well arrays on a TECAN machine were performed as previously described (Battesti and Bouveret, 2012). Peptide sequences used in this study are summarized in supplementary (table 1).

### ***Biacore Interaction***

Binding experiments were performed by surface plasmon resonance measurements on a Biacore 2000 instrument (Biacore Inc.) at 20 °C. Streptavidin was immobilized at high surface densities (~9,000 response units) on an activated CM5 chip using standard amine-coupling procedures as described by the manufacturer. Briefly, streptavidin was injected at a concentration of 250 µg/ml in 20 mM sodium acetate (pH 4.5) at a flow rate of 5 µl/min until desired surface densities, measured in response units, were reached. Unreacted groups were blocked by injecting 1 M ethanolamine. To perform peptide-peptide interaction assays, biotinylated PlexA1 peptide and other peptides were diluted in a buffer containing 10 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.005 % (v/v) surfactant P20 and 3 mM LDAO to maintain peptides in solution. The biotinylated- NRP1 peptide was immobilized onto the sensor surface of a Biacore streptavidin sensor chip prior addition of the different interacting peptides injected at a flow rate of 5 µl/min. Blank surfaces were used for background corrections. Injections of 30µl 1M LDS were used to regenerate surfaces between two binding

experiments. We used steady state analysis to estimate kinetic parameters of peptide-peptide interaction.

### ***Proliferation Assay***

In vitro cell proliferation was monitored using MTT (3-(4,5 -Dimethylthiazol-2 -yl)-2,5-di phenyl tetrazolium bromide) proliferation assay according to manufacturer's instruction (Sigma, M2128, USA). Optical density was determined at 570 nm using an ELISA plate reader spectrophotometer (EL800, Bio-Tek Instruments). U373 MG, U118 MG and cells were seeded at a density of 10 000 cells per well in a 96 well plate, the cells were then incubated with increasing peptide concentration (ranging from  $10^{-8}$ M to  $10^{-6}$ M) or corresponding vehicle increasing concentration (LDS, ranging from 0.7  $\mu$ M to 720  $\mu$ M). Cell proliferation was evaluated after 24 h, the culture media were removed from the well and 100  $\mu$ l of MTT dye freshly diluted (to 1/50 in GBSS) from stock solution (5 mg/ml) was added to each well for 4 h. After this incubation period, isopropanol (100  $\mu$ l) was added to the MTT solution in each well before reading the optical density at 570 nm.

### ***Migration Assay***

Aggregates of U373MG and HMEC cells were prepared using the hanging drops technique as previously described (Nasarre et al., 2010). 15 to 30 micro aggregates were deposited on a glass coverslips covered with 20  $\mu$ l of chicken plasma (sigma ref P-3266) and 20  $\mu$ l of a Thrombin solution (480  $\mu$ l of GBSS + 20  $\mu$ l thrombin 10,000 U sigma ref T-4648). After 45 min coagulation, 2 ml of culture medium containing or not VEGF (100 ng/ml GF094 Millipore), MTP-PlexA1 AT  $10^{-7}$ M or both were added to the culture dishes. Micro aggregates were incubated for 15 h at 37°C. Quantification is done in blind condition to determine the ratio of aggregates with chain migration over total number of aggregates.

### ***Heterotopic Xenografts***

Experiments were performed according to the Guide for Care and Use of Laboratory Animals (E67-6-482-21) and the European Directive with approval of the regional ethical committee (Reference AL/55/62/02/13). Mice received food and water ad libitum. Animals were sacrificed using CO<sub>2</sub>. All necessary precautions were taken to minimize pain or discomfort of the animals. Heterotopic grafts were produced by injecting  $10^6$  cells in the flank of pathogen-free NMRI nude mice (Janvier, Le Genest Saint Isle, France) maintained in individual cages. For that, the mice, all females, were anesthetized in a Plexiglas box flushed with oxygen containing 3 % isoflurane, and then maintained anesthetized by 2 % isoflurane inhalation using a facial mask. The cell suspension was taken into a 1 ml syringe and transplanted in the flank of the mouse subcutaneously (100  $\mu$ l,  $10^6$  cells U373MG or U118MG). Intraperitoneal administration of LDS (72  $\mu$ M) for the control group or MTP-PlexA1  $10^{-7}$ M are done every

day during 7 or 20 days (for U373MG and U118MG-Luc respectively) when the tumors reached a minimal volume of 100 mm<sup>3</sup>. At the end of the protocol mice were sacrificed and tumors collected for weighting (U373MG) or processed for histological analysis (U118MG-Luc). For U118MG-Luc subcutaneous tumors, bioluminescence imaging was performed using the NightOWL LB 580 in vivo Imaging System every 5 days until the day of sacrifice.

NCH644mCh cells expressing the mCherry fluorescent protein driven by the CMV promoter were used to evaluate Plexin-A1 dependent tumor engraftment and development. We performed bilateral grafting of 10<sup>6</sup> cells on each flank of 20 nude mice without treatment or pre-incubated for 1 hour with MTP-PlexA1 at 10<sup>-7</sup> M. After 5 days, the fluorescence emission of developing tumors was recorded using the NightOwl system (Berthold) using appropriate emission and excitation filters (580 nm/ 620nm respectively).

### ***Immunostaining***

Tumors were frozen in liquid nitrogen and cut as 10 µm thick sections with a cryostat. The slides were first washed with PBS 1X5 min, then fixed with PFA 4 % during 20 min and permeabilized with Tween 0.02 % in blocking solution (PBS +5 % FCS) during 1 hour at room temperature (RT). Primary antibodies were incubated overnight at 4°C in blocking solution. We used antibodies recognizing CD31 (PECAM-1 mouse, BD-Pharmingen, cat: 55 0274) 1/50, PH3 (Millipore, 06-570) 1/200, Plexin-A1 (R&D MAB6536) 1/50. After thorough wash (3 washes of 5 minutes) secondary antibodies (donkey anti-rabbit or donkey anti-mouse, Jackson Immunoresearch 711-165-152 or 715-475-150 diluted 1/1000 from stock) was added at room temperature for 90 minutes. After washing in PBS, the cell nuclei were stained with DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole, 1/30000 in water) for 10 minutes. Glass coverslips were finally mounted on microscopy glass slides using a polymerization medium (FluorSave reagent, Calbiochem-Merck cat#345789).

Gliomaspheres were collected after 4 days of culture and immediately frozen at -80°C in OCT Tissue-Tek. Tissue-Tek blocks were then cut to obtain 10 µm thick sections. The same protocol was used to performed indirect immunocytochemistry using the specific human stem cell marker Nestin (Millipore AB5922) and the antibody recognizing Plexin-A1 (R&D MAB6536) 1/50.

Chorio-allantoic membrane was fixed with PFA 4 % during 1h and blocking was added during 1h

### ***Tube-like Formation Assay***

For in vitro angiogenesis assay using matrigel (Millipore, ECM625) HUVEC cells were seeded at 10000/well of a 96-well plate. These assays were performed using manufacturer's instructions. Anti-angiogenic effects were quantified by counting the numbers of intersections.

### ***Phosphorylation of VEGFR-2***

PathScan Phospho-VEGFR-2 (Tyr1175) Sandwich ELISA kit-Based from Cell Signaling technology was used to monitor levels of phosphorylated VEGFR-2. HUVEC cells were seeded into the wells of the 6-well plate at a density of 500 000 cells in 2ml of cell culture medium and serum starved overnight. The cells were then treated with either vehicle (LDS 72  $\mu\text{M}$ ) or MTP-PlexA1 peptide for 1h at  $10^{-7}\text{M}$ , then the cells were treated with VEGF165 at 100 ng/ml during 10 min. Hvegfr2 phosphorylation was assessed according to the manufacturer's instructions.

### ***Chick embryo Chorio-allantoic Membrane Assay***

The CAM assay was performed using Leghorn eggs. After 4 days incubation at 37°C, the shells were opened and the embryos were transferred to a Petri dish. The CAMs were grown for additional 4 days before deposition of silicone reservoirs in a region containing one large vessel. Reservoirs were filled with 20  $\mu\text{l}$  VEGF165 solution (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) or a combination of VEGF165 (20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) + MTP-PlexA1 ( $10^{-7}\text{M}$ ). After 24 h incubation, micro- photographs were taken for quantification of vessel growth. Camera lucida drawing was systematically performed to allow better counting of blood vessels and sprouting; the entire analysis being performed in blind conditions.

### ***Interaction between Nrp1 and Plexin-A1 Analysis***

To determine the number of interactions between Nrp 1 and Plexin-A1 we used the Duolink in Situ system from Olink Bioscience. In brief, U373MG cells were cultured on glass coverslips for 24h before fixation in 4 % formaldehyde for 10 min. Cells were then permeabilized with a solution of PBS+0.2 % Tween during 10min. Primary antibodies were incubated overnight at 4 °C, Plexin-A1 (R&D MAB6536)1/50 and Neuropilin 1 (recognizing the MAM domain, (Bagnard et al., 2001), (Bagnard et al., 2004)). Next steps were done according to the manufacturer's instructions.

### ***Rac Assay***

To monitor the impact of the MTP-PlexA1 on Rho GTPase signaling we performed the G-LISA Rac Activation Assay biochem Kit from Cytoskeleton, Inc. ( BK125). U373MG cells were seeded in 6-well plates at a density of 500 000 cells in 2 ml of cell culture media and serum starved overnight. The cells were then treated with either vehicle (LDS 72  $\mu\text{M}$ ) or MTP-PlexA1 peptide for 1h at  $10^{-7}\text{M}$  before incubation Semaphorin 3A (R&D, Recombinant Human Semaphorin 3A Fc Chimera, 1250-S3-025) during 30 min at 100 ng/ml. Following steps were done according to the manufacturer's instructions.

### ***Western blot and immunoprecipitation***

U373MG cells were seeded at a density of 600 000 cells per well in a 6-well plate and serum starved overnight. Before protein extraction, the cells were treated either with  $10^{-7}$ M of MTP-PlexA1 or Vehicle (LDS, 720  $\mu$ M) during 1h. Stimulation was done with Semaphorin 3A at 100 ng/ml 30min or VEGF at 100 ng/ml during 10min. After a rapid PBS wash, the protein sample preparation was completed with PBS + Triton 0.2 % supplemented with protease inhibitor (Roche, #11836145001) and 5 mM of Na orthovanadate. Immunoprecipitations were done with anti-human Plexin-A1 antibody (R&D, MAB6536),  $\mu$ MACS Protein G MicroBeads (Miltenyi biotec, 130-071-101) and matching micro-columns (Miltenyi biotec, 130-042-701). Following steps were done according to the manufacturer's instructions. Proteins were resolved in an 8 % SDS/PAGE gel and transferred onto a nitrocellulose membrane (Whatman). The blots were soaked in blocking solution (TBS/1 %tween/5 % milk) for 1h at RT. First antibodies (Rabbit anti-phospho-akt, Rabbit anti-akt, Cell Signaling #4060 and #9272 respectively) and mouse anti-tubulin  $\alpha$  (Cell Signaling #2144) were incubated overnight at 4°C. After several washes (3 times 5 minutes, TBS/tween 1 %), secondary antibodies (anti-rabbit-HRP, GE Healthcare, #NA934V and anti-mouse-HRP, GE Healthcare, #NXA931) were incubated 1h a RT in TBS/1 % tween /5 % milk. The revelation step was performed using streptavidin-biotinylated Horseradish Peroxidase complex (Amersham #RPN1051) according to the manufacturer instructions. Images of the immuno-blots were acquired and analyzed thanks to the GENE GNOME apparatus (Syngene Bio Imaging, UK).

### ***Sphere forming assay***

Cells were stained with an orange fluorescent dye (CMRA orange, Molecular Probe) to facilitate monitoring of individual cell and sphere counting. Cells were grown into a 96-well plate at a density of 30 cells per well containing 50  $\mu$ l of culture medium during 4 days. After this period, the sphere forming rate was established by counting the number of clonal colonies. Cellular edifices were considered as spheres only when composed of at least 8 cells. The sphere forming rate was calculated by dividing the number of sphere at day 4 per the real number of cells at day one in a given well.

### ***Statistics***

Statistical analyses were performed using Mann Whitney test (for sample  $n < 30$ ), Chi square analysis (for qualitative data) using GraphPad software (USA). P-values are given in the figure legends, and values of  $P < 0.05$  were considered to be statistically significant. Normal distribution of the values was checked using GraphPad software (USA). A minimum of three independent experiments was performed for in vitro assays (proliferation, migration, angiogenesis, VEGFR-2 phosphorylation, Rac Assay, CAM assay).

## References

- Aldape, K.D., Ballman, K., Furth, A., Buckner, J.C., Giannini, C., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., Jenkins, R.B., and James, C.D. (2004). Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *63*, 700–707.
- Arkipov, A., Shan, Y., Das, R., Endres, N.F., Eastwood, M.P., Wemmer, D.E., Kuriyan, J., and Shaw, D.E. (2013). Architecture and membrane interactions of the EGF receptor. *Cell* *152*, 557–569.
- Bagci, T., Wu, J.K., Pfannl, R., Ilag, L.L., and Jay, D.G. (2009). Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. *Oncogene* *28*, 3537–3550.
- Bagnard, D., Vaillant, C., Khuth, S.T., Dufay, N., Lohrum, M., Puschel, A.W., Belin, M.F., Bolz, J., and Thomasset, N. (2001). Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 3332–3341.
- Bagnard, D., Sainturet, N., Meyronet, D., Perraut, M., Mieke, M., Roussel, G., Aunis, D., Belin, M.F., and Thomasset, N. (2004). Differential MAP kinases activation during semaphorin3A-induced repulsion or apoptosis of neural progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *25*, 722–731.
- Ball, S.G., Bayley, C., Shuttleworth, C.A., and Kielty, C.M. (2010). Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochem. J.* *427*, 29–40.
- Binda, E., Visioli, A., Reynolds, B., and Vescovi, A.L. (2012). Heterogeneity of cancer-initiating cells within glioblastoma. *Front. Biosci. Sch. Ed.* *4*, 1235–1248.
- Bonavia, R., Inda, M.-M., Cavenee, W.K., and Furnari, F.B. (2011). Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network. *Cancer Res.* *71*, 4055–4060.
- Bottsford-Miller, J.N., Coleman, R.L., and Sood, A.K. (2012). Resistance and escape from antiangiogenesis therapy: clinical implications and future strategies. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *30*, 4026–4034.
- Broholm, H., and Laursen, H. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor neuropilin-1's distribution in astrocytic tumors. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* *112*, 257–263.
- Campos, B., Wan, F., Farhadi, M., Ernst, A., Zeppernick, F., Tagscherer, K.E., Ahmadi, R., Lohr, J., Dictus, C., Gdynia, G., et al. (2010). Differentiation therapy exerts antitumor effects on stem-like glioma cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 2715–2728.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* *455*, 1061–1068.
- Chen, J., Li, Y., Yu, T.-S., McKay, R.M., Burns, D.K., Kernie, S.G., and Parada, L.F. (2012). A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy. *Nature* *488*, 522–526.

- Cymer, F., and Schneider, D. (2010). Transmembrane helix-helix interactions involved in ErbB receptor signaling. *Cell Adhes. Migr.* *4*, 299–312.
- Daouti, S., Li, W., Qian, H., Huang, K.-S., Holmgren, J., Levin, W., Reik, L., McGady, D.L., Gillespie, P., Perrotta, A., et al. (2008). A selective phosphatase of regenerating liver phosphatase inhibitor suppresses tumor cell anchorage-independent growth by a novel mechanism involving p130Cas cleavage. *Cancer Res.* *68*, 1162–1169.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E., and Berendsen, H.J.C. (2005). GROMACS: fast, flexible, and free. *J. Comput. Chem.* *26*, 1701–1718.
- Ding, H., Wu, X., Roncari, L., Lau, N., Shannon, P., Nagy, A., and Guha, A. (2000). Expression and regulation of neuropilin-1 in human astrocytomas. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *88*, 584–592.
- Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., et al. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *45*, 228–247.
- Endres, N.F., Das, R., Smith, A.W., Arkhipov, A., Kovacs, E., Huang, Y., Pelton, J.G., Shan, Y., Shaw, D.E., Wemmer, D.E., et al. (2013). Conformational coupling across the plasma membrane in activation of the EGF receptor. *Cell* *152*, 543–556.
- Glinka, Y., and Prud'homme, G.J. (2008). Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J. Leukoc. Biol.* *84*, 302–310.
- Grossman, S.A., Ye, X., Piantadosi, S., Desideri, S., Nabors, L.B., Rosenfeld, M., Fisher, J., and NABTT CNS Consortium (2010). Survival of patients with newly diagnosed glioblastoma treated with radiation and temozolomide in research studies in the United States. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *16*, 2443–2449.
- Hamerlik, P., Lathia, J.D., Rasmussen, R., Wu, Q., Bartkova, J., Lee, M., Moudry, P., Bartek, J., Jr, Fischer, W., Lukas, J., et al. (2012). Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *J. Exp. Med.* *209*, 507–520.
- He, L., and Hristova, K. (2012). Physical-chemical principles underlying RTK activation, and their implications for human disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1818*, 995–1005.
- Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 997–1003.
- Heimberger, A.B., Hlatky, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R., and Aldape, K. (2005). Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 1462–1466.
- Holland, E.C. (2001). Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 120–129.

- Hota, P.K., and Buck, M. (2012). Plexin structures are coming: opportunities for multilevel investigations of semaphorin guidance receptors, their cell signaling mechanisms, and functions. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 69, 3765–3805.
- Hubert, P., Sawma, P., Duneau, J.-P., Khao, J., Hénin, J., Bagnard, D., and Sturgis, J. (2010). Single-spanning transmembrane domains in cell growth and cell-cell interactions: More than meets the eye? *Cell Adhes. Migr.* 4, 313–324.
- Humphrey, W., Dalke, A., and Schulten, K. (1996). VMD: visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* 14, 33–38, 27–28.
- Jain, R.K., di Tomaso, E., Duda, D.G., Loeffler, J.S., Sorensen, A.G., and Batchelor, T.T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat. Rev. Neurosci.* 8, 610–622.
- Khalifa, N.B., Van Hees, J., Tasiaux, B., Huysseune, S., Smith, S.O., Constantinescu, S.N., Octave, J.-N., and Kienlen-Campard, P. (2010). What is the role of amyloid precursor protein dimerization? *Cell Adhes. Migr.* 4, 268–272.
- Kigel, B., Rabinowicz, N., Varshavsky, A., Kessler, O., and Neufeld, G. (2011). Plexin-A4 promotes tumor progression and tumor angiogenesis by enhancement of VEGF and bFGF signaling. *Blood* 118, 4285–4296.
- Li, E., and Hristova, K. (2010). Receptor tyrosine kinase transmembrane domains: Function, dimer structure and dimerization energetics. *Cell Adhes. Migr.* 4, 249–254.
- Liu, L., Bäcklund, L.M., Nilsson, B.R., Grandér, D., Ichimura, K., Goike, H.M., and Collins, V.P. (2005). Clinical significance of EGFR amplification and the aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 83, 917–926.
- Madhavan, S., Zenklusen, J.-C., Kotliarov, Y., Sahni, H., Fine, H.A., and Buetow, K. (2009). Rembrandt: helping personalized medicine become a reality through integrative translational research. *Mol. Cancer Res. MCR* 7, 157–167.
- Manolios, N., Ali, M., and Bender, V. (2010). T-cell antigen receptor (TCR) transmembrane peptides: A new paradigm for the treatment of autoimmune diseases. *Cell Adhes. Migr.* 4, 273–283.
- Marrink, S.-J., and Mark, A.E. (2004). Molecular view of hexagonal phase formation in phospholipid membranes. *Biophys. J.* 87, 3894–3900.
- Marrink, S.J., Risselada, H.J., Yefimov, S., Tieleman, D.P., and de Vries, A.H. (2007). The MARTINI force field: coarse grained model for biomolecular simulations. *J. Phys. Chem. B* 111, 7812–7824.
- Monticelli, L., Sorin, E.J., Tieleman, D.P., Pande, V.S., and Colombo, G. (2008). Molecular simulation of multistate peptide dynamics: a comparison between microsecond timescale sampling and multiple shorter trajectories. *J. Comput. Chem.* 29, 1740–1752.
- Müller, M.W., Giese, N.A., Swiercz, J.M., Ceyhan, G.O., Esposito, I., Hinz, U., Büchler, P., Giese, T., Büchler, M.W., Offermanns, S., et al. (2007). Association of axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* 121, 2421–2433.

Nasarre, C., Roth, M., Jacob, L., Roth, L., Koncina, E., Thien, A., Labourdette, G., Poulet, P., Hubert, P., Crémel, G., et al. (2010). Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth in vivo. *Oncogene* 29, 2381–2392.

Network, T.C.G.A.R. (2013). Corrigendum: Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 494, 506.

Norden, A.D., Drappatz, J., and Wen, P.Y. (2009). Antiangiogenic therapies for high-grade glioma. *Nat. Rev. Neurol.* 5, 610–620.

Nussenbaum, F., and Herman, I.M. (2010). Tumor angiogenesis: insights and innovations. *J. Oncol.* 2010, 132641.

Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2005). Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 109, 93–108.

Osada, H., Tokunaga, T., Nishi, M., Hatanaka, H., Abe, Y., Tsugu, A., Kijima, H., Yamazaki, H., Ueyama, Y., and Nakamura, M. (2004). Overexpression of the neuropilin 1 (NRP1) gene correlated with poor prognosis in human glioma. *Anticancer Res.* 24, 547–552.

Pallini, R., Ricci-Vitiani, L., Montano, N., Mollinari, C., Biffoni, M., Cenci, T., Pierconti, F., Martini, M., De Maria, R., and Larocca, L.M. (2011). Expression of the stem cell marker CD133 in recurrent glioblastoma and its value for prognosis. *Cancer* 117, 162–174.

Prud'homme, G.J., and Glinka, Y. (2012). Neuropilins are multifunctional coreceptors involved in tumor initiation, growth, metastasis and immunity. *Oncotarget* 3, 921–939.

Reardon, D.A., Turner, S., Peters, K.B., Desjardins, A., Gururangan, S., Sampson, J.H., McLendon, R.E., Herndon, J.E., 2nd, Jones, L.W., Kirkpatrick, J.P., et al. (2011). A review of VEGF/VEGFR-targeted therapeutics for recurrent glioblastoma. *J. Natl. Compr. Cancer Netw. JNCCN* 9, 414–427.

Rohm, B., Ottemeyer, A., Lohrum, M., and Püschel, A.W. (2000). Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech. Dev.* 93, 95–104.

Roodink, I., and Leenders, W.P.J. (2010). Targeted therapies of cancer: angiogenesis inhibition seems not enough. *Cancer Lett.* 299, 1–10.

Rosen, J.M., and Jordan, C.T. (2009). The increasing complexity of the cancer stem cell paradigm. *Science* 324, 1670–1673.

Roskoski, R., Jr (2007). Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 62, 179–213.

Roth, L., Nasarre, C., Dirrig-Grosch, S., Aunis, D., Crémel, G., Hubert, P., and Bagnard, D. (2008). Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Mol. Biol. Cell* 19, 646–654.

Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., et al. (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132

mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *27*, 4150–4154.

Sigalov, A.B. (2010). New therapeutic strategies targeting transmembrane signal transduction in the immune system. *Cell Adhes. Migr.* *4*, 255–267.

Sliwkowski, M.X., and Mellman, I. (2013). Antibody therapeutics in cancer. *Science* *341*, 1192–1198.

Sundqvist, A., Zieba, A., Vasilaki, E., Herrera Hidalgo, C., Söderberg, O., Koinuma, D., Miyazono, K., Heldin, C.-H., Landegren, U., Ten Dijke, P., et al. (2013). Specific interactions between Smad proteins and AP-1 components determine TGF $\beta$ -induced breast cancer cell invasion. *Oncogene* *32*, 3606–3615.

Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L.H., Murakami, Y., Kalb, R.G., Fujisawa, H., and Strittmatter, S.M. (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* *99*, 59–69.

Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G.I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M.L., Goodman, C.S., Poo, M., et al. (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* *99*, 71–80.

Tisato, V., Zauli, G., Voltan, R., Giancesini, S., di Iasio, M.G., Volpi, I., Fiorentini, G., Zamboni, P., and Secchiero, P. (2012). Endothelial cells obtained from patients affected by chronic venous disease exhibit a pro-inflammatory phenotype. *PloS One* *7*, e39543.

Turner, L.J., Nicholls, S., and Hall, A. (2004). The activity of the plexin-A1 receptor is regulated by Rac. *J. Biol. Chem.* *279*, 33199–33205.

Ulmer, T.S. (2010). Structural basis of transmembrane domain interactions in integrin signaling. *Cell Adhes. Migr.* *4*, 243–248.

Visvader, J.E., and Lindeman, G.J. (2012). Cancer stem cells: current status and evolving complexities. *Cell Stem Cell* *10*, 717–728.

Welti, J., Loges, S., Dimmeler, S., and Carmeliet, P. (2013). Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J. Clin. Invest.* *123*, 3190–3200.

West, D.C., Rees, C.G., Duchesne, L., Patey, S.J., Terry, C.J., Turnbull, J.E., Delehedde, M., Heegaard, C.W., Allain, F., Vanpouille, C., et al. (2005). Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem.* *280*, 13457–13464.

Yu, Y., Ramena, G., and Elble, R.C. (2012). The role of cancer stem cells in relapse of solid tumors. *Front. Biosci. Elite Ed.* *4*, 1528–1541.

Zhao, X., Chen, L., Xu, Q., and Li, Y. (2007). [Expression of Plexin A1 in gastric carcinoma and its relationship with tumor angiogenesis and proliferation]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi Chin. J. Gastrointest. Surg.* *10*, 265–268.

## Figures legends

### Figure 1:

Plexin A1 is a good prognostic marker of human glioma severity.

(A) PlexinA1 gene expression correlates with poor survival for GBM patients. (A) TCGA, and (B) Rembrandt Kaplan Meier curves indicating survival of patients. For each dataset, patients were stratified using the median value of *Plxn1* expression. The log-rank test was used to assess the significance of survival differences. (C) Representative microphotographs illustrating the expressing of Plexin A1 in different human glioma samples. Black boxes show higher magnification of each picture, scale bar: 40  $\mu$ m. (D) Quantification of Plexin-A1 expression according to the grade of the tumor, Ast I= Astrocytoma grade I, Ast II= Astrocytoma grade II, Astrocytoma grade III, GBM= Glioblastoma. P-values are determined by t-test, \*P < 0.05; \*\*P < 0.001; \*\*\*P < 0.0001. (E) RT-qPCR expression of Plexin-A1 in 8 GBM biopsies. Plexin-A1 expression is normalized to the expression of grade III Astrocytoma (ast II) sample.

### Figure 2:

Coarse grain molecular dynamic simulations in DOPC artificial membrane of NRP1 and PlexA1 TMD interaction. The graphs represent the inter helix distance between two monomers as a function of time. Contact maps exhibit the residue pairs (key interfacing residues) having the smallest distances between two helices backbones. The red squares correspond to the closest distances  $0.5 \text{ nm} < d < 0.6 \text{ nm}$  and the blue squares correspond to the longest distances ( $d > 1 \text{ nm}$ ). The yellow, green and light blue squares correspond to intermediate distances  $0.6 < d < 0.7, 0.8, 0.9 \text{ nm}$ .

Top: CG simulation including 2 NRP1 and 1 PlexA1 TMDs. (A) Homodimer TMD1 NRP1-TM2 Nrp1; (B) Heterodimer TMD2 NRP1-TMD3 PlexA1; (C) heterodimer TMD1 NRP1-TMD3 PlexA1. Middle: CG simulation including 1 NRP1 and 2 PlexA1 TMD. (D) Heterodimer TMD1 NRP1-TMD2 PlexA1; (E) Heterodimer TMD1 NRP1-TMD3 PlexA1; (F) Homodimer TMD2 PlexA1-TMD3 PlexA1. Bottom: (G) A scenario of TMD helix association illustrating the dynamics of the interactions between 3 NRP1 TMs and 3 PlexA1 TMDs inserted in DOPC during along 72  $\mu$ s.

### Figure 3:

3D Molecular model of PlexA1/NRP1 trimers. Key interfacing residues depicted on the contact maps (Figure 2) are highlighted in bead representations with a color code (Glycin in white, Metionin in Yellow, Alanin in blue and Leucin in pink). The NRP1 TM monomers are figured in red. The PlexA1 TM monomers are figured in orange or in yellow. (A) Trimer of 2 NRP1 TM domains and 1 PlexA1 TM domain (B) Trimer of 1 NRP1 TM domain, 2 PlexA1 TM domains.

### Figure 4:

The transmembrane domain of Plexin-A1 is able to interact with others transmembrane sequences.

(A) Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System demonstrating the positive homo- or hetero dimerization of MTP-PlexA1 with the transmembrane domain of putative co-receptors. The intensity of dimerization is proportional to the Beta galactosidase activity (AU). Zip sequence is the positive control of dimerization and Empty is the negative control of dimerization. Nrp1: Neuropilin1; PlexA1, A2, A3, A4: Plexin A1, A2, A3 and A4.

(B) Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System demonstrating the negative hetero dimerization of MTP-PlexA1. PlexB1: Plexin B1; cMET: Hepatocyte growth factor; VEGFR-1, 2, 3: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1, 2 and 3; Gpa: Glycophorine A; HER2: Human Epidermal Growth Factor Receptor-2; Int $\beta$ 1: Integrin  $\beta$ 1 are the TM sequences of different receptors

(C) Surface plasmon resonance assay (Biacore) to quantify of MTP-PlexA1 interactions with other transmembrane domains mimicking peptides. Interaction intensity is measured on resonance unit (RU). Different TM sequences are tested: PlexA1: Plexin A1; Nrp1: neuropilin 1; VEGFR2: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2.

**Figure 5:**

MTP-PlexA1 decreases Plexin A1 interaction capacities. (A) Duolink system showing that MTP-PlexA1 (10-7M) decreases the number of PlxA1-NRP1 interactions in U373 MG cells. \*P< 0.05. (B) Immunoprecipitation of Plexin A1 in U373 MG stimulated with Vehicle (LDS 72  $\mu$ M), SemA3A (100 ng/ml) or SemA3A + MTP-PlexA1 (10-7M). Left part: revelation of Plexin A1. Right part: revelation of Nrp1. (C) Immunoprecipitation of Plexin-A1 in U373 MG stimulated with Vehicle (LDS 72  $\mu$ M), VEGF (100 ng/ml) or VEGF+ MTP-PlexA1 (10-7M). Left part: revelation of Nrp1. Right part: revelation of Plexin-A4.

**Figure 6:**

MTP-PlexA1 decreases the transduction signaling triggered by semaphorin 3A and VEGF. (A) MTP-PlexA1 impacts RAC activation induced by 100 ng/ml of semaphorin 3A in U373 MG cells. \*\*P< 0.001. (B) Phosphorylated Akt, total Akt and tubulin are measured by WB on U373 treated by vehicle (LDS 72 $\mu$ M), semaphorin 3A (100 ng/ml) or semaphorin 3A + MTP-PlexA1 (10-7M). Graph shows quantification of the % p-Akt/Akt in different conditions. \*\*\*P< 0.0001. (C) MTP-PlexA1 decreases VEGFR-2 phosphorylation induced by VEGF (100 ng/ml) in HUVEC cells. \*P< 0.05, \*\*P< 0.001.

**Figure 7:**

MTP-PlexA1 impact in endothelial cells migration in vitro. (A) Microphotographs illustrating the expression of Plexin-A1 in vascular-like structures in human glioma tissues. Scale bar: 40  $\mu$ m. (B) Demonstration of the MTP-PlexA1 anti angiogenic effect, after 5h, at 10-7M, when growing HUVEC cells on matrigel. \*\*P< 0.001. (C) Impedance curve representative the impact of MTP-PlexA1 on HUVEC migration induced by the VEGF (100ng/ml) measured by Xelligence system. Graph represents the slope of the different impedance curves. \*\*\*P< 0.0001. (D) Demonstration of the capacity of MTP-PlexA1 (10-7M) to block the VEGF (100ng/ml) induced migration of HMEC cells aggregates growing in 3D plasma clot. \*P< 0.05, \*\*P<0.001.

**Figure 8:**

MTP-PlexA1 decreases on angiogenesis in vivo. (A) Microphotographs illustrating the expression of Plexin-A1 in blood vessels of the chicken chorioallontoic membrane. Scale bar: 40 $\mu$ m. (B) Microphotographs and camera lucida drawing of representative field of observations after 24h incubation with VEGF (100 ng/ml) or VEGF + MTP-PlexA1 (10-7M).

(C) Number of new blood vessels on CAM assay are quantified and represented on box whisker. \*P< 0.05.

**Figure 9:**

MTP-PlexA1 inhibits growth of U373MG cell line. (A) Demonstration of the dose-dependent anti-proliferative effect of MTP-PlexA1 after 24h on human glioma cells line U373MG. \*\*\*P< 0.0001. (B) Demonstration of the capacity of MTP-PlexA1 (10-7M) to block the migration of U373MG induced by VEGF (100ng/ml) from cell aggregates growing in a 3D cultured plasma clot matrix. \*P< 0.05, \*\*P< 0.001. (C) Waterfall graph representing the percent change in tumor volume of individual treated animals (grey bars, n=8) compared to the average tumor volume increased determined in the control group (dark bar, n=10) J7/J1. 100 % of the treated animals responded to the treatment with 37, 5 % stable disease and 62,5 % partial response. (D) Box whisker representation of final tumor weight of U373MG. \*\*\*P< 0.001.

**Figure 10:**

MTP-PlexA1 inhibits tumor growth U118MG cell line. (A) Demonstration of the dose-dependent anti-proliferative effect of MTP-PlexA1 after 24h in human glioma cell lines U118MG. \*\*P< 0.001, \*\*\*P< 0.0001. (B) Representative photographs illustrating the kinetic of tumor growth over 20 days in the two experimental groups. (C) Cumulated growth curves of the subcutaneous graft of U118MG Luc). Each time point is divided by the value of the first day of acquisition. Mice were treated with intraperitoneal injection of vehicle (72  $\mu$ M) and MTP-PlexA1 (10-7M) 3 times per week. Luminescence acquisition was done every 5 day (UA: Arbitrary Unit). (D) Final time point of the cumulated growth curves shows significant differences in treated group MTP-PlexA1 (10-7M).\*\*\*P< 0.0001, (CPS: Count Per Second. (E) Waterfall graph representing the percent change in tumor volume of individual treated animals (grey bars, n=10) compared to the average tumor volume increased determined in the control group (dark bar, n=10). This demonstrates that 80% of the treated animals responded to the treatment with a partial response (> 30 % decrease).

**Figure 11:**

MTP-PlexA1 inhibits tumor cell proliferation and angiogenesis in vivo. (A) Representation microphotographs of PH3 staining in subcutaneous U118MG tumors. (B) Box whisker of proliferative index per tumor, defined as number of PH3 positive cells per 0.1mm<sup>2</sup> of tumor. \*\*P< 0.05. (C) Representation microphotographs of CD31 staining in subcutaneous U118MG tumors. (D) Box whisker graph reflecting the quantification of % CD31 per  $\mu$ m<sup>2</sup> of tumors. \*P< 0.05.

**Figure 12**

MTP-PlexinA1 inhibits cancer stem cells-dependent tumor growth.(A) Representative microphotographs of Nestin (green), PlexA1 (red) and merge (yellow) immunostaining in NCH644 glioma spheres. (B) RT-qPCR expression of Plexin-A1 in normal brain, Ast II: Astrocytoma II and NCH644. (C) Demonstration of the reduction of the sphere formation rate

on PlexA-1 (10-7M) treated condition compared to vehicle (72μM), \*\*\*P = 0,0005. (D) Representative photographs illustrating the tumor growth after 5 days. Black circles highlighted vehicle (72μM) treated GSC; white circle highlighted PlexA1 (10-7M) treated GSC. (E) Quantitation of the number of detectable NCH644cherry tumors, \*\*P = 0,0075 .

## Supplemental methods

### *System setup*

NRP1 and PlexA1 TMD sequences were taken from the native potential sequences given in the Uniprot database (<http://www.uniprot.org/>). The length of the TM domains was adjusted in order to design a 28 amino acid sequence by adding a few residues on each side. For the sake of clarity, the TMD sequences have been re-numbered 1 to 28. The CG helical structures of the TM domains were modeled as ideal helices and were considered electrically neutral.

Three bilayer systems (2 trimers and one hexamer) were prepared. One is composed of 3 TMDs including 2 NRP1 TMDs and 1 PlexA1 TMD, a second one is composed of 3 TMDs including 1 NRP1 TM and 2 PlexA1 TMs. The third one includes 3 NRP1 TMs and 3 PlexA1 TMs.

The TMD peptides were inserted in a large equilibrated bilayer including DOPC (1,2-di-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine) initially built from the initial pre-equilibrated DOPC bilayer taken from the MARTINI web site (<http://md.chem.rug.nl/cgmartini/>). The X, Y, Z dimensions of the bilayer were 18.7, 19.2, 9.8 nm respectively and contained 1068 lipids and 15460 water molecules.

For these three systems, the peptides were inserted in a parallel manner, the helical axis being parallel to the bilayer normal (Z axis). Each peptide was randomly rotated about the helix axis thus leading to a random orientation of GxxxG motifs of one monomer relative to the other ones. During lipid insertion a small number of lipids and water molecules (a few tens depending on the systems) were removed from the sites of peptide insertion. Within the bilayer, the initial distance between the TMD peptides is about 6 nm from each other.

Each of these initial systems was energy minimized and equilibrated before performing MD simulations at 300K. The temperature was coupled to a thermostat using a time constant of 1 ps applied separately to the peptides, the lipids and the water groups using a Berendsen algorithm (Berendsen et al., 1984). The pressure was coupled using a semi-isotropic scheme (lateral and perpendicular pressures being coupled independently at 1 bar with a coupling time of 0.5 ps and a compressibility of  $4.5 \times 10^{-5}$  bar<sup>-1</sup>). A time step of 0.040 ps was used for the production step. Lennard Jones and Coulombic interactions were shifted to zero between 0.9 and 1.2 nm and 0.0 and 1.2 nm respectively. These same conditions were applied for the 1  $\mu$ s equilibration of the pure DOPC bilayer.

The duration of the simulations differ depending of the system studied and the simulation time was sufficiently long to observe a stable assembly of the peptides. Simulations were stopped when stable aggregates were observed. Then, simulation 1 (trimer 2 NRP1 TMDs + 1 PlexA1 TMD), simulation 2 (trimer 1 NRP1 + 2 PlexA1 TMDs) and simulation 3 (hexamer 3 NRP1 TMDs + 3 PlexA1 TMDs) were performed over 18  $\mu$ s, 40  $\mu$ s and 72  $\mu$ s respectively.

### ***System analyses***

Analyses were performed using tools provided in the Gromacs package (Van Der Spoel et al., 2005), (Hess et al., 2008). Inter-helix distances (distance between the center of mass of the helix backbones and inter-helix contact distances (minimal distance between the helix backbones) were calculated. An associated state of TM helices corresponds to a contact distance less than 0.5 nm. The longest period of an associated state was chosen to calculate the contact matrices representing, on average the smallest distances between the backbone beads of the residue pairs. Helix-helix interfaces were then extracted from the contact matrices.

In addition, RMSD (Root Mean Square Deviation) matrices, which compare all the conformations generated during the simulations, were calculated to identify the periods of the simulation during which the associated state of TM helices is well stabilized (RMSD value less than 0.3 nm).

### **Supplemental figures**

#### ***Supplementary table 1:***

Sequences of the peptides evaluated in the BACTH assay.

#### ***Supplementary figure 1:***

(A) Microphotographs illustrating the expression of Plexin-A1 in vascular-like structures in brain during development (E12 and E18). Black arrow heads highlight blood vessels. Scale bar : 40 $\mu$ m (B) Microphotograph illustrating the lack of Plexin-A1 expression in vascular-like structures in adult brain. Black arrow heads highlight blood vessels. Scale bar : 40 $\mu$ m

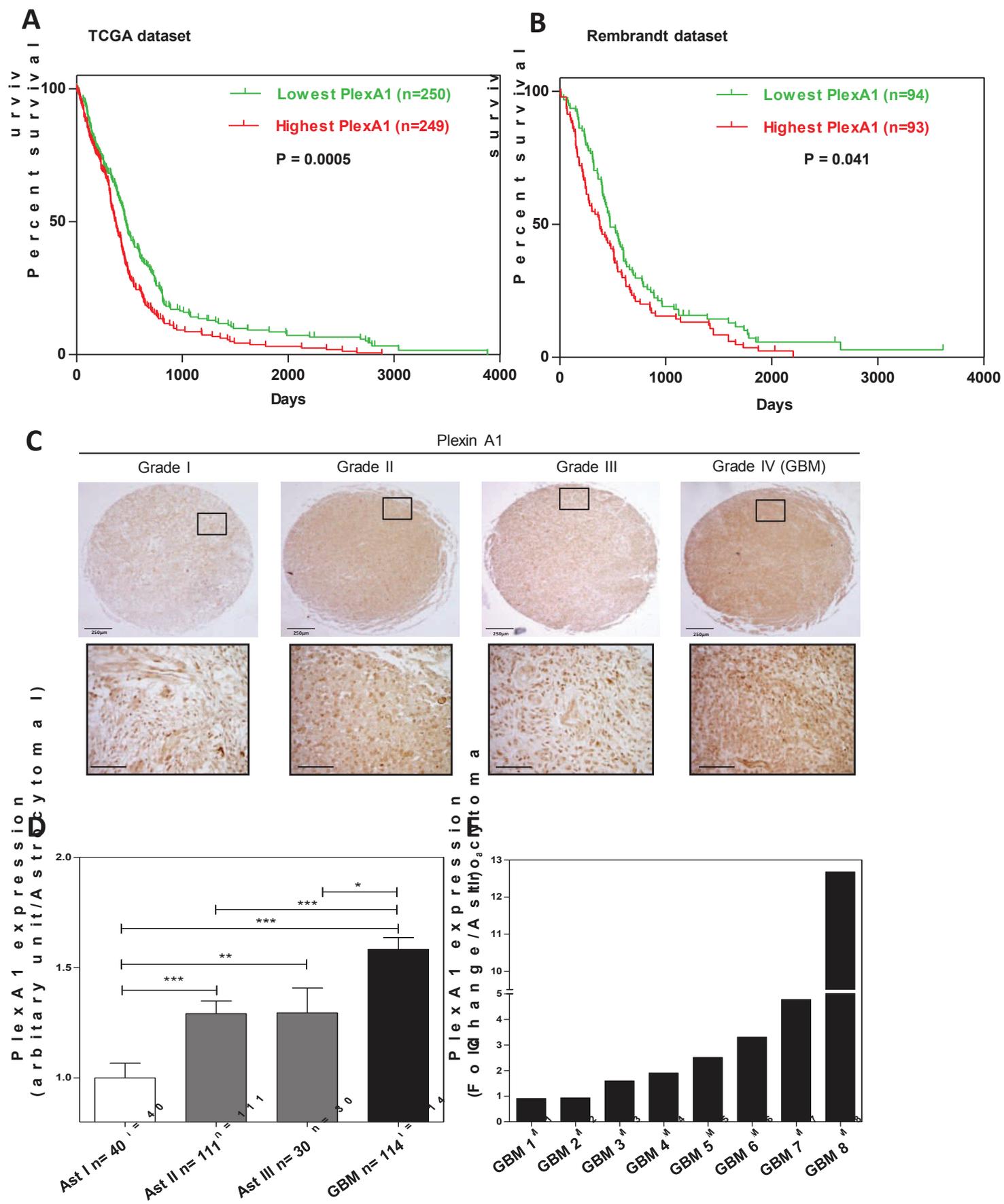


Figure 1:

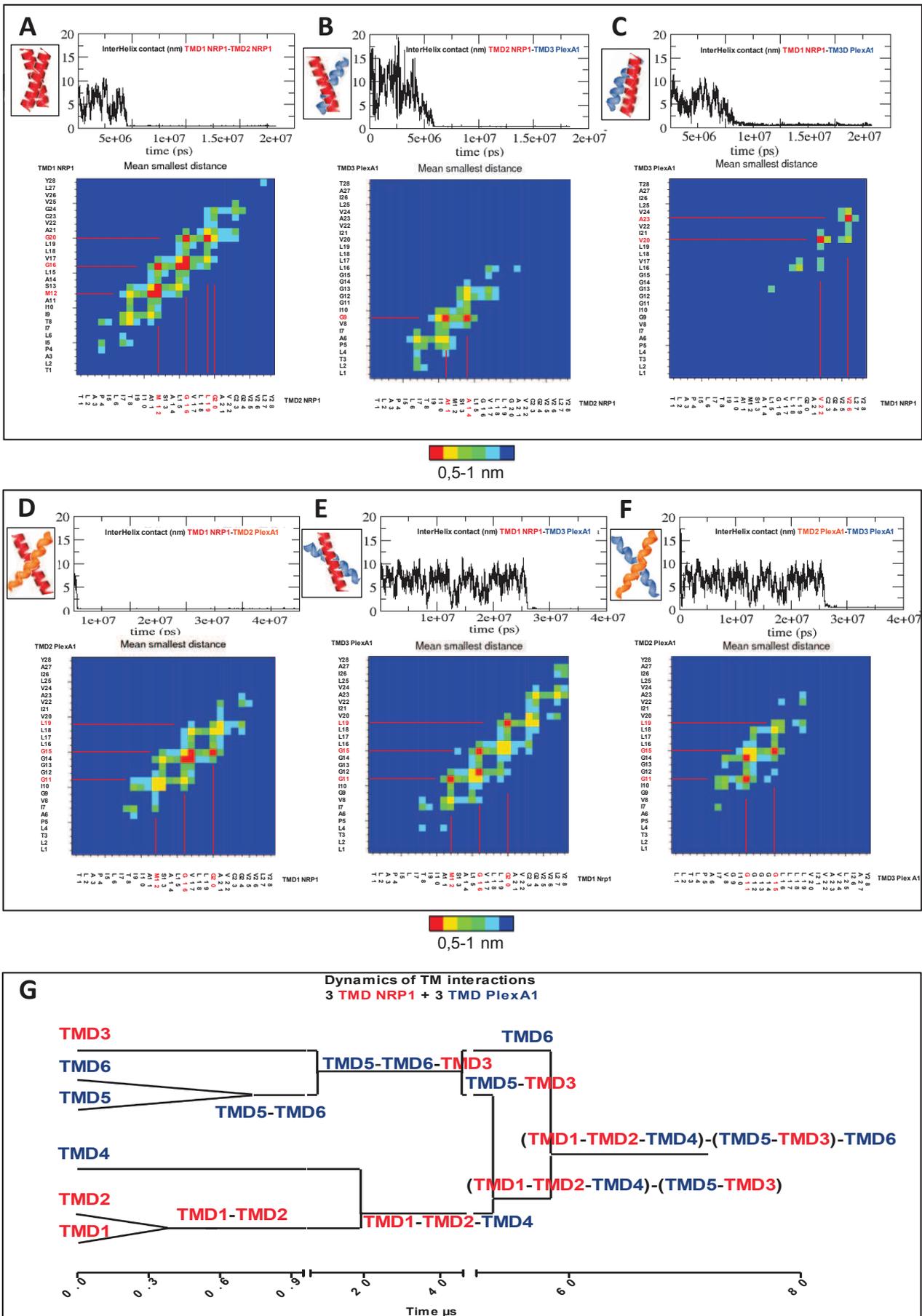
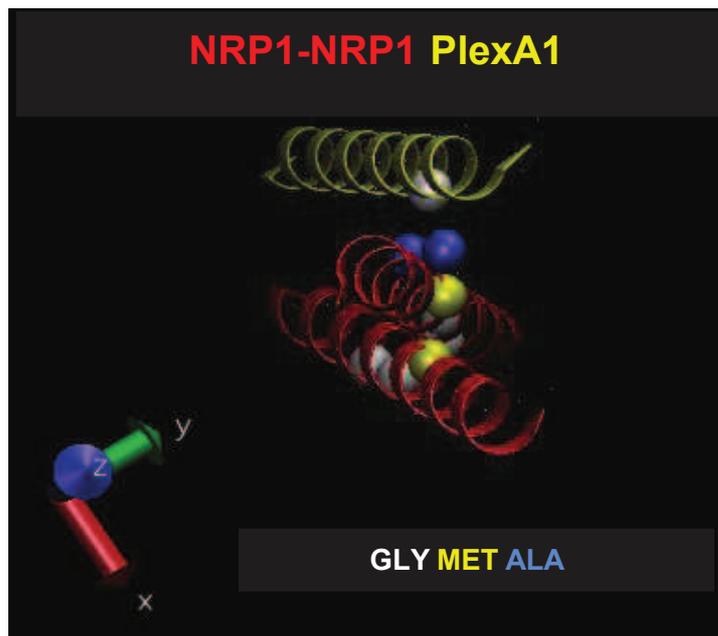


Figure 2:

A



B

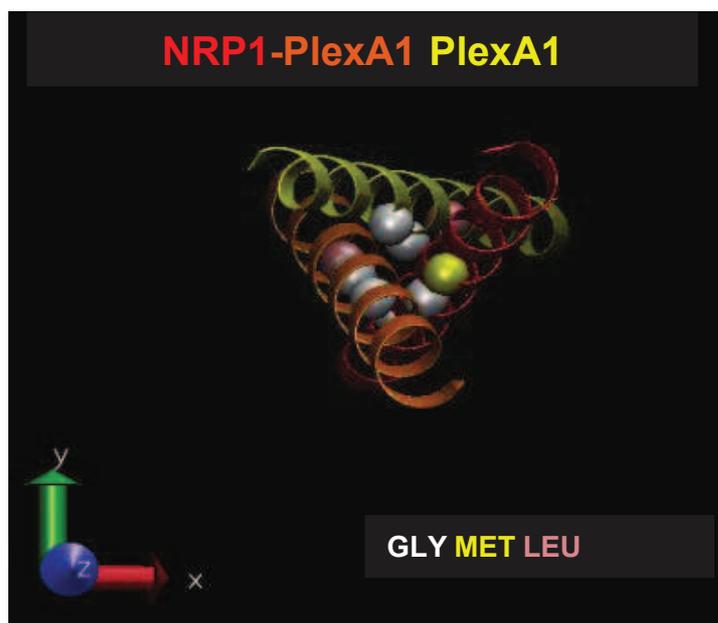


Figure 3:

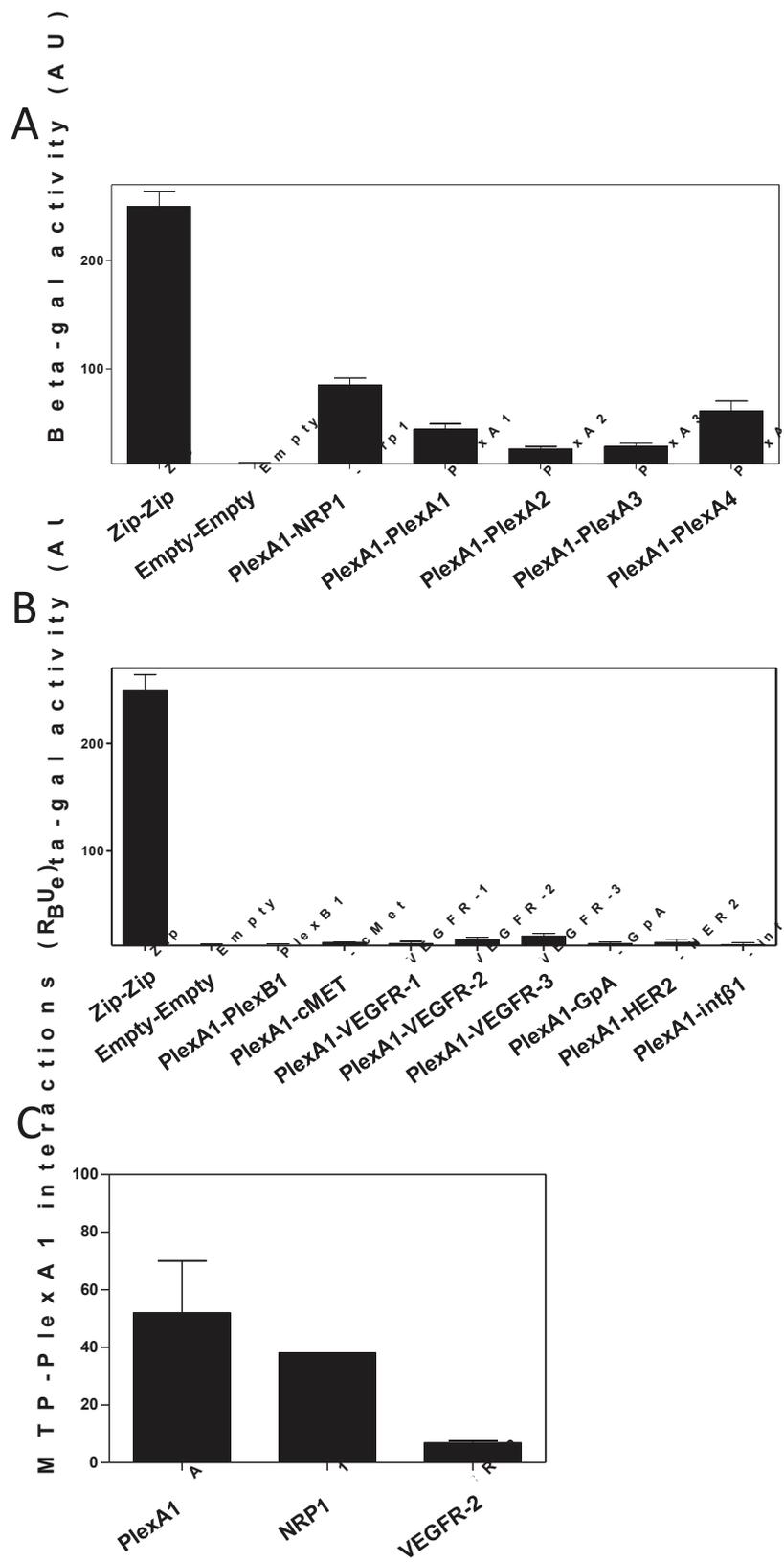


Figure 4:

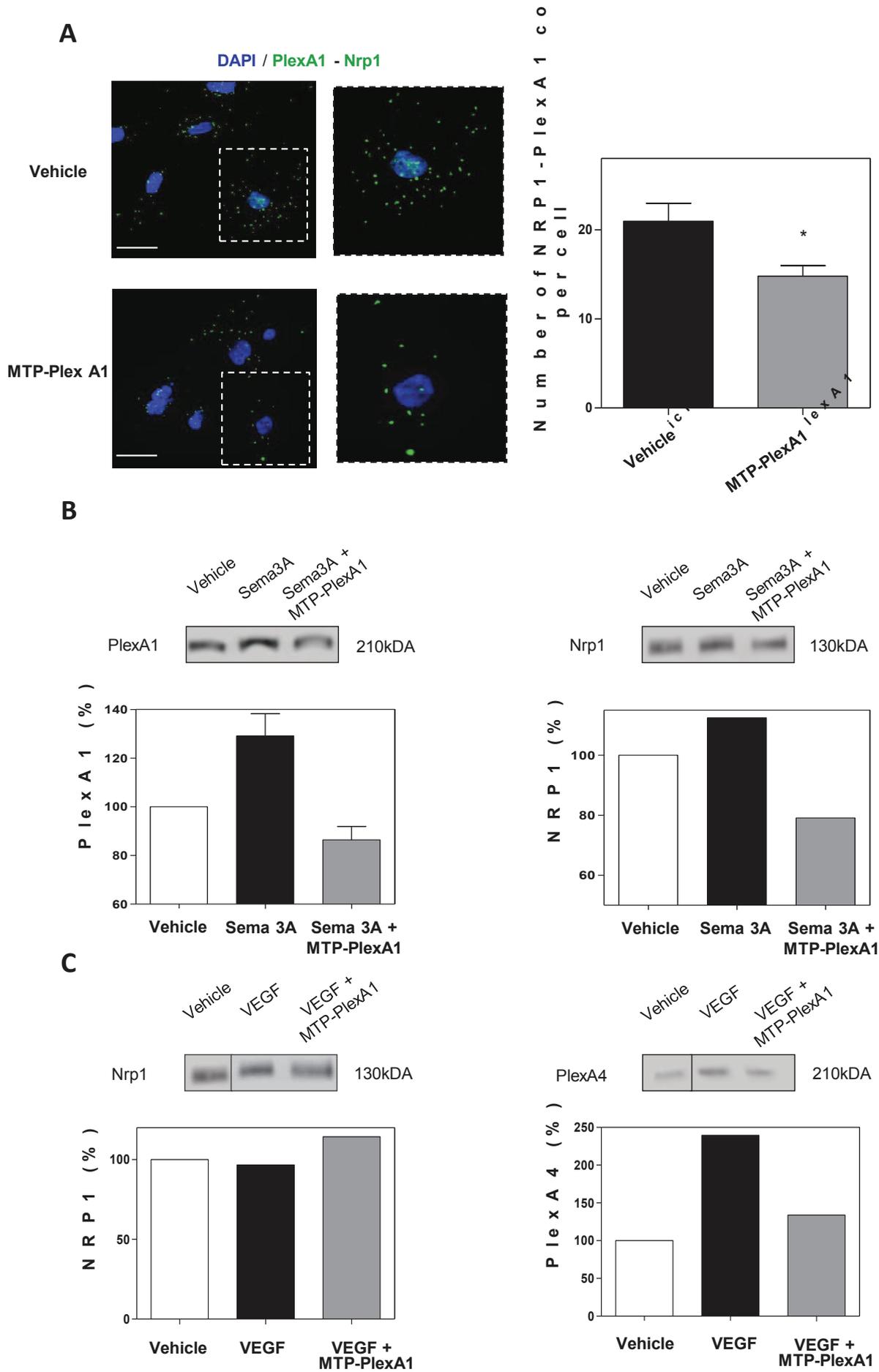


Figure 5:

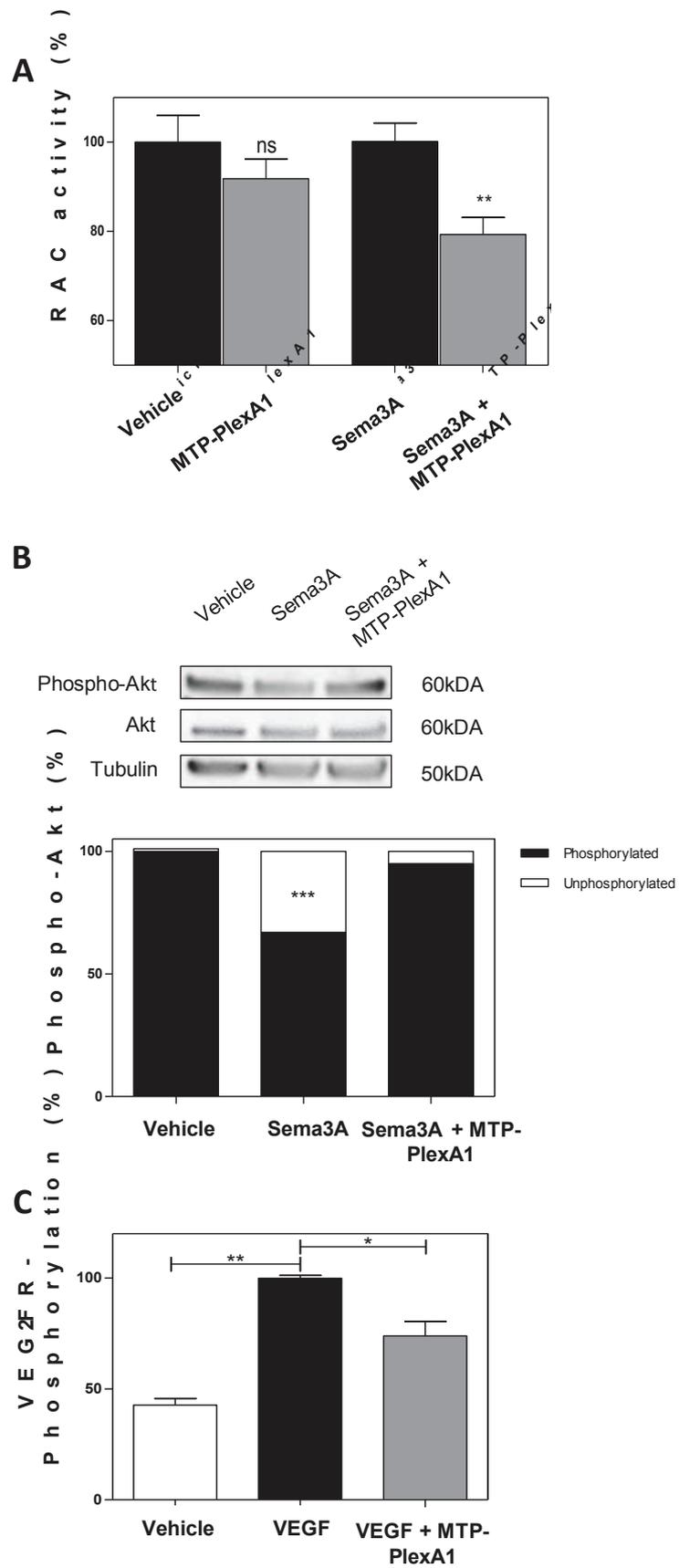


Figure 6:

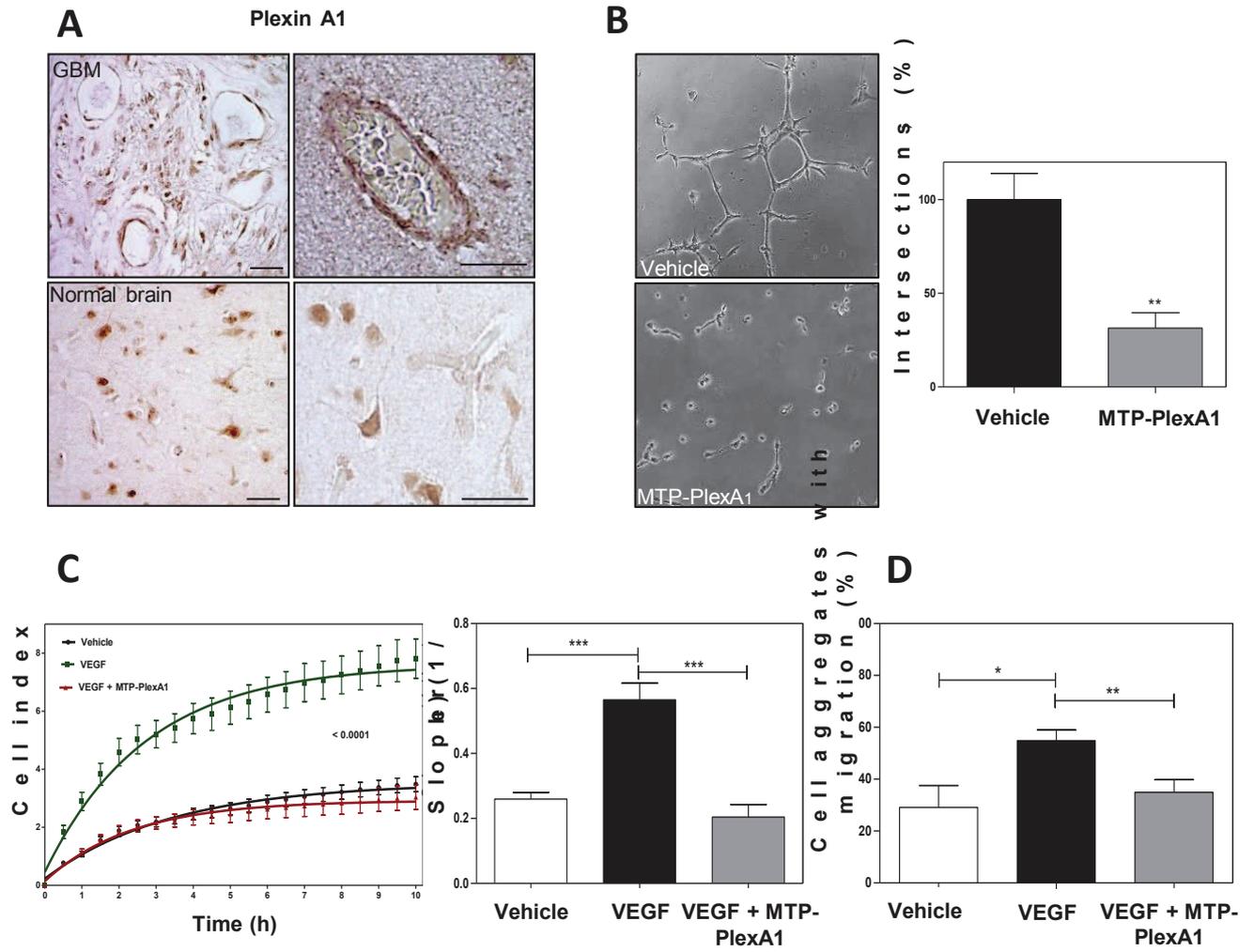


Figure 7:

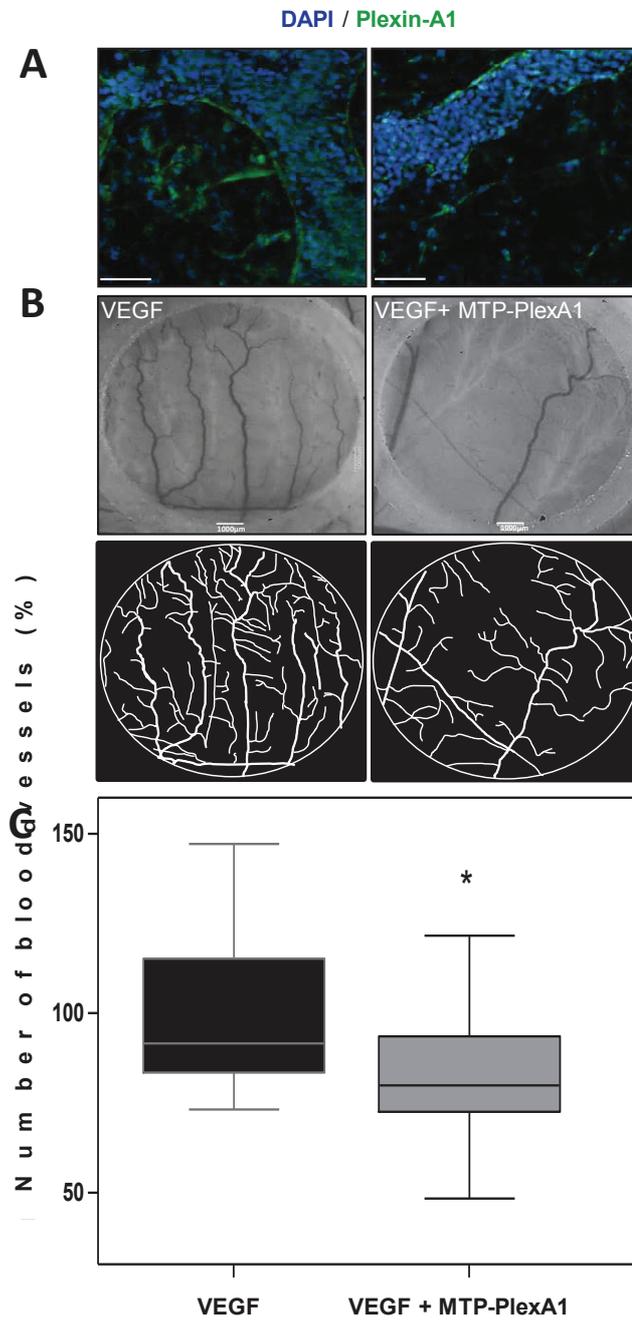


Figure 8:

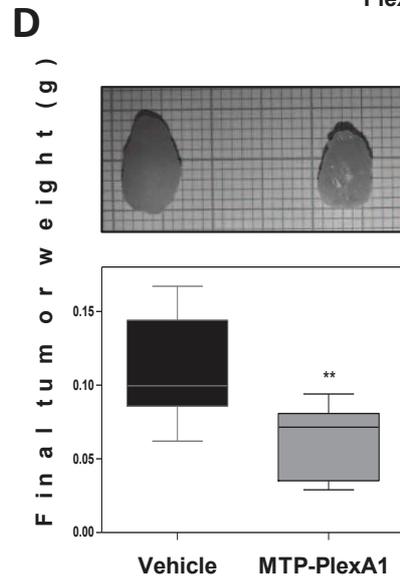
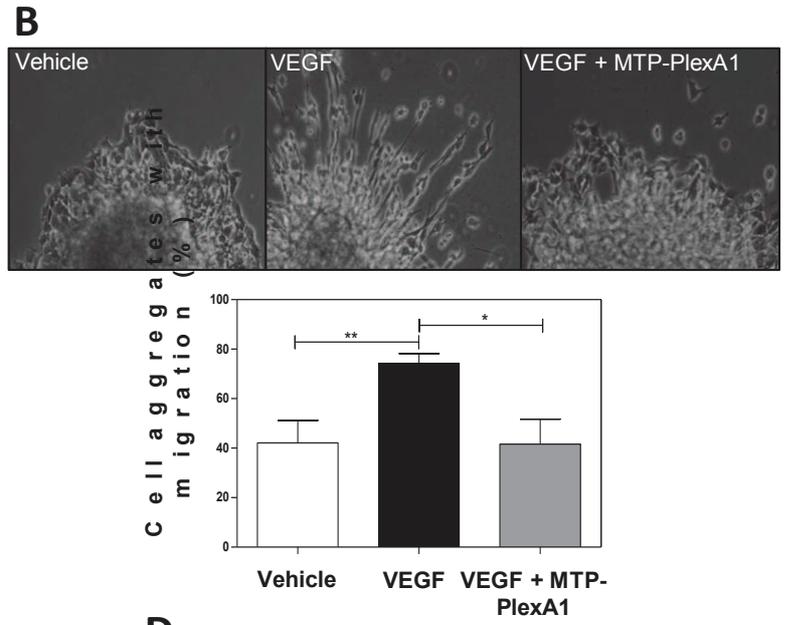
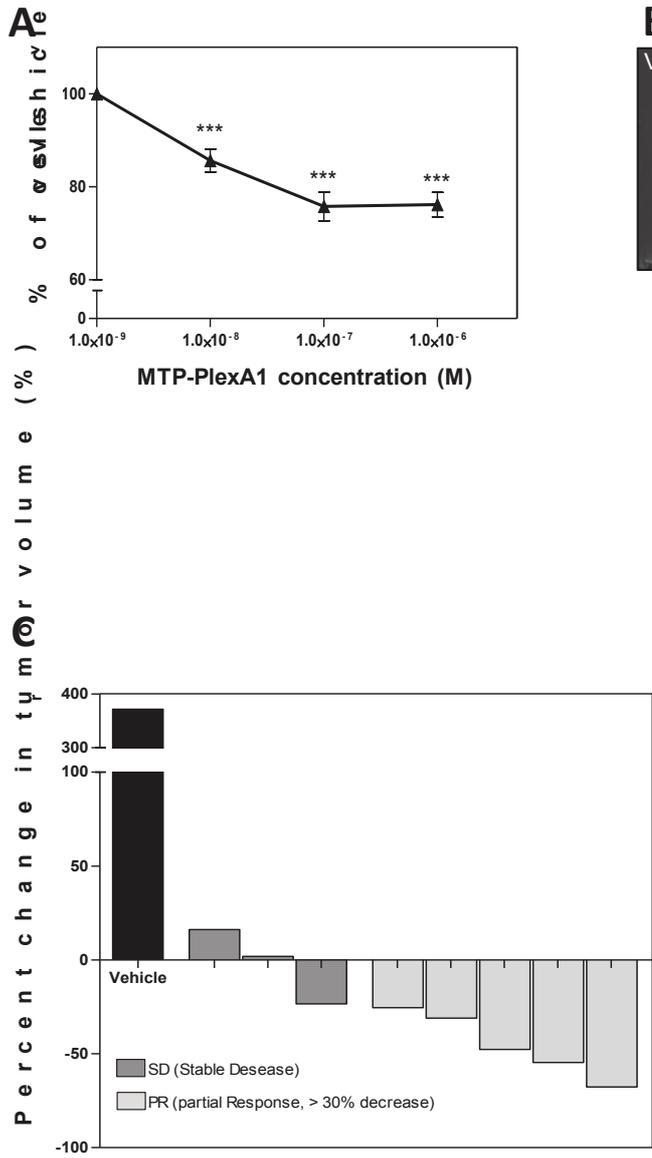


Figure 9:

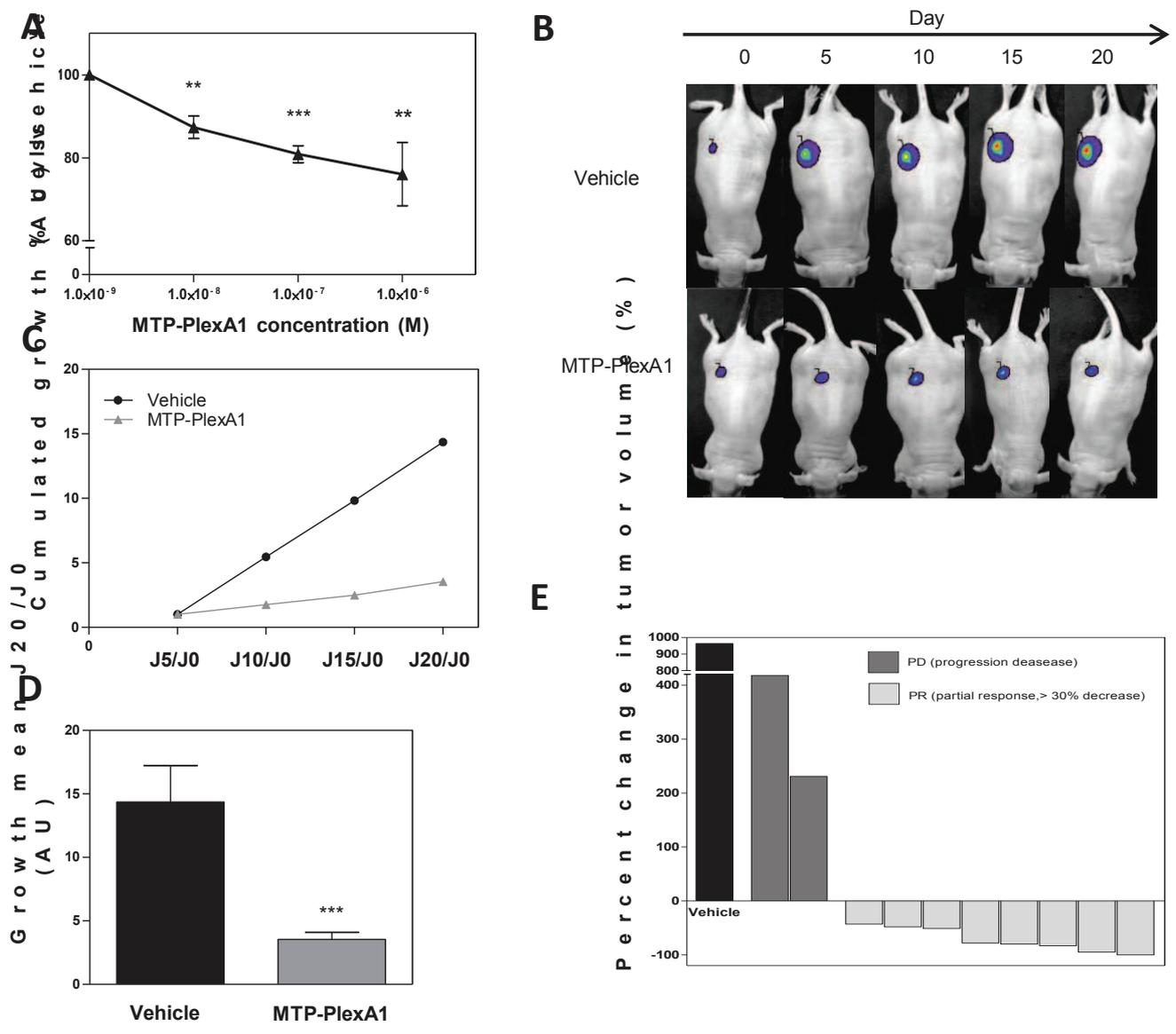


Figure 10:

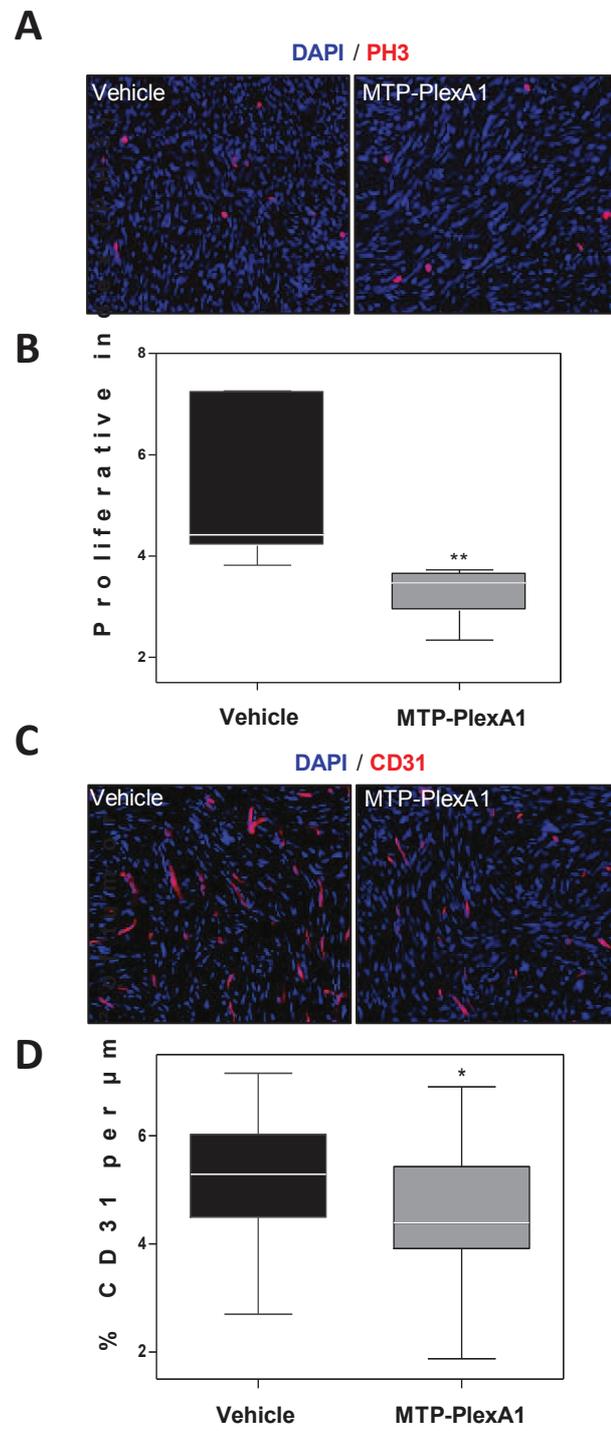


Figure 11:

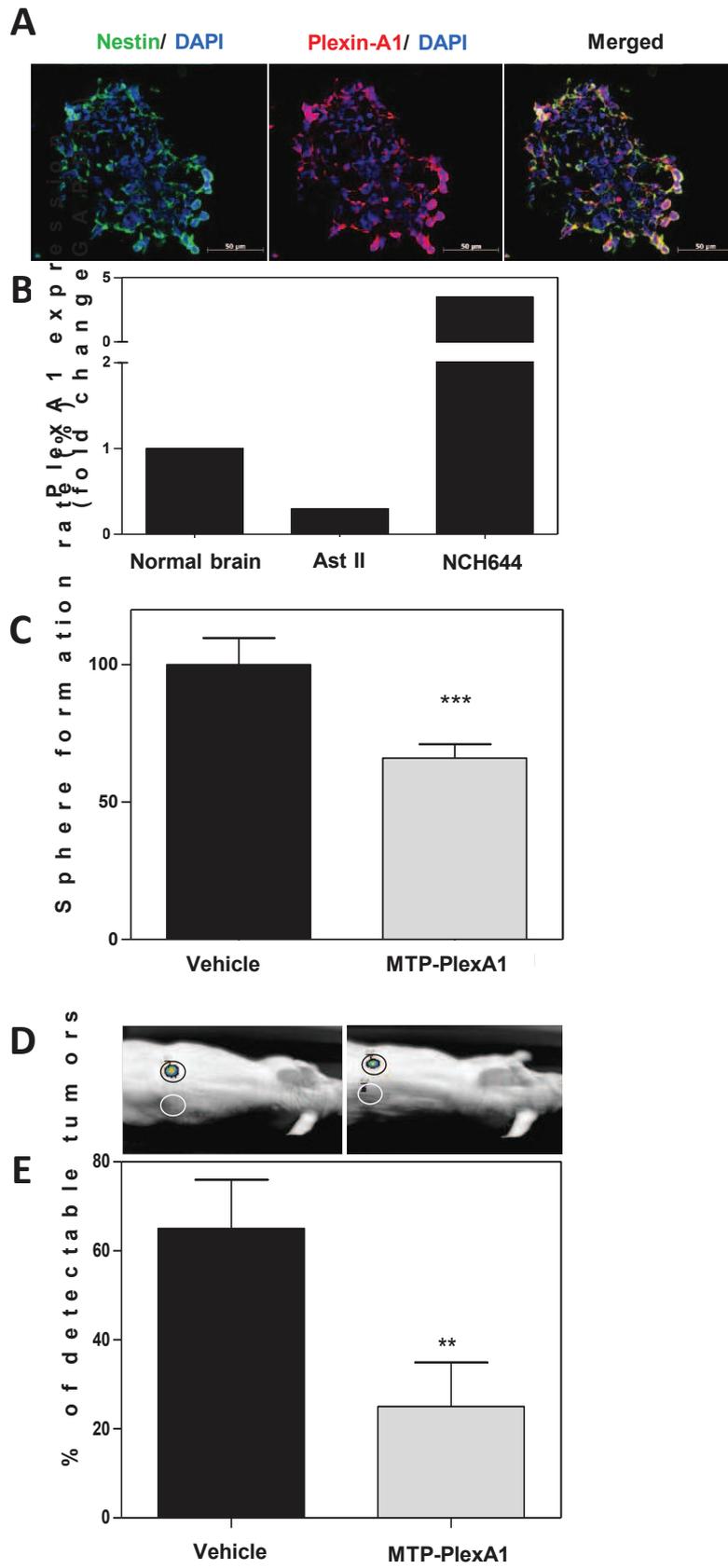
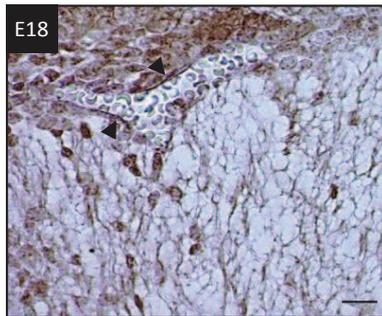
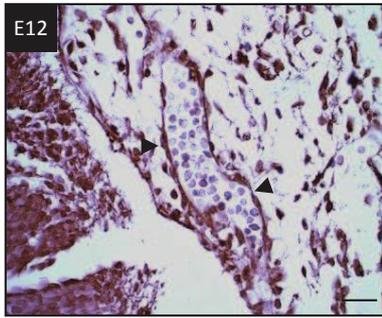


Figure 12:

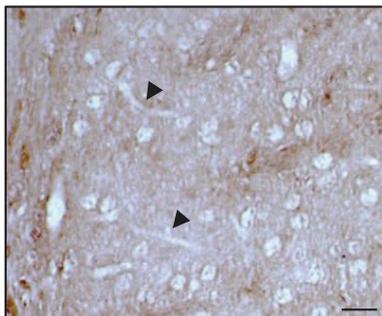
Peptides	Sequences
MTP-PlexA1 / PlexA1	TLPAIVGIGGGGLLLLVIVAVLIAYKRK
Neuropilin-1 (NRP1)	ILITIIAMSALGVLLGAVCGVVLYRKR
Plexine A2 (PlexA2)	TLPAIVSIAAGGSLLLIIVIVLIAYKRK
Plexine A3 (PlexA3)	TLPAMMGLAAGGLLLLAITAVLVAYKRK
Plexine A4 (PlexA4)	SLPAIVSIAVAGGLLIIFIVAVLIAYKRK
Plexine B1 (PlexB1)	AAQVGLGVGTSLLALGVIIIVLMYRRK
CMet	NFTGLIAGVVSISTALLLLGFFLWLKRR
VEGFR-1	NLELITLCTCVAATLFWLLTLFIRKK
VEGFR-2	IIILVGTAVIAMFFWLLLVIIILRTVKRK
VEGFR-3	SMEIVILVGTGVIAVFFWVLLLLIFCNRRK
GpA	IEITLIIFGVMAGVIGTILLISYGIRRK
HER2	ISIISAVVGILLVVVLGVVFGILIKRR
Int $\beta$ -1 (integrine)	IPIVAGVVAGIVLIGLALLLIWKLLKR

Supplementary table 1:

A Embryonic brain



B Adult brain



Supplementary figure 1:

# **Discussion et perspectives**

## 1. MTP-NRP1 est un puissant inhibiteur de l'angiogenèse

Nos résultats démontrent une activité anti-angiogénique du peptide MTP-NRP1. Initialement, j'ai mis en œuvre un test *in vitro* d'angiogenèse utilisant des cellules endothéliales humaines (HUVECs) produisant des structures tubulaires considérées comme les prémices de la formation des vaisseaux sanguins. Cette approche permet d'obtenir rapidement une première idée des effets anti-angiogéniques d'un composé mais reste cependant limitée car elle ne mime que les étapes de migration des cellules endothéliales et ce dans un environnement bidimensionnel. C'est la raison pour laquelle j'ai utilisé dans un second temps le modèle de la vascularisation de la membrane chorio-allantoïdienne de poulet qui récapitule l'ensemble des phénomènes de l'angiogenèse. Cette approche était possible car le segment transmembranaire de NRP1 est conservé à 100 % chez toutes les espèces, ce qui facilite le passage d'un modèle animal à un autre sans faire de modification du peptide inhibiteur. L'avantage de ce modèle est essentiellement de pouvoir tester de nombreuses conditions expérimentales (différents peptides, différentes concentrations). Cependant, ce système s'est révélé difficile à manipuler (infections, complexité du réseau vasculaire initiale plus au moins identique d'une expérience à l'autre, mort prématurée des embryons) et aura nécessité de nombreuses tentatives et modifications du protocole avant de pouvoir l'utiliser correctement. Face à ces difficultés techniques je me suis orienté vers un second modèle *in vivo* basé sur l'étude du développement du réseau vasculaire de la rétine de souris. Le choix d'animaux issus d'une même portée permet une meilleure synchronisation du développement vasculaire mais là encore, l'approche technique de dissection et préparation des rétines en vue de l'analyse histologique se révèle délicate avec un risque élevé de dommages du réseau vasculaire. Ceci peut être compensé par la multiplication des points de mesure de la distance du front de migration (jusqu'à 8 par rétines) afin de renforcer la validité des observations. Les données de la littérature montrent que NRP1 est exprimé sur les filopodes mais aussi directement sur le corps cellulaire des cellules « leader » du front de migration vasculaire (les « Tip cells ») où il participe à l'orientation et au contrôle de la croissance du réseau vasculaire (Gerhardt et al., 2004), (Fantin et al., 2013). On peut donc penser que l'inhibition du segment transmembranaire de NRP1 par MTP-NRP1 impacte directement ces cellules compte tenu de son effet sur la distance de migration. Il serait par conséquent intéressant, de quantifier avec précision le nombre de « tip cells » ainsi que la longueur de leurs prolongements pour vérifier si ces cellules sont touchées spécifiquement par le traitement. D'autre part, il a été démontré que NRP1 est préférentiellement exprimée sur

les artères plutôt que sur les veines (Herzog et al., 2001), (Eichmann et al., 2005). La vascularisation rétinienne se prête tout particulièrement à une étude approfondie de ces deux compartiments aisément identifiables dans le réseau en raison de leur disposition alternée. Enfin, ce modèle permettrait également de mieux prendre en compte l'effet potentiel des traitements sur la maturation des vaisseaux en recherchant le taux de recouvrement des vaisseaux par les péricytes en complétant l'analyse par la quantification du nombre de cellules NG2 positives dès le stade du 7<sup>ième</sup> jour de développement. Les effets anti-angiogéniques mesurés dans la CAM sont de l'ordre de -48 % ; ce qui est voisin des effets mesurés in vitro. Par contre, dans le modèle de la rétine, la diminution de la distance du front de migration est d'environ 8-10%. Cependant, lorsque nous comparons ces effets à ceux induits par les inhibiteurs du VEGF, des VEGFR ou de NRP1, l'amplitude de l'inhibition rapportée dans la littérature est sensiblement identique. En effet, dans le même modèle des traitements ciblant le VEGFR-2, le VEGFA et le VEGFR-3 (Benedito et al., 2012) ou ciblant le domaine de liaison du VEGF sur NRP1 (Pan et al., 2007) induisent une diminution n'excédant pas 20-23 % pour l'anti-VEGFR-2, 28 % pour l'anti-VEGF A, pas d'impact pour l'anti-VEGFR-3 et 10 % de diminution pour l'anti NRP1. Ces effets sont obtenus en utilisant les inhibiteurs à des concentrations de l'ordre de 10 mg/kg pour l'anti-NRP1 et 40 mg/kg pour les anti-VEGF soit 6 500 à 25 000 fois plus concentrés que le peptide MTP-NRP1 utilisé à la concentration de  $10^{-7}$  M (équivalent à 1,5 µg/kg). Nous pourrions envisager d'augmenter la concentration de MTP-NRP1 jusqu'à  $10^{-6}$  M ou plus afin de mieux définir la dose optimale pour une efficacité anti-angiogénique maximale. Enfin, il faut noter que les études mentionnées ci-dessus décrivent un impact très fort des différents composés anti-angiogéniques sur le remodelage vasculaire et la complexité du réseau. Nous envisageons d'utiliser la méthode fractale (Bernard et al., 2001) pour mieux caractériser les effets du peptide MTP-NRP1 sur la complexité du réseau vasculaire.

La mesure de la phosphorylation du VEGFR-2 induite par le VEGF dans des HUVECs a permis de mettre en évidence la capacité du peptide MTP-NRP1 à inhiber la signalisation du récepteur VEGFR-2. Cette approche visait plus spécifiquement la phosphorylation de la Tyr1175 qui est impliquée dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales (Holmqvist et al., 2004), (Wang et al., 2008). Il serait intéressant de regarder l'impact de MTP-NRP1 sur d'autres voies de signalisation du VEGFR-2 comme la phosphorylation des sites Tyr1054 ou Tyr1059 qui sont requis pour activer d'autres voies de signalisation du VEGFR-2 (Kendall et al., 1999). Cette diminution de la phosphorylation du VEGFR-2 peut s'interpréter de deux façons différentes. La première interprétation est que MTP-NRP1 interagit avec le domaine transmembranaire de NRP1

pour empêcher la formation d'un homodimère de NRP1 réduisant ainsi l'effet facilitateur de l'activation du VEGFR-2 en diminuant la fixation du VEGF. La seconde interprétation repose sur la possibilité d'une rupture de l'interaction directe entre NRP1 et VEGFR-2. Cependant, nos expériences de BACTH et de Biacore démontrent qu'il n'y a pas d'interaction entre les domaines transmembranaires de NRP1 et VEGFR-2. Ainsi, si les effets observés sont la conséquence de la rupture d'un hétérodimère NRP1/VEGFR-2, ceci implique une perturbation des domaines extracellulaires des deux récepteurs. Dans tous les cas, que ce soit via l'interférence des domaines TM ou des domaines extracellulaires en conséquence de modifications conformationnelles des récepteurs, la stratégie peptidique offre une approche efficace de rupture des oligomères et par conséquent des complexes de récepteurs.

## **2. MTP-NRP1 permet l'inhibition spécifique de certains récepteurs**

Les études de Biacore nous apportent des éléments clés sur la spécificité des interactions du peptide avec sa cible. La première information intéressante est sans doute la confirmation de l'importance du motif GxxxG dans l'interaction. En effet, le peptide MTP-NRP1 muté pour lequel les 3 glycines du motif GxxxGxxxG sont remplacées par des valines, ne montre aucune interaction avec le domaine transmembranaire de NRP1. En revanche, MTP-NRP1 montre une capacité d'interaction assez forte avec le domaine transmembranaire NRP2. Ceci peut s'expliquer en partie par la forte homologie des deux séquences transmembranaires (80 % d'homologie). Cette homologie est surtout présente dans la partie N-terminale qui conserve le premier motif GxxxG alors que le second motif n'est pas présent dans NRP2. Ce résultat est en accord avec la littérature qui fait état de l'existence d'hétérodimères NRP1-NRP2 à la surface membranaire (Chen et al., 1998). De manière intéressante, le segment transmembranaire de PlexA1, le partenaire privilégié de signalisation de NRP1, est lui aussi capable d'interagir significativement avec le segment TM de NRP1. Cependant, nous n'avons pas observé d'interaction significative avec les domaines TM de l'intégrine  $\beta$ 1 et du VEGFR-2, deux autres co-récepteurs de NRP1. Il faut rajouter que dans une de nos études précédentes le peptide n'interagissait pas non plus avec le domaine transmembranaire de la glycophorine A qui comporte également un motif GxxxG (Roth et al., 2008). Ainsi, les interactions du domaine transmembranaire de NRP1 ne sont pas simplement liées à une interaction aspécifique entre motif GxxxG, mais au contraire les

acides aminés présents autour de ces motifs jouent un rôle déterminant dans la spécificité des interactions. Seule une approche systématique permettra d'établir progressivement la cartographie complète des interactions du domaine transmembranaire de NRP1. Cette étape ouvrira alors la possibilité de mieux comprendre la hiérarchie des interactions tout en caractérisant la contribution de chacun des acides aminés du domaine transmembranaire. Cela constituerait une avancée majeure vers la possibilité d'optimiser le peptide pour une utilisation en clinique.

### 3. Vers une forme optimisée du peptide MTP-NRP1 ?

Le développement de peptides courts avait pour but d'une part l'optimisation de MTP-NRP1 entier en identifiant le motif minimal efficace et offrait d'autre part la possibilité de disséquer les fonctions des différentes parties du domaine transmembranaire de NRP1. Dans le test d'angiogenèse *in vitro*, le peptide court II (PC2-NRP1) qui couvre la partie C-terminale du domaine transmembranaire avec le deuxième motif GxxxG n'a pas d'effet alors que le peptide court I (PC1-NRP1) couvrant la partie N-terminale du domaine incluant le premier motif GxxxG est aussi efficace que le peptide entier. De manière surprenante, le peptide court III (PC3-NRP1) qui contient les deux motifs GxxxG n'induit qu'une faible inhibition de l'angiogenèse. Dans le test de migration cellulaire (avec les cellules de gliome U373) les trois peptides courts impactent la migration induite par le VEGF. L'inhibition est de même intensité que le peptide entier sauf avec le PC1-NRP1 qui présente une efficacité significativement réduite par rapport au peptide entier. Ces résultats suggèrent donc que les deux moitiés du domaine transmembranaire de NRP1 seraient impliquées dans des interactions différentes. La partie C-terminale, avec le premier motif GxxxG induirait des interactions impliquées dans les phénomènes d'angiogenèse alors que la partie N-terminale pourrait être reliée aux effets sur la migration des cellules tumorales. Cette différence fonctionnelle pourrait refléter la formation de complexes récepteurs spécifiques pour chacune des fonctions.

Il serait intéressant de vérifier cette hypothèse avec des expériences de co-immunoprécipitation de NRP1 en présence des différents peptides courts afin de révéler l'impact sur l'association avec NRP1, NRP2, VEGFR-2 et PlexA1. Cet enrôlement différentiel de deux motifs transmembranaires pour des fonctions distinctes a déjà été montré pour le motif C-terminal de Her2 impliqué dans l'homodimérisation alors que le motif situé dans la partie N-terminale est engagé dans l'hétérodimérisation de Her2 avec Her1 (Escher., 2009).

L'interprétation des résultats est cependant plus complexe car dans le modèle de greffes sous-cutanées hétérotopiques, seuls les peptides courts PC2-NRP1 et PC3-NRP1 ont une efficacité *in vivo*. Il ne faut donc pas exclure à ce point que les peptides courts possèdent des propriétés de diffusion différentes. D'ailleurs l'index GRAVY (Grand Average of Hydropathicity) qui indique le niveau d'hydrophobicité d'un peptide est de 1,726 pour le PC1-NRP1 alors qu'il tombe à 0,525 et 1,106 pour les PC2-NRP1 et PC3-NRP1 respectivement. Ce niveau d'hydrophobicité du PC1-NRP1 est semblable à celui du peptide entier (1,730). Ainsi, il serait intéressant de définir les profils de biodistribution des peptides courts afin de faire un lien entre l'efficacité biologique et la distribution des peptides dans l'organisme. Il faudrait alors sans doute passer par l'utilisation de peptides radio-marqués car la production de peptides courts couplés à une protéine fluorescente (comme la Rhodamine) pourrait en modifier la biodistribution. En effet, ce risque était déjà pris en compte lors de l'analyse de la biodistribution du peptide entier MTP-NRP1 couplé à la rhodamine ou à la biotine bien que les effets biologiques *in vitro* soient conservés (Nasarre et al., 2010).

Même si les résultats obtenus avec les peptides courts suggèrent fortement la possibilité de réduire la taille des peptides il faut rester prudent sur les effets observés. En effet, en réduisant l'interface d'interaction, il est possible que ces peptides courts perdent leur spécificité par un élargissement du spectre d'interaction. Il est clair que le motif GxxxG est important pour la réalisation de l'interaction mais les acides aminés en amont et en aval sont eux aussi importants pour la stabilisation et sans doute la spécificité des interactions. Par ailleurs, il ne semble pas possible aujourd'hui de tester la spécificité des peptides courts dans le modèle de BACTH qui nécessite un peptide entier pour la production du signal rapporteur. En revanche, une analyse systématique en Biacore ou par une méthode de FRET permettrait de répondre au moins partiellement à cette question. Dans tous les cas, seule une approche systématique de mutations dirigées (simples ou doubles mutations) de l'ensemble des acides aminés du segment transmembranaire permettra une connaissance plus détaillée du rôle spécifique de chacun des acides aminés ou groupes d'acides aminés.

## 4. MTP-NRP1 est un inhibiteur de la croissance des cellules de gliome

Neuropiline-1 est un marqueur de l'agressivité des gliomes. C'est la raison pour laquelle nous avons recherché le potentiel thérapeutique du peptide MTP-NRP1 dans différents modèles de croissance de cellules de glioblastome. Les travaux ont été menés initialement sur une lignée de rat (lignée C6) puis sur une lignée humaine (U373MG) exprimant fortement NRP1. J'ai par la suite poursuivi l'analyse sur la lignée humaine U118MG. Dans ces différentes lignées, MTP-NRP1 démontre une capacité à diminuer la prolifération cellulaire. L'utilisation d'un test MTT ne permet pas d'analyser finement l'impact du traitement sur les différentes phases du cycle cellulaire comme par exemple lors d'une analyse par cytométrie en flux. En revanche, le test MTT reflète également la viabilité cellulaire qui est l'index important lors de l'évaluation d'un composé anti-tumoral. Les effets anti-prolifératifs mesurés restent relativement faibles. Ceci n'est finalement pas très surprenant car le rôle de NRP1 dans la prolifération cellulaire est minime. Cet effet dépend d'ailleurs largement de son association avec le VEGFR-2 en réponse au VEGF. Ainsi, il est tentant de faire le lien entre l'amplitude de la diminution de prolifération (environ 15 %) et celle de la diminution de phosphorylation du VEGFR-2 (-15 %) observée en présence du peptide.

Ainsi, les effets anti-tumoraux observés *in vivo* reposent essentiellement sur les effets anti-migratoires du peptide mais aussi sur les effets anti-angiogéniques. Dans ce cas, il faut envisager que l'inhibition de l'angiogenèse tumorale soit la conséquence de l'inhibition de plusieurs voies angiogéniques comme celles du FGF, du PlGF, du TGF beta, du PDGF ou de l'HGF. De manière intéressante neuropiline-1 intervient dans les plateformes de signalisation de ces facteurs pro-angiogéniques alternatifs (West et al., 2005), (Snuderl et al., 2013), (Glinka and Prud'homme, 2008), (Ball et al., 2010), (Sulpice et al., 2008). Les premières données de biodistribution obtenues au laboratoire par le Dr Laure Thomas laissent penser que le peptide MTP-NRP1 (forme biotinylée ou rhodaminée) passe la barrière hématoencéphalique. Ceci ouvre la possibilité de tester les effets *in vivo* dans des modèles orthotopiques de gliomes. Des expériences préliminaires menées sur de petits groupes d'animaux font apparaître des inhibitions du volume tumoral de l'ordre de -26 % par rapport aux contrôles et près de -20 % par rapport à un groupe Témzolomide avec les cellules U373MG. Une autre étude de greffes intracérébrales de biopsie de patient montre une diminution de -20 % par rapport à l'inhibiteur de multiples récepteurs tyrosines kinases Sunitinib. Cependant, il faudra

attendre l'analyse d'un plus grand nombre d'animaux pour donner une validité statistique à ces études.

## 5. MTP-NRP1 est un composé thérapeutique bien toléré

A ce stade de développement, le peptide MTP-NRP1 présente des caractéristiques fonctionnelles intéressantes malgré la très faible concentration utilisée ( $10^{-7}$  M soit 1,5 µg/kg). Différentes études au laboratoire ont démontré l'absence d'effet toxique du peptide MTP-NRP1 après 24h et 72h de traitement sur différents types cellulaires comme par exemple les hépatocytes humains (HEPG2). De plus, l'administration aiguë (2h, 48h, 72h) et chronique (jusqu'à 3 mois tous les trois jours) *in vivo* n'induit pas de lésion histologique dans le foie, les poumons, les reins et le cerveau. L'analyse de marqueurs sanguins hépatiques, cardiaques et rénaux confirme l'absence de trouble fonctionnel de ces organes. Ainsi, même si NRP1 est exprimé dans de nombreux tissus adultes, l'inhibition du récepteur est bien tolérée. Ces résultats sont en accord avec l'étude clinique menée par Genentech pour l'anticorps anti-NRP1 qui montre un profil toxicologique acceptable (Darbonne et al, 2011). Par contre, lorsque cet anticorps est associé à l'Avastin (anti-VEGF) les effets secondaires sont plus nombreux (hémorragie gastrique, déplétion plaquettaire et augmentation de la protéinurie, Pan et al., 2007). Il sera intéressant de combiner le peptide MTP-NRP1 avec l'Avastin afin de vérifier si cette combinaison est mieux tolérée. Une étude de toxicologie sera menée très prochainement chez le chien dans le cadre de la validation préclinique réglementaire du peptide. De manière remarquable, il faut noter que ce peptide n'est pas immunogène. En effet, même couplé à une protéine porteuse (KLH) le peptide entier ou des versions plus courtes n'induisent pas de réaction immunitaire chez la souris (Travaux menés par la société Biotem dans le cadre d'un projet de maturation financé par la SATT Conectus de l'Université de Strasbourg). Enfin, le temps de demi-vie est de l'ordre de 3 jours *in vitro* et *in vivo* comme le montrent les expériences de biodistribution. Cette persistance inhabituelle pour un peptide peut largement s'expliquer par l'enfouissement du peptide dans les membranes cellulaires où il est très peu exposé aux protéases. En effet seule la famille des I-CliPs (intramembrane-cleaving proteases) incluant les gamma secrétases sont capables de cliver ces peptides (Erez et al., 2009).

En parallèle des effets biologiques remarquables ces caractéristiques de biodistribution et de tolérance font de MTP-NRP1 un bon candidat médicament. D'ailleurs, une startup issue du laboratoire (Mimesis Pharma) prend en charge le développement clinique du peptide. L'étape cruciale de la faisabilité industrielle (production de grammes de peptides) est aujourd'hui résolue grâce aux travaux menés par la société internationale Polypeptides qui devrait livrer dans les prochaines semaines le premier lot GMP qui servira aux études de toxicité réglementaire. D'autres travaux menés sur les cancers du sein ou du côlon et la régulation des lymphocytes Treg permettront de définir la meilleure indication thérapeutique pour ce composé.

## **6. Plexine-A1 est un marqueur diagnostique et pronostique des GBM**

Aujourd'hui le développement de biomarqueurs dans le domaine des GBM est face à plusieurs défis. En effet, l'identification de marqueurs appropriés est compliquée en raison d'une durée de survie des patients très courte, de la grande hétérogénéité des GBM ainsi que d'une connaissance incomplète de la physiopathologie des GBM. Peu de biomarqueurs sont validés aujourd'hui en clinique. On trouve la mutation IDH1 qui apparaît être un marqueur de bon pronostic des GBM (Sanson et al., 2009) ou la dérégulation du récepteur de l'EGF, plus particulièrement la surexpression du variant III de l'EGFR (EGFRvIII) qui est très fréquemment retrouvée dans les GBM (25 % à 33 %) (Aldape et al., 2004). Même si sa valeur pronostique fait encore débat (Liu et al., 2005), (Heimberger et al., 2005), la méthylation de la MGMT est quant à elle considérée comme un marqueur prédictif de l'efficacité des médicaments puisqu'elle est corrélée à une meilleure réponse aux agents alkylants tel que le témozolomide (Hegi et al., 2005). Ainsi, on comprend bien l'importance de découvrir de nouveaux biomarqueurs pour mieux diagnostiquer, stratifier les patients et prédire leur réponse aux traitements.

Dans mon étude immunohistochimique sur des banques de tissu tumoral, j'ai montré que l'expression de PlexA1 est corrélée avec l'agressivité des astrocytomes. En effet, le niveau d'expression se traduit par trois paliers correspondants aux astrocytomes de bas grade (Grade I), de grades moyens (Grade II et III) et de haut grade (Grade IV). Grâce à une collaboration, mise en place avec le service de neurochirurgie de l'hôpital de Hautepierre et le Pr Kehrl, nous avons obtenu une collection de biopsies provenant de patients atteints de GBM. Une analyse Q-PCR de l'expression de PlexA1 dans ces

biopsies confirme la surexpression de plexine-A1 dans ces tumeurs. Il faudra bien entendu étendre cette analyse de manière plus systématique mais ces premiers résultats vont dans le sens d'une corrélation entre sévérité du gliome et forte expression de plexin-A1. Il apparaît donc intéressant de confronter nos résultats avec l'initiative internationale qui se met en place pour l'établissement d'une classification des sous-types moléculaires des glioblastomes (Verhaak et al., 2010).

De surcroît, l'analyse de deux bases de données cliniques différentes, Rembrandt et TCGA, regroupant respectivement 187 et 499 patients atteints de GBM, nous a permis de montrer la corrélation entre la forte expression de PlexA1 et une survie plus courte des patients ( $p < 0.041$ ), ( $p < 0.0005$ ). La valeur pronostique de PlexA1 est donc validée par ces études et l'expression de PlexA1 peut être considérée comme un marqueur de mauvais pronostic de survie des patients atteints d'un GBM. De façon similaire, la forte expression de PlexA1 est également corrélée au mauvais pronostic pour les patients atteints de tumeurs du pancréas (Müller et al., 2007). Malgré tout, cette valeur pronostique nécessite une confirmation dans un nombre plus important de bases de données ou d'études rétrospectives. Ainsi nous pourrions, augmenter le nombre de patients inclus dans notre analyse pour en améliorer la pertinence. Une investigation plus poussée des critères cliniques, est également nécessaire, pour prendre en compte par exemple l'âge, le traitement et la catégorie du GBM (primaire ou secondaire) afin de réévaluer le lien entre l'expression de PlexA1 et la survie des patients.

Cette corrélation peut être expliquée selon différents angles. Tout d'abord, il semble que le récepteur PlexA1 soit impliqué directement dans la tumorigenèse. En effet, son expression basale dans les astrocytes est relativement faible à l'âge adulte et nous observons une forte expression de ce récepteur dans les astrocytes néoplasiques lors de l'évolution du gliome. Les différentes lignées de glioblastome utilisées au laboratoire (U118MG, U373MG, U87MG) expriment toutes fortement ce récepteur qui paraît clairement impliqué dans la prolifération mais surtout dans la migration/invasion de ces cellules tumorales, les trois piliers du développement tumoral des GBM.

Parallèlement, nous avons montré que l'expression de PlexA1 est retrouvée dans les vaisseaux sanguins des biopsies humaines analysées. Par contre, on n'observe pas de signal plexine-A1 en dehors des neurones dans le tissu sain. De même, chez la souris, seuls certains vaisseaux sanguins cérébraux embryonnaires (E12 et E18) expriment PlexA1. Il semble donc que PlexA1 ne soit exprimé que dans un contexte d'angiogenèse et/ou de néo-angiogenèse qui expliquerait le signal positif dans les tumeurs. Ceci confère donc une nouvelle fonction au récepteur PlexA1 dans

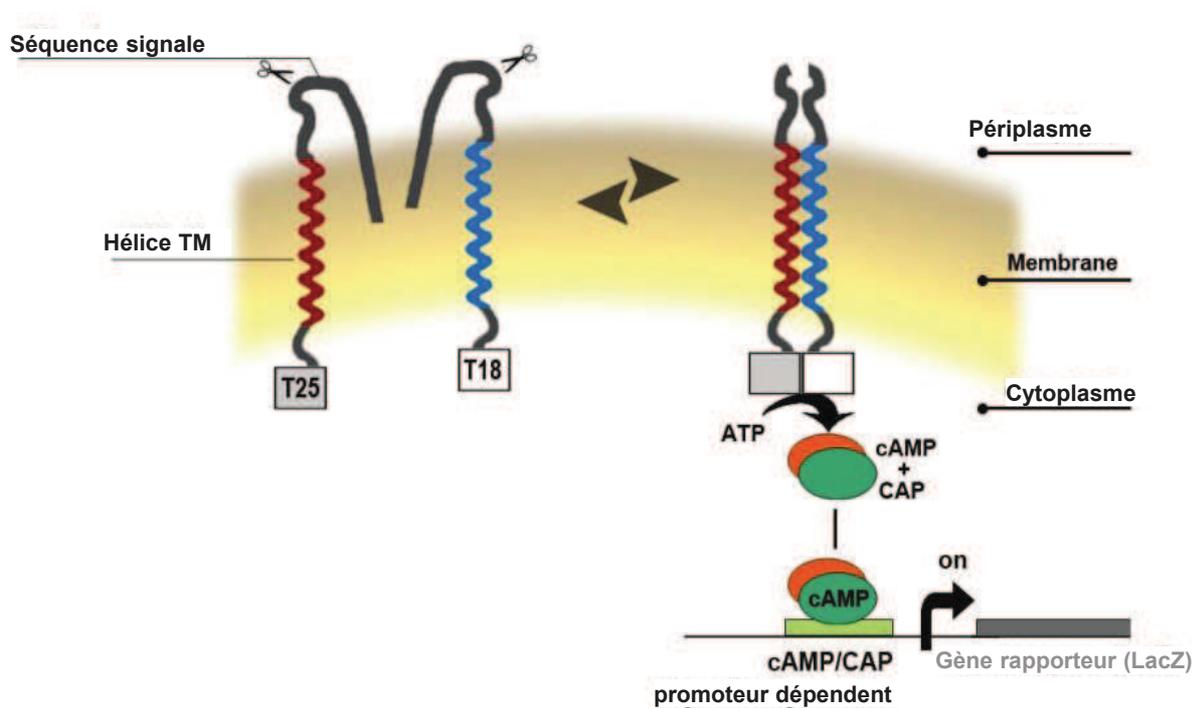
l'angiogenèse tumorale. Il faudrait maintenant pouvoir rechercher cette expression vasculaire dans d'autres types de tumeurs. D'ailleurs, l'expression de PlexA1 est corrélée avec la densité microvasculaire dans les carcinomes gastriques (Zhao et al., 2007). Cette expression de PlexA1 sur les vaisseaux tumoraux pourrait expliquer en partie la corrélation observée entre la forte expression de PlexA1 et l'agressivité des gliomes et la survie des patients atteints de GBM car l'agressivité est intimement liée à la présence d'une angiogenèse importante (Jain et al., 2007).

De plus, nous avons également démontré que PlexA1 est fortement exprimée sur les cellules souches de glioblastome (dans la lignée NCH644) par rapport à l'astrocytome de grade II. Là encore, il existe une corrélation entre la présence de cellules souches cancéreuses, l'agressivité tumorale et le mauvais pronostic de survie dans les GBM (Yan et al., 2011). On peut donc envisager que la forte expression de PlexA1 dans cette population de cellules souches tumorales contribue à l'agressivité des GBM. En effet, une étude décrit une boucle autocrine de VEGF passant par le complexe NRP1-VEGFR-2 sur des cellules souches de gliome humain (Hamerlik et al., 2012). Il est tentant de spéculer que MTP-PlexA1 soit capable d'impacter cette signalisation en perturbant les interactions entre NRP1 et VEGFR-2 ou entre PlexA1 et VEGFR-2 pour aboutir à un blocage de la formation de ce complexe conduisant à la rupture de cette boucle autocrine.

## **7. Le domaine TM de plexine-A1 est au cœur de la formation d'une plateforme de signalisation**

Le récepteur PlexA1 est décrit comme interagissant avec de nombreux récepteurs (NRP1, NRP2, L1CAM, VEGFR-2, PlexA4, OTK, TREM-2 et DAP12). Il est donc au centre de plateformes de récepteurs ayant la capacité de transduire la signalisation de divers ligands (sémaphorines, VEGFs). Ces interactions avec d'autres récepteurs sont généralement décrites dans la littérature comme passant par les domaines extramembranaires des récepteurs. Dans ce travail, nous avons démontré, pour la première fois, que le domaine transmembranaire de PlexA1 contribuait à la formation des homodimères et des hétérodimères. Ainsi, mes travaux identifient le segment transmembranaire comme un domaine à part entière dans la régulation de la formation des complexes incluant plexine-A1. Il faudra maintenant clarifier dans quelle mesure le segment TM impacte les domaines extracellulaires ou intracellulaires. Ceci est tout particulièrement pertinent puisque PlexA1 existe sous deux conformations, une

active (avec le domaine extracellulaire complètement déployé) et une conformation inactive (avec le domaine extracellulaire replié sur lui-même) (Takahashi and Strittmatter, 2001). Dans l'immédiat, nous avons disséqué les interactions transmembranaires avec l'équipe du Dr. Monique Genest à Orléans. Cette équipe est spécialisée dans les approches de modélisation de dynamique moléculaire par simulation computationnelle pour décortiquer les interactions transmembranaires. Cette approche complète ainsi les techniques de cristallographie aux rayons X et de RMN qui proposent une image statique d'un système ou d'une interaction mais qui sont surtout très peu réalisables sur les segments TM (MacKenzie et al., 1997), (Bocharov et al., 2008a). La représentation figée d'une macromolécule peut être trompeuse, car les atomes entrant dans sa composition sont en perpétuel mouvement. Les expériences de modélisation nous ont, au contraire apporté un nombre considérable d'informations (angle de croisement, distance de contact, conformation des hélices lors de l'interaction ...) tout en proposant une vision dynamique de ce qui peut se passer dans la membrane lors de simulations pouvant durer plusieurs microsecondes. Cette approche a par ailleurs dévoilé des cartes d'interaction faisant apparaître des motifs inattendus. Ainsi, il semblerait que le motif G11xxxG15xxxL19 du domaine TM de PlexA1 soit impliqué dans l'homodimérisation mais également dans l'hétérodimérisation avec NRP1. La complexité des simulations s'est par la suite renforcée en augmentant le nombre de séquences transmembranaires présentes dans la bicouche lipidique. Ce scénario démontre l'interaction d'un TM PlexA1 avec soit un homodimère de TM de NRP1 soit un hétérodimère de TM PlexA1-NRP1 préalablement formé. Ceci confirme que la formation d'un trimère de domaines transmembranaires est tout à fait concevable et envisageable d'un point de vue biologique. De plus, cette situation mime la situation expérimentale au cours de laquelle un peptide synthétique exogène est ajouté dans la membrane cellulaire. Dans ce cas, le peptide exogène peut entrer en compétition fonctionnelle avec, soit des monomères, soit des hétéromères préformés. Les simulations avec 6 domaines transmembranaires (3 PlexA1 et 3 NRP1) démontrent la dynamique du système puisque de nombreux échanges et transitions sont observés. Cette démonstration d'une véritable plasticité des interactions démontre pour la première fois la manière dont les peptides exogènes peuvent perturber les plateformes de signalisation en s'immisçant dans les complexes membranaires. A partir de là, il est envisageable de creuser le mécanisme en identifiant les acides aminés contrôlant la hiérarchie de ces interactions en reproduisant les simulations avec des peptides mutés. Cependant, le temps de calcul assez long (plusieurs semaines) n'est pas compatible avec une analyse systématique. C'est la raison pour laquelle nous avons également développé une autre approche : le système BACTH (Bacterial Adenylate Cyclase Two



**Figure 41 : Le système BACTH.** Principe du BACTH (Bacterial Adenylate Cyclase Two Hybride). T25 et T18 sont des fragments complémentaires du domaine catalytique de l'adénylate cyclase. cAMP: cyclic Adenosin Monophosphate CAP: Catabolite Activator Protein.

Hybride). Cette technique a été réalisée en collaboration avec l'équipe du Dr Pierre Hubert à Marseille. Il s'agit de faire exprimer les séquences transmembranaires d'intérêt dans la membrane bactérienne d'*Escherichia coli*. Ces séquences sont couplées avec des cassettes, T18 et T25, qui sont deux fragments de l'enzyme adénylate cyclase (Karimova et al., 2001) (**Figure 41**). Lorsqu'une interaction entre les segments TM se produit, elle induit alors une fusion de ces deux fragments aboutissant ainsi à une enzyme fonctionnelle. On peut alors observer une production d'AMP cyclique qui permet la survie d'une souche d'*E. Coli* dépourvue de cette enzyme. La synthèse d'AMP cyclique est proportionnelle à la quantité d'interaction entre les deux segments et peut être mesurée par un gène rapporteur, ici le gène Lac Z, produisant la  $\beta$ -galactosidase. Le BACTH permet aussi bien de visualiser des interactions en homodimère qu'en hétérodimère ce qui lui confère un avantage conséquent par rapport à une autre technique de mesure d'interactions, comme le système ToxR qui ne fonctionne qu'avec la formation d'homodimères (Roth et al., 2008). De plus, l'induction d'AMP cyclique soluble et non pas d'un système rapporteur bloqué à la membrane, le rend plus quantitatif que le système GALLEX (Schneider and Engelman, 2003).

Cette approche nous a permis, d'une part, de valider les interactions observées lors de simulations computationnelles mais surtout de hiérarchiser les interactions puisque cette technique est considérée comme semi-quantitative. On peut voir ainsi que l'interaction d'homodimérisation PlexA1-PlexA1 est relativement faible comparée à l'interaction d'homodimérisation NRP1-NRP1. De plus, l'interaction d'hétérodimérisation PlexA1-NRP1 semble également plus importante ou au moins équivalente à l'interaction PlexA1-PlexA1. Ces résultats sont confirmés par des mesures du potentiel de force moyen de ces interactions (Aci-Sèche et al., en préparation) ainsi que par les expériences de Biacore qui confortent la proposition de hiérarchie d'interaction des TM : NRP1-NRP1 > NRP1-PlexA1 > PlexA1-PlexA1.

Ces données nous permettent de penser que le domaine TM de PlexA1 paraît plus enclin à former des hétérodimères que ne l'est celui de NRP1 plus orienté vers la formation d'homodimères. Cette caractéristique de PlexA1 peut être expliquée par la particularité de sa séquence transmembranaire. En effet, elle contient un enchaînement de 6 glycines (G9, G11-G15) qui lui confère une sorte de bouée d'interaction faisant le tour complet de l'hélice. Cette organisation lui permet de multiplier les interactions par deux motifs GxxxG distincts, ne se trouvant pas sur la même face de l'hélice. Ceci confère alors la possibilité d'avoir un motif libre pouvant interagir lorsque le récepteur est en configuration d'homodimère ou d'hétérodimère avec NRP1. Il nous faudra évidemment encore continuer les investigations pour découvrir les règles précises

contrôlant les interactions transmembranaires de PlexA1 mais nous savons d'ores et déjà que ces interactions sont extrêmement spécifiques. En effet beaucoup des domaines transmembranaires testés (PlexB1, CMET, VEGFR-1,-2,-3, HER-2, Intégrine  $\beta$ 1) ne montrent aucune interaction directe avec le TM de PlexA1 alors qu'ils contiennent des motifs GxxxG. En revanche, des interactions significatives avec PlexA2, PlexA3, mais surtout PlexA4 confirment la capacité de reconnaissance et d'assemblage spécifiques des hétérodimères. Cette diversité d'interactions révèle de nouvelles possibilités d'interactions qui peuvent expliquer les rôles fonctionnels de plexine-A1. Ainsi, l'approche BACTH pourrait être utilisée pour rechercher des corécepteurs des plexines ou des neuropilines afin de mieux comprendre les mécanismes responsables de la diversité fonctionnelle encodée par ces récepteurs.

Comme dans le cas de neuropiline-1, la production et l'analyse en BACTH de segments TM mutés de PlexA1 permettra de clarifier la nature exacte du motif d'interaction, acide aminé par acide aminé. Cette approche pourrait là encore permettre d'optimiser la séquence pour un blocage optimal.

## **8. MTP-PlexA1 est un perturbateur du complexe PlexA1-NRP1**

Après avoir validé par la modélisation la possibilité d'interférer avec la formation des complexes de récepteurs grâce à un peptide mimant le domaine TM de plexine-A1, j'ai mis en place une série d'approches expérimentales pour démontrer la réalité du mécanisme. L'utilisation du système Duolink a par exemple permis de démontrer in situ que NRP1 et PlexA1 forment des complexes en dehors de la présence de ligand, en accord avec les travaux récents de Jones et collaborateurs (Janssen et al., 2012). Par contre, l'addition du peptide MTP-PlexA1 provoque une diminution du nombre d'hétérodimères à la surface membranaire. J'ai pu confirmer ce résultat par une méthode indépendante de co-immunoprécipitation qui aboutit à la même constatation : le peptide diminue l'interaction entre NRP1 et PlexA1 avec ou sans ligand. De manière cohérente, la rupture du complexe NRP1/PlexA1 s'accompagne d'une diminution des voies de signalisation sous-jacentes directes (activité Rac-1) et indirectes (Akt, VEGFR-2). Il serait intéressant de développer les outils nécessaires à l'étude des autres co-récepteurs potentiels de plexine A1 afin de mieux caractériser l'ensemble des voies inhibées par le peptide. Une étude plus récente montre clairement qu'une boucle autocrine de Sema3A dans les cellules de glioblastomes U87MG (surexprimant NRP1)

induit une diminution de leurs propriétés d'adhérence à la matrice extracellulaire ce qui aboutit, au final, à une augmentation de leur capacité d'invasion. Bagci et collaborateurs montrent par ailleurs que Sema3A est surexprimée dans les GBM humains par rapport au tissu cérébral adulte sain (Bagci et al., 2009). De plus, Sema3A par son effet inhibiteur de la fonction anti-tumorale des lymphocytes T (Catalano et al., 2006) favorise la progression tumorale. Ainsi, le blocage de la formation des complexes induits par Sema3A dans nos différents tests laisse penser qu'il s'agit là d'un mécanisme important pour expliquer l'effet anti-tumoral du peptide MTP-PlexA1. Ceci renforce l'intérêt de cibler plexine-A1 dans le contexte des gliomes et particulièrement du GBM qui présentent une très forte capacité d'infiltration dans le parenchyme cérébral (Berens and Giese, 1999). Les travaux de Bagci proposent un modèle bi-phasique dans lequel les effets de Sema3A dépendent de la concentration. Or, la perturbation du complexe NRP1-PlexA1 par MTP-PlexA1 est indépendante des ligands et peut donc neutraliser cette voie quelles que soient les variations de concentration des ligands.

## **9. MTP-PlexA1 inhibe la fonction pro-angiogénique de plexine A1**

L'angiogenèse est une étape primordiale dans le développement tumoral. De nombreux médicaments en développement visent à bloquer les voies impliquées dans la formation des vaisseaux sanguins pour asphyxier la tumeur. Bien évidemment, le complexe VEGF-VEGFR-2 est au cœur de ces mécanismes.

De manière intéressante, nous avons mis en évidence l'expression de PlexA1 sur les vaisseaux sanguins des biopsies de patients atteints de GBM ainsi que sur les vaisseaux en développement de la membrane chorio-allantoïque de l'embryon de poulet. Cette expression est également retrouvée par immunocytochimie et analyse Q-PCR sur les cellules endothéliales humaines HUVEC et HMEC. Cependant, cette expression de PlexA1 dans les vaisseaux adultes et dans le tissu sain n'est pas retrouvée suggérant un rôle angiogénique très ponctuel pour PlexA1. Pour clarifier le rôle de PlexA1 dans les phénomènes d'angiogenèse j'ai utilisé toute une batterie de tests *in vitro* et *in vivo* qui vont tous dans le sens d'une implication majeure de plexine-A1 dans la formation de nouveaux vaisseaux sanguins.

En collaboration avec le Dr Jacky Goetz nous venons de réaliser une étude de knock-down de plexineA1 chez le poisson zèbre par la méthode des morpholinos. Cette

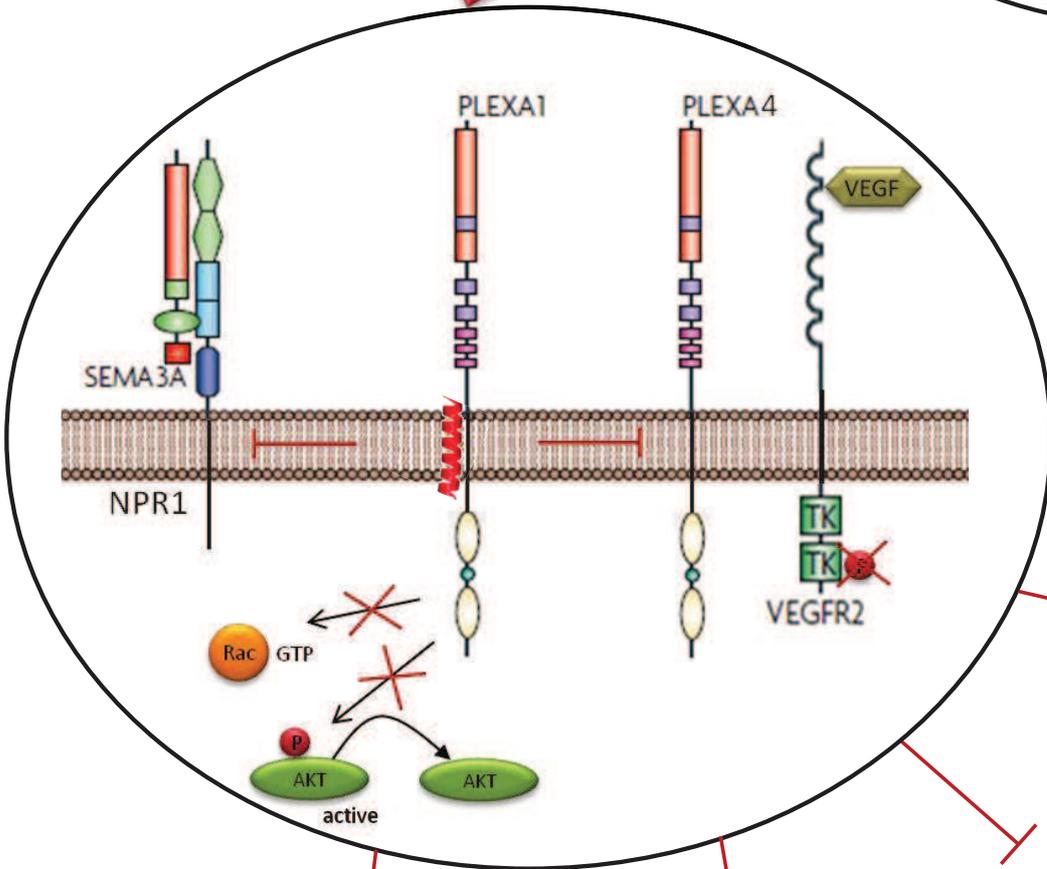
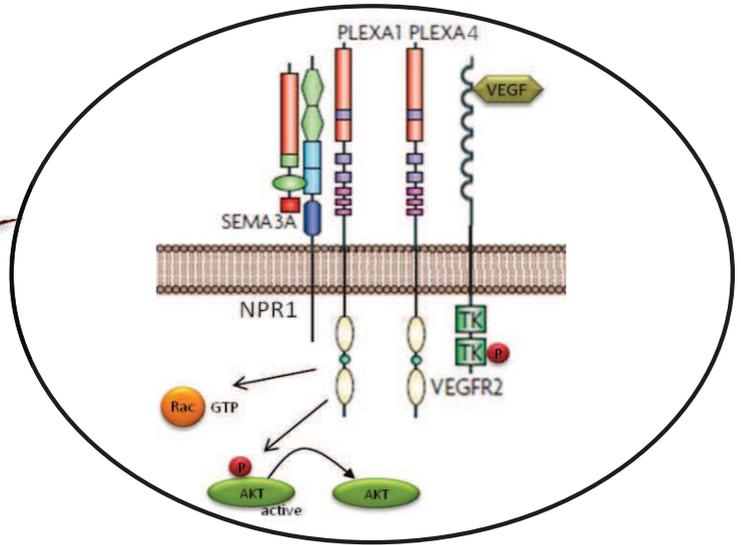
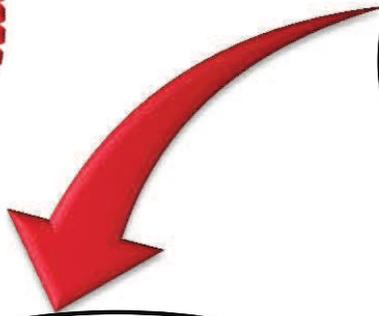
expérience préliminaire a été conduite avec une lignée de poisson exprimant un rapporteur fluorescent dans les vaisseaux sanguins ce qui permet une observation directe de l'angiogenèse pendant les stades embryonnaires. Les premiers résultats montrent un défaut de branchement des vaisseaux intersegmentaux et du plexus vasculaire caudal. Des expériences complémentaires sont actuellement en cours pour valider définitivement ce résultat. Pour comprendre comment MTP-PlexA1 peut jouer ce rôle anti-angiogénique, il faut tout d'abord rappeler l'existence d'une interaction entre PlexA1 et le VEGFR-2 (Catalano et al., 2009). Dans cette étude, les effets pro-angiogéniques sont déclenchés par Sema6D (et non pas par le VEGF) qui induit la phosphorylation du VEGFR-2 de manière PlexA1 dépendante. Une autre étude met en lumière une interaction entre PlexA1 et PlexA4 dans les HUVEC dont la prolifération induite par le VEGF est abolie par des sh-RNA dirigés contre PlexA1 ou PlexA4. Les auteurs démontrent que PlexA4 peut former un complexe avec le VEGFR-2 et module ainsi son activité (Kigel et al., 2011).

Face à ces résultats, nous avons voulu vérifier quel était l'impact du peptide MTP-PlexA1 sur l'interaction entre PlexA1 et PlexA4 dans une étude de co-immunoprécipitation. Le VEGF induit une forte augmentation de l'interaction PlexA1-PlexA4 qui est fortement inhibée en présence de MTP-PlexA1. De plus, les résultats du test en BACTH montrent que PlexA1 et PlexA4 interagissent par leurs domaines transmembranaires. Ainsi, ces différents résultats laissent envisager la possibilité que les plexines-A1 et -A4 forment un complexe avec le VEGFR-2 et modulent positivement l'activation du récepteur en réponse au VEGF. L'effet anti-angiogénique de MTP-PlexA1 passerait donc en partie par une rupture de l'interaction PlexA1-PlexA4 aboutissant à une diminution de l'activation du VEGFR-2. Cette association pourrait également expliquer le mode d'action du peptide MTP-PlexA1 qui bloque la phosphorylation du récepteur VEGFR-2 en réponse au VEGF.

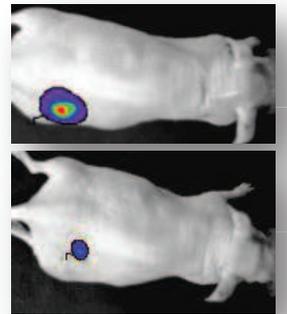
## **10. MTP-PlexA1 est un inhibiteur de la croissance tumorale in vivo**

Pour valider l'effet thérapeutique de MTP-PlexA1, j'ai tout d'abord testé son efficacité sur un modèle de greffes sous-cutanées de cellules de GBM humain, les U373MG. Le traitement avec MTP-PlexA1 est réalisé, à une concentration de  $10^{-7}$  M, soit 1,5 µg/kg par injection par voie intrapéritonéale tous les jours pendant 10 jours. Ce

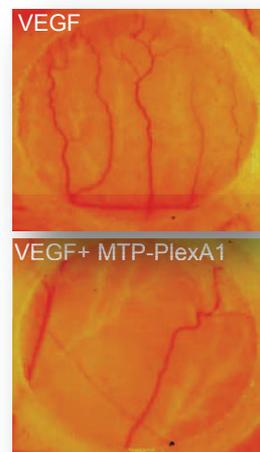
MTP-PlexA1



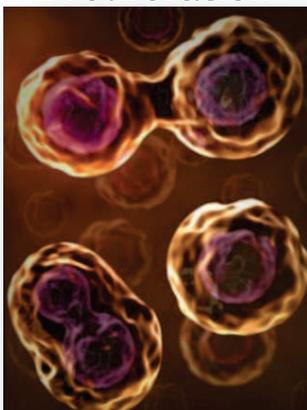
Croissance tumorale



Angiogenèse



Prolifération



Migration

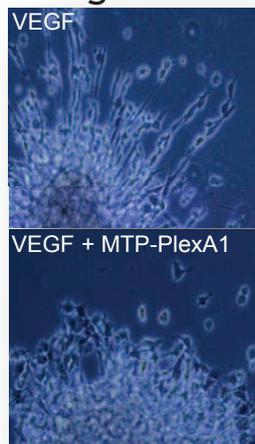


Figure 42: Schéma bilan de l'action du MTP-PlexA1

protocole est similaire à celui employé pour la validation du peptide inhibant le segment TM de NRP1. Contrairement à ce peptide, les voies d'administration sous-cutanée et intraveineuse n'ont pas encore été évaluées. Cette possibilité sera décidée à la lumière des résultats de biodistribution de versions rhodaminées et biotinylées du peptide MTP-PlexA1 récemment disponibles au laboratoire. Dans tous les cas, l'effet anti-tumoral observé atteint - 44 % par rapport au groupe contrôle. Cet effet est remarquable compte tenu de la dose injectée. Afin d'étudier, l'impact du traitement sur une plus longue période ainsi que sur la cinétique de croissance tumorale, j'ai reproduit cette expérience avec une autre lignée de glioblastome bioluminescente (U118MG-Luc). Cette lignée exprime de manière stable le gène de la luciférase pour permettre la visualisation par luminescence des cellules tumorales lorsqu'elles sont en présence de luciférine. Grâce au système NightOwl Berthold, LB580), nous pouvons suivre l'évolution de la croissance des tumeurs sous-cutanées de manière non invasive et plus précise qu'avec l'utilisation du pied à coulisse pour mesurer le volume. Les résultats exprimés selon les critères de recherche clinique RECIST (Eisenhauer et al., 2009), montrent que 80 % des souris répondent au traitement. L'accroissement du signal cumulé dans le groupe traité avec le peptide est fortement diminué. L'effet thérapeutique est maintenu pendant toute la période d'analyse (soit 20 jours) sans infléchissement. Cette étude a été complétée par l'analyse des tumeurs à l'échelle histologique. De manière remarquable, nous observons une diminution du marqueur de cellules endothéliales CD31 mais aussi du marqueur de cellules en prolifération PH3 dans les tumeurs traitées comparées au groupe contrôle. Ainsi, l'effet anti-tumoral du peptide MTP-PlexA1 est la conséquence d'un effet anti-prolifératif et anti-angiogénique. Cette activité anti-tumorale va être prochainement recherchée dans un modèle de greffes orthotopiques de gliomes pour mimer encore mieux la pathologie humaine. Finalement, la greffe d'une biopsie de patient chez des souris « nues » (4 contrôles et 4 traités) montre une réduction de -40 % du volume tumoral intracrânien après 10 jours de traitement. Cette étude préliminaire laisse penser que le peptide MTP-PlexA1 possède un potentiel thérapeutique remarquable (**Figure 42**).

## 11. Vers une nouvelle classe de thérapie ciblée des cancers ?

Le concept de notre stratégie thérapeutique repose sur le fait que les domaines transmembranaires sont des acteurs à part entière de la formation des plateformes de signalisation responsables de nombreuses fonctions biologiques.

Depuis 10 ans, l'équipe de D. Bagnard a récolté un nombre important de résultats et d'informations permettant de bien comprendre le mécanisme d'action de cette stratégie d'inhibition. Les résultats de modélisation moléculaire, de FRET, de BACTH, de Duolink, d'immunoprécipitation, d'analyses de la signalisation, démontrent une interaction spécifique des peptides avec leurs cibles. Ces interactions sont capables de bloquer l'oligomérisation des récepteurs et par conséquent d'impacter la formation et la stabilité des plateformes dans lesquelles ils sont impliqués. L'interférence des plateformes permet d'inhiber simultanément différentes voies de signalisation. Cet effet pourrait permettre de lutter contre les mécanismes d'échappement et/ou de redondance mis en jeu dans les cellules tumorales par l'action prolongée des peptides qui peuvent entrer en compétition fonctionnelle avec les nombreux corécepteurs de NRP1 ou de PlexA1.

Mes travaux doivent être considérés comme une des premières démonstrations de la possibilité d'appliquer la stratégie peptidique développée au laboratoire à un grand nombre de récepteur formant des hétérodimères. A terme, de nombreuses autres cibles pourraient être inhibées selon le même procédé. Les obstacles de synthèse et de purification de ces peptides hydrophobes sont aujourd'hui levés. Nous avons développé une approche intégrée qui mêle modélisation, approches biochimiques et tests biologiques qui constituent une véritable chaîne de développement préclinique d'un nouveau type de médicament : les peptides antagonistes des segments transmembranaires.

# **Références bibliographiques**

## Références bibliographiques :

Adamian, L., and Liang, J. (2001). Helix-helix packing and interfacial pairwise interactions of residues in membrane proteins. *J. Mol. Biol.* *311*, 891–907.

Aizawa, H., Wakatsuki, S., Ishii, A., Moriyama, K., Sasaki, Y., Ohashi, K., Sekine-Aizawa, Y., Sehara-Fujisawa, A., Mizuno, K., Goshima, Y., et al. (2001). Phosphorylation of cofilin by LIM-kinase is necessary for semaphorin 3A-induced growth cone collapse. *Nat. Neurosci.* *4*, 367–373.

Aldape, K.D., Ballman, K., Furth, A., Buckner, J.C., Giannini, C., Burger, P.C., Scheithauer, B.W., Jenkins, R.B., and James, C.D. (2004). Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *63*, 700–707.

Amon, M.A., Ali, M., Bender, V., Chan, Y.-N., Toth, I., and Manolios, N. (2006). Lipidation and glycosylation of a T cell antigen receptor (TCR) transmembrane hydrophobic peptide dramatically enhances in vitro and in vivo function. *Biochim. Biophys. Acta* *1763*, 879–888.

Antipenko, A., Himanen, J.-P., van Leyen, K., Nardi-Dei, V., Lesniak, J., Barton, W.A., Rajashankar, K.R., Lu, M., Hoemme, C., Püschel, A.W., et al. (2003). Structure of the semaphorin-3A receptor binding module. *Neuron* *39*, 589–598.

Appleton, B.A., Wu, P., Maloney, J., Yin, J., Liang, W.-C., Stawicki, S., Mortara, K., Bowman, K.K., Elliott, J.M., Desmarais, W., et al. (2007). Structural studies of neuropilin/antibody complexes provide insights into semaphorin and VEGF binding. *EMBO J.* *26*, 4902–4912.

Ara, J., Fekete, S., Zhu, A., and Frank, M. (2010). Characterization of neural stem/progenitor cells expressing VEGF and its receptors in the subventricular zone of newborn piglet brain. *Neurochem. Res.* *35*, 1455–1470.

Arimura, N., Ménager, C., Kawano, Y., Yoshimura, T., Kawabata, S., Hattori, A., Fukata, Y., Amano, M., Goshima, Y., Inagaki, M., et al. (2005). Phosphorylation by Rho kinase regulates CRMP-2 activity in growth cones. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9973–9984.

Arkin, I.T., and Brunger, A.T. (1998). Statistical analysis of predicted transmembrane alpha-helices. *Biochim. Biophys. Acta* *1429*, 113–128.

Arkin, M.R., and Wells, J.A. (2004). Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat. Rev. Drug Discov.* *3*, 301–317.

Artigiani, S., Barberis, D., Fazzari, P., Longati, P., Angelini, P., van de Loo, J.-W., Comoglio, P.M., and Tamagnone, L. (2003). Functional regulation of semaphorin receptors by proprotein convertases. *J. Biol. Chem.* *278*, 10094–10101.

Artigiani, S., Conrotto, P., Fazzari, P., Gilestro, G.F., Barberis, D., Giordano, S., Comoglio, P.M., and Tamagnone, L. (2004). Plexin-B3 is a functional receptor for semaphorin 5A. *EMBO Rep.* *5*, 710–714.

Baba, T., Kariya, M., Higuchi, T., Mandai, M., Matsumura, N., Kondoh, E., Miyaniishi, M., Fukuhara, K., Takakura, K., and Fujii, S. (2007). Neuropilin-1 promotes unlimited growth of ovarian cancer by evading contact inhibition. *Gynecol. Oncol.* *105*, 703–711.

Bagci, T., Wu, J.K., Pfannl, R., Ilag, L.L., and Jay, D.G. (2009). Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. *Oncogene* *28*, 3537–3550.

Bagnard, D., Vaillant, C., Khuth, S.T., Dufay, N., Lohrum, M., Puschel, A.W., Belin, M.F., Bolz, J., and Thomasset, N. (2001). Semaphorin 3A-vascular endothelial growth factor-165 balance mediates migration and apoptosis of neural progenitor cells by the recruitment of shared receptor. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *21*, 3332–3341.

- Bagnard, D., Sainturet, N., Meyronet, D., Perraut, M., Miehé, M., Roussel, G., Aunis, D., Belin, M.F., and Thomasset, N. (2004). Differential MAP kinases activation during semaphorin3A-induced repulsion or apoptosis of neural progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* *25*, 722–731.
- Bagri, A., Cheng, H.-J., Yaron, A., Pleasure, S.J., and Tessier-Lavigne, M. (2003). Stereotyped pruning of long hippocampal axon branches triggered by retraction inducers of the semaphorin family. *Cell* *113*, 285–299.
- Balakrishnan, A., Penachioni, J.Y., Lamba, S., Bleeker, F.E., Zanon, C., Rodolfo, M., Vallacchi, V., Scarpa, A., Felicioni, L., Buck, M., et al. (2009). Molecular profiling of the “plexinome” in melanoma and pancreatic cancer. *Hum. Mutat.* *30*, 1167–1174.
- Baldi, I., Huchet, A., Bauchet, L., and Loiseau, H. (2010). [Epidemiology of glioblastoma]. *Neurochirurgie.* *56*, 433–440.
- Baldi, I., Gruber, A., Alioum, A., Berteaud, E., Lebailly, P., Huchet, A., Tourdias, T., Kantor, G., Maire, J.P., Vital, A., et al. (2011). Descriptive epidemiology of CNS tumors in France: results from the Gironde Registry for the period 2000-2007. *Neuro-Oncol.* *13*, 1370–1378.
- Ball, S.G., Bayley, C., Shuttleworth, C.A., and Kielty, C.M. (2010). Neuropilin-1 regulates platelet-derived growth factor receptor signalling in mesenchymal stem cells. *Biochem. J.* *427*, 29–40.
- Ballmer-Hofer, K., Andersson, A.E., Ratcliffe, L.E., and Berger, P. (2011). Neuropilin-1 promotes VEGFR-2 trafficking through Rab11 vesicles thereby specifying signal output. *Blood* *118*, 816–826.
- Banerjee, S., Sengupta, K., Dhar, K., Mehta, S., D’Amore, P.A., Dhar, G., and Banerjee, S.K. (2006). Breast cancer cells secreted platelet-derived growth factor-induced motility of vascular smooth muscle cells is mediated through neuropilin-1. *Mol. Carcinog.* *45*, 871–880.
- Bange, J., Prechtel, D., Cheburkin, Y., Specht, K., Harbeck, N., Schmitt, M., Knyazeva, T., Müller, S., Gärtner, S., Sures, I., et al. (2002). Cancer progression and tumor cell motility are associated with the FGFR4 Arg(388) allele. *Cancer Res.* *62*, 840–847.
- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* *444*, 756–760.
- Bargmann, C.I., and Weinberg, R.A. (1988). Oncogenic activation of the neu-encoded receptor protein by point mutation and deletion. *EMBO J.* *7*, 2043–2052.
- Bargmann, C.I., Hung, M.C., and Weinberg, R.A. (1986). Multiple independent activations of the neu oncogene by a point mutation altering the transmembrane domain of p185. *Cell* *45*, 649–657.
- Bauchet, L., Rigau, V., Mathieu-Daudé, H., Figarella-Branger, D., Hugues, D., Palusseau, L., Bauchet, F., Fabbro, M., Campello, C., Capelle, L., et al. (2007). French brain tumor data bank: methodology and first results on 10,000 cases. *J. Neurooncol.* *84*, 189–199.
- Bechinger, B. (2008). A dynamic view of peptides and proteins in membranes. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *65*, 3028–3039.
- Becker, P.M., Waltenberger, J., Yachechko, R., Mirzapiozova, T., Sham, J.S.K., Lee, C.G., Elias, J.A., and Verin, A.D. (2005). Neuropilin-1 regulates vascular endothelial growth factor-mediated endothelial permeability. *Circ. Res.* *96*, 1257–1265.
- Beevers, A.J., Damianoglou, A., Oates, J., Rodger, A., and Dixon, A.M. (2010). Sequence-dependent oligomerization of the Neu transmembrane domain suggests inhibition of “conformational switching” by an oncogenic mutant. *Biochemistry (Mosc.)* *49*, 2811–2820.

- Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, G., Haigh, J., Chauvet, S., and Mann, F. (2010). VEGFR2 (KDR/Flk1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron* *66*, 205–219.
- Benedito, R., Rocha, S.F., Woeste, M., Zamykal, M., Radtke, F., Casanovas, O., Duarte, A., Pytowski, B., and Adams, R.H. (2012). Notch-dependent VEGFR3 upregulation allows angiogenesis without VEGF-VEGFR2 signalling. *Nature* *484*, 110–114.
- Benej, M., Fekecsova, S., and Poturnajova, M. (2013). Assessing the effect of RET transmembrane domain mutations in receptor self-association capability using the in vivo TOXCAT system. *Neoplasma* *60*, 111–120.
- Bennasroune, A., Fickova, M., Gardin, A., Dirrig-Grosch, S., Aunis, D., Crémel, G., and Hubert, P. (2004). Transmembrane peptides as inhibitors of ErbB receptor signaling. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3464–3474.
- Bennasroune, A., Gardin, A., Auzan, C., Clauser, E., Dirrig-Grosch, S., Meira, M., Appert-Collin, A., Aunis, D., Crémel, G., and Hubert, P. (2005). Inhibition by transmembrane peptides of chimeric insulin receptors. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *62*, 2124–2131.
- Berens, M.E., and Giese, A. (1999). “...those left behind.” Biology and oncology of invasive glioma cells. *Neoplasia N. Y. N* *1*, 208–219.
- Bernard, F., Bossu, J.L., and Gaillard, S. (2001). Identification of living oligodendrocyte developmental stages by fractal analysis of cell morphology. *J. Neurosci. Res.* *65*, 439–445.
- Bilimoria, P.M., and Bonni, A. (2013). Molecular control of axon branching. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* *19*, 16–24.
- Binder-Foucard et al (2013). Estimation-nationale-incidence-mortalite-par-cancer-France-1980-2012-Partie-1-V2.pdf.
- Blanc, V., Nariculam, J., Munson, P., Freeman, A., Klocker, H., Masters, J., and Williamson, M. (2011). A role for class 3 semaphorins in prostate cancer. *The Prostate* *71*, 649–658.
- Bloch, I., Quintana, F.J., Gerber, D., Cohen, T., Cohen, I.R., and Shai, Y. (2007). T-cell inactivation and immunosuppressive activity induced by HIV gp41 via novel interacting motif. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *21*, 393–401.
- Bocharov, E.V., Mineev, K.S., Volynsky, P.E., Ermolyuk, Y.S., Tkach, E.N., Sobol, A.G., Chupin, V.V., Kirpichnikov, M.P., Efremov, R.G., and Arseniev, A.S. (2008a). Spatial structure of the dimeric transmembrane domain of the growth factor receptor ErbB2 presumably corresponding to the receptor active state. *J. Biol. Chem.* *283*, 6950–6956.
- Bocharov, E.V., Mayzel, M.L., Volynsky, P.E., Goncharuk, M.V., Ermolyuk, Y.S., Schulga, A.A., Artemenko, E.O., Efremov, R.G., and Arseniev, A.S. (2008b). Spatial structure and pH-dependent conformational diversity of dimeric transmembrane domain of the receptor tyrosine kinase EphA1. *J. Biol. Chem.* *283*, 29385–29395.
- Bocharov, E.V., Mayzel, M.L., Volynsky, P.E., Mineev, K.S., Tkach, E.N., Ermolyuk, Y.S., Schulga, A.A., Efremov, R.G., and Arseniev, A.S. (2010). Left-handed dimer of EphA2 transmembrane domain: Helix packing diversity among receptor tyrosine kinases. *Biophys. J.* *98*, 881–889.
- Boenzli, E., Robert-Tissot, C., Sabatino, G., Cattori, V., Meli, M.L., Gutte, B., Rovero, P., Flynn, N., Hofmann-Lehmann, R., and Lutz, H. (2011). In vitro inhibition of feline leukaemia virus infection by synthetic peptides derived from the transmembrane domain. *Antivir. Ther.* *16*, 905–913.

- Bonaventure, J., Rousseau, F., Legeai-Mallet, L., Le Merrer, M., Munnich, A., and Maroteaux, P. (1996). Common mutations in the gene encoding fibroblast growth factor receptor 3 account for achondroplasia, hypochondroplasia and thanatophoric dysplasia. *Acta Paediatr. Oslo Nor.* 1992 Suppl. 417, 33–38.
- Bormann, B.J., Knowles, W.J., and Marchesi, V.T. (1989). Synthetic peptides mimic the assembly of transmembrane glycoproteins. *J. Biol. Chem.* 264, 4033–4037.
- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865–877.
- Bovenkamp, D.E., Goishi, K., Bahary, N., Davidson, A.J., Zhou, Y., Becker, T., Becker, C.G., Zon, L.I., and Klagsbrun, M. (2004). Expression and mapping of duplicate neuropilin-1 and neuropilin-2 genes in developing zebrafish. *Gene Expr. Patterns GEP* 4, 361–370.
- Bowen, M., and Brunger, A.T. (2006). Conformation of the synaptobrevin transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 8378–8383.
- Bowen, M.E., Engelman, D.M., and Brunger, A.T. (2002). Mutational analysis of synaptobrevin transmembrane domain oligomerization. *Biochemistry (Mosc.)* 41, 15861–15866.
- Bowie, J.U. (2005). Solving the membrane protein folding problem. *Nature* 438, 581–589.
- Broholm, H., and Laursen, H. (2004). Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor neuropilin-1's distribution in astrocytic tumors. *APMIS Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 112, 257–263.
- Bron, R., Vermeren, M., Kokot, N., Andrews, W., Little, G.E., Mitchell, K.J., and Cohen, J. (2007). Boundary cap cells constrain spinal motor neuron somal migration at motor exit points by a semaphorin-plexin mechanism. *Neural Develop.* 2, 21.
- Brown, C.B., Feiner, L., Lu, M.M., Li, J., Ma, X., Webber, A.L., Jia, L., Raper, J.A., and Epstein, J.A. (2001). PlexinA2 and semaphorin signaling during cardiac neural crest development. *Dev. Camb. Engl.* 128, 3071–3080.
- Brown, M., Jacobs, T., Eickholt, B., Ferrari, G., Teo, M., Monfries, C., Qi, R.Z., Leung, T., Lim, L., and Hall, C. (2004). Alpha2-chimaerin, cyclin-dependent Kinase 5/p35, and its target collapsin response mediator protein-2 are essential components in semaphorin 3A-induced growth-cone collapse. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 8994–9004.
- Brümmendorf, T., and Rathjen, F.G. (1996). Structure/function relationships of axon-associated adhesion receptors of the immunoglobulin superfamily. *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 584–593.
- Cackowski, F.C., Xu, L., Hu, B., and Cheng, S.-Y. (2004). Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms. *Genomics* 84, 82–94.
- Cai, H., and Reed, R.R. (1999). Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 19, 6519–6527.
- Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., et al. (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer Cell* 11, 69–82.
- Cancer Genome Atlas Research Network (2008). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455, 1061–1068.
- Cao, Y., Ji, W.R., Qi, P., Rosin, A., and Cao, Y. (1997). Placenta growth factor: identification and characterization of a novel isoform generated by RNA alternative splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235, 493–498.

- Caputo, G.A., Litvinov, R.I., Li, W., Bennett, J.S., Degrado, W.F., and Yin, H. (2008). Computationally designed peptide inhibitors of protein-protein interactions in membranes. *Biochemistry (Mosc.)* *47*, 8600–8606.
- Carmeliet, P., and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* *473*, 298–307.
- Casazza, A., Finisguerra, V., Capparuccia, L., Camperi, A., Swiercz, J.M., Rizzolio, S., Rolny, C., Christensen, C., Bertotti, A., Sarotto, I., et al. (2010). Sema3E-Plexin D1 signaling drives human cancer cell invasiveness and metastatic spreading in mice. *J. Clin. Invest.* *120*, 2684–2698.
- Casazza, A., Fu, X., Johansson, I., Capparuccia, L., Andersson, F., Giustacchini, A., Squadrito, M.L., Venneri, M.A., Mazzone, M., Larsson, E., et al. (2011). Systemic and targeted delivery of semaphorin 3A inhibits tumor angiogenesis and progression in mouse tumor models. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *31*, 741–749.
- Castellani, V., Chédotal, A., Schachner, M., Faivre-Sarrailh, C., and Rougon, G. (2000). Analysis of the L1-deficient mouse phenotype reveals cross-talk between Sema3A and L1 signaling pathways in axonal guidance. *Neuron* *27*, 237–249.
- Castellani, V., Falk, J., and Rougon, G. (2004). Semaphorin3A-induced receptor endocytosis during axon guidance responses is mediated by L1 CAM. *Mol. Cell. Neurosci.* *26*, 89–100.
- Catalano, A., Lazzarini, R., Di Nuzzo, S., Orciari, S., and Procopio, A. (2009). The plexin-A1 receptor activates vascular endothelial growth factor-receptor 2 and nuclear factor-kappaB to mediate survival and anchorage-independent growth of malignant mesothelioma cells. *Cancer Res.* *69*, 1485–1493.
- Cebecauer, M., Spitaler, M., Sergé, A., and Magee, A.I. (2010). Signalling complexes and clusters: functional advantages and methodological hurdles. *J. Cell Sci.* *123*, 309–320.
- Chabbert-de Ponnat, I., Marie-Cardine, A., Pasterkamp, R.J., Schiavon, V., Tamagnone, L., Thomasset, N., Bensussan, A., and Boumsell, L. (2005). Soluble CD100 functions on human monocytes and immature dendritic cells require plexin C1 and plexin B1, respectively. *Int. Immunol.* *17*, 439–447.
- Chadborn, N.H., Ahmed, A.I., Holt, M.R., Prinjha, R., Dunn, G.A., Jones, G.E., and Eickholt, B.J. (2006). PTEN couples Sema3A signalling to growth cone collapse. *J. Cell Sci.* *119*, 951–957.
- Chang, A., Nishiyama, A., Peterson, J., Prineas, J., and Trapp, B.D. (2000a). NG2-positive oligodendrocyte progenitor cells in adult human brain and multiple sclerosis lesions. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 6404–6412.
- Chang, A., Tourtellotte, W.W., Rudick, R., and Trapp, B.D. (2002). Premyelinating oligodendrocytes in chronic lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *346*, 165–173.
- Chang, Y.S., di Tomaso, E., McDonald, D.M., Jones, R., Jain, R.K., and Munn, L.L. (2000b). Mosaic blood vessels in tumors: frequency of cancer cells in contact with flowing blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 14608–14613.
- Chardin, P. (2006). Function and regulation of Rnd proteins. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 54–62.
- Chauvet, S., Cohen, S., Yoshida, Y., Fekrane, L., Livet, J., Gayet, O., Segu, L., Buhot, M.-C., Jessell, T.M., Henderson, C.E., et al. (2007). Gating of Sema3E/PlexinD1 signaling by neuropilin-1 switches axonal repulsion to attraction during brain development. *Neuron* *56*, 807–822.
- Cheatham, B., Shoelson, S.E., Yamada, K., Goncalves, E., and Kahn, C.R. (1993). Substitution of the erbB-2 oncoprotein transmembrane domain activates the insulin receptor and modulates the action of insulin and insulin-receptor substrate 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *90*, 7336–7340.

- Chen, H., Chédotal, A., He, Z., Goodman, C.S., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III. *Neuron* *19*, 547–559.
- Chittenden, T.W., Claes, F., Lanahan, A.A., Autiero, M., Palac, R.T., Tkachenko, E.V., Elfenbein, A., Ruiz de Almodovar, C., Dedkov, E., Tomanek, R., et al. (2006). Selective regulation of arterial branching morphogenesis by synectin. *Dev. Cell* *10*, 783–795.
- Choi, Y.I., Duke-Cohan, J.S., Ahmed, W.B., Handley, M.A., Mann, F., Epstein, J.A., Clayton, L.K., and Reinherz, E.L. (2008). PlexinD1 glycoprotein controls migration of positively selected thymocytes into the medulla. *Immunity* *29*, 888–898.
- Choma, C., Gratkowski, H., Lear, J.D., and DeGrado, W.F. (2000). Asparagine-mediated self-association of a model transmembrane helix. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 161–166.
- Ciczora, Y., Callens, N., Penin, F., Pécheur, E.-I., and Dubuisson, J. (2007). Transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins: residues involved in E1E2 heterodimerization and involvement of these domains in virus entry. *J. Virol.* *81*, 2372–2381.
- Clement, V., Sanchez, P., de Tribolet, N., Radovanovic, I., and Ruiz i Altaba, A. (2007). HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity. *Curr. Biol. CB* *17*, 165–172.
- Cohen, R.I., Rottkamp, D.M., Maric, D., Barker, J.L., and Hudson, L.D. (2003). A role for semaphorins and neuropilins in oligodendrocyte guidance. *J. Neurochem.* *85*, 1262–1278.
- Colombo-Benkmann, M., Li, Z., Riemann, B., Hengst, K., Herbst, H., Keuser, R., Gross, U., Rondot, S., Raue, F., Senninger, N., et al. (2008). Characterization of the RET protooncogene transmembrane domain mutation S649L associated with nonaggressive medullary thyroid carcinoma. *Eur. J. Endocrinol. Eur. Fed. Endocr. Soc.* *158*, 811–816.
- Comeau, M.R., Johnson, R., DuBose, R.F., Petersen, M., Gearing, P., VandenBos, T., Park, L., Farrah, T., Buller, R.M., Cohen, J.I., et al. (1998). A poxvirus-encoded semaphorin induces cytokine production from monocytes and binds to a novel cellular semaphorin receptor, VESPR. *Immunity* *8*, 473–482.
- Constantinescu, S.N., Keren, T., Socolovsky, M., Nam, H., Henis, Y.I., and Lodish, H.F. (2001). Ligand-independent oligomerization of cell-surface erythropoietin receptor is mediated by the transmembrane domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 4379–4384.
- Coons, S.W., Johnson, P.C., Scheithauer, B.W., Yates, A.J., and Pearl, D.K. (1997). Improving diagnostic accuracy and interobserver concordance in the classification and grading of primary gliomas. *Cancer* *79*, 1381–1393.
- Cross, M.J., Dixelius, J., Matsumoto, T., and Claesson-Welsh, L. (2003). VEGF-receptor signal transduction. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 488–494.
- Curran, A.R., and Engelman, D.M. (2003). Sequence motifs, polar interactions and conformational changes in helical membrane proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *13*, 412–417.
- Cymer, F., and Schneider, D. (2010). Transmembrane helix-helix interactions involved in ErbB receptor signaling. *Cell Adhes. Migr.* *4*, 299–312.
- Daumas-Duport, C., Beuvon, F., Varlet, P., and Fallet-Bianco, C. (2000). [Gliomas: WHO and Sainte-Anne Hospital classifications]. *Ann. Pathol.* *20*, 413–428.
- Dawson, J.P., Weinger, J.S., and Engelman, D.M. (2002). Motifs of serine and threonine can drive association of transmembrane helices. *J. Mol. Biol.* *316*, 799–805.

- Dawson, J.P., Melnyk, R.A., Deber, C.M., and Engelman, D.M. (2003). Sequence context strongly modulates association of polar residues in transmembrane helices. *J. Mol. Biol.* **331**, 255–262.
- Dayanir, V., Meyer, R.D., Lashkari, K., and Rahimi, N. (2001). Identification of tyrosine residues in vascular endothelial growth factor receptor-2/FLK-1 involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase and cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **276**, 17686–17692.
- Delgoffe, G.M., Woo, S.-R., Turnis, M.E., Gravano, D.M., Guy, C., Overacre, A.E., Bettini, M.L., Vogel, P., Finkelstein, D., Bonnevier, J., et al. (2013). Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature* **501**, 252–256.
- Dews, I.C., and Mackenzie, K.R. (2007). Transmembrane domains of the syndecan family of growth factor coreceptors display a hierarchy of homotypic and heterotypic interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 20782–20787.
- Dhar, K., Dhar, G., Majumder, M., Haque, I., Mehta, S., Van Veldhuizen, P.J., Banerjee, S.K., and Banerjee, S. (2010). Tumor cell-derived PDGF-B potentiates mouse mesenchymal stem cells-pericytes transition and recruitment through an interaction with NRP-1. *Mol. Cancer* **9**, 209.
- Ding, H., Wu, X., Roncari, L., Lau, N., Shannon, P., Nagy, A., and Guha, A. (2000). Expression and regulation of neuropilin-1 in human astrocytomas. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **88**, 584–592.
- Dosch, D.D., and Ballmer-Hofer, K. (2010). Transmembrane domain-mediated orientation of receptor monomers in active VEGFR-2 dimers. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **24**, 32–38.
- Doura, A.K., Kobus, F.J., Dubrovsky, L., Hibbard, E., and Fleming, K.G. (2004). Sequence context modulates the stability of a GxxxG-mediated transmembrane helix-helix dimer. *J. Mol. Biol.* **341**, 991–998.
- Doyle, D.A., and Wallace, B.A. (1998). Shifting the equilibrium mixture of gramicidin double helices toward a single conformation with multivalent cationic salts. *Biophys. J.* **75**, 635–640.
- Duan, P., Li, S., and You, G. (2011). Transmembrane peptide as potent inhibitor of oligomerization and function of human organic anion transporter 1. *Mol. Pharmacol.* **79**, 569–574.
- Dubay, J.W., Roberts, S.J., Brody, B., and Hunter, E. (1992). Mutations in the leucine zipper of the human immunodeficiency virus type 1 transmembrane glycoprotein affect fusion and infectivity. *J. Virol.* **66**, 4748–4756.
- Ebie, A.Z., and Fleming, K.G. (2007). Dimerization of the erythropoietin receptor transmembrane domain in micelles. *J. Mol. Biol.* **366**, 517–524.
- Eddidin, M., Kuo, S.C., and Sheetz, M.P. (1991). Lateral movements of membrane glycoproteins restricted by dynamic cytoplasmic barriers. *Science* **254**, 1379–1382.
- Eichmann, A., Yuan, L., Moyon, D., Lenoble, F., Pardanaud, L., and Breant, C. (2005). Vascular development: from precursor cells to branched arterial and venous networks. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 259–267.
- Eisenhauer, E.A., Therasse, P., Bogaerts, J., Schwartz, L.H., Sargent, D., Ford, R., Dancey, J., Arbuck, S., Gwyther, S., Mooney, M., et al. (2009). New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* **1990** **45**, 228–247.
- El Hallani, S., Boisselier, B., Peglion, F., Rousseau, A., Colin, C., Idbaih, A., Marie, Y., Mokhtari, K., Thomas, J.-L., Eichmann, A., et al. (2010). A new alternative mechanism in glioblastoma vascularization: tubular vasculogenic mimicry. *Brain J. Neurol.* **133**, 973–982.

- Elia-Pasquet, S., Provost, D., Jaffré, A., Loiseau, H., Vital, A., Kantor, G., Maire, J.-P., Dautheribes, M., Darrouzet, V., Dartigues, J.-F., et al. (2004). Incidence of central nervous system tumors in Gironde, France. *Neuroepidemiology* *23*, 110–117.
- Engelman, D.M. (2005). Membranes are more mosaic than fluid. *Nature* *438*, 578–580.
- Engelman, D.M., Chen, Y., Chin, C.-N., Curran, A.R., Dixon, A.M., Dupuy, A.D., Lee, A.S., Lehnert, U., Matthews, E.E., Reshetnyak, Y.K., et al. (2003). Membrane protein folding: beyond the two stage model. *FEBS Lett.* *555*, 122–125.
- Erez, E., Fass, D., and Bibi, E. (2009). How intramembrane proteases bury hydrolytic reactions in the membrane. *Nature* *459*, 371–378.
- Escher, C., Cymer, F., and Schneider, D. (2009). Two GxxxG-like motifs facilitate promiscuous interactions of the human ErbB transmembrane domains. *J. Mol. Biol.* *389*, 10–16.
- Evans, I.M., Yamaji, M., Britton, G., Pellet-Many, C., Lockie, C., Zachary, I.C., and Frankel, P. (2011). Neuropilin-1 signaling through p130Cas tyrosine phosphorylation is essential for growth factor-dependent migration of glioma and endothelial cells. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1174–1185.
- Fagerberg, L., Jonasson, K., von Heijne, G., Uhlén, M., and Berglund, L. (2010). Prediction of the human membrane proteome. *Proteomics* *10*, 1141–1149.
- Fakhari, M., Pullirsch, D., Abraham, D., Paya, K., Hofbauer, R., Holzfeind, P., Hofmann, M., and Aharinejad, S. (2002). Selective upregulation of vascular endothelial growth factor receptors neuropilin-1 and -2 in human neuroblastoma. *Cancer* *94*, 258–263.
- Falk, J., Julien, F., Bechara, A., Fiore, R., Nawabi, H., Zhou, H., Hoyo-Becerra, C., Bozon, M., Rougon, G., Grumet, M., et al. (2005). Dual functional activity of semaphorin 3B is required for positioning the anterior commissure. *Neuron* *48*, 63–75.
- Fantin, A., Schwarz, Q., Davidson, K., Normando, E.M., Denti, L., and Ruhrberg, C. (2011). The cytoplasmic domain of neuropilin 1 is dispensable for angiogenesis, but promotes the spatial separation of retinal arteries and veins. *Dev. Camb. Engl.* *138*, 4185–4191.
- Fantin, A., Vieira, J.M., Plein, A., Denti, L., Fruttiger, M., Pollard, J.W., and Ruhrberg, C. (2013). NRP1 acts cell autonomously in endothelium to promote tip cell function during sprouting angiogenesis. *Blood* *121*, 2352–2362.
- Favier, B., Alam, A., Barron, P., Bonnin, J., Laboudie, P., Fons, P., Mandron, M., Herault, J.-P., Neufeld, G., Savi, P., et al. (2006). Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood* *108*, 1243–1250.
- Fdez, E., Martínez-Salvador, M., Beard, M., Woodman, P., and Hilfiker, S. (2010). Transmembrane-domain determinants for SNARE-mediated membrane fusion. *J. Cell Sci.* *123*, 2473–2480.
- Feiner, L., Koppel, A.M., Kobayashi, H., and Raper, J.A. (1997). Secreted chick semaphorins bind recombinant neuropilin with similar affinities but bind different subsets of neurons in situ. *Neuron* *19*, 539–545.
- Ferrara, N., and Henzel, W.J. (1989). Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *161*, 851–858.
- Finger, C., Escher, C., and Schneider, D. (2009). The single transmembrane domains of human receptor tyrosine kinases encode self-interactions. *Sci. Signal.* *2*, ra56.
- Fleishman, S.J., Schlessinger, J., and Ben-Tal, N. (2002). A putative molecular-activation switch in the transmembrane domain of erbB2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 15937–15940.

- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* *285*, 1182–1186.
- Fraisl, P., Mazzone, M., Schmidt, T., and Carmeliet, P. (2009). Regulation of angiogenesis by oxygen and metabolism. *Dev. Cell* *16*, 167–179.
- Freeman-Cook, L.L., Edwards, A.P.B., Dixon, A.M., Yates, K.E., Ely, L., Engelman, D.M., and Dimaio, D. (2005). Specific locations of hydrophilic amino acids in constructed transmembrane ligands of the platelet-derived growth factor beta receptor. *J. Mol. Biol.* *345*, 907–921.
- Fuh, G., Garcia, K.C., and de Vos, A.M. (2000). The interaction of neuropilin-1 with vascular endothelial growth factor and its receptor flt-1. *J. Biol. Chem.* *275*, 26690–26695.
- Fujio, Y., and Walsh, K. (1999). Akt mediates cytoprotection of endothelial cells by vascular endothelial growth factor in an anchorage-dependent manner. *J. Biol. Chem.* *274*, 16349–16354.
- Fujita, H., Zhang, B., Sato, K., Tanaka, J., and Sakanaka, M. (2001). Expressions of neuropilin-1, neuropilin-2 and semaphorin 3A mRNA in the rat brain after middle cerebral artery occlusion. *Brain Res.* *914*, 1–14.
- Fukumura, D., Gohongi, T., Kadambi, A., Izumi, Y., Ang, J., Yun, C.O., Buerk, D.G., Huang, P.L., and Jain, R.K. (2001). Predominant role of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis and vascular permeability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 2604–2609.
- Fukushima, Y., Okada, M., Kataoka, H., Hirashima, M., Yoshida, Y., Mann, F., Gomi, F., Nishida, K., Nishikawa, S.-I., and Uemura, A. (2011). Sema3E-PlexinD1 signaling selectively suppresses disoriented angiogenesis in ischemic retinopathy in mice. *J. Clin. Invest.* *121*, 1974–1985.
- Gabrovska, P.N., Smith, R.A., Tiang, T., Weinstein, S.R., Haupt, L.M., and Griffiths, L.R. (2011). Semaphorin-plexin signalling genes associated with human breast tumourigenesis. *Gene* *489*, 63–69.
- Gadd, S.L., and Clevenger, C.V. (2006). Ligand-independent dimerization of the human prolactin receptor isoforms: functional implications. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *20*, 2734–2746.
- Gagliardini, V., and Fankhauser, C. (1999). Semaphorin III can induce death in sensory neurons. *Mol. Cell. Neurosci.* *14*, 301–316.
- Gagnon, M.L., Bielenberg, D.R., Gechtman, Z., Miao, H.Q., Takashima, S., Soker, S., and Klagsbrun, M. (2000). Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*, 2573–2578.
- Galanis, E., Buckner, J.C., Maurer, M.J., Kreisberg, J.I., Ballman, K., Boni, J., Peralba, J.M., Jenkins, R.B., Dakhil, S.R., Morton, R.F., et al. (2005). Phase II trial of temsirolimus (CCI-779) in recurrent glioblastoma multiforme: a North Central Cancer Treatment Group Study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* *23*, 5294–5304.
- Gao, Y., Li, M., Chen, W., and Simons, M. (2000). Synectin, syndecan-4 cytoplasmic domain binding PDZ protein, inhibits cell migration. *J. Cell. Physiol.* *184*, 373–379.
- Gardin, A., Auzan, C., Clauser, E., Malherbe, T., Aunis, D., Crémel, G., and Hubert, P. (1999). Substitution of the insulin receptor transmembrane domain with that of glycoporphin A inhibits insulin action. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *13*, 1347–1357.
- Gavard, J., and Gutkind, J.S. (2006). VEGF controls endothelial-cell permeability by promoting the beta-arrestin-dependent endocytosis of VE-cadherin. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1223–1234.

- Gerber, D., Sal-Man, N., and Shai, Y. (2004). Two motifs within a transmembrane domain, one for homodimerization and the other for heterodimerization. *J. Biol. Chem.* *279*, 21177–21182.
- Gerber, D., Quintana, F.J., Bloch, I., Cohen, I.R., and Shai, Y. (2005). D-enantiomer peptide of the TCR $\alpha$  transmembrane domain inhibits T-cell activation in vitro and in vivo. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 1190–1192.
- Gerhardt, H., Ruhrberg, C., Abramsson, A., Fujisawa, H., Shima, D., and Betsholtz, C. (2004). Neuropilin-1 is required for endothelial tip cell guidance in the developing central nervous system. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *231*, 503–509.
- Ghez, D., Lepelletier, Y., Lambert, S., Fourneau, J.-M., Blot, V., Janvier, S., Arnulf, B., van Endert, P.M., Heveker, N., Pique, C., et al. (2006). Neuropilin-1 is involved in human T-cell lymphotropic virus type 1 entry. *J. Virol.* *80*, 6844–6854.
- Giger, R.J., Urquhart, E.R., Gillespie, S.K., Levengood, D.V., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (1998). Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity. *Neuron* *21*, 1079–1092.
- Giordano, R.J., Anobom, C.D., Cardó-Vila, M., Kalil, J., Valente, A.P., Pasqualini, R., Almeida, F.C.L., and Arap, W. (2005). Structural basis for the interaction of a vascular endothelial growth factor mimic peptide motif and its corresponding receptors. *Chem. Biol.* *12*, 1075–1083.
- Giordano, S., Corso, S., Conrotto, P., Artigiani, S., Gilestro, G., Barberis, D., Tamagnone, L., and Comoglio, P.M. (2002). The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat. Cell Biol.* *4*, 720–724.
- Gitler, A.D., Lu, M.M., and Epstein, J.A. (2004). PlexinD1 and semaphorin signaling are required in endothelial cells for cardiovascular development. *Dev. Cell* *7*, 107–116.
- Glantz, M.J., Burger, P.C., Herndon, J.E., 2nd, Friedman, A.H., Cairncross, J.G., Vick, N.A., and Schold, S.C., Jr (1991). Influence of the type of surgery on the histologic diagnosis in patients with anaplastic gliomas. *Neurology* *41*, 1741–1744.
- Glinka, Y., and Prud'homme, G.J. (2008). Neuropilin-1 is a receptor for transforming growth factor beta-1, activates its latent form, and promotes regulatory T cell activity. *J. Leukoc. Biol.* *84*, 302–310.
- Gluzman-Poltorak, Z., Cohen, T., Herzog, Y., and Neufeld, G. (2000). Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165 [corrected]. *J. Biol. Chem.* *275*, 18040–18045.
- Godfroy, J.I., 3rd, Roostan, M., Moroz, Y.S., Korendovych, I.V., and Yin, H. (2012). Isolated Toll-like receptor transmembrane domains are capable of oligomerization. *PLoS One* *7*, e48875.
- Göllner, G.P., Müller, G., Alt, R., Knop, J., and Enk, A.H. (2000). Therapeutic application of T cell receptor mimic peptides or cDNA in the treatment of T cell-mediated skin diseases. *Gene Ther.* *7*, 1000–1004.
- Gomez, C., Burt-Pichat, B., Mallein-Gerin, F., Merle, B., Delmas, P.D., Skerry, T.M., Vico, L., Malaval, L., and Chenu, C. (2005). Expression of Semaphorin-3A and its receptors in endochondral ossification: potential role in skeletal development and innervation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *234*, 393–403.
- Goodman, C., Kolodkin, A., Luo, Y., Püschel, A., and Raper, J. (1999). Unified Nomenclature for the Semaphorins/Collapsins. *Cell* *97*, 551–552.
- Goshima, Y., Nakamura, F., Strittmatter, P., and Strittmatter, S.M. (1995). Collapsin-induced growth cone collapse mediated by an intracellular protein related to UNC-33. *Nature* *376*, 509–514.

- Gospodarowicz, D., Abraham, J.A., and Schilling, J. (1989). Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *86*, 7311–7315.
- Grasberger, B., Minton, A.P., DeLisi, C., and Metzger, H. (1986). Interaction between proteins localized in membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *83*, 6258–6262.
- Gratkowski, H., Lear, J.D., and DeGrado, W.F. (2001). Polar side chains drive the association of model transmembrane peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 880–885.
- Grygielska, B., Hughes, C.E., and Watson, S.P. (2009). Molecular basis of platelet activation by an alphallbbeta3-CHAMPS peptide. *J. Thromb. Haemost. JTH* *7*, 339–346.
- Gu, C., Limberg, B.J., Whitaker, G.B., Perman, B., Leahy, D.J., Rosenbaum, J.S., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (2002). Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165. *J. Biol. Chem.* *277*, 18069–18076.
- Gu, C., Rodriguez, E.R., Reimert, D.V., Shu, T., Fritsch, B., Richards, L.J., Kolodkin, A.L., and Ginty, D.D. (2003). Neuropilin-1 conveys semaphorin and VEGF signaling during neural and cardiovascular development. *Dev. Cell* *5*, 45–57.
- Gu, C., Yoshida, Y., Livet, J., Reimert, D.V., Mann, F., Merte, J., Henderson, C.E., Jessell, T.M., Kolodkin, A.L., and Ginty, D.D. (2005). Semaphorin 3E and plexin-D1 control vascular pattern independently of neuropilins. *Science* *307*, 265–268.
- Gualandris, A., Noghero, A., Geuna, M., Arese, M., Valdembri, D., Serini, G., and Bussolino, F. (2009). Microenvironment drives the endothelial or neural fate of differentiating embryonic stem cells coexpressing neuropilin-1 and Flk-1. *FASEB J.* *23*, 68–78.
- Guo, W., Shi, L., and Javitch, J.A. (2003). The fourth transmembrane segment forms the interface of the dopamine D2 receptor homodimer. *J. Biol. Chem.* *278*, 4385–4388.
- Guo, W., Shi, L., Filizola, M., Weinstein, H., and Javitch, J.A. (2005). Crosstalk in G protein-coupled receptors: changes at the transmembrane homodimer interface determine activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 17495–17500.
- Guo, W., Urizar, E., Kralikova, M., Mobarec, J.C., Shi, L., Filizola, M., and Javitch, J.A. (2008). Dopamine D2 receptors form higher order oligomers at physiological expression levels. *EMBO J.* *27*, 2293–2304.
- Hall, A. (1998). Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* *279*, 509–514.
- Hamerlik, P., Lathia, J.D., Rasmussen, R., Wu, Q., Bartkova, J., Lee, M., Moudry, P., Bartek, J., Jr, Fischer, W., Lukas, J., et al. (2012). Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *J. Exp. Med.* *209*, 507–520.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* *86*, 353–364.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hansel, D.E., Wilentz, R.E., Yeo, C.J., Schulick, R.D., Montgomery, E., and Maitra, A. (2004). Expression of neuropilin-1 in high-grade dysplasia, invasive cancer, and metastases of the human gastrointestinal tract. *Am. J. Surg. Pathol.* *28*, 347–356.
- Hansen, W., Hutzler, M., Abel, S., Alter, C., Stockmann, C., Kliche, S., Albert, J., Sparwasser, T., Sakaguchi, S., Westendorf, A.M., et al. (2012). Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *J. Exp. Med.* *209*, 2001–2016.

- Hardee, M.E., and Zagzag, D. (2012). Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am. J. Pathol.* *181*, 1126–1141.
- Hauser, S., and Weich, H.A. (1993). A heparin-binding form of placenta growth factor (PlGF-2) is expressed in human umbilical vein endothelial cells and in placenta. *Growth Factors Chur Switz.* *9*, 259–268.
- Hayashi, M., Nakashima, T., Taniguchi, M., Kodama, T., Kumanogoh, A., and Takayanagi, H. (2012). Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature* *485*, 69–74.
- He, Z., and Tessier-Lavigne, M. (1997). Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III. *Cell* *90*, 739–751.
- He, H., Yang, T., Terman, J.R., and Zhang, X. (2009). Crystal structure of the plexin A3 intracellular region reveals an autoinhibited conformation through active site sequestration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 15610–15615.
- Heasman, S.J., and Ridley, A.J. (2008). Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *9*, 690–701.
- Hedin, L.E., Illergård, K., and Elofsson, A. (2011). An introduction to membrane proteins. *J. Proteome Res.* *10*, 3324–3331.
- Hegi, M.E., Diserens, A.-C., Gorlia, T., Hamou, M.-F., de Tribolet, N., Weller, M., Kros, J.M., Hainfellner, J.A., Mason, W., Mariani, L., et al. (2005). MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 997–1003.
- Heimberger, A.B., Hlatky, R., Suki, D., Yang, D., Weinberg, J., Gilbert, M., Sawaya, R., and Aldape, K. (2005). Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *11*, 1462–1466.
- Henderson, R., and Unwin, P.N. (1975). Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* *257*, 28–32.
- Hernández-Miranda, L.R., Cariboni, A., Faux, C., Ruhrberg, C., Cho, J.H., Cloutier, J.-F., Eickholt, B.J., Parnavelas, J.G., and Andrews, W.D. (2011). Robo1 regulates semaphorin signaling to guide the migration of cortical interneurons through the ventral forebrain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 6174–6187.
- Herzog, B., Pellet-Many, C., Britton, G., Hartzoulakis, B., and Zachary, I.C. (2011). VEGF binding to NRP1 is essential for VEGF stimulation of endothelial cell migration, complex formation between NRP1 and VEGFR2, and signaling via FAK Tyr407 phosphorylation. *Mol. Biol. Cell* *22*, 2766–2776.
- Herzog, Y., Kalcheim, C., Kahane, N., Reshef, R., and Neufeld, G. (2001). Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins. *Mech. Dev.* *109*, 115–119.
- Herzog, Y., Guttman-Raviv, N., and Neufeld, G. (2005). Segregation of arterial and venous markers in subpopulations of blood islands before vessel formation. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *232*, 1047–1055.
- Hofer, E., and Schweighofer, B. (2007). Signal transduction induced in endothelial cells by growth factor receptors involved in angiogenesis. *Thromb. Haemost.* *97*, 355–363.
- Hoffman, S., Propp, J.M., and McCarthy, B.J. (2006). Temporal trends in incidence of primary brain tumors in the United States, 1985-1999. *Neuro-Oncol.* *8*, 27–37.

- Holl, E.K., O'Connor, B.P., Holl, T.M., Roney, K.E., Zimmermann, A.G., Jha, S., Kelsoe, G., and Ting, J.P.-Y. (2011). Plexin-D1 is a novel regulator of germinal centers and humoral immune responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *186*, 5603–5611.
- Holland, S.J., Gale, N.W., Mbamalu, G., Yancopoulos, G.D., Henkemeyer, M., and Pawson, T. (1996). Bidirectional signalling through the EPH-family receptor Nuk and its transmembrane ligands. *Nature* *383*, 722–725.
- Holmes, D.I.R., and Zachary, I.C. (2008). Vascular endothelial growth factor regulates stanniocalcin-1 expression via neuropilin-1-dependent regulation of KDR and synergism with fibroblast growth factor-2. *Cell. Signal.* *20*, 569–579.
- Holmqvist, K., Cross, M.J., Rolny, C., Hägerkvist, R., Rahimi, N., Matsumoto, T., Claesson-Welsh, L., and Welsh, M. (2004). The adaptor protein shb binds to tyrosine 1175 in vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 and regulates VEGF-dependent cellular migration. *J. Biol. Chem.* *279*, 22267–22275.
- Hong, T.-M., Chen, Y.-L., Wu, Y.-Y., Yuan, A., Chao, Y.-C., Chung, Y.-C., Wu, M.-H., Yang, S.-C., Pan, S.-H., Shih, J.-Y., et al. (2007). Targeting neuropilin 1 as an antitumor strategy in lung cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *13*, 4759–4768.
- Houck, K.A., Ferrara, N., Winer, J., Cachianes, G., Li, B., and Leung, D.W. (1991). The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *5*, 1806–1814.
- Hsieh, S.H., Ying, N.W., Wu, M.H., Chiang, W.F., Hsu, C.L., Wong, T.Y., Jin, Y.T., Hong, T.M., and Chen, Y.L. (2008). Galectin-1, a novel ligand of neuropilin-1, activates VEGFR-2 signaling and modulates the migration of vascular endothelial cells. *Oncogene* *27*, 3746–3753.
- Hu, B., Guo, P., Bar-Joseph, I., Imanishi, Y., Jarzynka, M.J., Bogler, O., Mikkelsen, T., Hirose, T., Nishikawa, R., and Cheng, S.Y. (2007). Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway. *Oncogene* *26*, 5577–5586.
- Hu, H., Marton, T.F., and Goodman, C.S. (2001). Plexin B mediates axon guidance in *Drosophila* by simultaneously inhibiting active Rac and enhancing RhoA signaling. *Neuron* *32*, 39–51.
- Huang, H.-Y., Cheng, Y.-Y., Liao, W.-C., Tien, Y.-W., Yang, C.-H.J., Hsu, S.-M., and Huang, P.-H. (2012). SOX4 transcriptionally regulates multiple SEMA3/plexin family members and promotes tumor growth in pancreatic cancer. *PLoS One* *7*, e48637.
- Huang, J., Chen, S., Zhang, J.J., and Huang, X.-Y. (2013). Crystal structure of oligomeric  $\beta$ 1-adrenergic G protein-coupled receptors in ligand-free basal state. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 419–425.
- Huber, O., Kemler, R., and Langosch, D. (1999). Mutations affecting transmembrane segment interactions impair adhesiveness of E-cadherin. *J. Cell Sci.* *112 ( Pt 23)*, 4415–4423.
- Hwang, J.-Y., Lee, J.-Y., Park, M.-H., Kim, K.-S., Kim, K.-K., Ryu, H.-J., Lee, J.-K., Han, B.G., Kim, J.W., Oh, B., et al. (2006). Association of PLXNA2 polymorphisms with vertebral fracture risk and bone mineral density in postmenopausal Korean population. *Osteoporos. Int. J. Establ. Result Coop. Eur. Found. Osteoporos. Natl. Osteoporos. Found. USA* *17*, 1592–1601.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673–687.
- Idbaih, A., Marie, Y., Pierron, G., Brennetot, C., Hoang-Xuan, K., Kujas, M., Mokhtari, K., Sanson, M., Lejeune, J., Aurias, A., et al. (2005). Two types of chromosome 1p losses with opposite significance in gliomas. *Ann. Neurol.* *58*, 483–487.
- Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402, Cairncross, G., Berkey, B., Shaw, E., Jenkins, R., Scheithauer, B., Brachman, D., Buckner, J., Fink, K., Souhami, L., et al. (2006).

Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24**, 2707–2714.

Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2006). Small GTPase Rnd1 is involved in neuronal activity-dependent dendritic development in hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.* **400**, 218–223.

Ito, N., Wernstedt, C., Engström, U., and Claesson-Welsh, L. (1998). Identification of vascular endothelial growth factor receptor-1 tyrosine phosphorylation sites and binding of SH2 domain-containing molecules. *J. Biol. Chem.* **273**, 23410–23418.

Iwamoto, T., You, M., Li, E., Spangler, J., Tomich, J.M., and Hristova, K. (2005). Synthesis and initial characterization of FGFR3 transmembrane domain: consequences of sequence modifications. *Biochim. Biophys. Acta* **1668**, 240–247.

Jain, R.K., di Tomaso, E., Duda, D.G., Loeffler, J.S., Sorensen, A.G., and Batchelor, T.T. (2007). Angiogenesis in brain tumours. *Nat. Rev. Neurosci.* **8**, 610–622.

Janssen, B.J.C., Robinson, R.A., Pérez-Brangulí, F., Bell, C.H., Mitchell, K.J., Siebold, C., and Jones, E.Y. (2010). Structural basis of semaphorin-plexin signalling. *Nature* **467**, 1118–1122.

Janssen, B.J.C., Malinauskas, T., Weir, G.A., Cader, M.Z., Siebold, C., and Jones, E.Y. (2012). Neuropilins lock secreted semaphorins onto plexins in a ternary signaling complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 1293–1299.

Jarvis, A., Allerston, C.K., Jia, H., Herzog, B., Garza-Garcia, A., Winfield, N., Ellard, K., Aqil, R., Lynch, R., Chapman, C., et al. (2010). Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) interaction. *J. Med. Chem.* **53**, 2215–2226.

Javadpour, M.M., Eilers, M., Groesbeek, M., and Smith, S.O. (1999). Helix packing in polytopic membrane proteins: role of glycine in transmembrane helix association. *Biophys. J.* **77**, 1609–1618.

Jenkins, R.B., Blair, H., Ballman, K.V., Giannini, C., Arusell, R.M., Law, M., Flynn, H., Passe, S., Felten, S., Brown, P.D., et al. (2006). A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma. *Cancer Res.* **66**, 9852–9861.

Jia, H., Bagherzadeh, A., Hartzoulakis, B., Jarvis, A., Löhr, M., Shaikh, S., Aqil, R., Cheng, L., Tickner, M., Esposito, D., et al. (2006). Characterization of a bicyclic peptide neuropilin-1 (NP-1) antagonist (EG3287) reveals importance of vascular endothelial growth factor exon 8 for NP-1 binding and role of NP-1 in KDR signaling. *J. Biol. Chem.* **281**, 13493–13502.

Joukov, V., Pajusola, K., Kaipainen, A., Chilov, D., Lahtinen, I., Kukk, E., Saksela, O., Kalkkinen, N., and Alitalo, K. (1996). A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* **15**, 290–298.

Kanda, T., Yoshida, Y., Izu, Y., Nifuji, A., Ezura, Y., Nakashima, K., and Noda, M. (2007). PlexinD1 deficiency induces defects in axial skeletal morphogenesis. *J. Cell. Biochem.* **101**, 1329–1337.

Karimova, G., Ullmann, A., and Ladant, D. (2001). Protein-protein interaction between *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 73–82.

Karjalainen, K., Jaalouk, D.E., Bueso-Ramos, C.E., Zurita, A.J., Kuniyasu, A., Eckhardt, B.L., Marini, F.C., Lichtiger, B., O'Brien, S., Kantarjian, H.M., et al. (2011). Targeting neuropilin-1 in human leukemia and lymphoma. *Blood* **117**, 920–927.

- Kärpänen, T., Heckman, C.A., Keskitalo, S., Jeltsch, M., Ollila, H., Neufeld, G., Tamagnone, L., and Alitalo, K. (2006). Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1462–1472.
- Kawamura, H., Li, X., Goishi, K., van Meeteren, L.A., Jakobsson, L., Cébe-Suarez, S., Shimizu, A., Edholm, D., Ballmer-Hofer, K., Kjellén, L., et al. (2008). Neuropilin-1 in regulation of VEGF-induced activation of p38MAPK and endothelial cell organization. *Blood* 112, 3638–3649.
- Kawasaki, T., Kitsukawa, T., Bekku, Y., Matsuda, Y., Sanbo, M., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1999). A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation. *Dev. Camb. Engl.* 126, 4895–4902.
- Keith, B., Johnson, R.S., and Simon, M.C. (2012). HIF1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$ : sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat. Rev. Cancer* 12, 9–22.
- Kendall, R.L., Rutledge, R.Z., Mao, X., Tebben, A.J., Hungate, R.W., and Thomas, K.A. (1999). Vascular endothelial growth factor receptor KDR tyrosine kinase activity is increased by autophosphorylation of two activation loop tyrosine residues. *J. Biol. Chem.* 274, 6453–6460.
- KERNOHAN, J.W., and MABON, R.F. (1949). A simplified classification of the gliomas. *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* 24, 71–75.
- Kigel, B., Rabinowicz, N., Varshavsky, A., Kessler, O., and Neufeld, G. (2011). Plexin-A4 promotes tumor progression and tumor angiogenesis by enhancement of VEGF and bFGF signaling. *Blood* 118, 4285–4296.
- Kim, J., Oh, W.-J., Gaiano, N., Yoshida, Y., and Gu, C. (2011). Semaphorin 3E-Plexin-D1 signaling regulates VEGF function in developmental angiogenesis via a feedback mechanism. *Genes Dev.* 25, 1399–1411.
- Kim, J.H., Hartley, T.L., Curran, A.R., and Engelman, D.M. (2009). Molecular dynamics studies of the transmembrane domain of gp41 from HIV-1. *Biochim. Biophys. Acta* 1788, 1804–1812.
- Kim, S., Jeon, T.-J., Oberai, A., Yang, D., Schmidt, J.J., and Bowie, J.U. (2005). Transmembrane glycine zippers: physiological and pathological roles in membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 14278–14283.
- Kitsukawa, T., Shimono, A., Kawakami, A., Kondoh, H., and Fujisawa, H. (1995). Overexpression of a membrane protein, neuropilin, in chimeric mice causes anomalies in the cardiovascular system, nervous system and limbs. *Dev. Camb. Engl.* 121, 4309–4318.
- Kitsukawa, T., Shimizu, M., Sanbo, M., Hirata, T., Taniguchi, M., Bekku, Y., Yagi, T., and Fujisawa, H. (1997). Neuropilin-semaphorin III/D-mediated chemorepulsive signals play a crucial role in peripheral nerve projection in mice. *Neuron* 19, 995–1005.
- Kjaer, S., Kurokawa, K., Perrinjaquet, M., Abrescia, C., and Ibáñez, C.F. (2006). Self-association of the transmembrane domain of RET underlies oncogenic activation by MEN2A mutations. *Oncogene* 25, 7086–7095.
- Klostermann, A., Lohrum, M., Adams, R.H., and Püschel, A.W. (1998). The chemorepulsive activity of the axonal guidance signal semaphorin D requires dimerization. *J. Biol. Chem.* 273, 7326–7331.
- Kodo, K., Nishizawa, T., Furutani, M., Arai, S., Yamamura, E., Joo, K., Takahashi, T., Matsuoka, R., and Yamagishi, H. (2009). GATA6 mutations cause human cardiac outflow tract defects by disrupting semaphorin-plexin signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 13933–13938.
- Kolodkin, A.L., and Tessier-Lavigne, M. (2011). Mechanisms and molecules of neuronal wiring: a primer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3.

- Kolodkin, A.L., Matthes, D.J., and Goodman, C.S. (1993). The semaphorin genes encode a family of transmembrane and secreted growth cone guidance molecules. *Cell* **75**, 1389–1399.
- Kolodkin, A.L., LeVengood, D.V., Rowe, E.G., Tai, Y.T., Giger, R.J., and Ginty, D.D. (1997). Neuropilin is a semaphorin III receptor. *Cell* **90**, 753–762.
- Koppel, A.M., Feiner, L., Kobayashi, H., and Raper, J.A. (1997). A 70 amino acid region within the semaphorin domain activates specific cellular response of semaphorin family members. *Neuron* **19**, 531–537.
- Kota, P., Reeves, P.J., Rajbhandary, U.L., and Khorana, H.G. (2006). Opsin is present as dimers in COS1 cells: identification of amino acids at the dimeric interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 3054–3059.
- Kozma, R., Sarnier, S., Ahmed, S., and Lim, L. (1997). Rho family GTPases and neuronal growth cone remodelling: relationship between increased complexity induced by Cdc42Hs, Rac1, and acetylcholine and collapse induced by RhoA and lysophosphatidic acid. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 1201–1211.
- Kreuter, M., Woelke, K., Bieker, R., Schliemann, C., Steins, M., Buechner, T., Berdel, W.E., and Mesters, R.M. (2006). Correlation of neuropilin-1 overexpression to survival in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **20**, 1950–1954.
- Kubatzky, K.F., Ruan, W., Gurezka, R., Cohen, J., Ketteler, R., Watowich, S.S., Neumann, D., Langosch, D., and Klingmüller, U. (2001). Self assembly of the transmembrane domain promotes signal transduction through the erythropoietin receptor. *Curr. Biol. CB* **11**, 110–115.
- Kuhlmann, T., Miron, V., Cui, Q., Cuo, Q., Wegner, C., Antel, J., and Brück, W. (2008). Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* **131**, 1749–1758.
- Kunkel, P., Ulbricht, U., Bohlen, P., Brockmann, M.A., Fillbrandt, R., Stavrou, D., Westphal, M., and Lamszus, K. (2001). Inhibition of glioma angiogenesis and growth in vivo by systemic treatment with a monoclonal antibody against vascular endothelial growth factor receptor-2. *Cancer Res.* **61**, 6624–6628.
- Lai, C.-C., Edwards, A.P.B., and DiMaio, D. (2005). Productive interaction between transmembrane mutants of the bovine papillomavirus E5 protein and the platelet-derived growth factor beta receptor. *J. Virol.* **79**, 1924–1929.
- Lamallice, L., Houle, F., Jourdan, G., and Huot, J. (2004). Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene* **23**, 434–445.
- Lamont, R.E., Lamont, E.J., and Childs, S.J. (2009). Antagonistic interactions among Plexins regulate the timing of intersegmental vessel formation. *Dev. Biol.* **331**, 199–209.
- Lanahan, A., Zhang, X., Fantin, A., Zhuang, Z., Rivera-Molina, F., Speichinger, K., Prahst, C., Zhang, J., Wang, Y., Davis, G., et al. (2013). The neuropilin 1 cytoplasmic domain is required for VEGF-A-dependent arteriogenesis. *Dev. Cell* **25**, 156–168.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860–921.
- Langosch, D., and Arkin, I.T. (2009). Interaction and conformational dynamics of membrane-spanning protein helices. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **18**, 1343–1358.
- Langosch, D., and Heringa, J. (1998). Interaction of transmembrane helices by a knobs-into-holes packing characteristic of soluble coiled coils. *Proteins* **31**, 150–159.

- Lantuéjoul, S., Constantin, B., Drabkin, H., Brambilla, C., Roche, J., and Brambilla, E. (2003). Expression of VEGF, semaphorin SEMA3F, and their common receptors neuropilins NP1 and NP2 in preinvasive bronchial lesions, lung tumours, and cell lines. *J. Pathol.* *200*, 336–347.
- Latil, A., Bièche, I., Pesche, S., Valéri, A., Fournier, G., Cussenot, O., and Lidereau, R. (2000). VEGF overexpression in clinically localized prostate tumors and neuropilin-1 overexpression in metastatic forms. *Int. J. Cancer* *89*, 167–171.
- Lau, T.-L., Kim, C., Ginsberg, M.H., and Ulmer, T.S. (2009). The structure of the integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 3 transmembrane complex explains integrin transmembrane signalling. *EMBO J.* *28*, 1351–1361.
- Lemmon, M.A., Flanagan, J.M., Treutlein, H.R., Zhang, J., and Engelman, D.M. (1992). Sequence specificity in the dimerization of transmembrane alpha-helices. *Biochemistry (Mosc.)* *31*, 12719–12725.
- Lepelletier, Y., Smaniotto, S., Hadj-Slimane, R., Villa-Verde, D.M.S., Nogueira, A.C., Dardenne, M., Hermine, O., and Savino, W. (2007). Control of human thymocyte migration by Neuropilin-1/Semaphorin-3A-mediated interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 5545–5550.
- Liang, W.-C., Dennis, M.S., Stawicki, S., Chantry, Y., Pan, Q., Chen, Y., Eigenbrot, C., Yin, J., Koch, A.W., Wu, X., et al. (2007). Function blocking antibodies to neuropilin-1 generated from a designed human synthetic antibody phage library. *J. Mol. Biol.* *366*, 815–829.
- Lindner, R., and Naim, H.Y. (2009). Domains in biological membranes. *Exp. Cell Res.* *315*, 2871–2878.
- Lingwood, D., and Simons, K. (2010). Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science* *327*, 46–50.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S. (2006). Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* *5*, 67.
- Liu, H., Juo, Z.S., Shim, A.H.-R., Focia, P.J., Chen, X., Garcia, K.C., and He, X. (2010). Structural basis of semaphorin-plexin recognition and viral mimicry from Sema7A and A39R complexes with PlexinC1. *Cell* *142*, 749–761.
- Liu, L., Bäcklund, L.M., Nilsson, B.R., Grandér, D., Ichimura, K., Goike, H.M., and Collins, V.P. (2005). Clinical significance of EGFR amplification and the aberrant EGFRvIII transcript in conventionally treated astrocytic gliomas. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* *83*, 917–926.
- Liu, Y., Engelman, D.M., and Gerstein, M. (2002). Genomic analysis of membrane protein families: abundance and conserved motifs. *Genome Biol.* *3*, research0054.
- Long, J.B., Jay, S.M., Segal, S.S., and Madri, J.A. (2009). VEGF-A and Semaphorin3A: modulators of vascular sympathetic innervation. *Dev. Biol.* *334*, 119–132.
- Louis, D.N., Ohgaki, H., Wiestler, O.D., Cavenee, W.K., Burger, P.C., Jouvett, A., Scheithauer, B.W., and Kleihues, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *114*, 97–109.
- Love, C.A., Harlos, K., Mavaddat, N., Davis, S.J., Stuart, D.I., Jones, E.Y., and Esnouf, R.M. (2003). The ligand-binding face of the semaphorins revealed by the high-resolution crystal structure of SEMA4D. *Nat. Struct. Biol.* *10*, 843–848.
- Lu, P., Weaver, V.M., and Werb, Z. (2012). The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* *196*, 395–406.

- Lucio-Eterovic, A.K., Piao, Y., and de Groot, J.F. (2009). Mediators of glioblastoma resistance and invasion during antivascular endothelial growth factor therapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 4589–4599.
- Luo, B.-H., and Springer, T.A. (2006). Integrin structures and conformational signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.* 18, 579–586.
- Luo, Y., Raible, D., and Raper, J.A. (1993). Collapsin: a protein in brain that induces the collapse and paralysis of neuronal growth cones. *Cell* 75, 217–227.
- Lyttle, D.J., Fraser, K.M., Fleming, S.B., Mercer, A.A., and Robinson, A.J. (1994). Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J. Virol.* 68, 84–92.
- Mac Gabhann, F., and Popel, A.S. (2005). Differential binding of VEGF isoforms to VEGF receptor 2 in the presence of neuropilin-1: a computational model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288, H2851–2860.
- Mac Gabhann, F., and Popel, A.S. (2006). Targeting neuropilin-1 to inhibit VEGF signaling in cancer: Comparison of therapeutic approaches. *PLoS Comput. Biol.* 2, e180.
- Mackenzie, K.R., Prestegard, J.H., and Engelman, D.M. (1997). A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science* 276, 131–133.
- Maestrini, E., Tamagnone, L., Longati, P., Cremona, O., Gulisano, M., Bione, S., Tamanini, F., Neel, B.G., Toniolo, D., and Comoglio, P.M. (1996). A family of transmembrane proteins with homology to the MET-hepatocyte growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 674–678.
- Magee, J.A., Piskounova, E., and Morrison, S.J. (2012). Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* 21, 283–296.
- Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Delli-Bovi, P., and Persico, M.G. (1991). Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 9267–9271.
- Maglione, D., Guerriero, V., Viglietto, G., Ferraro, M.G., Aprelikova, O., Alitalo, K., Del Vecchio, S., Lei, K.J., Chou, J.Y., and Persico, M.G. (1993). Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14. *Oncogene* 8, 925–931.
- Maher, E.A., Brennan, C., Wen, P.Y., Durso, L., Ligon, K.L., Richardson, A., Khatri, D., Feng, B., Sinha, R., Louis, D.N., et al. (2006). Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer Res.* 66, 11502–11513.
- Maier, V., Jolicoeur, C., Rayburn, H., Takegahara, N., Kumanogoh, A., Kikutani, H., Tessier-Lavigne, M., Wurst, W., and Friedel, R.H. (2011). Semaphorin 4C and 4G are ligands of Plexin-B2 required in cerebellar development. *Mol. Cell. Neurosci.* 46, 419–431.
- Majed, H.H., Chandran, S., Niclou, S.P., Nicholas, R.S., Wilkins, A., Wing, M.G., Rhodes, K.E., Spillantini, M.G., and Compston, A. (2006). A novel role for Sema3A in neuroprotection from injury mediated by activated microglia. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 26, 1730–1738.
- Makinen, T., Olofsson, B., Karpanen, T., Hellman, U., Soker, S., Klagsbrun, M., Eriksson, U., and Alitalo, K. (1999). Differential binding of vascular endothelial growth factor B splice and proteolytic isoforms to neuropilin-1. *J. Biol. Chem.* 274, 21217–21222.
- Mamluk, R., Gechtman, Z., Kutcher, M.E., Gasiunas, N., Gallagher, J., and Klagsbrun, M. (2002). Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain. *J. Biol. Chem.* 277, 24818–24825.

- Mancia, F., Assur, Z., Herman, A.G., Siegel, R., and Hendrickson, W.A. (2008). Ligand sensitivity in dimeric associations of the serotonin 5HT<sub>2c</sub> receptor. *EMBO Rep.* **9**, 363–369.
- Manolios, N., Bonifacino, J.S., and Klausner, R.D. (1990). Transmembrane helical interactions and the assembly of the T cell receptor complex. *Science* **249**, 274–277.
- Manolios, N., Collier, S., Taylor, J., Pollard, J., Harrison, L.C., and Bender, V. (1997). T-cell antigen receptor transmembrane peptides modulate T-cell function and T cell-mediated disease. *Nat. Med.* **3**, 84–88.
- Marin, O., Yaron, A., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., and Rubenstein, J.L. (2001). Sorting of striatal and cortical interneurons regulated by semaphorin-neuropilin interactions. *Science* **293**, 872–875.
- Masuda, K., Furuyama, T., Takahara, M., Fujioka, S., Kurinami, H., and Inagaki, S. (2004). Semaphorin 4D stimulates axonal outgrowth of embryonic DRG sensory neurones. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* **9**, 821–829.
- Matsumoto, T., Bohman, S., Dixelius, J., Berge, T., Dimberg, A., Magnusson, P., Wang, L., Wikner, C., Qi, J.H., Wernstedt, C., et al. (2005). VEGF receptor-2 Y951 signaling and a role for the adapter molecule TSA1 in tumor angiogenesis. *EMBO J.* **24**, 2342–2353.
- Matsuoka, R.L., Nguyen-Ba-Charvet, K.T., Parray, A., Badea, T.C., Chédotal, A., and Kolodkin, A.L. (2011). Transmembrane semaphorin signalling controls laminar stratification in the mammalian retina. *Nature* **470**, 259–263.
- Matsushita, A., Götze, T., and Krc, M. (2007). Hepatocyte growth factor-mediated cell invasion in pancreatic cancer cells is dependent on neuropilin-1. *Cancer Res.* **67**, 10309–10316.
- Matsushita, C., Tamagaki, H., Miyazawa, Y., Aimoto, S., Smith, S.O., and Sato, T. (2013). Transmembrane helix orientation influences membrane binding of the intracellular juxtamembrane domain in Neu receptor peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 1646–1651.
- Matthews, E.E., Zoonens, M., and Engelman, D.M. (2006). Dynamic helix interactions in transmembrane signaling. *Cell* **127**, 447–450.
- Maurer, M.H., Tripps, W.K.C., Feldmann, R.E., Jr, and Kuschinsky, W. (2003). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in rat neural stem cells. *Neurosci. Lett.* **344**, 165–168.
- Mauti, O., Domanitskaya, E., Andermatt, I., Sadhu, R., and Stoeckli, E.T. (2007). Semaphorin6A acts as a gate keeper between the central and the peripheral nervous system. *Neural Develop.* **2**, 28.
- Mechtcheriakova, D., Wlachos, A., Holzmüller, H., Binder, B.R., and Hofer, E. (1999). Vascular endothelial cell growth factor-induced tissue factor expression in endothelial cells is mediated by EGR-1. *Blood* **93**, 3811–3823.
- Mehlen, P., Delloye-Bourgeois, C., and Chédotal, A. (2011). Novel roles for Slits and netrins: axon guidance cues as anticancer targets? *Nat. Rev. Cancer* **11**, 188–197.
- Melnyk, R.A., Kim, S., Curran, A.R., Engelman, D.M., Bowie, J.U., and Deber, C.M. (2004). The affinity of GXXXG motifs in transmembrane helix-helix interactions is modulated by long-range communication. *J. Biol. Chem.* **279**, 16591–16597.
- Mendrola, J.M., Berger, M.B., King, M.C., and Lemmon, M.A. (2002). The single transmembrane domains of ErbB receptors self-associate in cell membranes. *J. Biol. Chem.* **277**, 4704–4712.
- Meyer, M., Clauss, M., Lepplé-Wienhues, A., Waltenberger, J., Augustin, H.G., Ziche, M., Lanz, C., Büttner, M., Rziha, H.J., and Dehio, C. (1999). A novel vascular endothelial growth factor

encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* *18*, 363–374.

Meyers, G.A., Orlow, S.J., Munro, I.R., Przylepa, K.A., and Jabs, E.W. (1995). Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) transmembrane mutation in Crozon syndrome with acanthosis nigricans. *Nat. Genet.* *11*, 462–464.

Miao, H.Q., Soker, S., Feiner, L., Alonso, J.L., Raper, J.A., and Klagsbrun, M. (1999a). Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J. Cell Biol.* *146*, 233–242.

Miao, H.Q., Soker, S., Feiner, L., Alonso, J.L., Raper, J.A., and Klagsbrun, M. (1999b). Neuropilin-1 mediates collapsin-1/semaphorin III inhibition of endothelial cell motility: functional competition of collapsin-1 and vascular endothelial growth factor-165. *J. Cell Biol.* *146*, 233–242.

Miao, H.Q., Lee, P., Lin, H., Soker, S., and Klagsbrun, M. (2000). Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *14*, 2532–2539.

Michel, V., and Bakovic, M. (2007). Lipid rafts in health and disease. *Biol. Cell Auspices Eur. Cell Biol. Organ.* *99*, 129–140.

Migdal, M., Huppertz, B., Tessler, S., Comforti, A., Shibuya, M., Reich, R., Baumann, H., and Neufeld, G. (1998). Neuropilin-1 is a placenta growth factor-2 receptor. *J. Biol. Chem.* *273*, 22272–22278.

Mineev, K.S., Bocharov, E.V., Pustovalova, Y.E., Bocharova, O.V., Chupin, V.V., and Arseniev, A.S. (2010). Spatial structure of the transmembrane domain heterodimer of ErbB1 and ErbB2 receptor tyrosine kinases. *J. Mol. Biol.* *400*, 231–243.

Mittler, M.A., Walters, B.C., and Stopa, E.G. (1996). Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J. Neurosurg.* *85*, 1091–1094.

Montero, M., Gulzar, N., Klaric, K.-A., Donald, J.E., Lepik, C., Wu, S., Tsai, S., Julien, J.-P., Hessel, A.J., Wang, S., et al. (2012). Neutralizing epitopes in the membrane-proximal external region of HIV-1 gp41 are influenced by the transmembrane domain and the plasma membrane. *J. Virol.* *86*, 2930–2941.

Muhle-Goll, C., Hoffmann, S., Afonin, S., Grage, S.L., Polyansky, A.A., Windisch, D., Zeitler, M., Bürck, J., and Ulrich, A.S. (2012). Hydrophobic matching controls the tilt and stability of the dimeric platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)  $\beta$  transmembrane segment. *J. Biol. Chem.* *287*, 26178–26186.

Mukoyama, Y.-S., Gerber, H.-P., Ferrara, N., Gu, C., and Anderson, D.J. (2005). Peripheral nerve-derived VEGF promotes arterial differentiation via neuropilin 1-mediated positive feedback. *Dev. Camb. Engl.* *132*, 941–952.

Müller, M.W., Giese, N.A., Swiercz, J.M., Ceyhan, G.O., Esposito, I., Hinz, U., Büchler, P., Giese, T., Büchler, M.W., Offermanns, S., et al. (2007). Association of axon guidance factor semaphorin 3A with poor outcome in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *121*, 2421–2433.

Nakamura, F., Tanaka, M., Takahashi, T., Kalb, R.G., and Strittmatter, S.M. (1998). Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron* *21*, 1093–1100.

Narazaki, M., Segarra, M., Hou, X., Tanaka, T., Li, X., and Tosato, G. (2010). Oligo-guanosine nucleotide induces neuropilin-1 internalization in endothelial cells and inhibits angiogenesis. *Blood* *116*, 3099–3107.

- Nasarre, C., Roth, M., Jacob, L., Roth, L., Koncina, E., Thien, A., Labourdette, G., Poulet, P., Hubert, P., Crémel, G., et al. (2010). Peptide-based interference of the transmembrane domain of neuropilin-1 inhibits glioma growth in vivo. *Oncogene* 29, 2381–2392.
- Neilson, K.M., and Friesel, R. (1996). Ligand-independent activation of fibroblast growth factor receptors by point mutations in the extracellular, transmembrane, and kinase domains. *J. Biol. Chem.* 271, 25049–25057.
- Neufeld, G., Kessler, O., and Herzog, Y. (2002). The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv. Exp. Med. Biol.* 515, 81–90.
- Ng, D.P., and Deber, C.M. (2010). Modulation of the oligomerization of myelin proteolipid protein by transmembrane helix interaction motifs. *Biochemistry (Mosc.)* 49, 6896–6902.
- Nishimura, T., Fukata, Y., Kato, K., Yamaguchi, T., Matsuura, Y., Kamiguchi, H., and Kaibuchi, K. (2003). CRMP-2 regulates polarized Numb-mediated endocytosis for axon growth. *Nat. Cell Biol.* 5, 819–826.
- Nobes, C.D., Lauritzen, I., Mattei, M.G., Paris, S., Hall, A., and Chardin, P. (1998). A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J. Cell Biol.* 141, 187–197.
- Nobusawa, S., Watanabe, T., Kleihues, P., and Ohgaki, H. (2009). IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 15, 6002–6007.
- Nogi, T., Yasui, N., Mihara, E., Matsunaga, Y., Noda, M., Yamashita, N., Toyofuku, T., Uchiyama, S., Goshima, Y., Kumanogoh, A., et al. (2010). Structural basis for semaphorin signalling through the plexin receptor. *Nature* 467, 1123–1127.
- Norman, P. (2002). Tipifarnib (Janssen Pharmaceutica). *Curr. Opin. Investig. Drugs Lond. Engl.* 2000 3, 313–319.
- O'Connor, B.P., and Ting, J.P.-Y. (2008). The evolving role of semaphorins and plexins in the immune system: Plexin-A1 regulation of dendritic cell function. *Immunol. Res.* 41, 217–222.
- O'Shea, E.K., Klemm, J.D., Kim, P.S., and Alber, T. (1991). X-ray structure of the GCN4 leucine zipper, a two-stranded, parallel coiled coil. *Science* 254, 539–544.
- Oates, J., King, G., and Dixon, A.M. (2010). Strong oligomerization behavior of PDGFbeta receptor transmembrane domain and its regulation by the juxtamembrane regions. *Biochim. Biophys. Acta* 1798, 605–615.
- Ohgaki, H., and Kleihues, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* 170, 1445–1453.
- Oinuma, I., Ishikawa, Y., Katoh, H., and Negishi, M. (2004). The Semaphorin 4D receptor Plexin-B1 is a GTPase activating protein for R-Ras. *Science* 305, 862–865.
- Okada, A., and Tomooka, Y. (2013). A role of Sema6A expressed in oligodendrocyte precursor cells. *Neurosci. Lett.* 539, 48–53.
- Okubo, M., Kimura, T., Fujita, Y., Mochizuki, S., Niki, Y., Enomoto, H., Suda, Y., Toyama, Y., and Okada, Y. (2011). Semaphorin 3A is expressed in human osteoarthritic cartilage and antagonizes vascular endothelial growth factor 165-promoted chondrocyte migration: an implication for chondrocyte cloning. *Arthritis Rheum.* 63, 3000–3009.
- Olofsson, B., Pajusola, K., Kaipainen, A., von Euler, G., Joukov, V., Saksela, O., Orpana, A., Pettersson, R.F., Alitalo, K., and Eriksson, U. (1996a). Vascular endothelial growth factor B, a novel growth factor for endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 2576–2581.

- Olofsson, B., Pajusola, K., von Euler, G., Chilov, D., Alitalo, K., and Eriksson, U. (1996b). Genomic organization of the mouse and human genes for vascular endothelial growth factor B (VEGF-B) and characterization of a second splice isoform. *J. Biol. Chem.* *271*, 19310–19317.
- Olsson, A.-K., Dimberg, A., Kreuger, J., and Claesson-Welsh, L. (2006). VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 359–371.
- Osada, H., Tokunaga, T., Nishi, M., Hatanaka, H., Abe, Y., Tsugu, A., Kijima, H., Yamazaki, H., Ueyama, Y., and Nakamura, M. (2004). Overexpression of the neuropilin 1 (NRP1) gene correlated with poor prognosis in human glioma. *Anticancer Res.* *24*, 547–552.
- Osada, R., Horiuchi, A., Kikuchi, N., Ohira, S., Ota, M., Katsuyama, Y., and Konishi, I. (2006). Expression of semaphorins, vascular endothelial growth factor, and their common receptor neuropilins and allelic loss of semaphorin locus in epithelial ovarian neoplasms: increased ratio of vascular endothelial growth factor to semaphorin is a poor prognostic factor in ovarian carcinomas. *Hum. Pathol.* *37*, 1414–1425.
- Otrock, Z.K., Makarem, J.A., and Shamseddine, A.I. (2007). Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells. Mol. Dis.* *38*, 258–268.
- Overton, M.C., Chinault, S.L., and Blumer, K.J. (2003). Oligomerization, biogenesis, and signaling is promoted by a glycoprotein A-like dimerization motif in transmembrane domain 1 of a yeast G protein-coupled receptor. *J. Biol. Chem.* *278*, 49369–49377.
- Pan, Q., Chathery, Y., Wu, Y., Rathore, N., Tong, R.K., Peale, F., Bagri, A., Tessier-Lavigne, M., Koch, A.W., and Watts, R.J. (2007a). Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting. *J. Biol. Chem.* *282*, 24049–24056.
- Pan, Q., Chathery, Y., Liang, W.-C., Stawicki, S., Mak, J., Rathore, N., Tong, R.K., Kowalski, J., Yee, S.F., Pacheco, G., et al. (2007b). Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth. *Cancer Cell* *11*, 53–67.
- Parikh, A.A., Fan, F., Liu, W.B., Ahmad, S.A., Stoeltzing, O., Reinmuth, N., Bielenberg, D., Bucana, C.D., Klagsbrun, M., and Ellis, L.M. (2004). Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis. *Am. J. Pathol.* *164*, 2139–2151.
- Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J.C.-H., Leary, R.J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I.-M., Gallia, G.L., et al. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* *321*, 1807–1812.
- Pasquale, E.B. (2010). Eph receptors and ephrins in cancer: bidirectional signalling and beyond. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 165–180.
- Pecho-Vrieseling, E., Sigrist, M., Yoshida, Y., Jessell, T.M., and Arber, S. (2009). Specificity of sensory-motor connections encoded by Sema3e-Plxnd1 recognition. *Nature* *459*, 842–846.
- Persson, A.I., Petritsch, C., Swartling, F.J., Itsara, M., Sim, F.J., Auvergne, R., Goldenberg, D.D., Vandenberg, S.R., Nguyen, K.N., Yakovenko, S., et al. (2010). Non-stem cell origin for oligodendroglioma. *Cancer Cell* *18*, 669–682.
- Petti, L.M., Talbert-Slagle, K., Hochstrasser, M.L., and Dimaio, D. (2013). A Single Amino Acid Substitution Converts a Transmembrane Protein Activator of the Platelet-derived Growth Factor  $\beta$  Receptor into an Inhibitor. *J. Biol. Chem.* *288*, 27273–27286.
- Piaton, G., Aigrot, M.-S., Williams, A., Moyon, S., Tepavcevic, V., Moutkine, I., Gras, J., Matho, K.S., Schmitt, A., Soellner, H., et al. (2011). Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system. *Brain J. Neurol.* *134*, 1156–1167.

- Piechnik, A., Dmoszynska, A., Omiotek, M., Mlak, R., Kowal, M., Stilgenbauer, S., Bullinger, L., and Giannopoulos, K. (2013). The VEGF receptor, neuropilin-1, represents a promising novel target for chronic lymphocytic leukemia patients. *Int. J. Cancer* *133*, 1489–1496.
- Plotkowski, M.L., Kim, S., Phillips, M.L., Partridge, A.W., Deber, C.M., and Bowie, J.U. (2007). Transmembrane domain of myelin protein zero can form dimers: possible implications for myelin construction. *Biochemistry (Mosc.)* *46*, 12164–12173.
- Poltorak, Z., Cohen, T., and Neufeld, G. (2000). The VEGF splice variants: properties, receptors, and usage for the treatment of ischemic diseases. *Herz* *25*, 126–129.
- Popot, J.L., and Engelman, D.M. (1990). Membrane protein folding and oligomerization: the two-stage model. *Biochemistry (Mosc.)* *29*, 4031–4037.
- Porotto, M., Yokoyama, C.C., Palermo, L.M., Mungall, B., Aljofan, M., Cortese, R., Pessi, A., and Moscona, A. (2010). Viral entry inhibitors targeted to the membrane site of action. *J. Virol.* *84*, 6760–6768.
- Poulsen, B.E., and Deber, C.M. (2012). Drug efflux by a small multidrug resistance protein is inhibited by a transmembrane peptide. *Antimicrob. Agents Chemother.* *56*, 3911–3916.
- Prahst, C., Héroult, M., Lanahan, A.A., Uziel, N., Kessler, O., Shraga-Heled, N., Simons, M., Neufeld, G., and Augustin, H.G. (2008). Neuropilin-1-VEGFR-2 complexing requires the PDZ-binding domain of neuropilin-1. *J. Biol. Chem.* *283*, 25110–25114.
- Przylepa, K.A., Paznekas, W., Zhang, M., Golabi, M., Bias, W., Bamshad, M.J., Carey, J.C., Hall, B.D., Stevenson, R., Orlow, S., et al. (1996). Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome. *Nat. Genet.* *13*, 492–494.
- Purow, B.W., Haque, R.M., Noel, M.W., Su, Q., Burdick, M.J., Lee, J., Sundaresan, T., Pastorino, S., Park, J.K., Mikolaenko, I., et al. (2005). Expression of Notch-1 and its ligands, Delta-like-1 and Jagged-1, is critical for glioma cell survival and proliferation. *Cancer Res.* *65*, 2353–2363.
- Püschel, A.W. (2002). The function of neuropilin/plexin complexes. *Adv. Exp. Med. Biol.* *515*, 71–80.
- Qi, J.H., and Claesson-Welsh, L. (2001). VEGF-induced activation of phosphoinositide 3-kinase is dependent on focal adhesion kinase. *Exp. Cell Res.* *263*, 173–182.
- Raper, J.A. (2000). Semaphorins and their receptors in vertebrates and invertebrates. *Curr. Opin. Neurobiol.* *10*, 88–94.
- Rasheed, B.K., Wiltshire, R.N., Bigner, S.H., and Bigner, D.D. (1999). Molecular pathogenesis of malignant gliomas. *Curr. Opin. Oncol.* *11*, 162–167.
- Renaud, J., Kerjan, G., Sumita, I., Zagar, Y., Georget, V., Kim, D., Fouquet, C., Suda, K., Sanbo, M., Suto, F., et al. (2008). Plexin-A2 and its ligand, Sema6A, control nucleus-centrosome coupling in migrating granule cells. *Nat. Neurosci.* *11*, 440–449.
- Renzi, M.J., Feiner, L., Koppel, A.M., and Raper, J.A. (1999). A dominant negative receptor for specific secreted semaphorins is generated by deleting an extracellular domain from neuropilin-1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *19*, 7870–7880.
- Ricard, D., Stankoff, B., Bagnard, D., Aguera, M., Rogemond, V., Antoine, J.C., Spassky, N., Zalc, B., Lubetzki, C., Belin, M.F., et al. (2000). Differential expression of collapsin response mediator proteins (CRMP/ULIP) in subsets of oligodendrocytes in the postnatal rodent brain. *Mol. Cell. Neurosci.* *16*, 324–337.
- Ricard, D., Idbaih, A., Ducray, F., Lahutte, M., Hoang-Xuan, K., and Delattre, J.-Y. (2012). Primary brain tumours in adults. *Lancet* *379*, 1984–1996.

- Ricci-Vitiani, L., Pallini, R., Biffoni, M., Todaro, M., Invernici, G., Cenci, T., Maira, G., Parati, E.A., Stassi, G., Larocca, L.M., et al. (2010). Tumour vascularization via endothelial differentiation of glioblastoma stem-like cells. *Nature* *468*, 824–828.
- Rigau, V., Zouaoui, S., Mathieu-Daudé, H., Darlix, A., Maran, A., Trétarre, B., Bessaoud, F., Bauchet, F., Attaoua, R., Fabbro-Peray, P., et al. (2011). French brain tumor database: 5-year histological results on 25 756 cases. *Brain Pathol. Zurich Switz.* *21*, 633–644.
- Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *11*, 73–91.
- Rizzolio, S., Rabinowicz, N., Rainero, E., Lanzetti, L., Serini, G., Norman, J., Neufeld, G., and Tamagnone, L. (2012). Neuropilin-1-dependent regulation of EGF-receptor signaling. *Cancer Res.* *72*, 5801–5811.
- Rohm, B., Ottemeyer, A., Lohrum, M., and Püschel, A.W. (2000a). Plexin/neuropilin complexes mediate repulsion by the axonal guidance signal semaphorin 3A. *Mech. Dev.* *93*, 95–104.
- Rohm, B., Rahim, B., Kleiber, B., Hovatta, I., and Püschel, A.W. (2000b). The semaphorin 3A receptor may directly regulate the activity of small GTPases. *FEBS Lett.* *486*, 68–72.
- Roodink, I., Verrijp, K., Raats, J., and Leenders, W.P.J. (2009). Plexin D1 is ubiquitously expressed on tumor vessels and tumor cells in solid malignancies. *BMC Cancer* *9*, 297.
- Rossignol, M., Beggs, A.H., Pierce, E.A., and Klagsbrun, M. (1999). Human neuropilin-1 and neuropilin-2 map to 10p12 and 2q34, respectively. *Genomics* *57*, 459–460.
- Rossignol, M., Gagnon, M.L., and Klagsbrun, M. (2000). Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics* *70*, 211–222.
- Roth, L., Nasarre, C., Dirrig-Grosch, S., Aunis, D., Crémel, G., Hubert, P., and Bagnard, D. (2008). Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1. *Mol. Biol. Cell* *19*, 646–654.
- Roth, L., Koncina, E., Satkauskas, S., Crémel, G., Aunis, D., and Bagnard, D. (2009). The many faces of semaphorins: from development to pathology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* *66*, 649–666.
- Roy, R., Laage, R., and Langosch, D. (2004). Synaptobrevin transmembrane domain dimerization-revisited. *Biochemistry (Mosc.)* *43*, 4964–4970.
- Ruan, W., Becker, V., Klingmüller, U., and Langosch, D. (2004). The interface between self-assembling erythropoietin receptor transmembrane segments corresponds to a membrane-spanning leucine zipper. *J. Biol. Chem.* *279*, 3273–3279.
- Rubenstein, J.L., Kim, J., Ozawa, T., Zhang, M., Westphal, M., Deen, D.F., and Shuman, M.A. (2000). Anti-VEGF antibody treatment of glioblastoma prolongs survival but results in increased vascular cooption. *Neoplasia N. Y. N* *2*, 306–314.
- Rünker, A.E., Little, G.E., Suto, F., Fujisawa, H., and Mitchell, K.J. (2008). Semaphorin-6A controls guidance of corticospinal tract axons at multiple choice points. *Neural Develop.* *3*, 34.
- Russ, W.P., and Engelman, D.M. (2000). The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* *296*, 911–919.
- Saffman, P.G., and Delbrück, M. (1975). Brownian motion in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *72*, 3111–3113.
- Sahay, A., Kim, C.-H., Sepkuty, J.P., Cho, E., Haganir, R.L., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (2005). Secreted semaphorins modulate synaptic transmission in the adult hippocampus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 3613–3620.

- Sako, Y., and Kusumi, A. (1994). Compartmentalized structure of the plasma membrane for receptor movements as revealed by a nanometer-level motion analysis. *J. Cell Biol.* 125, 1251–1264.
- Sal-Man, N., Gerber, D., and Shai, Y. (2004). The composition rather than position of polar residues (QxxS) drives aspartate receptor transmembrane domain dimerization in vivo. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 2309–2313.
- Sanchez-Carbayo, M., Socci, N.D., Lozano, J.J., Li, W., Charytonowicz, E., Belbin, T.J., Prystowsky, M.B., Ortiz, A.R., Childs, G., and Cordon-Cardo, C. (2003). Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am. J. Pathol.* 163, 505–516.
- Sandoval, I.V., and Bakke, O. (1994). Targeting of membrane proteins to endosomes and lysosomes. *Trends Cell Biol.* 4, 292–297.
- Sanson, M., Marie, Y., Paris, S., Idbaih, A., Laffaire, J., Ducray, F., El Hallani, S., Boisselier, B., Mokhtari, K., Hoang-Xuan, K., et al. (2009). Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4150–4154.
- Sarris, M., Andersen, K.G., Randow, F., Mayr, L., and Betz, A.G. (2008). Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity* 28, 402–413.
- Satoda, M., Takagi, S., Ohta, K., Hirata, T., and Fujisawa, H. (1995). Differential expression of two cell surface proteins, neuropilin and plexin, in *Xenopus* olfactory axon subclasses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 942–955.
- Sawano, A., Takahashi, T., Yamaguchi, S., and Shibuya, M. (1997). The phosphorylated 1169-tyrosine containing region of flt-1 kinase (VEGFR-1) is a major binding site for PLCgamma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 238, 487–491.
- Schachner, M. (1991). Cell surface recognition and neuron-glia interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 633, 105–112.
- Schneider, D., and Engelman, D.M. (2003). GALLEX, a measurement of heterologous association of transmembrane helices in a biological membrane. *J. Biol. Chem.* 278, 3105–3111.
- Schneider, D., and Engelman, D.M. (2004a). Motifs of two small residues can assist but are not sufficient to mediate transmembrane helix interactions. *J. Mol. Biol.* 343, 799–804.
- Schneider, D., and Engelman, D.M. (2004b). Involvement of transmembrane domain interactions in signal transduction by alpha/beta integrins. *J. Biol. Chem.* 279, 9840–9846.
- Schor, N.F. (2005). The p75 neurotrophin receptor in human development and disease. *Prog. Neurobiol.* 77, 201–214.
- Schulz, G.E. (2002). The structure of bacterial outer membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1565, 308–317.
- Schwarz, Q., Maden, C.H., Vieira, J.M., and Ruhrberg, C. (2009). Neuropilin 1 signaling guides neural crest cells to coordinate pathway choice with cell specification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 6164–6169.
- Scully, S., Francescone, R., Faibish, M., Bentley, B., Taylor, S.L., Oh, D., Schapiro, R., Moral, L., Yan, W., and Shao, R. (2012). Transdifferentiation of glioblastoma stem-like cells into mural cells drives vasculogenic mimicry in glioblastomas. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 12950–12960.

- Seerapu, H.R., Borthakur, S., Kong, N., Agrawal, S., Drazba, J., VasANJI, A., Fantin, A., Ruhrberg, C., Buck, M., and Horowitz, A. (2013). The cytoplasmic domain of neuropilin-1 regulates focal adhesion turnover. *FEBS Lett.*
- Senes, A., Gerstein, M., and Engelman, D.M. (2000). Statistical analysis of amino acid patterns in transmembrane helices: the GxxxG motif occurs frequently and in association with beta-branched residues at neighboring positions. *J. Mol. Biol.* 296, 921–936.
- Senes, A., Ubarretxena-Belandia, I., and Engelman, D.M. (2001). The Calpha ---H...O hydrogen bond: a determinant of stability and specificity in transmembrane helix interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9056–9061.
- Senes, A., Engel, D.E., and DeGrado, W.F. (2004). Folding of helical membrane proteins: the role of polar, GxxxG-like and proline motifs. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 14, 465–479.
- Serini, G., Valdembri, D., Zanivan, S., Morterra, G., Burkhardt, C., Caccavari, F., Zammataro, L., Primo, L., Tamagnone, L., Logan, M., et al. (2003). Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function. *Nature* 424, 391–397.
- Shandler, S.J., Korendovych, I.V., Moore, D.T., Smith-Dupont, K.B., Streu, C.N., Litvinov, R.I., Billings, P.C., Gai, F., Bennett, J.S., and DeGrado, W.F. (2011). Computational design of a  $\beta$ -peptide that targets transmembrane helices. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 12378–12381.
- Sharpe, S., Barber, K.R., and Grant, C.W.M. (2002). Interaction between ErbB-1 and ErbB-2 transmembrane domains in bilayer membranes. *FEBS Lett.* 519, 103–107.
- Sheetz, M.P., and Alhanaty, E. (1983). Bilayer sensor model of erythrocyte shape control. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 416, 58–65.
- Sheetz, M.P., Schindler, M., and Koppel, D.E. (1980). Lateral mobility of integral membrane proteins is increased in spherocytic erythrocytes. *Nature* 285, 510–511.
- Shen, K., and Cowan, C.W. (2010). Guidance molecules in synapse formation and plasticity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001842.
- Shirvan, A., Ziv, I., Fleminger, G., Shina, R., He, Z., Brudo, I., Melamed, E., and Barzilai, A. (1999). Semaphorins as mediators of neuronal apoptosis. *J. Neurochem.* 73, 961–971.
- Shraga-Heled, N., Kessler, O., Prahst, C., Kroll, J., Augustin, H., and Neufeld, G. (2007a). Neuropilin-1 and neuropilin-2 enhance VEGF121 stimulated signal transduction by the VEGFR-2 receptor. *FASEB J.* 21, 915–926.
- Shraga-Heled, N., Kessler, O., Prahst, C., Kroll, J., Augustin, H., and Neufeld, G. (2007b). Neuropilin-1 and neuropilin-2 enhance VEGF121 stimulated signal transduction by the VEGFR-2 receptor. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 21, 915–926.
- Si, Y., Liu, S., Liu, X., Jacobs, J.L., Cheng, M., Niu, Y., Jin, Q., Wang, T., and Yang, W. (2012). A human claudin-1-derived peptide inhibits hepatitis C virus entry. *Hepatol. Baltim. Md* 56, 507–515.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175, 720–731.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Hide, T., and Dirks, P.B. (2004a). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* 23, 7267–7273.
- Singh, S.K., Hawkins, C., Clarke, I.D., Squire, J.A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R.M., Cusimano, M.D., and Dirks, P.B. (2004b). Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432, 396–401.

- Skutella, T., and Nitsch, R. (2001). New molecules for hippocampal development. *Trends Neurosci.* *24*, 107–113.
- Slimani, H., Guenin, E., Briane, D., Coudert, R., Charnaux, N., Starzec, A., Vassy, R., Lecouvey, M., Perret, Y.G., and Cao, A. (2006). Lipopeptide-based liposomes for DNA delivery into cells expressing neuropilin-1. *J. Drug Target.* *14*, 694–706.
- Smith, J.S., and Jenkins, R.B. (2000). Genetic alterations in adult diffuse glioma: occurrence, significance, and prognostic implications. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* *5*, D213–231.
- Smith, S.O., and Bormann, B.J. (1995). Determination of helix-helix interactions in membranes by rotational resonance NMR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 488–491.
- Smith, S.O., Smith, C.S., and Bormann, B.J. (1996). Strong hydrogen bonding interactions involving a buried glutamic acid in the transmembrane sequence of the neu/erbB-2 receptor. *Nat. Struct. Biol.* *3*, 252–258.
- Smith, S.O., Song, D., Shekar, S., Groesbeek, M., Ziliox, M., and Aimoto, S. (2001). Structure of the transmembrane dimer interface of glycophorin A in membrane bilayers. *Biochemistry (Mosc.)* *40*, 6553–6558.
- Snuderl, M., Batista, A., Kirkpatrick, N.D., Ruiz de Almodovar, C., Riedemann, L., Walsh, E.C., Anolik, R., Huang, Y., Martin, J.D., Kamoun, W., et al. (2013). Targeting placental growth factor/neuropilin 1 pathway inhibits growth and spread of medulloblastoma. *Cell* *152*, 1065–1076.
- Soda, Y., Marumoto, T., Friedmann-Morvinski, D., Soda, M., Liu, F., Michiue, H., Pastorino, S., Yang, M., Hoffman, R.M., Kesari, S., et al. (2011). Transdifferentiation of glioblastoma cells into vascular endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 4274–4280.
- Soker, S., Takashima, S., Miao, H.Q., Neufeld, G., and Klagsbrun, M. (1998). Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell* *92*, 735–745.
- Soker, S., Miao, H.-Q., Nomi, M., Takashima, S., and Klagsbrun, M. (2002). VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding. *J. Cell. Biochem.* *85*, 357–368.
- Solomon, B.D., Mueller, C., Chae, W.-J., Alabanza, L.M., and Bynoe, M.S. (2011). Neuropilin-1 attenuates autoreactivity in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 2040–2045.
- Spassky, N., de Castro, F., Le Bras, B., Heydon, K., Quéraud-LeSaux, F., Bloch-Gallego, E., Chédotal, A., Zalc, B., and Thomas, J.-L. (2002). Directional guidance of oligodendroglial migration by class 3 semaphorins and netrin-1. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 5992–6004.
- Sperduto, P.W. (2003). A review of stereotactic radiosurgery in the management of brain metastases. *Technol. Cancer Res. Treat.* *2*, 105–110.
- Stacker, S.A., Stenvers, K., Caesar, C., Vitali, A., Domagala, T., Nice, E., Roufail, S., Simpson, R.J., Moritz, R., Karpanen, T., et al. (1999). Biosynthesis of vascular endothelial growth factor-D involves proteolytic processing which generates non-covalent homodimers. *J. Biol. Chem.* *274*, 32127–32136.
- Starzec, A., Vassy, R., Martin, A., Lecouvey, M., Di Benedetto, M., Crépin, M., and Perret, G.Y. (2006). Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1. *Life Sci.* *79*, 2370–2381.
- Stephenson, J.M., Banerjee, S., Saxena, N.K., Cherian, R., and Banerjee, S.K. (2002). Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in

- preneoplastic and neoplastic human breast: a possible marker for the progression of breast cancer. *Int. J. Cancer* *101*, 409–414.
- Stevens, T.J., and Arkin, I.T. (2000). Do more complex organisms have a greater proportion of membrane proteins in their genomes? *Proteins* *39*, 417–420.
- Stevens, L., McClelland, L., Fricke, A., Williamson, M., Kuo, I., and Scott, G. (2010). Plexin B1 suppresses c-Met in melanoma: a role for plexin B1 as a tumor-suppressor protein through regulation of c-Met. *J. Invest. Dermatol.* *130*, 1636–1645.
- Straume, O., and Akslen, L.A. (2003). Increased expression of VEGF-receptors (FLT-1, KDR, NRP-1) and thrombospondin-1 is associated with glomeruloid microvascular proliferation, an aggressive angiogenic phenotype, in malignant melanoma. *Angiogenesis* *6*, 295–301.
- Stupp, R., Mason, W.P., van den Bent, M.J., Weller, M., Fisher, B., Taphoorn, M.J.B., Belanger, K., Brandes, A.A., Marosi, C., Bogdahn, U., et al. (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* *352*, 987–996.
- Sugimoto, Y., Taniguchi, M., Yagi, T., Akagi, Y., Nojyo, Y., and Tamamaki, N. (2001). Guidance of glial precursor cell migration by secreted cues in the developing optic nerve. *Dev. Camb. Engl.* *128*, 3321–3330.
- Sulistijo, E.S., and Mackenzie, K.R. (2009). Structural basis for dimerization of the BNIP3 transmembrane domain. *Biochemistry (Mosc.)* *48*, 5106–5120.
- Sulpice, E., Plouët, J., Bergé, M., Allanic, D., Tobelem, G., and Merkulova-Rainon, T. (2008). Neuropilin-1 and neuropilin-2 act as coreceptors, potentiating proangiogenic activity. *Blood* *111*, 2036–2045.
- Suto, F., Ito, K., Uemura, M., Shimizu, M., Shinkawa, Y., Sanbo, M., Shinoda, T., Tsuboi, M., Takashima, S., Yagi, T., et al. (2005). Plexin-a4 mediates axon-repulsive activities of both secreted and transmembrane semaphorins and plays roles in nerve fiber guidance. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 3628–3637.
- Sutton, A.L.M., Zhang, X., Dowd, D.R., Kharode, Y.P., Komm, B.S., and Macdonald, P.N. (2008). Semaphorin 3B is a 1,25-Dihydroxyvitamin D3-induced gene in osteoblasts that promotes osteoclastogenesis and induces osteopenia in mice. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* *22*, 1370–1381.
- Swiercz, J.M., Kuner, R., and Offermanns, S. (2004). Plexin-B1/RhoGEF-mediated RhoA activation involves the receptor tyrosine kinase ErbB-2. *J. Cell Biol.* *165*, 869–880.
- Swiercz, J.M., Worzfeld, T., and Offermanns, S. (2008). ErbB-2 and met reciprocally regulate cellular signaling via plexin-B1. *J. Biol. Chem.* *283*, 1893–1901.
- Swift, M.R., and Weinstein, B.M. (2009). Arterial-venous specification during development. *Circ. Res.* *104*, 576–588.
- Syed, Y.A., Hand, E., Möbius, W., Zhao, C., Hofer, M., Nave, K.A., and Kotter, M.R. (2011). Inhibition of CNS remyelination by the presence of semaphorin 3A. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 3719–3728.
- Takagi, S., Tsuji, T., Amagai, T., Takamatsu, T., and Fujisawa, H. (1987). Specific cell surface labels in the visual centers of *Xenopus laevis* tadpole identified using monoclonal antibodies. *Dev. Biol.* *122*, 90–100.
- Takahashi, T., and Strittmatter, S.M. (2001). Plexina1 autoinhibition by the plexin sema domain. *Neuron* *29*, 429–439.

- Takahashi, T., Nakamura, F., Jin, Z., Kalb, R.G., and Strittmatter, S.M. (1998). Semaphorins A and E act as antagonists of neuropilin-1 and agonists of neuropilin-2 receptors. *Nat. Neurosci.* *1*, 487–493.
- Takahashi, T., Fournier, A., Nakamura, F., Wang, L.H., Murakami, Y., Kalb, R.G., Fujisawa, H., and Strittmatter, S.M. (1999). Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* *99*, 59–69.
- Takahashi, T., Yamaguchi, S., Chida, K., and Shibuya, M. (2001). A single autophosphorylation site on KDR/Flk-1 is essential for VEGF-A-dependent activation of PLC-gamma and DNA synthesis in vascular endothelial cells. *EMBO J.* *20*, 2768–2778.
- Takamatsu, H., Takegahara, N., Nakagawa, Y., Tomura, M., Taniguchi, M., Friedel, R.H., Rayburn, H., Tessier-Lavigne, M., Yoshida, Y., Okuno, T., et al. (2010). Semaphorins guide the entry of dendritic cells into the lymphatics by activating myosin II. *Nat. Immunol.* *11*, 594–600.
- Takegahara, N., Takamatsu, H., Toyofuku, T., Tsujimura, T., Okuno, T., Yukawa, K., Mizui, M., Yamamoto, M., Prasad, D.V.R., Suzuki, K., et al. (2006). Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 615–622.
- Talbert-Slagle, K., Marlatt, S., Barrera, F.N., Khurana, E., Oates, J., Gerstein, M., Engelman, D.M., Dixon, A.M., and Dimaio, D. (2009). Artificial transmembrane oncoproteins smaller than the bovine papillomavirus E5 protein redefine sequence requirements for activation of the platelet-derived growth factor beta receptor. *J. Virol.* *83*, 9773–9785.
- Tamagnone, L. (2012). Emerging role of semaphorins as major regulatory signals and potential therapeutic targets in cancer. *Cancer Cell* *22*, 145–152.
- Tamagnone, L., Artigiani, S., Chen, H., He, Z., Ming, G.I., Song, H., Chedotal, A., Winberg, M.L., Goodman, C.S., Poo, M., et al. (1999). Plexins are a large family of receptors for transmembrane, secreted, and GPI-anchored semaphorins in vertebrates. *Cell* *99*, 71–80.
- Taniguchi, M., Masuda, T., Mikami, Y., Kimura, M., Yoshida, T., Mishina, M., and Shimizu, T. (2011). Identification and characterization of a novel zebrafish semaphorin. *Neurosci. Lett.* *488*, 215–220.
- Tawarayama, H., Yoshida, Y., Suto, F., Mitchell, K.J., and Fujisawa, H. (2010). Roles of semaphorin-6B and plexin-A2 in lamina-restricted projection of hippocampal mossy fibers. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 7049–7060.
- Taylor, K.L., Henderson, A.M., and Hughes, C.C.W. (2002). Notch activation during endothelial cell network formation in vitro targets the basic HLH transcription factor HESR-1 and downregulates VEGFR-2/KDR expression. *Microvasc. Res.* *64*, 372–383.
- Teesalu, T., Sugahara, K.N., Kotamraju, V.R., and Ruoslahti, E. (2009). C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 16157–16162.
- Thévenin, D., Lazarova, T., Roberts, M.F., and Robinson, C.R. (2005). Oligomerization of the fifth transmembrane domain from the adenosine A2A receptor. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* *14*, 2177–2186.
- Thomas, N., Bechet, D., Becuwe, P., Tirand, L., Vanderesse, R., Frochot, C., Guillemin, F., and Barberi-Heyob, M. (2009). Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 in vitro and in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B* *96*, 101–108.
- THOMLINSON, R.H., and GRAY, L.H. (1955). The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *Br. J. Cancer* *9*, 539–549.

- Tian, T.V., Tomavo, N., Huot, L., Flourens, A., Bonnelye, E., Flajollet, S., Hot, D., Leroy, X., de Launoit, Y., and Duterque-Coquillaud, M. (2013). Identification of novel Tmprss2:ERG mechanisms in prostate cancer metastasis: involvement of MMP9 and PLXNA2. *Oncogene*.
- Tirand, L., Frochot, C., Vanderesse, R., Thomas, N., Trinquet, E., Pinel, S., Viriot, M.-L., Guillemain, F., and Barberi-Heyob, M. (2006). A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J. Control. Release Off. J. Control. Release Soc.* *111*, 153–164.
- Tirand, L., Thomas, N., Dodeller, M., Dumas, D., Frochot, C., Maunit, B., Guillemain, F., and Barberi-Heyob, M. (2007). Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an in vivo and in vitro study. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* *35*, 806–813.
- Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., La Noce, M., Laino, L., De Francesco, F., and Papaccio, G. (2013). Cancer stem cells in solid tumors: an overview and new approaches for their isolation and characterization. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *27*, 13–24.
- Di Tomaso, E., Snuderl, M., Kamoun, W.S., Duda, D.G., Auluck, P.K., Fazlollahi, L., Andronesi, O.C., Frosch, M.P., Wen, P.Y., Plotkin, S.R., et al. (2011). Glioblastoma recurrence after cediranib therapy in patients: lack of “rebound” revascularization as mode of escape. *Cancer Res.* *71*, 19–28.
- Tong, Y., Chugha, P., Hota, P.K., Alviani, R.S., Li, M., Tempel, W., Shen, L., Park, H.-W., and Buck, M. (2007). Binding of Rac1, Rnd1, and RhoD to a novel Rho GTPase interaction motif destabilizes dimerization of the plexin-B1 effector domain. *J. Biol. Chem.* *282*, 37215–37224.
- Torres-Vázquez, J., Gitler, A.D., Fraser, S.D., Berk, J.D., Van N Pham, Fishman, M.C., Childs, S., Epstein, J.A., and Weinstein, B.M. (2004). Semaphorin-plexin signaling guides patterning of the developing vasculature. *Dev. Cell* *7*, 117–123.
- Toyofuku, T., and Kikutani, H. (2007). Semaphorin signaling during cardiac development. *Adv. Exp. Med. Biol.* *600*, 109–117.
- Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N., Yabuki, M., Harada, K., Hori, M., and Kikutani, H. (2004a). Guidance of myocardial patterning in cardiac development by *Sema6D* reverse signalling. *Nat. Cell Biol.* *6*, 1204–1211.
- Toyofuku, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Takegahara, N., Suto, F., Kamei, J., Aoki, K., Yabuki, M., Hori, M., Fujisawa, H., et al. (2004b). Dual roles of *Sema6D* in cardiac morphogenesis through region-specific association of its receptor, *Plexin-A1*, with off-track and vascular endothelial growth factor receptor type 2. *Genes Dev.* *18*, 435–447.
- Toyofuku, T., Yoshida, J., Sugimoto, T., Zhang, H., Kumanogoh, A., Hori, M., and Kikutani, H. (2005). *FARP2* triggers signals for *Sema3A*-mediated axonal repulsion. *Nat. Neurosci.* *8*, 1712–1719.
- Tran, T.S., Rubio, M.E., Clem, R.L., Johnson, D., Case, L., Tessier-Lavigne, M., Huganir, R.L., Ginty, D.D., and Kolodkin, A.L. (2009). Secreted semaphorins control spine distribution and morphogenesis in the postnatal CNS. *Nature* *462*, 1065–1069.
- Tran-Van, H., Avota, E., Börtlein, C., Mueller, N., and Schneider-Schaulies, S. (2011). Measles virus modulates dendritic cell/T-cell communication at the level of *plexinA1*/*neuropilin-1* recruitment and activity. *Eur. J. Immunol.* *41*, 151–163.
- Trusolino, L., and Comoglio, P.M. (2002). Scatter-factor and semaphorin receptors: cell signalling for invasive growth. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 289–300.

- Tsai, H.-H., and Miller, R.H. (2002). Glial cell migration directed by axon guidance cues. *Trends Neurosci.* *25*, 173–175; discussion 175–176.
- Uchida, Y., Ohshima, T., Sasaki, Y., Suzuki, H., Yanai, S., Yamashita, N., Nakamura, F., Takei, K., Ihara, Y., Mikoshiba, K., et al. (2005). Semaphorin3A signalling is mediated via sequential Cdk5 and GSK3beta phosphorylation of CRMP2: implication of common phosphorylating mechanism underlying axon guidance and Alzheimer's disease. *Genes Cells Devoted Mol. Cell. Mech.* *10*, 165–179.
- Usui, H., Taniguchi, M., Yokomizo, T., and Shimizu, T. (2003). Plexin-A1 and plexin-B1 specifically interact at their cytoplasmic domains. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *300*, 927–931.
- Valdembri, D., Caswell, P.T., Anderson, K.I., Schwarz, J.P., König, I., Astanina, E., Caccavari, F., Norman, J.C., Humphries, M.J., Bussolino, F., et al. (2009). Neuropilin-1/GIPC1 signaling regulates alpha5beta1 integrin traffic and function in endothelial cells. *PLoS Biol.* *7*, e25.
- Vander Kooi, C.W., Jusino, M.A., Perman, B., Neau, D.B., Bellamy, H.D., and Leahy, D.J. (2007). Structural basis for ligand and heparin binding to neuropilin B domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 6152–6157.
- Vanveldhuizen, P.J., Zulfiqar, M., Banerjee, S., Cherian, R., Saxena, N.K., Rabe, A., Thrasher, J.B., and Banerjee, S.K. (2003). Differential expression of neuropilin-1 in malignant and benign prostatic stromal tissue. *Oncol. Rep.* *10*, 1067–1071.
- Verhaak, R.G.W., Hoadley, K.A., Purdom, E., Wang, V., Qi, Y., Wilkerson, M.D., Miller, C.R., Ding, L., Golub, T., Mesirov, J.P., et al. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* *17*, 98–110.
- Vescovi, A.L., Galli, R., and Reynolds, B.A. (2006). Brain tumour stem cells. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 425–436.
- Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* *294*, 1299–1304.
- Vieira, J.M., Schwarz, Q., and Ruhrberg, C. (2007). Selective requirements for NRP1 ligands during neurovascular patterning. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 1833–1843.
- De Vries, L., Lou, X., Zhao, G., Zheng, B., and Farquhar, M.G. (1998). GIPC, a PDZ domain containing protein, interacts specifically with the C terminus of RGS-GAIP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 12340–12345.
- Waimey, K.E., and Cheng, H.-J. (2006). Axon pruning and synaptic development: how are they per-plexin? *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* *12*, 398–409.
- Waimey, K.E., Huang, P.-H., Chen, M., and Cheng, H.-J. (2008). Plexin-A3 and plexin-A4 restrict the migration of sympathetic neurons but not their neural crest precursors. *Dev. Biol.* *315*, 448–458.
- Wakimoto, H., Aoyagi, M., Nakayama, T., Nagashima, G., Yamamoto, S., Tamaki, M., and Hirakawa, K. (1996). Prognostic significance of Ki-67 labeling indices obtained using MIB-1 monoclonal antibody in patients with supratentorial astrocytomas. *Cancer* *77*, 373–380.
- Waltenberger, J., Claesson-Welsh, L., Siegbahn, A., Shibuya, M., and Heldin, C.H. (1994). Different signal transduction properties of KDR and Flt1, two receptors for vascular endothelial growth factor. *J. Biol. Chem.* *269*, 26988–26995.
- Wang, L.H., and Strittmatter, S.M. (1997). Brain CRMP forms heterotetramers similar to liver dihydropyrimidinase. *J. Neurochem.* *69*, 2261–2269.

- Wang, L., Zeng, H., Wang, P., Soker, S., and Mukhopadhyay, D. (2003). Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration. *J. Biol. Chem.* 278, 48848–48860.
- Wang, L., Mukhopadhyay, D., and Xu, X. (2006). C terminus of RGS-GAIP-interacting protein conveys neuropilin-1-mediated signaling during angiogenesis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 20, 1513–1515.
- Wang, L., Dutta, S.K., Kojima, T., Xu, X., Khosravi-Far, R., Ekker, S.C., and Mukhopadhyay, D. (2007). Neuropilin-1 modulates p53/caspases axis to promote endothelial cell survival. *PLoS One* 2, e1161.
- Wang, S., Li, X., Parra, M., Verdin, E., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2008). Control of endothelial cell proliferation and migration by VEGF signaling to histone deacetylase 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 7738–7743.
- Webster, M.K., and Donoghue, D.J. (1996). Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia. *EMBO J.* 15, 520–527.
- Webster, M.K., and Donoghue, D.J. (1997). FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing. *Trends Genet.* 13, 178–182.
- Weiss, J.M., Bilate, A.M., Gobert, M., Ding, Y., Curotto de Lafaille, M.A., Parkhurst, C.N., Xiong, H., Dolpady, J., Frey, A.B., Ruocco, M.G., et al. (2012). Neuropilin 1 is expressed on thymus-derived natural regulatory T cells, but not mucosa-generated induced Foxp3<sup>+</sup> T reg cells. *J. Exp. Med.* 209, 1723–1742, S1.
- Wen, H., Lei, Y., Eun, S.-Y., and Ting, J.P.-Y. (2010). Plexin-A4-semaphorin 3A signaling is required for Toll-like receptor- and sepsis-induced cytokine storm. *J. Exp. Med.* 207, 2943–2957.
- West, D.C., Rees, C.G., Duchesne, L., Patey, S.J., Terry, C.J., Turnbull, J.E., Delehedde, M., Heegaard, C.W., Allain, F., Vanpouille, C., et al. (2005). Interactions of multiple heparin binding growth factors with neuropilin-1 and potentiation of the activity of fibroblast growth factor-2. *J. Biol. Chem.* 280, 13457–13464.
- Westphal, M., Hilt, D.C., Bortey, E., Delavault, P., Olivares, R., Warnke, P.C., Whittle, I.R., Jääskeläinen, J., and Ram, Z. (2003). A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma. *Neuro-Oncol.* 5, 79–88.
- Wey, J.S., Gray, M.J., Fan, F., Belcheva, A., McCarty, M.F., Stoeltzing, O., Somcio, R., Liu, W., Evans, D.B., Klagsbrun, M., et al. (2005). Overexpression of neuropilin-1 promotes constitutive MAPK signalling and chemoresistance in pancreatic cancer cells. *Br. J. Cancer* 93, 233–241.
- Whitaker, G.B., Limberg, B.J., and Rosenbaum, J.S. (2001). Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF(121). *J. Biol. Chem.* 276, 25520–25531.
- White, K.E., Cabral, J.M., Davis, S.I., Fishburn, T., Evans, W.E., Ichikawa, S., Fields, J., Yu, X., Shaw, N.J., McLellan, N.J., et al. (2005). Mutations that cause osteoglophonic dysplasia define novel roles for FGFR1 in bone elongation. *Am. J. Hum. Genet.* 76, 361–367.
- Wick, W., Puduvalli, V.K., Chamberlain, M.C., van den Bent, M.J., Carpentier, A.F., Cher, L.M., Mason, W., Weller, M., Hong, S., Musib, L., et al. (2010). Phase III study of enzastaurin compared with lomustine in the treatment of recurrent intracranial glioblastoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28, 1168–1174.

- Wilhelm, S., Carter, C., Lynch, M., Lowinger, T., Dumas, J., Smith, R.A., Schwartz, B., Simantov, R., and Kelley, S. (2006). Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 835–844.
- Williams, A., Piaton, G., Aigrot, M.-S., Belhadi, A., Théaudin, M., Petermann, F., Thomas, J.-L., Zalc, B., and Lubetzki, C. (2007). Semaphorin 3A and 3F: key players in myelin repair in multiple sclerosis? *Brain J. Neurol.* 130, 2554–2565.
- Wilson, W.R., and Hay, M.P. (2011). Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 11, 393–410.
- Winberg, M.L., Tamagnone, L., Bai, J., Comoglio, P.M., Montell, D., and Goodman, C.S. (2001). The transmembrane protein Off-track associates with Plexins and functions downstream of Semaphorin signaling during axon guidance. *Neuron* 32, 53–62.
- Wise, L.M., Veikkola, T., Mercer, A.A., Savory, L.J., Fleming, S.B., Caesar, C., Vitali, A., Makinen, T., Alitalo, K., and Stacker, S.A. (1999). Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3071–3076.
- Wolswijk, G. (1998). Chronic stage multiple sclerosis lesions contain a relatively quiescent population of oligodendrocyte precursor cells. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 18, 601–609.
- Wolswijk, G. (2002). Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain J. Neurol.* 125, 338–349.
- Xu, Y., Li, P., Zhang, X., Wang, J., Gu, D., and Wang, Y. (2013). Prognostic implication of neuropilin-1 upregulation in human nasopharyngeal carcinoma. *Diagn. Pathol.* 8, 155.
- Yadav, M., Louvet, C., Davini, D., Gardner, J.M., Martinez-Llordella, M., Bailey-Bucktrout, S., Anthony, B.A., Sverdrup, F.M., Head, R., Kuster, D.J., et al. (2012). Neuropilin-1 distinguishes natural and inducible regulatory T cells among regulatory T cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* 209, 1713–1722, S1–19.
- Yamamoto, M., Suzuki, K., Okuno, T., Ogata, T., Takegahara, N., Takamatsu, H., Mizui, M., Taniguchi, M., Chédotal, A., Suto, F., et al. (2008). Plexin-A4 negatively regulates T lymphocyte responses. *Int. Immunol.* 20, 413–420.
- Yamazaki, Y., Tokunaga, Y., Takani, K., and Morita, T. (2005). Identification of the heparin-binding region of snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF-F) and its blocking of VEGF-A165. *Biochemistry (Mosc.)* 44, 8858–8864.
- Yan, H., Parsons, D.W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B.A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G.J., et al. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N. Engl. J. Med.* 360, 765–773.
- Yan, X., Ma, L., Yi, D., Yoon, J., Diercks, A., Foltz, G., Price, N.D., Hood, L.E., and Tian, Q. (2011). A CD133-related gene expression signature identifies an aggressive glioblastoma subtype with excessive mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 1591–1596.
- Yaqoob, U., Cao, S., Shergill, U., Jagavelu, K., Geng, Z., Yin, M., de Assuncao, T.M., Cao, Y., Szabolcs, A., Thorgeirsson, S., et al. (2012). Neuropilin-1 stimulates tumor growth by increasing fibronectin fibril assembly in the tumor microenvironment. *Cancer Res.* 72, 4047–4059.
- Yin, H., Slusky, J.S., Berger, B.W., Walters, R.S., Vilaire, G., Litvinov, R.I., Lear, J.D., Caputo, G.A., Bennett, J.S., and DeGrado, W.F. (2007). Computational design of peptides that target transmembrane helices. *Science* 315, 1817–1822.

- Yonekura, S., Ting, C.-Y., Neves, G., Hung, K., Hsu, S.-N., Chiba, A., Chess, A., and Lee, C.-H. (2006). The variable transmembrane domain of *Drosophila* N-cadherin regulates adhesive activity. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 6598–6608.
- Yu, H.-H., Houart, C., and Moens, C.B. (2004). Cloning and embryonic expression of zebrafish neuropilin genes. *Gene Expr. Patterns GEP* *4*, 371–378.
- Zagzag, D., Lukyanov, Y., Lan, L., Ali, M.A., Esencay, M., Mendez, O., Yee, H., Voura, E.B., and Newcomb, E.W. (2006). Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *86*, 1221–1232.
- Zhang, Y., Singh, M.K., Degenhardt, K.R., Lu, M.M., Bennett, J., Yoshida, Y., and Epstein, J.A. (2009). Tie2Cre-mediated inactivation of plexinD1 results in congenital heart, vascular and skeletal defects. *Dev. Biol.* *325*, 82–93.
- Zhao, X., Chen, L., Xu, Q., and Li, Y. (2007). [Expression of Plexin A1 in gastric carcinoma and its relationship with tumor angiogenesis and proliferation]. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi Chin. J. Gastrointest. Surg.* *10*, 265–268.
- Zhou, F.X., Cocco, M.J., Russ, W.P., Brunger, A.T., and Engelman, D.M. (2000). Interhelical hydrogen bonding drives strong interactions in membrane proteins. *Nat. Struct. Biol.* *7*, 154–160.
- Zhou, F.X., Merianos, H.J., Brunger, A.T., and Engelman, D.M. (2001). Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *98*, 2250–2255.
- Zhu, J., Carman, C.V., Kim, M., Shimaoka, M., Springer, T.A., and Luo, B.-H. (2007). Requirement of alpha and beta subunit transmembrane helix separation for integrin outside-in signaling. *Blood* *110*, 2475–2483.
- Zouaoui, S., Rigau, V., Mathieu-Daudé, H., Darlix, A., Bessaoud, F., Fabbro-Peray, P., Bauchet, F., Kerr, C., Fabbro, M., Figarella-Branger, D., et al. (2012). [French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects]. *Neurochirurgie.* *58*, 4–13.
- Van der Zwaag, B., Hellemons, A.J.C.G.M., Leenders, W.P.J., Burbach, J.P.H., Brunner, H.G., Padberg, G.W., and Van Bokhoven, H. (2002). PLEXIN-D1, a novel plexin family member, is expressed in vascular endothelium and the central nervous system during mouse embryogenesis. *Dev. Dyn. Off. Publ. Am. Assoc. Anat.* *225*, 336–343.
- Zygmunt, T., Gay, C.M., Blondelle, J., Singh, M.K., Flaherty, K.M., Means, P.C., Herwig, L., Krudewig, A., Belting, H.-G., Affolter, M., et al. (2011). Semaphorin-PlexinD1 signaling limits angiogenic potential via the VEGF decoy receptor sFlt1. *Dev. Cell* *21*, 301–314.