

## Médecine expérimentale

M. Pierre CORVOL, membre de l'Institut  
(Académie des Sciences), professeur

### Angiogenèse et cancer

Le cours de la Chaire de Médecine Expérimentale en 2006-2007 est la suite du cours « Angiogenèse et Cancer » (2005-2006). Il a porté sur les mécanismes moléculaires et cellulaires de formation des métastases en faisant le point sur le rôle des lymphatiques dans la dissémination cancéreuse. L'autre partie du cours avait trait aux propriétés de certains peptides vasoactifs dans l'angiogenèse, à leurs effets sur la tumorigenèse expérimentale et la possibilité d'utiliser des antagonistes de ces peptides en cancérologie.

La gravité du processus cancéreux provient des risques d'invasion locale, locorégionale et à distance des cellules cancéreuses. La dissémination peut se faire par proximité, par envahissement des cavités du corps (péritoine, plèvre) mais surtout à distance par voie sanguine et lymphatique. L'atteinte ganglionnaire peut être limitée aux tout premiers ganglions lymphatiques drainant la tumeur (ganglion sentinelle) ou concerner une chaîne ganglionnaire. Les métastases ganglionnaires sont un mauvais facteur pronostic tant pour ce qui est de l'espérance de vie que du risque de récurrence du cancer.

Le processus de colonisation métastatique suit plusieurs étapes : envahissement du vaisseau sanguin ou lymphatique par les cellules tumorales (intravasation), puis extravasation des cellules tumorales à distance, colonisation dans le tissu hôte, prolifération des cellules métastatiques et développement d'une angiogenèse. Ces différentes étapes supposent une activation des cellules cancéreuses, des modifications de leur interaction avec la matrice extracellulaire, une participation des protéines d'adhésion (intégrine et cadhérine), des facteurs de croissance, des chimiokines et des métalloprotéases. Du fait de ces différents processus, la colonisation métastatique est un phénomène peu efficace. À titre d'exemple, quelques pourcent seulement des cellules du mélanome expérimental donneront des micrométastases hépatiques.

## I — Développement du système lymphatique au cours de l'embryogenèse

Le système lymphatique est impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques essentielles : il assure le retour du liquide interstitiel, riche en protéines, dans la circulation sanguine. Il permet l'absorption des graisses au niveau intestinal. Il joue enfin un rôle important dans la réponse immunitaire. Décrit par Aselli pour la première fois au XVII<sup>e</sup> siècle sous la forme de vaisseaux lactés (« lactae venae »), il est constitué de capillaires, de vaisseaux et de ganglions lymphatiques. Il est largement distribué dans l'organisme, notamment au niveau de l'intestin grêle, de la peau et de la plupart des organes internes à l'exception du système nerveux central, de la moëlle osseuse, de l'épiderme et de tissus avasculaires. Les capillaires lymphatiques comportent une couche de cellules endothéliales et ne possèdent ni membrane basale ni péricytes. Entre les cellules endothéliales, existent des ouvertures à type de valves qui permettent le passage des liquides, des macromolécules, des cellules sanguines (macrophages), éventuellement de bactéries ou de virus. Ces capillaires se distinguent donc des capillaires sanguins et certains marqueurs moléculaires leur sont spécifiques tels que LYVE-1, CCL21, podoplanine et VEGF-R3<sup>1</sup>.

Chez l'homme, la lymphangiogenèse débute par l'apparition de sacs lymphatiques vers la 6-7<sup>e</sup> semaine. Les capillaires lymphatiques apparaissent chez la souris au 10<sup>e</sup> jour d'embryogenèse. Ils ont une origine veineuse, comme ceci a été montré il y a longtemps (Ranvier, 1895 ; Sabin, 1902). Il existe aussi des précurseurs qui leur sont propres, les lymphangioblastes. Depuis un peu plus d'une dizaine d'années, les principaux facteurs de croissance, les récepteurs et les facteurs de transcription impliqués dans la lymphangiogenèse ont été découverts. Leurs propriétés ont été explorées *in vitro* dans des cultures de cellules endothéliales lymphatiques et *in vivo* chez la souris.

Le VEGF-C, apparenté au VEGF-A, est un facteur essentiel du développement des lymphatiques. Il est synthétisé sous la forme d'un précurseur non maturé qui se lie à un récepteur spécifique, le VEGF-R3, présent dans les cellules endothéliales lymphatiques. Après maturation intracellulaire au niveau N- et C-terminal, le VEGF-C se lie avec une plus grande affinité que son précurseur au récepteur VEGF-R3 et au récepteur VEGF-R2. Le VEGF-C stimule la lymphangiogenèse et l'angiogenèse dans la mesure où le récepteur R2 se trouve sur les capillaires sanguins. *In vivo*, la transgenèse du VEGF-C dirigée par le promoteur de la kératine 14 au niveau de la peau entraîne un accroissement de la densité des lymphatiques et une angiogenèse dans le derme. La transfection de ce facteur de croissance *in vitro* dans des lignées tumorales, qui sont ensuite greffées chez la souris nude, provoque un accroissement de la densité des vaisseaux lymphatiques et des métastases ganglionnaires.

---

1. Alitalo K. *et al.*, Nature 438 : 946-953, 2005.

Le récepteur VEGF-R3 est exprimé dans les vaisseaux sanguins et lymphatiques au cours du développement embryonnaire et dans les vaisseaux tumoraux. En fin de développement embryonnaire, son expression est confinée au niveau des cellules endothéliales lymphatiques. Ce récepteur lie les VEGF-C et -D, ce dernier étant une isoforme proche du VEGF-C. Le récepteur R3 ne lie pas le VEGF-A. Comme les autres récepteurs des VEGF, le VEGF-R3 est un récepteur à tyrosine-kinase qui interagit avec d'autres protéines et notamment la neuropiline-2. Il provoque une migration des cellules endothéliales, leur prolifération et accroît leur survie<sup>2</sup>. L'inactivation du gène du VEGF-C entraîne une létalité à E17-E19 : il n'existe aucun développement du système lymphatique. Les souris hétérozygotes peuvent survivre et développent une ascite chyleuse. En revanche, les souris dépourvues de VEGF-D ont une croissance normale. Le VEGF-C assure donc par lui même une croissance suffisante du système lymphatique chez ces souris. L'inactivation du gène du VEGF-R3 entraîne une létalité précoce, à E10. Les souris hétérozygotes ont une hypoplasie du système lymphatique et développent une ascite chyleuse. Ce phénotype est proche de la maladie de Milroy observée chez l'homme qui est liée à une mutation de l'activité tyrosine-kinase du VEGF-R3. D'autres gènes sont essentiels à la croissance des lymphatiques : le facteur de transcription Prox-1 qui permet la différenciation des cellules endothéliales en cellules endothéliales lymphatiques, la podoplanine qui promeut l'adhésion et la migration des cellules endothéliales lymphatiques, la neuropiline-2 qui lie le VEGF-C et qui est un co-récepteur du VEGF-R3. Un autre gène, Fox-C2 est impliqué dans la genèse des valves lymphatiques. Sa mutation chez l'homme entraîne une forme rare de lymphœdème héréditaire<sup>3,4</sup>.

## II — Lymphangiogenèse tumorale

On note la présence de vaisseaux lymphatiques dans les tumeurs, à l'intérieur et à la périphérie des tumeurs cancéreuses. Ceci pose un certain nombre de question : s'agit-il de cooptation de vaisseaux lymphatiques pré-existants ?, d'une néoprolifération de vaisseaux lymphatiques (lymphangiogenèse) ? Le recrutement de précurseurs de cellules endothéliales lymphatiques (lymphangioblastes) pourrait aussi être incriminé. Enfin, le VEGF-C pourrait dilater les vaisseaux lymphatiques pré-existants. La régulation de la croissance des vaisseaux lymphatiques ne semble pas liée à l'hypoxie dans la mesure où ni le VEGF-C, ni le VEGF-D ne sont régulés par l'hypoxie. En revanche, le VEGF-C provenant de la tumeur, des macrophages et du stroma, pourrait participer à la croissance des vaisseaux lymphatiques. Il en est de même des cytokines pro-inflammatoires.

Il existe une interaction étroite entre cellules endothéliales, cellules lymphatiques, cellules dendritiques et tumorales. Les cellules dendritiques émigrant du

2. Hirakawa S. *et al.*, J. Dermatol. Science 35 : 1-8, 2004.

3. Achen M.G. *et al.*, Cancer Cell 7 : 121-127, 2005.

4. Tammela *et al.*, Trends in Cell Biology 15 : 434-441, 2005.

tissu tumoral expriment le récepteur CCR7 de la chimiokine SLC qui a un effet migratoire. Cette chimiokine est exprimée par les cellules endothéliales lymphatiques. Par ailleurs, les cellules tumorales expriment des récepteurs d'adhésion tels que CCR7, CXCR4. Ainsi, ces cellules peuvent interagir avec les canaux lymphatiques qui expriment la chimiokine SLC. L'interaction entre ces différents types de cellules rendrait compte de la dilatation et de la prolifération des vaisseaux lymphatiques et de la réponse immunitaire associée à la tumorigenèse et à la dissémination métastatique.

Les stratégies utilisées pour bloquer l'invasion lymphatique dans les tumeurs se sont essentiellement portées sur le couple VEGF-C/D et le récepteur VEGF-R3 : anticorps anti-VEGF-D, anti-VEGF-R3, utilisation de leurres (protéine de fusion VEGF-R3-Ig soluble) ou encore des inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase intracellulaire du VEGF-R3. Différents modèles expérimentaux montrent l'efficacité de l'inhibition de VEGF-C/VEGF-R3 dans la lymphangiogenèse tumorale et les métastases ganglionnaires. Ainsi, He *et al.* ont montré que l'inhibition de VEGF-R3 par une protéine de fusion, VEGF-R3-Ig, bloque la lymphangiogenèse tumorale et les métastases ganglionnaire<sup>5</sup>. Toutefois, des métastases pulmonaires apparaissent malgré le blocage du récepteur R3. Dans une étude ultérieure, le même groupe a montré que le VEGF-C induit une déstabilisation des lymphatiques, qu'il bloque l'entrée et la division des cellules tumorales dans les lymphatiques mais que cette stratégie est dénuée d'effet sur la croissance des métastases établies<sup>6</sup>.

Le mécanisme précis de l'effet anti-métastatique et anti-tumoral de la stratégie anti-VEGF-C/R-3 est toutefois discuté par l'équipe de R. Jain, la même équipe qui avait mis en doute le concept d'éradication des néo-vaisseaux sanguins dans les tumeurs. Ce groupe avait proposé que les stratégies anti-angiogéniques permettaient en fait de rétablir une circulation intratumorale facilitant ainsi l'apport de substances chimiotoxiques et l'efficacité de la radiothérapie. Le même raisonnement a été appliqué par cette équipe pour comprendre la fonctionnalité des lymphatiques péri-tumoraux et l'efficacité des stratégies anti-lymphatiques. En explorant la fonctionnalité des vaisseaux lymphatiques, cette équipe<sup>7</sup> montre que le VEGF-C induit des lymphatiques fonctionnels essentiellement à la périphérie de la tumeur. Ce serait ces lymphatiques péri-tumoraux — et non pas les lymphatiques intratumoraux, non fonctionnels — qui pourraient être responsables des métastases ganglionnaires. Cette équipe propose que les vaisseaux lymphatiques intratumoraux sont collabés, non fonctionnels tandis que les lymphatiques péri-tumoraux sont ouverts et fonctionnels<sup>8,9</sup>. Ces derniers seraient comprimés par les cellules tumorales et leur ré-ouverture pourrait permettre l'acheminement des

5. He Y. *et al.*, J. Nat. Cancer Inst. 94 : 819-825, 2002

6. He Y. *et al.*, Cancer Res. 65 : 4739-4746, 2005.

7. Isaka N. *et al.*, Cancer Res. 64 : 4400-4404, 2004.

8. Padera T.P. *et al.*, Science 296 : 1883-1886, 2002.

9. Padera T.P. *et al.*, Nature 427 : 695, 2004.

traitements cytotoxiques avec toutefois comme effet néfaste possible une dissémination métastatique.

Plusieurs études de tumorigenèse expérimentale et cliniques semblent montrer que la lymphangiogenèse intratumorale est liée à l'expression de de VEGF-C/VEGF-R3 et que les métastases ganglionnaires dépendent des lymphatiques péri-tumoraux. La présence de lymphatiques intra — et péri-tumoraux et d'une lymphangiogenèse active seraient un marqueur pronostic de métastases ganglionnaires et de survie<sup>10</sup>. D'après Achen *et al.*, il semble qu'il existe dans l'ensemble une corrélation entre métastase ganglionnaire et lymphangiogenèse dans différents types de cancers<sup>11</sup>.

En conclusion :

1. Le VEGF-C, et à moindre degré le VEGF-D, sont capables d'induire des métastases ganglionnaires et à distance lorsqu'ils sont surexprimés *in vitro* dans des lignées cellulaires tumorales puis greffés chez la souris.

2. Il existe, en général, une corrélation entre le niveau d'expression des VEGF-C et -D, du VEGF-R3 dans les tumeurs, la présence de métastases et le pronostic.

3. La même corrélation s'observe entre l'expression de ces VEGF et la lymphangiogenèse, la densité ou le calibre des vaisseaux lymphatiques.

4. Expérimentalement, on observe chez la souris une inhibition ou une régression de la dissémination ganglionnaire (mais pas des tumeurs à distance) grâce à des stratégies anti-VEGF-C/D et anti-VEGF-R3.

Toutefois, il est trop tôt pour savoir si les lymphatiques se comportent comme des conduits passifs ou actifs dans le processus métastatique. De même, reste la question de savoir si la lymphangiogenèse est une condition nécessaire et/ou suffisante à la dissémination tumorale. Les stratégies dirigées contre les vaisseaux lymphatiques sont encore à un stade trop précoce — ou ne sont pas suffisamment spécifiques — pour répondre à ces questions dans les cancers chez l'homme.

### III — Peptides vasoactifs et angiogenèse

Plusieurs peptides vasoactifs, tels que l'angiotensine, l'endothéline, l'adréno-méduline, la bradykinine ont d'autres fonctions que celles de seulement contrôler le tonus vasculaire et de réguler les flux sanguins régionaux. Ils peuvent agir comme facteurs de croissance de la paroi vasculaire, exercer des effets sur le système nerveux, contrôler la production hormonale, etc. Depuis peu, a émergé l'hypothèse d'une implication possible des peptides vasoactifs dans la formation de nouveaux vaisseaux par angiogenèse et remodelage vasculaire. Le cours 2006-2007 s'est intéressé à l'effet pro-angiogénique *in vitro* et *in vivo* de deux peptides vasoactifs, l'angiotensine II et l'endothéline.

10. Dadras S. *et al.*, Am. J. Pathol. 612 : 1951-1960, 2003.

11. Achen M.G. *et al.*, Br. J. Cancer 94 : 1335-1360, 2006.

Tout d'abord ces peptides agissent sur le développement vasculaire au cours de l'embryogenèse. L'inactivation génique (globale ou ciblée) ou le blocage pharmacologique du récepteur de l'angiotensine II ou de l'endothéline 1 chez l'animal a montré l'implication de ces systèmes dans le développement de certains vaisseaux au cours de l'embryogenèse.

Le blocage du système rénine-angiotensine conduit à des anomalies de la vascularisation rénale ; celui du système endothéline à l'anomalie de la formation de la paroi de grosses artères dérivées des cellules de la crête neurale (aorte, carotide, sous-claviaire). Par ailleurs, l'angiotensine II exerce un effet pro-angiogénique dans des modèles classiques d'angiogenèse, *in vitro* et *in vivo* : l'angiotensine II, à dose élevée, s'avère être angiogénique dans le modèle de la membrane chorioallantoïdienne du poulet, de la cornée avasculaire. Elle augmente la densité des microvaisseaux du muscle crémastère chez le rat. *In vitro*, l'angiotensine II augmente l'expression, la synthèse et la sécrétion de VEGF dans différents types de culture cellulaire (cellules musculaires lisses vasculaires, cellules endothéliales et cellules mésangiales). Elle stimule la migration des péricytes des microvaisseaux rétiniens et est un facteur de croissance pour les cellules musculaires lisses vasculaires de même que pour certaines lignées cellulaires cancéreuses. Enfin, l'angiotensine II augmente l'expression du facteur HIF-1 $\alpha$ .

Afin d'explorer le rôle du récepteur AT<sub>1</sub> dans l'angiogenèse réactionnelle post-ischémique après ligature de l'artère fémorale, Sasaki *et al.* ont créé une ischémie aiguë de la patte chez la souris sauvage et chez la souris dépourvue du récepteur AT<sub>1</sub><sup>12</sup>. Il en résulte une atténuation de l'angiogenèse post-ischémique chez la souris AT<sub>1</sub> -/- ou chez la souris sauvage traitée par un antagoniste du récepteur de l'angiotensine II. Cet effet est indépendant du niveau de la pression artérielle. L'angiogenèse déficitaire chez les souris AT<sub>1</sub> -/- peut être corrigée par transplantation de cellules mononucléées provenant de souris sauvages. Cette étude montre l'importance de l'infiltrat, des chimiokines inflammatoires, des lymphocytes et des macrophages qui expriment le VEGF. Elle révèle que le système rénine-angiotensine pourrait jouer un rôle non pas tant directement sur l'angiogenèse que sur les cellules mononucléées qui sont activées par l'ischémie aiguë et l'inflammation. Ces résultats sont à rapprocher des effets proinflammatoires et de la génération de radicaux libres dérivés de l'oxygène induits par l'activation du système rénine. Le système rénine entraîne une génération de cytokines et de chimiokines pro-angiogéniques. Une expérience similaire a été réalisée par Toko *et al.* chez la souris AT<sub>1</sub> -/- chez qui est réalisé un infarctus du myocarde<sup>13</sup>. On observe une diminution de la néovascularisation autour de la zone de nécrose de l'infarctus chez la souris AT<sub>1</sub> -/-, une diminution de la production des métalloprotéases, de la NOS, de l'infiltrat et des cytokines inflammatoires chez ces souris par rapport aux souris sauvages.

12. Sasaki K. *et al.*, J. Clin. Invest. 109 : 603-611, 2002.

13. Toko H. *et al.*, Arterioscl. Thomb. Vasc. Biol. 24 : 664-670, 2004.

#### IV — Angiotensine II, angiogenèse et tumorigenèse

Plusieurs arguments expérimentaux sont en faveur d'un effet anti-angiogénique et anti-tumoral des inhibiteurs du système rénine-angiotensine (inhibiteurs de l'enzyme de conversion, antagonistes du récepteur de l'angiotensine II). Le mécanisme d'action de ces effets est en partie élucidé. Dans un modèle d'implantation de sarcome murin chez la souris sauvage ou chez la souris  $AT_{1A}^{-/-}$ , Fujita *et al.*<sup>14</sup> ont montré que le blocage pharmacologique du système rénine-angiotensine inhibait la croissance tumorale et l'angiogenèse. Le récepteur  $AT_{1A}$  est exprimé dans stroma tumoral et le VEGF dans le stroma péri-tumoral. La croissance de la tumeur est réduite chez la souris  $AT_{1A}^{-/-}$  et les anti-VEGF n'ont plus d'effet sur la croissance tumorale chez cette souris alors qu'ils inhibent la croissance tumorale chez la souris sauvage. Cela souligne l'importance de l'expression du système rénine-angiotensine au niveau du stroma tumoral et son implication dans les phénomènes d'angiogenèse et de tumorigenèse. Ces résultats confortent ceux d'Egami *et al.*<sup>15</sup> qui avaient montré une réduction de la croissance du mélanome B16-F1 et de l'angiogenèse tumorale chez la souris  $AT_1^{-/-}$ . Ces souris avaient une survie prolongée par rapport aux souris sauvages, un nombre réduit de macrophages et une expression abaissée de VEGF dans les macrophages péri-tumoraux. D'autres modèles expérimentaux ont montré l'effet des inhibiteurs du système rénine-angiotensine dans la tumorigenèse et l'angiogenèse (xénogreffe chez la souris de tumeur vésicale, de cancer de la prostate, de xénogreffe de cancer ovarien, etc.).

Plusieurs questions se posent à l'issue de l'analyse de résultats expérimentaux de la littérature : 1. les données observées avec certains des bloqueurs du système rénine-angiotensine sont-elles extrapolables à tous les types d'inhibiteurs de ce système (effet des anti-rénine ?). 2. La plupart des études ne mentionnent pas de courbe dose-réponse. 3. Les doses utilisées sont souvent très élevées, rendant difficile l'extrapolation des données chez l'homme. 4. Enfin, le mécanisme d'action supposé nécessite d'être confirmé par d'autres études mécanistiques.

En clinique humaine, les données sont fragmentaires et contradictoires. Une étude épidémiologique restrospective du risque de cancer chez les patients hypertendus traités par des inhibiteurs de l'enzyme de conversion (IEC) ou par un autre traitement antihypertenseur a été rapportée par Lever *et al.* en 1998<sup>16</sup>. Cette équipe a étudié le risque de cancer chez 5207 patients hypertendus de 1980 à 1995. Le comparateur était le registre des cancers dans la même région. Sous inhibiteurs de l'enzyme de conversion, le risque relatif d'apparition d'un cancer était de 0,72 et de 0,65 de décès par cancer. Les autres antihypertenseurs n'avaient aucun effet positif ou négatif sur le risque relatif d'apparition ou de décès d'un cancer. Bien que suggérant un effet bénéfique des IEC dans le cancer,

14. Fujita M. *et al.*, *Carcinogenesis* 26 : 271-279, 2005.

15. Egami K. *et al.*, *J. Clin. Invest.* 112 : 67-76, 2003.

16. Lever A.F. *et al.*, *Lancet* 352 : 179-184, 1998.

Lever conclut « *the status of this finding is more that of a hypothesis generation than of hypothesis testing... randomized controled trials are needed* ». Il existe de nombreuses limites à cette étude : étude rétrospective incluant un faible nombre relatif de patients et manque de puissance statistique. Il n'existe pas non plus de données sur l'effet des différents inhibiteurs de l'enzyme de conversion. Cette étude a été suivie d'une étude épidémiologique sur le risque de cancer au Danemark par Friis *et al.*<sup>17</sup> Chez 17897 patients recevant des IEC, l'incidence du cancer a été comparée à celle observée dans une cohorte de sujets de la même région. Les patients sous IEC n'avaient pas de bénéfice par rapport aux patients de la cohorte. Deux autres études épidémiologiques sont, elles aussi, négatives. Outre les réserves sus-citées, les raisons possibles de discordance de ces études avec l'étude initiale de Lever, peuvent être l'inclusion de patients âgés durant un temps court, le type d'IEC, la dose, la durée du traitement, l'observance thérapeutique et une éventuelle participation du génotype de l'ACE. Quoi qu'il en soit, ces études incitent à engager une étude prospective — et non plus rétrospective — pour savoir si l'adjonction d'un bloqueur du système rénine-angiotensine peut avoir un effet additif au traitement standard de différents types de cancers.

#### V — Endothéline, angiogenèse et tumorigenèse

L'endothéline 1 est un puissant peptide vasoconstricteur découvert en 1988 par Yanagisawa. Il agit sur les récepteurs ET<sub>A</sub> et ET<sub>B</sub>, le récepteur ET<sub>A</sub> étant responsable des effets vasoconstricteurs. L'endothéline 1, *via* ce récepteur, est aussi un puissant mitogène pour les cellules mésangiales, les cellules musculaires lisses vasculaires et à moindre degré pour les cellules endothéliales. L'endothéline est exprimée dans plusieurs types de tumeur. En 1990, Kusuvara montrait la production d'endothéline dans des lignées cancéreuses et depuis, la synthèse d'endothéline *in vitro* a été montrée dans des lignées de cancers du colon, de la prostate, etc. Egidy *et al.* ont montré l'expression du système endothéline (ET-1 mais aussi ECE-1, ET<sub>B</sub>) dans les cellules endothéliales vasculaires et le stroma de cancer du colon<sup>18</sup>. Le récepteur ET<sub>B</sub> est aussi fortement exprimé, ainsi que ET-1, dans les phéochromocytomes. En outre, le taux de récepteur ET<sub>B</sub> est près de dix fois supérieur dans les phéochromocytomes malins à ceux des phéochromocytomes bénins<sup>19</sup>. L'effet mitogénique de l'endothéline s'exerce aussi sur plusieurs lignées cancéreuses humaines (sarcome, mélanome, ovaire, prostate, colon). Cet effet est médié par le récepteur ET<sub>A</sub> et peut être bloqué par des antagonistes spécifiques de ce récepteur. Toutefois, le récepteur ET<sub>B</sub> peut être aussi impliqué dans des tumeurs non-épithéliales, telles que le mélanome. Cet effet mitogénique serait médié par l'activation de différentes kinases (PKC, EGF,

17. Friis S. *et al.*, Cancer 92 : 2462-2470, 2001.

18. Egidy G. *et al.*, Am. J. Pathol. 157 : 1863-1874, 2000.

19. Favier J. *et al.*, Am. J. Pathol. 161 : 1235-1246, 2002.

MAPK). En outre, l'endothéline serait capable d'inhiber l'apoptose cellulaire (inhibition de FASL/récepteur FAS).

Outre l'effet mitogénique direct de l'endothéline, qui peut rendre compte de son implication dans la progression tumorale, l'endothéline exerce un effet pro-angiogénique *in vitro* (prolifération des cellules endothéliales, activation des protéases, production de VEGF) et *in vivo* (formation de pseudo-tubes endothéliaux en matrigel, effet angiogénique dans la CAM)<sup>20</sup>. La production d'endothéline est régulée par l'hypoxie, en partie *via* le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ . Ainsi, l'endothéline pourrait promouvoir la progression tumorale par différents mécanismes : action mitogénique directe sur les cellules cancéreuses, effet anti-apoptotique, effet proangiogénique. L'endothéline agirait aussi sur la production accrue de métalloprotéases par les cellules endothéliales et les cellules cancéreuses, favorisant ainsi la migration cellulaire et leur dissémination.

Plusieurs données expérimentales montrent que le blocage du récepteur ET<sub>A</sub> de l'endothéline a un effet anti-tumorigénique. Ainsi, la xénogreffe de cellules cancéreuses du col de l'utérus chez la souris nude par l'atrasantan inhibe la croissance de la tumeur ainsi que la néoangiogenèse<sup>21</sup>. L'inhibition du récepteur ET<sub>B</sub> dans le mélanome expérimental par un bloqueur spécifique, le BQ788 ou par siRNA, induit l'apoptose dans les cellules de mélanome, réduit les facteurs de survie des cellules cancéreuses, mais, de façon paradoxale, accroît l'expression de VEGF<sup>22</sup>. *In vivo*, on observe une régression tumorale malgré l'induction de l'angiogenèse.

Les premiers essais thérapeutiques d'un anti-endothéline chez l'homme ont été réalisés récemment avec un antagoniste sélectif du récepteur ET<sub>A</sub> (atrasantan) dans le cancer de la prostate chez l'homme. Une étude de phase II et deux études de phases III contre placebo ont montré une efficacité modeste sur le critère principal (temps de progression de la tumeur et des métastases) et le critère secondaire (dosage de l'antigène PSA)<sup>23</sup>.

En conclusion :

1. L'angiotensine II et l'endothéline exercent un effet pro-angiogénique *in vitro* et *in vivo*, au moins à dose pharmacologique. Il reste à déterminer si ces peptides peuvent jouer un rôle dans l'angiogenèse physiologique.
2. Cette propriété d'angiogenèse n'est sans doute pas directement reliée à leur propriété vasoconstrictrice dans la mesure où d'autres peptides tels que la bradykinine et l'adrénomédulline sont aussi pro-angiogéniques bien qu'étant des peptides vasodilatateurs.
3. L'effet proangiogénique de l'angiotensine et de l'endothéline est médié respectivement par le récepteur AT<sub>1</sub> et le récepteur ET<sub>A</sub>, tous deux des récepteurs

20. Cruz A. *et al.*, J. Vasc. Res. 38 : 536-545, 2001

21. Bagnato A. *et al.*, Cancer Res. 62 : 6381-6384, 2002.

22. Lahav R. *et al.*, Cancer Res. 64 : 8945-8953, 2004.

23. Carducci M.A. *et al.*, J. Clin. Oncol. 21 : 679-689, 2003.

couplés aux protéines G. Il est vraisemblable que des récepteurs de croissance à tyrosine-kinase sont impliqués indirectement dans cet effet pro-angiogénique. Ainsi le récepteur de l'angiotensine II activé par l'angiotensine est capable de transactiver un récepteur de croissance tel que l'EGFR.

4. Le rôle de l'angiotensine et de l'endothéline dans l'angiogénèse tumorale résulte sans doute d'effets multiples sur la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'activation de protéases, la migration cellulaire et le remodelage vasculaire.

5. L'effet pro-angiogénique peut être médié de façon directe et indirecte par le VEGF. L'angiotensine II et l'endothéline ont un effet pro-inflammatoire qui met en jeu secondairement la production de VEGF.

6. L'utilisation clinique des antagonistes des récepteurs des peptides vasoactifs en thérapeutique cardiovasculaire nécessite une évaluation de leurs propriétés potentielles anti-angiogéniques. Bien que non cliniquement démontré, il n'est pas exclu qu'une partie des effets bénéfiques de ces antagonistes soient limités par un effet anti-angiogénique, détrimental en cas d'ischémie tissulaire.

7. Les antagonistes des récepteurs de l'angiotensine II n'ont jamais été prescrits dans une indication cancéreuse. Il en est de même pour les antagonistes des récepteur de l'endothéline, en dehors d'une étude limitée sur le cancer de la prostate en phase III. Il serait souhaitable d'envisager un essai thérapeutique où un bloqueur du système rénine-angiotensine pourrait être ajouté à un traitement anti-cancéreux standard pour évaluer son effet bénéfique potentiel.

#### RAPPORT D'ACTIVITÉ DU LABORATOIRE

### **I — Contrôle moléculaire du développement vasculaire**

Équipe : A. EICHMANN, L. PARDANAUD, F. LEBRIN, C. FREITAS, S. SUTCHING, E. JONES, B. LARRIVÉE, R. DEL-TORO ESTEVEZ, Y. XU, K. BOUVRÉE, T. MATHIVET, C. LÉBOUVIER, C. BRÉANT, L. PIBOUIN

#### **I-1. Identification de précurseurs endothéliaux circulant chez l'embryon**

Chez l'homme adulte, la moelle osseuse et le sang périphérique contiennent des précurseurs endothéliaux capables de participer à la néovascularisation de tissus ischémiques. Ces précurseurs représentent une cible intéressante pour la thérapie cellulaire et/ou génique visant à favoriser la néovascularisation de ces tissus ou, au contraire, à empêcher la vascularisation de tumeurs solides. L'origine des précurseurs endothéliaux au cours de l'ontogénèse est encore mal connue. L'ampleur de leur participation aux phénomènes de néovascularisation est également controversée et varie en fonction du modèle expérimental choisi. Nous avons exploré ces deux problèmes en utilisant un modèle de parabiose entre embryons de caille et de poulet. Les deux embryons sont placés dans une même coquille au deuxième jour de leur développement. Chaque embryon développe une membrane chorioallantoïdienne (CAM) vascularisée ; ces deux

membranes fusionnent ensuite et le sang circule entre les deux embryons. La participation des cellules circulantes de caille aux tissus de poulet est mise en évidence par immunohistochimie en utilisant un anticorps monoclonal reconnaissant toutes les cellules de caille et un autre ne reconnaissant que les cellules endothéliales (CE) et hématopoïétiques (CH) de caille (QH1). Les résultats obtenus par cette approche sont les suivants : 1. Les seules cellules circulantes intégrées aux tissus de poulet sont les CE. 2. Les CE circulantes sont déjà présentes avant la formation de la moelle osseuse, leur origine est donc extra-médullaire. 3. Les CE intégrées dans les vaisseaux de poulet sont extrêmement rares. 4. Leur nombre augmente de façon significative si l'on induit une angiogenèse ectopique chez l'embryon de poulet par application de facteurs de croissance angiogéniques, par blessure, ou par la greffe sur la CAM de poulet d'un organe, qui est ensuite vascularisé. Une participation importante des précurseurs endothéliaux à la néo-vascularisation s'observe dans tous les cas (Pardanaud & Eichmann, Development 2006).

### **I-2. Rôle déterminant des forces hémodynamiques dans la mise en place du réseau artério-veineux**

Pour étudier une possible plasticité endothéliale *in vivo*, nous avons examiné la mise en place du réseau artério-veineux chez l'embryon de poulet et de souris, en mettant au point la vidéo-microscopie time-lapse couplée à l'hybridation *in situ* avec des marqueurs spécifiques de l'endothélium artériel et veineux. Les résultats montrent que les CE de la veine vitelline proviennent de CE initialement artérielles. Le développement normal du réseau vasculaire implique donc une plasticité endothéliale vis-à-vis de leur différenciation artério-veineuse. L'acquisition d'une identité artérielle ou veineuse est régulée principalement par les forces hémodynamiques (Jones *et al.*, Physiology 2006). En collaboration avec Vincent Fleury à l'École Polytechnique d'Orsay (laboratoire de Physique de la Matière Condensée), nous avons démontré que la morphogenèse des vaisseaux était étroitement liée à l'auto-organisation du champ *hydrodynamique* à l'intérieur des vaisseaux et du champ de contraintes à l'extérieur des vaisseaux. Nous avons développé un modèle décrivant de façon dynamique la formation des vaisseaux sanguins du sac vitellin de l'embryon de poulet et de la rétine chez la souris (Nguyen *et al.*, E. Stat. Nonlin. Soft Matter 2006).

### **I-3. Facteurs de croissance vasculaire dans le système nerveux**

Les systèmes nerveux et vasculaire montrent des similarités anatomiques importantes. Des facteurs de guidage des axones ont été impliqués dans le guidage des vaisseaux (Suchting *et al.*, Exp. Cell Res. 2006 ; Yuan *et al.*, In : Angiogenesis 2006). À l'inverse, les facteurs de croissance responsables de la survie et de la prolifération des CE ont récemment été impliqués dans la survie et la différenciation neuronale. En collaboration avec l'Inserm U711, nous avons

montré que parmi les membres de la famille des VEGFs, seul le VEGF-C s'exprime dans le nerf optique embryonnaire. Ce facteur stimule *in vitro* la prolifération des progéniteurs oligodendrocytaires, ainsi que leur migration et leur survie. En revanche, le VEGF n'a aucun effet sur ces cellules. *In vivo*, des souris déficientes en VEGF-C présentent une forte réduction du nombre de progéniteurs oligodendrocytaires dans le nerf optique, alors que ni les neurones, ni d'autres types de cellules gliales, ne sont affectés (LeBras *et al.*, FEBS Lett. 2006). L'action du VEGF et du VEGF-C dans le système nerveux semble cibler deux types de cellules différentes dans le système vasculaire et neural : artères, veines et neurones pour le VEGF ; endothélium lymphatique et cellules gliales dans le cas du VEGF-C.

Pour examiner si le VEGF-C pouvait agir sur d'autres types de cellules neurales en dehors du nerf optique, nous avons examiné l'expression de son récepteur VEGFR3 dans tout le cerveau embryonnaire. Le VEGFR3 s'exprime dans plusieurs sites d'oligodendrogenèse, mais aussi dans d'autres sites, comme la zone ventriculaire du bulbe olfactif. Un typage des cellules exprimant le récepteur montre qu'il s'agit de progéniteurs immatures exprimant l'antigène Nestin-1. *In vitro*, le VEGF-C stimule la prolifération de ces cellules, alors que le VEGF-A n'a aucune activité. *In vivo*, les souris *vegfc* déficientes montrent une réduction de la prolifération des cellules ventriculaires du bulbe olfactif. Le VEGF-C agit donc sur certaines populations de progéniteurs neuraux chez l'embryon de souris, et cette action paraît médiée par son récepteur VEGFR3 exprimé par les progéniteurs. Pour examiner si l'action du VEGF-C sur les progéniteurs neuraux était conservée au cours de l'évolution, nous avons examiné des embryons de Xénope chez lesquels le gène *vegfc* a été inactivé par morpholino-knockdown. Dans le système vasculaire, ces têtards montrent des défauts sévères du développement lymphatique, alors que les artères et veines sont moins affectés. Dans le cerveau des têtards *vegfc* knockdown, nous observons une diminution significative de la prolifération de progéniteurs ventriculaires exprimant le VEGFR3. Le VEGF-C semble donc cibler des progéniteurs neuraux dans différentes espèces (LeBras *et al.*, FEBS Lett. 2006).

#### **I-4. Contrôle moléculaire du guidage des capillaires : sélection des « tip cells »**

L'angiogenèse par bourgeonnement procède de manière analogue à la morphogenèse de tubes épithéliaux de la trachée chez la Drosophile. Pendant ce processus, des cellules uniques sont sélectionnées pour former le « tip » d'un bourgeon, ces cellules répondent au facteur de croissance des fibroblastes (FGF) (branchless) par une extension de filopodes et prennent la tête du bourgeon croissant. Les cellules en arrière suivent, mais ne deviennent pas « tip ». Ni les tip, ni les autres cellules ne sont pré-spécifiées, mais il y a une compétition entre plusieurs cellules afin que celles avec le plus fort taux d'activité du récepteur FGF prennent la tête, alors que celles avec une activité moindre prennent la suite. Cette compétition implique une inhibition latérale médiée par Notch qui empêche des cellules

surnuméraires à prendre la tête du bourgeon (Ghabrial & Krasnow, 2006, *Nature* 441 : 746-9).

La sélection des « tip cells » dans le système vasculaire est sous contrôle de voies de signalisation similaires. Les cellules tip à la tête des capillaires en bourgeonnement sont induites par la signalisation du VEGF par son récepteur VEGFR2 (Gerhardt *et al.*, 2003, *J. Cell. Biol.* 161 : 1163-77). Les cellules tip expriment aussi des taux importants de Delta-like 4 (Dll4), un ligand de Notch. L'expression de Dll4 est en aval de la signalisation VEGF, puisque le blocage de cette signalisation par un VEGFR soluble diminue l'expression de DLL4 dans les tip cells. L'inactivation génique d'un allèle de *dll4* chez la souris provoque une formation excessive de tip cells dans le réseau capillaire de la rétine (Suchting *et al.*, Exp. Cell Res. 2007A, PNAS, 2007B). Un phénotype similaire est obtenu après inactivation pharmacologique de Notch au moyen d'inhibiteurs des gamma-sécrétases ou après la délétion endothélial-spécifique inducible du récepteur Notch-1 (Suchting *et al.*, PNAS, 2007, Hellström *et al.*, 2007, *Nature* 445 : 776-80). L'inactivation de *dll4* s'accompagne d'un changement des taux d'expression des récepteurs au VEGF, indiquant que DLL4 régule négativement la réponse des CE au VEGF et agit comme un frein de cette signalisation, contrôlant ainsi la formation d'un nombre limité de tip cells.

## II — Hypoxie, angiogenèse : protéines matricielles en pathologie cardiovasculaire et tumorale

Équipe : S. GERMAIN, C. MONNOT, L. MULLER, A. BARRET, C. ARDIDIE-ROBOUANT, J. PHILIPPE, E. ÉTIENNE, E. GOMEZ, A. CAZES, A. GALAUP, N. BRÉCHOT, J. VERINE, C. CHOMEL, M. BIGNON, S. WAGNER, S. GAUVRIT

Moduler l'angiogenèse, la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants est une approche thérapeutique prometteuse dans de nombreuses situations pathophysiologiques, notamment dans les cancers et les ischémies cardiovasculaires. L'hypoxie est un stimulus majeur de l'angiogenèse. Le but de notre équipe est i) la recherche de nouveaux gènes par deux approches complémentaires, transcriptomique et protéomique et ii) l'étude de leur rôle au cours de l'hypoxie cellulaire ou tissulaire ainsi que dans la régulation des différentes étapes de l'angiogenèse réactionnelle.

Cette étude a été initiée par un criblage différentiel des ARNm (cDNA RDA) de cellules endothéliales soumises à un stress hypoxique par rapport aux mêmes cellules cultivées en condition témoin (normoxie). Trois cent gènes dont l'expression est induite par l'hypoxie ont été identifiés. Les résultats de ce criblage ont été vérifiés par des approches complémentaires telles que l'hybridation de puces cDNA, sur lesquelles ont été immobilisés les cDNAs issus du criblage (en collaboration avec l'INSERM U533). L'analyse statistique des puces nous a permis de vérifier de façon globale l'induction par l'hypoxie d'une majorité de gènes issus du criblage et d'identifier des gènes dont les rôles dans les mécanismes de

régulation de l'angiogenèse par l'hypoxie ne sont pas caractérisés : IGF-Binding Protein 3, la neuritine et la Thioredoxin-interacting protein. L'hybridation *in situ* nous a permis de caractériser l'expression de ces gènes apportant ainsi la preuve de la validité du criblage et la pertinence de certains marqueurs dans les tissus hypoxiques et angiogéniques (Le Jan S. *et al.*, FEBS Lett. 2006).

Afin d'étudier la fonction de certains gènes, les critères de choix suivants ont été appliqués : 1. Constituent-ils des marqueurs de pathologies (ischémie des membres inférieurs ou cancer) ? 2. Sont-ils des cibles thérapeutiques potentielles (protéines sécrétées ou récepteurs) ? 3. Comment sont-ils susceptibles de moduler la réponse angiogénique ? *tsp1* et *angptl4*, d'une part, étaient les gènes dont l'expression était la plus fortement induite, à la fois après criblage cDNA RDA et analyse de puces cDNA, et d'autre part, montraient, le profil d'expression le plus pertinent sur des pièces d'amputation de patients souffrant d'ischémie critique des membres inférieurs ainsi que dans les pathologies tumorales (Le Jan S. *et al.*, Am. J. Pathol. 2003). Nos efforts se sont donc centrés sur l'étude de la fonction d'Angiopietin-like 4 (ANGPTL4) et de la thrombospondine-1 (TSP1).

ANGPTL4 appartient à la famille des angiopoiétines, protéines impliquées dans la maturation et la stabilisation des vaisseaux ainsi que dans le développement du système lymphatique (Thurston, 2003). Nous avons montré que l'expression de ce gène est induite par l'hypoxie dans les cellules endothéliales. L'ARNm d'ANGPTL4 est aussi exprimé spécifiquement dans les cellules tumorales des cancers conventionnels du rein (ou à cellules claires) pour lesquels ce gène constitue un marqueur diagnostique (Le Jan S. *et al.*, Am. J. Pathol. 2003). Puis, nous avons montré qu'ANGPTL4 est une protéine sécrétée dans les cultures primaires de cellules endothéliales humaines issues de macro- ou de microvaisseaux, soumises à l'hypoxie et est présente sous deux formes distinctes : 1. ANGPTL4 soluble, présente dans le milieu de culture et soumise à une protéolyse extracellulaire (forme longue de 55 kDa et protéolysée de 35 kDa) 2. ANGPTL4 matricielle, associée à la matrice extracellulaire subendothéliale et non protéolysée (55 kDa). Cette forme matricielle interagit très fortement avec la matrice extracellulaire, en particulier par l'intermédiaire des héparanes sulfates protéoglycans. *In vivo*, une accumulation de la forme entière d'ANGPTL4 est observée dans les muscles ischémiques dans un modèle murin d'ischémie de patte (ligature-excision de l'artère fémorale) montrant qu'ANGPTL4 pourrait exercer un rôle modulateur de l'angiogenèse sur les cellules de la paroi vasculaire dans un contexte hypoxique. Les analyses fonctionnelles réalisées *in vitro* ont confirmé cette hypothèse. L'interaction matricielle d'ANGPTL4 participe à la constitution d'un réservoir de molécules bioactives qui inhibe la migration et l'adhésion des cellules endothéliales, au cours de processus hypoxiques. Ces événements s'accompagnent d'un étalement intermédiaire des HUVEC, associé à une modification du cytosquelette objectivée par une diminution des fibres de stress et des points focaux d'adhésion. Enfin, ANGPTL4 matricielle inhibe le bourgeonnement endothélial et la formation de tubes (Cazes A. *et al.* Circ. Res. 2006).

ANGPTL4 étant induit par l'hypoxie et interagissant avec la matrice extracellulaire, cette protéine pourrait modifier le micro-environnement tumoral et ainsi affecter les cellules tumorales mais aussi les cellules endothéliales intratumorales. La technique d'électrotransfert d'ADN a été utilisée pour exprimer ANGPTL4 *in vivo* chez la souris. Nous avons montré, en collaboration avec l'UMR 8121 à l'IGR, que les cellules de carcinome pulmonaire 3LL xénogreffées sous la peau de souris et les cellules de mélanome murin B16F0 injectées dans le sinus rétro-orbital, développent moins de métastases pulmonaires chez les souris électrotransférées avec ANGPTL4 que chez les souris contrôle. Les cellules B16 forment des nodules qui restent intravasculaires au niveau pulmonaire, montrant qu'ANGPTL4 inhibe aussi le processus d'extravasation. De plus, ANGPTL4 inhibe la perméabilité vasculaire dans un test de Miles en réponse à l'histamine. *In vitro*, l'expression d'ANGPTL4 par les cellules B16 inhibe leurs propriétés de migration, d'invasion et d'adhésion. Ces phénomènes s'accompagnent d'une désorganisation du cytosquelette d'actine des cellules exprimant ANGPTL4. La formation de points focaux d'adhésion est aussi fortement réduite. Ces résultats montrent qu'ANGPTL4 inhibe les processus métastatiques en affectant la perméabilité vasculaire et les propriétés de motilité et d'invasion des cellules tumorales (Galaup A. *et al.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006).

Il est maintenant important de déterminer les caractéristiques moléculaires et fonctionnelles de l'interaction d'ANGPTL4 avec la matrice extracellulaire, la modulation de ces interactions pouvant contrôler la biodisponibilité d'ANGPTL4 dans les pathologies ischémiques tumorales comme cardiovasculaires. Les analyses des cibles moléculaires (récepteurs, intégrines) et cellulaires (cellules de la paroi vasculaire ou cellules tumorales) ainsi que l'étude des souris invalidées pour le gène (*angptl4* KO), disponibles au laboratoire, est en cours.

Dans le cadre d'un réseau INSERM dédié à l'étude des cellules souches, nous étudions le transcriptome ainsi que les propriétés angiogéniques de progéniteurs endothéliaux circulants adultes (Zhang, 2006). De plus, il a été récemment montré que plusieurs membres de la famille des ANGPTL (dont ANGPTL2 et -3) stimulent l'expansion des cellules souches hématopoïétiques. ANGPTL4 ayant un rôle de modulation de l'angiogenèse, nous analysons le rôle des membres de cette famille sur les progéniteurs endothéliaux circulants adultes, sur la régulation de leurs propriétés d'expansion et de leur capacité de revascularisation. L'analyse de l'effet des ANGPTL2, -3 et -4 sur ces cellules est donc en cours.

L'objectif de l'équipe est aussi d'analyser les modifications du microenvironnement vasculaire dans un contexte hypoxique, par une analyse des protéines de la matrice extracellulaire produite par les cellules endothéliales *in vitro*. Les processus angiogéniques s'accompagnent d'un profond remodelage matriciel qui consiste aussi bien en la dégradation de la matrice extracellulaire en place qu'en l'établissement d'une matrice provisoire associée aux phénomènes dynamiques de migration cellulaire, puis à la formation d'une lame basale permettant la stabilisation du vaisseau néoformé. Le remodelage matriciel résulte donc à la fois

des variations d'expression de gènes et des modifications post-traductionnelles des protéines exprimées. Dans ce contexte, il est important d'analyser le « sous-protéome » matriciel et en particulier l'expression de certains constituants matriciels, notamment des protéines matricellulaires auxquelles ANGPTL4 est apparentée. Les cellules endothéliales expriment effectivement certains membres de cette famille tels que les CCN (Cyr61, Nov et CTGF), ostéonectine (SPARC) ou la thrombospondine 1 (TSP1) et IGFBP3. Le profil d'expression de Cyr61, Nov, TSP1 et ANGPTL4 a été établi au laboratoire dans le milieu de sécrétion et la MEC de cultures primaires d'HUVEC (Cazes A. *et al.* *Circ. Res.* 2006). De plus, l'expression de la TSP1 *in vivo* est analysée dans les tissus ischémiques du modèle murin de patte ligaturée. Les conséquences fonctionnelles de cette expression sont en cours par la caractérisation de la revascularisation de la patte chez les souris sauvages et les souris invalidées pour le gène (*tsp1* KO), disponibles au laboratoire.

Parallèlement à cette caractérisation de protéines matricellulaires candidates, une approche protéomique différentielle sans *a priori* a été réalisée par séparation des protéines en électrophorèse bidimensionnelle sur la MEC de cultures primaires de cellules endothéliales de micro — et macrovaisseaux cultivées en normoxie ou hypoxie. Cette approche permet l'analyse de facteurs bioactifs associés aux composants structuraux de la MEC. Ainsi, nous avons identifié par spectrométrie de masse des protéases et des enzymes de pontage et de réticulation de la MEC. Certaines de ces protéines sont accumulées dans la MEC subendothéliale hypoxique, en association avec des réseaux de collagènes et de laminines. L'expression de ces protéines est aussi fortement augmentée dans les tissus ischémiques de pattes de souris ligaturées. Les analyses de ces protéines de pontage de la MEC se poursuivent afin de déterminer leur rôle dans le remodelage matriciel et les réponses angiogéniques des cellules vasculaires.

L'ensemble de ces travaux permettra de caractériser l'action concertée de protéines matricielles régulées par l'hypoxie, contribuant aux modifications du micro-environnement et impliquées dans les processus angiogéniques.

### III — Angiogenèse normale et pathologique

Équipe : P. CORVOL, G. NGUYEN, C. HUBERT, J.M. GASC, H. KEMPF, N. LAMANDÉ, A. MICHAUD, I. QUEGUINER, M. CLEMESSY, A. BESSONNAT, E. LARGER, S. LEDOUX F. VINCENT, A. CAILLARD, N. PRAIZOVIC, L. LI

#### III-1. Système rénine-angiotensine

Les travaux de cette équipe se sont poursuivis dans plusieurs directions :

##### a) Rôle anti-angiogénique de l'angiotensinogène

L'angiotensinogène, substrat de la rénine est une serpine. Le décapeptide angiotensine I correspond à la partie N-terminale de l'angiotensinogène et est

clivé par la rénine humaine. Outre ses fonctions essentielles, du fait de son caractère serpentine, l'angiotensinogène exerce un effet antiangiogénique déjà documenté dans notre laboratoire (J. Célérier *et al.*, Hypertension 2002). L'angiotensinogène inhibe *in vitro* la prolifération des cellules endothéliales et exerce un effet *in ovo* dans le modèle de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de poulet. Le mode d'action cellulaire de l'angiotensinogène a été étudié dans ce modèle en déposant l'angiotensinogène humain ou en le faisant exprimer par des cellules CHO greffées sur la CAM. Les vaisseaux de la CAM ont été marqués par une lectine spécifique des cellules endothéliales. Après 48 h de traitement par l'angiotensinogène, on observe une baisse de 70 % des vaisseaux mésodermiques par rapport au contrôle. L'angiotensinogène provoque une baisse importante de la prolifération des cellules endothéliales que l'on peut suivre par incorporation de BrDU. Une apoptose des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins mésodermiques est notée après deux jours de traitement par l'angiotensinogène (effet TUNEL). En revanche, il n'existe pas de baisse notable de l'expression des principaux facteurs de croissance vasculaire par hybridation *in situ*. Ainsi, l'angiotensinogène induit une apoptose et une baisse de la prolifération des cellules endothéliales sans modifier l'expression des facteurs de croissance vasculaire (M. Brand *et al.*, J. Mol. Med. 2007).

#### *b) Dysgénésie tubulaire rénale*

La dysgénésie tubulaire rénale est une affection observée chez le fœtus et caractérisée par la quasi absence de développement des tubules proximaux, une oligoanurie et la mort chez le fœtus ou chez le nourrisson peu après la naissance. Elle est liée à des mutations inactivatrices d'un des composants du système rénine-angiotensine.

Une étude de morphologie rénale a été effectuée en collaboration avec l'équipe de M.C. Gubler. Elle a montré chez les fœtus ayant une mutation sur le récepteur de l'angiotensine II, l'enzyme de conversion de l'angiotensine ou l'angiotensinogène une expression extrêmement marquée de la rénine au niveau des appareils juxtaglomérulaires, des artérioles afférentes et des cellules mésangiales glomérulaires (Lacoste M. *et al.*, J. Am. Soc. Nephrol. 2007).

Cette étude morphologique est suivie actuellement d'un projet de recherche visant à approfondir les relations entre les mutations et la fonction des composants du système rénine.

#### *c) Pseudohypoaldostéronisme de type I*

Le pseudohypoaldostéronisme de type I est une maladie autosomale dominante liée à des mutations affectant le gène du récepteur minéralocorticoïde. Dans six cas étudiés en collaboration avec le groupe de RP Lifton, l'expression phénotypique de cette affection a pu être précisée. Il existe dans de nombreux cas une mortalité néonatale. En revanche, les patients adultes présentant ce syndrome ont

un bilan sodé équilibré grâce à une stimulation importante du système rénine-angiotensine-aldostérone marquée par des taux élevés de rénine, d'angiotensine II et d'aldostérone. Ces données montrent l'importance critique du récepteur du minéralocorticoïde durant la prime enfance (Geller D.S. *et al.*, *J. Am. Soc. Nephrol.* 2006).

#### *d) Récepteur de la rénine*

Nous avons cloné le récepteur spécifique de la rénine et de son précurseur inactif, la pro-rénine. Ce récepteur joue un rôle essentiel dans la génération d'angiotensines tissulaires et son activation est associée à une augmentation de la synthèse de molécules profibrosantes (TGFs et PAI1) et de la prolifération cellulaire. De nombreux modèles expérimentaux ont suggéré le rôle pathogénique du récepteur dans la fibrose cardiaque associée à l'hypertension artérielle et dans la néphropathie et la glomérulosclérose observées au cours du diabète (revues dans Nguyen 2007 et Nguyen 2006a et 2006b). Pour notre part, nous avons démontré l'implication directe du récepteur dans l'hypertension artérielle en générant des rats transgéniques qui ont une surexpression du récepteur dans les cellules musculaires lisses vasculaires. Ces rats développent une hypertension artérielle modérée vers l'âge de 4 mois. Chez ces animaux, l'existence d'une hyperaldostéronémie malgré une concentration plasmatique de rénine et d'angiotensine II normales, suggère un effet direct du récepteur sur la synthèse d'aldostérone (Burcklé *et al.*, *Hypertension* 2006). Nous venons également de montrer que dans un modèle d'hypertension reno-vasculaire (1 clip-2 reins), il existait une augmentation de l'expression de la rénine et de son récepteur et qui co-localisent dans les vaisseaux et les tubules du cortex rénal. Ces vaisseaux ont une paroi épaissie et les tubes sont entourés d'une fibrose interstitielle, suggérant un rôle du récepteur dans la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires et la fibrose tubulo-interstitielle. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression du récepteur dans le tissu adipeux viscéral et sa co-localisation avec le PAI1 suggère également qu'il pourrait avoir un rôle dans l'accumulation du tissu adipeux viscéral (Achard *et al.*, *Am. J. Physiol.* 2007).

### **III-2. Propriétés antiangiogéniques du myo-inositoltripyrophosphate (ITPP)**

L'ITPP est une molécule qui agit comme effecteur allostérique de l'hémoglobine. L'ITPP accroît la dissociation de l'oxygène à partir du taux d'hémoglobine et l'hypothèse de travail était que l'ITPP pouvait contrecarrer les effets de l'hypoxie qui agit de façon critique dans l'angiogenèse et la progression tumorale.

L'ITPP possède un effet antiangiogénique dans le modèle de la CAM de poulet. À cette occasion, a été mis au point un système de quantification digitalisé de l'angiogenèse dans ce modèle. L'ITPP réduit aussi de façon nette la progression tumorale et l'angiogenèse dans un modèle expérimental de culture de

cellules de gliome U87 greffées sur la CAM. Ces résultats montrent que l'ITPP est un agent antiangiogénique et qu'il pourrait avoir des propriétés intéressantes comme composé anticancéreux (Sinh G. *et al.*, FEBS Lett. 2007).

### III-3. Calcifications vasculaires

Dans les conditions physiologiques, la minéralisation de la matrice extracellulaire (MEC) apparaît exclusivement dans les os (et les dents) qui se forment soit directement par différenciation ostéoblastique soit par l'intermédiaire de cartilage lors d'une différenciation chondro-ostéoblastique. Toutefois, dans certaines conditions pathologiques, une minéralisation ectopique et anormale peut se développer dans des tissus mous, tels que les artères. Cette minéralisation ectopique des vaisseaux, appelée plus couramment calcification vasculaire, est fréquemment observée chez le sujet âgé ou comme complication chez le patient atteint de pathologies, telles que l'athérosclérose, le diabète, l'hypercholestérolémie, ou encore l'insuffisance rénale. Bien que longtemps considérées comme bénignes, il est désormais clairement établi que les conséquences cliniques de ces calcifications vasculaires sont énormes et la minéralisation de la paroi vasculaire est un indicateur important de morbi-mortalité cardiovasculaire.

Bien que la physiopathologie de ces calcifications/minéralisations vasculaires soit bien documentée, peu de choses sont connues sur les processus moléculaires impliqués dans leur formation et leur développement dans la paroi artérielle. Il apparaît donc évident qu'une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'initiation et la progression de cette pathologie est essentielle pour améliorer la prévention et le traitement de ces minéralisations ectopiques. L'essentiel de la littérature suggère que le développement des calcifications vasculaires est due à la différenciation ostéoblastique de cellules musculaires lisses vasculaires en cellules osseuses dont la MEC subit une minéralisation. Cependant, d'autres résultats générés par l'analyse de souris mutées, telles que celles dépourvues de Matrix Gla Protein (Mgp, une protéine beta-carboxylée de la MEC), démontrent que la minéralisation de la paroi artérielle peut être initiée en absence d'ostéoblastes mais en présence de chondroblastes. Ces résultats suggèrent que, lors des calcifications vasculaires, la paroi artérielle peut être le siège par des mécanismes qu'il reste à découvrir à la fois d'une différenciation chondroblastique à l'origine de l'apparition de cellules cartilagineuse dans le vaisseau affecté et d'une minéralisation indépendante de la présence d'ostéoblastes de ce même vaisseau.

Pour élucider les mécanismes moléculaires responsables de l'initiation de la minéralisation pathologique des vaisseaux, notre projet propose :

(1) D'étudier les signaux et facteurs de transcription (notamment mais pas exclusivement certains candidats tels que Shh, BMPs et GATA6, Nkx3.2 respectivement), responsables de la formation de cartilage ectopique dans les artères, grâce à l'analyse de deux modèles d'animaux présentant des calcifications vasculaires importantes.

(2) De déterminer, en culture mais également *in vivo*, les rôles et interactions spécifiques de ces molécules dans la transition phénotypique des cellules musculaires lisses en cellules cartilagineuses.

(3) D'identifier et de caractériser des nouveaux régulateurs impliqués dans la minéralisation indépendante de l'apparition d'ostéoblastes.

En étudiant la formation des calcifications vasculaires par des approches nouvelles et sur des terrains encore non ou peu explorés, ce projet fournira des informations nouvelles et déterminantes sur les mécanismes qui régulent les étapes précoces de ces complications cardiovasculaires. Par conséquent, nous anticipons que les résultats obtenus au terme de ce projet puissent être bénéfiques à des stratégies thérapeutiques destinées à bloquer très précocement l'apparition et le développement de ces calcifications chez les sujets à risque.

#### LISTE DE PUBLICATIONS DU LABORATOIRE 2006-2007

BRAND M., LAMANDE N., SIGMUND C.D., LARGER E., CORVOL P. and GASC J.M. Angiotensinogen modulates renal vasculature growth. *Hypertension* 47 : 1067-1074, 2006.

BURCKLE C.A., JAN DANSER A.H., MULLER D.N., GARRELDs I.M., GASC J.M., POPOVA E., PLEHM R., PETERS J., BADER M. and NGUYEN G. Elevated blood pressure and heart rate in human renin receptor transgenic rats. *Hypertension* 47 : 552-556, 2006.

CASTROP H., OPPERMANN M., WEISS Y., HUANG Y., MIZEL D, LU H., GERMAIN S., SCHWEDA F., THEILIG F., BACHMANN S., BRIGGS J., KURTZ A. and SCHNERMANN J. Reporter gene recombination in juxtaglomerular granular and collecting duct cells by a human renin promoter-cre recombinase transgene. *Physiol. Genomics* 25 : 277-285, 2006.

CAZES A., GALAUP A., CHOMEL C., BIGNON M., BRECHOT N., LE JAN S., WEBER H., CORVOL P., MULLER L., GERMAIN S. and MONNOT C. Extracellular matrix-bound angiotensin-like 4 inhibits endothelial cell adhesion, migration, and sprouting and alters actin cytoskeleton. *Circ. Res.* 99 : 1207-1215, 2006.

DEVAUCHELLE V., ESSABBANI A., DE PINIEUX G., GERMAIN S., TOURNEUR L., MISTOU S., MARGOTTIN-GOGUET F., ANRACT P., MIGAUD H., LE NEN D., LEQUERRE T., SARAUX A., DOUGADOS M., BREBAN M., FOURNIER C. and CHIOCCHIA G. Characterization and functional consequences of underexpression of clusterin in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* 177 : 6471-6479, 2006.

GALAUP A., CAZES A., LE JAN S., PHILIPPE J., CONNAULT E., LE COZ E., MEKID H., MIR L.M., OPOLON P., CORVOL P., MONNOT C. and GERMAIN S. Angiotensin-like 4 prevents metastasis through inhibition of vascular permeability and tumor cell motility and invasiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 : 18721-18726, 2006.

GELLER D.S., ZHANG J., ZENNARO M.C., VALLO-BOADO A., RODRIGUEZ-SORIANO J., FURU L., HAWS R., METZGER D., BOTELHO B., KARAVITI L., HAQQ A.M., COREY H., JANSSENS S., CORVOL P. and LIFTON R.P. Autosomal dominant pseudohypoaldosteronism type 1 : mechanisms, evidence for neonatal lethality, and phenotypic expression in adults. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 : 1429-1436, 2006.

GENTIL C., LE JAN S., PHILIPPE J., LEIBOWITCH J., SONIGO P., GERMAIN S. and PIETRI-ROUXEL F. Is oxygen a key factor in the lipodystrophy phenotype ? *Lipids Health Dis.* 5 : 27-38, 2006.

GERVAIS M., DUGOURD C., MULLER L., ARDIDIE C., CANTON B., LOVICONI L., CORVOL P., CHNEIWEISS H. and MONNOT C. Akt down-regulates ERK1/2 nuclear localization and angiotensin II-induced cell proliferation through PEA-15. *Mol. Biol. Cell.* 17 : 3940-3951, 2006.

HUBERT C., SAVARY K., GASC J.M. and CORVOL P. The hematopoietic system : a new niche for the renin-angiotensin system. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3 : 80-85, 2006.

JONES E.A., LE NOBLE F. and EICHMANN A. What determines blood vessel structure ? Genetic prespecification vs. hemodynamics. *Physiology* 21 : 388-395, 2006.

KLIPPER E., LEVY N., GILBOA T., MULLER L. and MEIDAN R. Identification of a novel alternatively spliced variant endothelin converting enzyme-1 lacking a transmembrane domain. *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 231 : 723-728, 2006.

LACOSTE M., GASC J.M., CORVOL P. and GUBLER M.C. Renal tubular dysgenesis, a not uncommon autosomal recessive disorder leading to oligohydramnios : role of the renin-angiotensin system. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17 : 2253-2263, 2006.

LE BRAS B., BARALLOBRE M.J., HOMMAN-LUDIYE J., NY A., WYNS S., TAMMELA T., HAIKO P., KARKKAINEN M.J., YUAN L., MURIEL M.P., CHATZPOULOU E., BREANT C., ZALC B., CARMELIET P., ALITALO K., EICHMANN A. and THOMAS J.L. VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. *Nat. Neurosci.* 9 : 340-348, 2006.

LE JAN S., LE MEUR N., CAZES A., PHILIPPE J, LE CUNFF M., LEGER J., CORVOL P. and GERMAIN S. Characterization of the expression of the hypoxia-induced genes neuritin, TXNIP and IGFBP3 in cancer. *FEBS Lett.* 580 : 3395-3400, 2006.

NGUYEN T.H., EICHMANN A., LE NOBLE F. and FLEURY V. Dynamics of vascular morphogenesis : the effect of blood and tissue flow. *Phys. Rev. E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 73 (6 Pt 1) : 061907. Epub 2006 Jun 14, 2006.

PARDANAUD L. and EICHMANN A. Identification, emergence and mobilization of circulating endothelial cells or progenitors in the embryo. *Development* 133 : 2527-2537, 2006.

PARDANAUD L. and EICHMANN A. Identification, emergence and mobilization of circulating endothelial cells and/or progenitors in the embryo. *Development* 133 : 2527-2537, 2006.

SIHN G., SAVARY K., MICHAUD A., FOURNIE-ZALUSKI M.C., ROQUES B.P., CORVOL P. and GASC J.M. Aminopeptidase N during the ontogeny of the chick. *Differentiation* 74 : 119-128, 2006.

SUCHTING S., BICKNELL R. and EICHMANN A. Neuronal clues to vascular guidance. *Exp. Cell Res.* 312, 668-675, 2006.

ACHARD V., BOULLU-CIOCCA S., DESBRIERE R., NGUYEN G. and GRINO M. Renin receptor expression in human adipose tissue. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 292 : R274-R282, 2007.

MAGNON C., GALAUP A., ROUFFIAC V., OPOLON P., CONNAULT E., ROSE M., PERRICAUDET M., ROCHE A., GERMAIN S., GRISCELLI F. and LASSAU N. Dynamic assessment of antiangiogenic therapy by monitoring both tumoral vascularization and tissue degeneration. *Gene Ther.* 14 : 108-117, 2007.

SIHN G., WALTER T., KLEIN J.C., QUEGUINER I., IWAO H., NICOLAU C., LEHN J.M., CORVOL P. and GASC J.M. Anti-angiogenic properties of myo-inositol triphosphosphate *in ovo* and growth reduction of implant. *FEBS Lett.* 581 : 962-966, 2007.

SUCHTING S., FREITAS C., LE NOBLE F., BENEDITO R., BREANT C., DUARTE A. and EICHMANN A. The Notch ligand Delta-like 4 negatively regulates endothelial tip cell formation and vessel branching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104 : 3225-3230, 2007.

### Revues, ouvrages

SUCHTING S., BICKNELL R. and EICHMANN A. Neuronal clues to vascular guidance. *Exp. Cell. Res.* 312 : 668-675, 2005. Review.

HUBERT C., SAVARY K., GASC J.M. and CORVOL P. The hematopoietic system : a new niche for the renin-angiotensin system. *Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med.* 3 : 80-85, 2006. Review.

NGUYEN G. Renin/prorenin receptors. *Kidney Int.* 69 : 1503-1506, 2006.

NGUYEN G. and DANSER AH. The (pro)renin receptor : therapeutic consequences. *Expert Opin Investig Drugs.* 15 : 1131-1135, 2006

NGUYEN G. Increased cyclooxygenase-2, hyperfiltration, glomerulosclerosis, and diabetic nephropathy : put the blame on the (pro)renin receptor ? *Kidney Int.* 70 : 618-620, 2006

YUAN L., CORVOL P. and EICHMANN A. Neural guidance molecules in vascular development. In : *Angiogenesis : from basic science to clinical applications*, Taylor & Francis, N. Ferrara, Ed., 89-111, 2006.

NGUYEN G. The (pro)renin receptor : pathophysiological roles in cardiovascular and renal pathology. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 16 : 129-133, 2007.

SUCHTING S., FREITAS C. and EICHMANN A. L'angiogenèse passe sous contrôle de Delta-Notch *Med. Sci. (Paris)* 23 : 347-348, 2007.

## LISTE DES DIPLÔMÉS

**Thèses**

- Benjamin DeLafarge : Thèse de Doctorat d'Université Paris XI.  
Soutenue le 10 octobre 2006.  
*Rôle du facteur de guidage axonal Nétrine-1 et de son récepteur UNC5B dans le développement du système vasculaire.*
- Gabin Sihm : Thèse de Doctorat d'Université. Spécialité : Signalisation, Endocrinologie, Reproduction — Paris XI.  
Soutenue le 11 décembre 2006.  
*Étude du rôle de l'aminopeptidase N dans l'angiogenèse. Etude des propriétés anti-angiogéniques de l'inositol tripyrophosphate.*

