

## Analyse moléculaire de l'angiogenèse tumorale

Bernard Vandenbunder  
Véronique Fafeur  
Nicolas Wernert  
Dominique Stéhelin

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins, ou angiogenèse, constitue une étape cruciale du développement de la plupart des tumeurs solides. De nombreux acteurs moléculaires, isolés de cultures de cellules endothéliales, ont été impliqués dans ce processus angiogénique. Mais ces acteurs, étudiés *in vitro* et dans divers essais angiogéniques, sont-ils effectivement présents pendant l'angiogenèse *in vivo*? Les résultats de l'analyse *in situ*, avec des sondes nucléotidiques et des anticorps spécifiques des facteurs angiogéniques, des protéases dégradant les composants de la matrice extracellulaire et leurs inhibiteurs, et des facteurs de transcription, nous obligent à revoir quelques stéréotypes dérivés des expériences *in vitro*.

L'hypothèse selon laquelle la croissance tumorale dépend de la formation de nouveaux capillaires (angiogenèse) a été proposée en 1971 par Judah Folkman [1]. En l'absence de vaisseaux sanguins, seule la diffusion passive permet l'apport d'éléments nutritifs vers les cellules tumorales ou le rejet de déchets vers le milieu extérieur, ce qui limite de façon très importante la taille des carcinomes *in vivo*. En revanche, l'expansion rapide de la population tumorale est souvent corrélée à la vascularisation de la tumeur par de nouveaux capillaires. Il est cependant important de remarquer que la capacité des cellules tumorales à induire l'angiogenèse n'est pas toujours corrélée à leur malignité. Ainsi, beaucoup de tumeurs endocrines, comme l'adé-

nome de la surrénale, sont des tumeurs bénignes fortement vascularisées. Par ailleurs, certaines populations de cellules tumorales peuvent échapper aux exigences de la vascularisation, en croissant d'une façon diffuse ou sous forme de mince couche, sur les méninges, la plèvre ou autour des gaines nerveuses [1].

Les principales étapes de l'angiogenèse ont été déterminées à partir des systèmes accessibles à l'observation directe, comme la cornée de lapin ou de souris. Un des premiers événements qui suit l'implantation de cellules tumorales est la disparition de la membrane basale entourant les capillaires à proximité de l'implant et la migration des cellules endothéliales vers celui-ci (figure 1). Les cellules endothéliales qui migrent en tête ne semblent pas se diviser, tandis que les cellules à

### ADRESSE

B. Vandenbunder : directeur de recherche au Cnrs. V. Fafeur : chargée de recherches à l'Inserm. N. Wernert : docteur en médecine, médecin hospitalier. D. Stéhelin : directeur de recherche au Cnrs, directeur du laboratoire d'oncologie moléculaire. Laboratoire d'oncologie moléculaire, Cnrs URA 1160, Institut Pasteur de Lille, 1, rue Calmette, 59019 Lille Cedex, France.

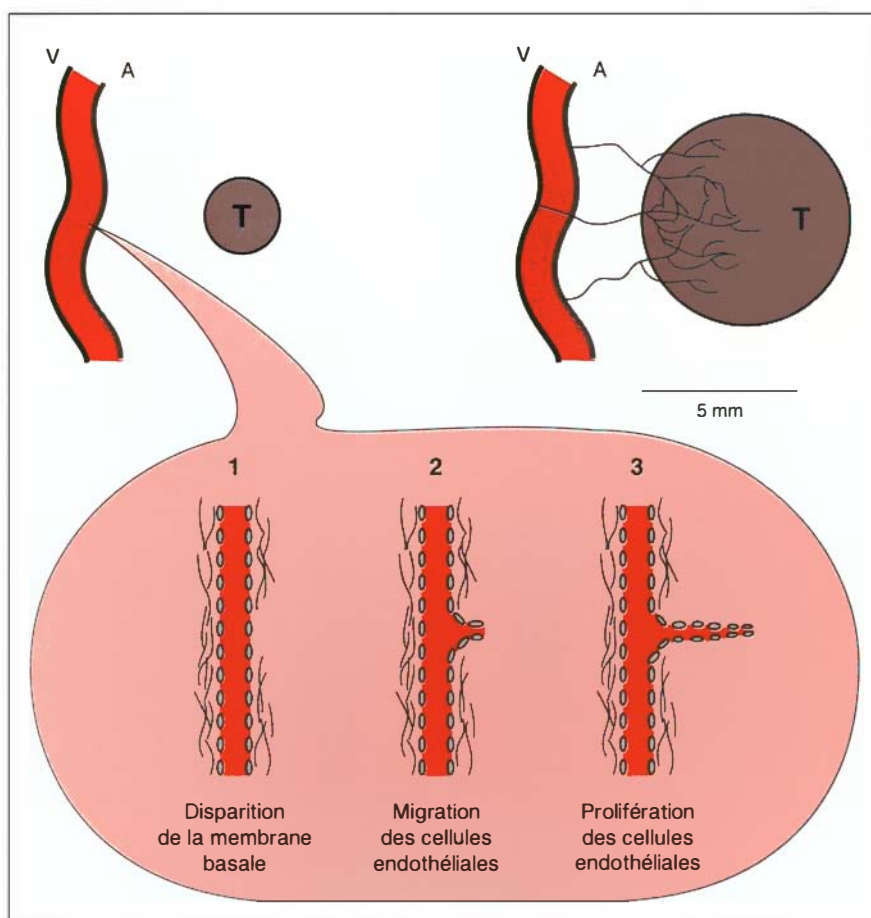


Figure 1. **Les étapes de l'angiogenèse tumorale.** (1) Certains composants de la matrice extracellulaire entourant le capillaire voisin sont dégradés. (2) La migration des cellules endothéliales débute à travers la membrane basale. (3) Les cellules endothéliales forment des tubules et prolifèrent. Lorsque la circulation s'établit, la taille de la formation tumorale augmente.

Tableau I			
ACTIVITÉ BIOLOGIQUE DES FACTEURS ANGIOGÉNIQUES			
	Test d'activité <i>in vivo</i> prolifération	Effet sur les cellules endothéliales, <i>in vitro</i> migration	
Angiogénine	RC	+/-0	nd.
aFGF	RC/CAM	+	+
bFGF	RC/CAM	+	+
HGF/SF	RC	+	+
IL8	RC	+	+
PD-ECGF	RC	+	+
PDGF	nd.	+/-0	nd.
TGF $\alpha$	HCP	+	nd.
TGF $\beta$	CAM	-	-
TNF $\alpha$	RC	-	+
VEGF	RC	+	+

L'activité *in vivo* a été testée sur la cornée de lapin (RC), la membrane chorioallantoïde de poulet (CAM) ou la joue de hamster (HCP). *In vitro*, les facteurs angiogéniques stimulent (+), inhibent (-) ou n'ont pas d'effet (0) sur la prolifération ou la migration des cellules endothéliales. nd = non déterminé. Abréviations: HGF: hepatocyte growth factor; SF: scatter factor; PD-ECGF: platelet derived endothelial cell growth factor; TNF $\alpha$ : tumor necrosis factor; FGF: fibroblast growth factor; IL8: interleukine 8; PDGF: platelet derived growth factor; TGF: tumor growth factor; VEGF: vascular endothelial growth factor.

m/s n° 5 vol. 10, mai 94

l'arrière se mettent à entrer en phase S et à proliférer. Ensuite, les premières cellules se différencient et s'organisent en tubes en formant des lumières; ces tubes se raboutent les uns aux autres et forment des boucles dans lesquelles pourra s'établir la circulation. L'étape finale du développement des capillaires est la formation d'une membrane basale [2].

Aujourd'hui, grâce aux sondes nucléotidiques et aux anticorps spécifiques, il est possible d'aller voir *in situ* si les acteurs moléculaires identifiés dans des cellules en culture, facteurs angiogéniques, facteurs de transcription ou protéases, sont effectivement présents au moment où se déclenche l'angiogenèse tumorale *in vivo*. L'objet de cette revue est de rassembler les résultats de cette analyse *in situ*, résultats encore fragmentaires qui doivent être interprétés avec précaution, mais qui sont indispensables à la compréhension des mécanismes moléculaires de l'angiogenèse *in vivo*.

## Les facteurs angiogéniques

Une douzaine de molécules capables de provoquer l'angiogenèse dans des systèmes modèles *in vivo* ont été purifiées (Tableau I). Il est à noter que ces facteurs angiogéniques qui affectent la prolifération et/ou la migration des cellules endothéliales en culture ont aussi en général une activité vis-à-vis de nombreux autres types de cellules en culture. Pour apprécier le rôle que jouent, éventuellement, ces facteurs au cours de l'angiogenèse *in vivo*, il faut pouvoir décrire leur expression ainsi que celle de leurs récepteurs. Une telle description sera informative si elle concerne les différents stades de l'angiogenèse dans des conditions normales (développement embryonnaire, lutéinisation), dans des conditions pathologiques (cicatrisation, développement de tumeurs) ou dans des modèles expérimentaux (cornée de lapin, membrane chorioallantoïde de poulet). Pour certains facteurs angiogéniques, on dispose aujourd'hui d'un ensemble d'informations qui permettent de mieux apprécier leur rôle *in vivo*.

## RÉFÉRENCES

1. Folkman J. The role of angiogenesis in tumor growth. *Semin Cancer Biol* 1992; 3: 65-71.
2. Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1032: 89-118.
3. Hori A, Sasada R, Matsutani E, Naito K, Sakura Y, Fujita T, Kozai Y. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor. *Cancer Res* 1991; 51: 6180-4.
4. Schnürch H, Risau W. Differentiating and mature neurons express the acidic fibroblast growth factor gene during chick neural development. *Development* 1991; 111: 1143-54.
5. Fu YM, Spirito P, Yu ZX, Biro S, Sasse J, Lei J, Ferrans VF, Epstein SE, Casscells W. Acidic fibroblast growth factor in the developing rat embryo. *J Cell Biol* 1991; 114: 1261-73.
6. Peters KG, Werner S, Chen G, Williams LT. Two FGF receptor genes are differentially expressed in epithelial and mesenchymal tissues during limb formation and organogenesis in the mouse. *Development* 1992; 114: 233-43.
7. Kandel J, Bossy-Wetzel E, Radvanyi F, Klagsbrun M, Folkman J, Hanahan D. Neovascularization is associated with a switch to the export of bFGF in the multistep development of fibrosarcoma. *Cell* 1991; 66: 1095-104.
8. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992; 114: 521-32.
9. Millauer B, Witzigmann-Voos S, Schnürch H, Martinez R, Moller NPH, Risau W, Ullrich A. High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 1993; 72: 835-46.
10. Ferrara N, Houck KA, Jakeman LB, Winer J, Leung DW. The vascular endothelial growth factor family of polypeptides. *J Cell Biochem* 1991; 47: 211-8.
11. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359: 843-5.
12. Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van de Water L, Senger DR. Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors: concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 1991; 174: 1275-8.

## Les FGF acide et basique

Les *fibroblast growth factors* de type acide ou basique (aFGF et bFGF) figurent parmi les premiers facteurs angiogéniques dont la séquence a été établie. Ils se distinguent de la plupart des autres facteurs par l'absence de séquence signal qui les dirigerait vers le circuit normal de sécrétion. Il est possible que ces FGF soient exportés par un mécanisme de sécrétion inhabituel qui ne nécessite pas de peptide signal, ou par diffusion à la suite de la mort des cellules. Un modèle expérimental illustrant l'importance de l'angiogenèse tumorale a été obtenu en injectant dans des souris *nude* des fibroblastes dans lesquels avait été transfecté le gène codant le bFGF fusionné avec une séquence « signal » qui assure l'exportation de son produit [3]. Les tumeurs obtenues sont fortement vascularisées. Un traitement par un anticorps monoclonal anti-bFGF inhibe la croissance de ces tumeurs et leur vascularisation (figure 2). Cependant, cette expérience réalisée avec une molécule de bFGF fusionnée avec un peptide signal ne permet pas de savoir si le bFGF endogène joue un rôle dans l'angiogenèse tumorale.

*In vitro*, les FGF induisent la prolifération, non seulement des fibroblastes comme leur nom l'indique, mais aussi d'autres types de cellules comme les cellules endothéliales. Lorsqu'elles sont stimulées, par le bFGF, les cellules endothéliales placées sur un gel de collagène, migrent et forment des structures tubulaires ressemblant à des capillaires. *In vivo*, chez l'embryon de poulet, l'expression de l'ARN messager pour l'aFGF est détectée dans les neurones et elle atteint un niveau maximum après éclosion. En aucun cas cette expression de l'aFGF n'est corrélée à la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse dans le cerveau de l'embryon [4]. Par ailleurs, de façon générale, les anticorps spécifiques de l'aFGF ou du bFGF ne marquent pas les cellules endothéliales dans les embryons. Seul un article mentionne un marquage intense avec un anticorps anti-aFGF sur les parois

des vaisseaux sanguins du cerveau et de la moelle épinière, pendant l'angiogenèse, ainsi que dans des sinusoides du foie de l'embryon de rat [5].

Récemment ont été clonés quatre récepteurs de forte affinité pour les FGF. Le FGFR-1 (ou produit du gène *flg*) et le FGFR-2 (ou produit du gène *bek*) fixent les FGF basique et acide avec la même affinité. FGFR-1 s'exprime de façon diffuse dans le mésenchyme, FGFR-2 essentiellement dans les épithéliums de l'embryon de souris [6]. D'après les auteurs de ce travail, aucun de ces récepteurs ne s'exprime clairement dans les petits vaisseaux sanguins. L'ARN messager pour le FGFR-1 est détecté dans l'endothélium et le muscle lisse de l'aorte de l'embryon de 12 jours *p.c.*, 3 jours après les premiers battements du cœur, et ce signal diminue à 16 jours *p.c.* Ces derniers résultats suggèrent un rôle pour l'aFGF ou le bFGF dans les dernières étapes de la formation des vaisseaux sanguins [6]. L'ensemble de ces données montre que, ni l'aFGF, ni le bFGF, ni deux de leurs récepteurs ne sont présents systématiquement dans les cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse chez l'embryon.

On peut se demander si le bFGF est l'un des signaux émis par les cellules tumorales lorsque survient l'angiogenèse au cours du développement d'une tumeur solide. Cette question a été abordée dans l'étude des différents stades de développement d'un fibrosarcome chez une souris transgénique [7]. De façon surprenante, dans ce modèle, les cellules obtenues à partir de tumeurs fortement vascularisées contiennent la même quantité de bFGF que les cellules obtenues aux premiers stades tumoraux, ou même que les fibroblastes normaux ! En revanche, l'analyse du milieu conditionné par ces différentes cellules révèle que la sécrétion du bFGF, par un mécanisme encore inconnu, survient au stade caractérisé par une angiogenèse intense. Bien évidemment, cette corrélation ne montre pas que le bFGF joue un rôle instrumental pour l'angiogenèse tumorale dans ce modèle. En outre, on ne dispose pas d'une description des



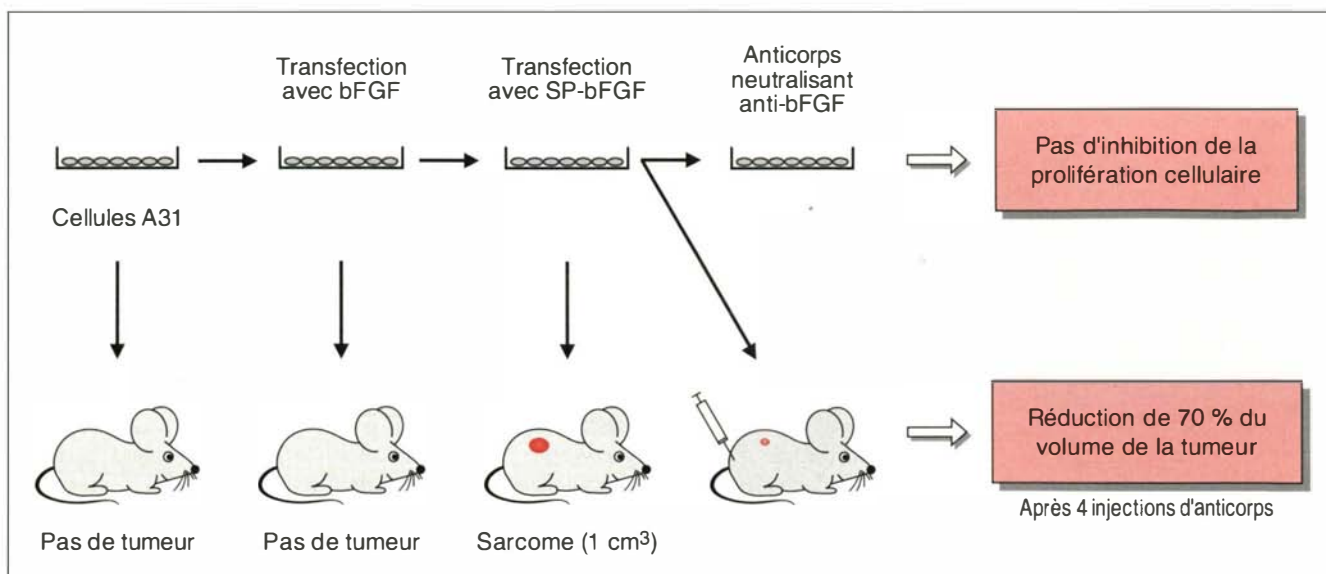


Figure 2. **Modèle expérimental démontrant l'importance de l'angiogenèse tumorale.** Lorsque les fibroblastes A31 sont transfectés avec un gène codant pour le bFGF (basic fibroblast growth factor) qui n'a pas de séquence d'exportation, le taux de prolifération de ces cellules augmente *in vitro*, mais les cellules ne sont ni angiogéniques, ni tumorigènes. Lorsque ces cellules sont transfectées avec un gène codant pour le bFGF auquel a été fusionné un peptide signal (SP-bFGF), le bFGF est exporté et les cellules sont angiogéniques et tumorigènes dans des souris syngéniques. Lorsque les souris portant ces tumeurs reçoivent un anticorps neutralisant dirigé contre le bFGF, l'angiogenèse et le développement de la tumeur sont inhibés (d'après [3]).

récepteurs qui suggère que les FGF puissent se fixer sur les cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse tumorale.

## Le VEGF

Le *vascular endothelial growth factor* (VEGF) est un mitogène moins efficace que le bFGF pour les cellules endothéliales. Les cellules qui produisent le VEGF sont capables de la sécréter. Ce facteur a été nommé aussi *vascular permeability factor* (VPF) parce qu'il induit une augmentation de la perméabilité de ces cellules, *in vitro*, et qu'il pourrait être responsable de la grande perméabilité des vaisseaux sanguins qui irriguent les tumeurs solides. Récemment, le produit du gène *flk1* (*fms-like tyrosine kinase*) a été identifié comme un récepteur de 170 kDa doué d'une forte affinité pour le VEGF.

Dans l'embryon, l'expression du VEGF coïncide avec la vascularisation et la prolifération des cellules endothéliales dans le neuro-épithélium des ventricules du cer-

veau et dans l'épithélium des glomérules du rein [8]. En outre, les ARNm pour Flk1, récepteur du VEGF, sont détectés spécifiquement dans les cellules endothéliales à tous les stades du développement de l'embryon de souris [9]. La quantité de ces transcrits diminue de façon radicale dans les vaisseaux qui irriguent les tissus adultes. Cependant, il faut noter qu'une étude des sites de fixation du VEGF, réalisée avec cette molécule marquée à l'iode<sup>125</sup>, montre que des récepteurs de forte affinité pour le VEGF sont largement distribués dans toutes les cellules endothéliales des tissus adultes de rat, y compris les cellules quiescentes [10]. Cela suggère que le VEGF pourrait participer à des fonctions physiologiques autres que la prolifération des cellules endothéliales, telles que la régulation de la perméabilité vasculaire.

L'analyse de glioblastomes humains [11] montre que la production du VEGF est induite dans les cellules tumorales proches des foyers de nécrose et que le récepteur pour le

VEGF (Flk1) est exprimé dans les cellules endothéliales des capillaires qui irriguent la tumeur ; les cellules endothéliales du cerveau normal n'expriment pas Flk1. Lorsque des cellules de carcinome sont transplantées chez le cobaye, la synthèse de VEGF par ces cellules et son accumulation dans les vaisseaux sanguins voisins sont observées dès cinq heures après la transplantation [12].

Enfin, l'importance physiologique du VEGF et de son récepteur Flk1 a été démontrée par l'utilisation d'un anticorps monoclonal bloquant spécifiquement l'activité du VEGF, et par l'expression d'un mutant trans-dominant négatif du récepteur Flk1. L'injection de l'anticorps dirigé contre le VEGF inhibe la croissance des tumeurs obtenues après implantation de cellules tumorales issues de myosarcomes ou de glioblastomes humains dans la souris *nude* [13] ; en revanche, cet anticorps n'a aucun effet sur la prolifération de ces cellules tumorales *in vitro*. Dans les tumeurs traitées avec cet anticorps, la densité des vais-

## RÉFÉRENCES

13. Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Philips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth *in vivo*. *Nature* 1993; 362 : 841-6.
  14. Millauer B, Shawver LK, Plate KH, Risau W, Ullrich A. Glioblastoma growth inhibited *in vivo* by a dominant-negative Flk1 mutant. *Nature* 1994; 367 : 576-9.
  15. Beitz JG, Kim IS, Calabresi P, Frackelton JAR. Human microvascular endothelial cells express receptors for platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88 : 2021-5.
  16. Holmgren L, Glaser A, Pfeifer-Ohlsson S, Ohlsson R. Angiogenesis during human extraembryonic development involves the spatio-temporal control of PDGF ligand and receptor gene expression. *Development* 1991; 113 : 749-54.
  17. Weiner HL, Weiner LH, Swain JL. Tissue distribution and developmental expression of the messenger RNA encoding angiogenin. *Science* 1987; 237 : 280-2.
  18. Tryggvason K. Extracellular matrix and its enzymatic degradation in tumor invasion. In : Liotta LA, ed. *Influence of tumor development on the host*. Dordrecht, Netherlands : Kluwer Academic Publishers, 1989 : 72-83.
  19. Pepper MS, Belin D, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Transforming growth factor- $\beta$ 1 modulates basic fibroblast growth factor-induced proteolytic and angiogenic properties of endothelial cells *in vitro*. *J Cell Biol* 1990; 111 : 743-55.
  20. Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP. Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol* 1992; 153 : 557-62.
  21. Pepper MS, Sappino AP, Stöcklin R, Montesano R, Orci L, Vassalli JD. Upregulation of urokinase receptor expression on migrating endothelial cells. *J Cell Biol* 1993; 122 : 673-84.
  22. Moses MA, Sudhalter J, Langer R. Isolation and characterization of an inhibitor of neovascularization from scapular chondrocytes. *J Cell Biol* 1992; 119 : 475-82.
  23. Mignatti P, Tsuboi R, Robbins E, Rifkin DB. *In vitro* angiogenesis on the human amniotic membrane : requirement for basic fibroblast growth factor-induced proteinases. *J Cell Biol* 1989; 108 : 671-82.
  24. Sappino AP, Huarte J, Vassalli JD, Belin D. Sites of synthesis of urokinase and tissue-type plasminogen activators in the murine kidney. *J Clin Invest* 1991; 87 : 962-70.
- seaux sanguins décroît ; l'étendue de cette décroissance et l'efficacité de la réduction de taille des tumeurs sont corrélées. Le mutant transdominant négatif du récepteur du VEGF forme avec le récepteur sauvage des hétérodimères incapables de transmettre un signal mitotique [14]. A l'aide d'un rétrovirus recombinant, ce mutant a pu être introduit dans les cellules endothéliales des vaisseaux situés au voisinage des cellules de glioblastome implantées dans une souris *nude*. Le développement des tumeurs est alors inhibé de façon remarquable, ainsi que la formation des capillaires dans ces tumeurs.

### Le PDGF

Pendant longtemps on a pensé que les cellules endothéliales ne répondaient pas au *platelet-derived growth factor* (PDGF). Cette conclusion se fondait sur des expériences utilisant des cellules endothéliales de gros vaisseaux, aorte ou veine ombilicale. En outre, aucune preuve directe de l'activité angiogénique du PDGF n'avait été rapportée. Cependant, les cellules endothéliales de petits vaisseaux ou capillaires expriment au moins un des récepteurs du PDGF, et le PDGF est mitogène pour ces cellules [15]. Au cours de l'angiogenèse dans le placenta humain et dans des glioblastomes, la plupart des cellules endothéliales des microcapillaires expriment à la fois le gène du PDGF-B et celui du récepteur du PDGF-B [16]. Dans les gros vaisseaux du placenta, l'expression du PDGF-B est maintenue alors que celle du récepteur n'est plus détectable ; dans les tissus normaux autour des tumeurs, aucun de ces deux signaux n'est détecté [16].

### L'angiogénine

L'angiogénine a été purifiée originellement à partir de milieu conditionné de cellules tumorales. Elle est angiogénique *in vivo*, et mitogène pour les cellules endothéliales de capillaire de bœuf, mais ne l'est pas pour les cellules endothéliales de l'aorte, pour les fibroblastes ni pour les cellules de muscle lisse. La distribution des transcrits pour l'angiogénine a été décrite chez le rat par

la technique de *Northern blot* [17]. Les ARN messagers pour l'angiogénine sont détectés de façon prédominante dans le foie. Cette expression augmente chez le nouveau-né pour atteindre un niveau maximum chez l'adulte. Si ces ARNm sont traduits en une protéine active, l'angiogénine continue à s'exprimer intensément chez le rat adulte, bien après la formation des vaisseaux sanguins. Il faut aussi noter que la quantité d'ARN messager pour l'angiogénine n'est pas plus grande dans des cellules de carcinome du colon ou d'hépatomes que dans des cellules issues des tissus normaux correspondants [17]. Si l'angiogénine joue un rôle dans la vascularisation de ces tumeurs, il faut alors envisager, comme pour le bFGF dans les fibrosarcomes [7], l'existence de mécanismes post-transcriptionnels réglant spécifiquement son expression ou son activité dans les cellules tumorales.

En résumé, il apparaît aujourd'hui que l'on dispose d'un ensemble de données cohérentes qui associent le VEGF à l'angiogenèse *in vivo*. Les cartes d'expression des FGF acide et basique et celles de leurs récepteurs, de même que les effets de ces facteurs *in vitro*, montrent qu'ils ne sont pas spécifiques d'un processus biologique et d'un type de cellule, comme la plupart des cytokines. En revanche, il est vraisemblable que le VEGF puisse coopérer avec d'autres cytokines, comme les FGF, pour régler l'angiogenèse *in vivo*.

### Les protéases dégradant la matrice extracellulaire

Dans les cellules endothéliales en culture, les facteurs angiogéniques induisent l'expression de gènes codant des protéases qui dégradent la matrice extracellulaire. Ce résultat semblait compatible avec l'observation morphologique des premiers stades de l'angiogenèse dans des modèles *in vivo*. L'un des premiers événements observés après un stimulus angiogénique *in vivo* est, en effet, la dissolution de la membrane basale autour des capillaires, avant la migration des cellules endothéliales [2]. La migration cellulaire



s'accompagne de la modification des différents systèmes d'adhérence de la cellule avec ses voisines, avec la membrane basale et la matrice extracellulaire, et de remaniements de la matrice extracellulaire : les dégradations protéiques permettent le passage des cellules endothéliales et la néo-synthèse fournit les substrats protéiques sur lesquels se déplacent ces cellules.

### La régulation de la dégradation de la matrice extracellulaire

La membrane basale autour du capillaire est constituée de collagène de type IV, de laminine, d'entactine et de protéoglycanes qui interagissent entre eux et forment un réseau. Le tissu conjonctif interstitiel autour des vaisseaux contient du collagène de type I, III et V, de l'élas-

tine, de la fibronectine et de la fibrine [18]. La dégradation de ces protéines est assurée par un arsenal d'enzymes différentes dont la spécificité de substrat n'est pas stricte : glycosidases, cathepsines, collagénases (collagénase interstitielle de type I et collagénases de type IV) et stromélysines.

La régulation de la dégradation de la matrice extracellulaire peut être assurée à différents niveaux (figure 3). Les enzymes dégradant la matrice extracellulaire ne sont pas normalement exprimées par les cellules endothéliales, et la transcription des gènes correspondants nécessite un stimulus externe. Ces enzymes sont sécrétées sous forme latente et activées par clivage protéolytique. Une cascade d'activités protéolytiques est mise en œuvre pour cette régulation ; les activateurs du plasmino-

gène (t-PA, de type tissulaire, ou u-PA, de type urokinase) convertissent le plasminogène, inactif et ubiquitaire, en plasmine, protéase active capable de dégrader directement certains constituants de la matrice et d'activer d'autres protéases comme les collagénases. Après cette activation protéolytique dans le milieu extracellulaire, ces enzymes peuvent être inhibées par des polypeptides spécifiques comme les PAI-I et II (*plasminogen-activator inhibitors I and II*) ou les TIMP (*tissue inhibitor of metalloproteases*). Enfin, les cytokines, les enzymes protéolytiques et leurs inhibiteurs ne sont pas toujours libres, en solution. Ils peuvent être fixés à la matrice extracellulaire : EGF et FGF sur l'héparane sulfate, le TGF $\beta$  sur la décorine et la thrombospondine, le PAI-I et le plasminogène sur la vitronectine, l'u-PA sur un récepteur de forte affinité à la surface des cellules. La dégradation de la matrice extracellulaire va libérer les cytokines, modifier l'activité des inhibiteurs ou des enzymes immobilisés. Cette immobilisation permet donc l'établissement d'un nouveau niveau de régulation qui se superpose aux précédents. Ces différents niveaux de régulation ont des temps de réponse différents. Alors que le clivage ou la fixation d'un inhibiteur se réalisent rapidement, en quelques millisecondes, la mise en route de la machinerie transcriptionnelle et la synthèse des ARNm codant pour ces enzymes protéolytiques nécessitent au moins une heure.

### Les protéases dans les cellules endothéliales, *in vitro*

Les protéases dégradant la matrice extracellulaire ont été détectées dans les cellules endothéliales en culture. Ainsi, dans les cellules endothéliales de la veine de cordon ombilical humain, les facteurs angiogéniques tels que le bFGF et le TGF $\beta$  induisent l'expression de l'u-PA [19], et le VEGF induit l'expression de la collagénase-I [20]. La migration des cellules endothéliales sur les bords d'une lésion, réalisée dans un tapis de cellules confluentes, s'accompagne d'une activité u-PA [21] : cette activité est due à la synthèse de l'u-PA et de son récep-

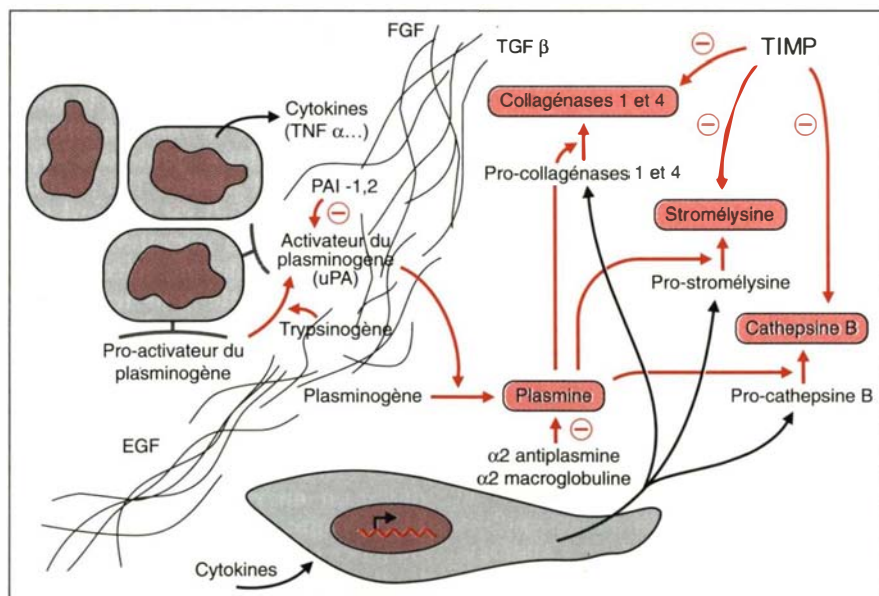


Figure 3. **Représentation schématique des différents niveaux de régulation impliqués dans la dégradation de la matrice extracellulaire.** Les cellules cancéreuses émettent des cytokines qui activent la transcription des gènes codant pour différentes protéases dans les cellules stromales voisines. Ces protéases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs, qui sont activés par protéolyse. Les protéases dégradant la matrice extracellulaire (dont le nom est entouré de rouge) peuvent être inhibées par des inhibiteurs spécifiques (TIMP, PAI). Ces inhibiteurs, les cytokines et les protéases sont fixés sur la matrice extracellulaire et peuvent être libérés par sa dégradation. Les actions inhibitrices sont indiquées par le signe (-). FGF: fibroblast growth factor; TNF: tumor necrosis factor; TGF: tumor growth factor; EGF: endothelial growth factor; u-PA: activateur du plasminogène de type urokinase; PAI: inhibiteur de l'activateur du plasminogène; TIMP: tissue inhibitor of metalloprotease.

## RÉFÉRENCES

25. Bacharach E, Itin A, Keshet E. *In vivo* patterns of expression of urokinase and its inhibitor PAI-I suggest a concerted role in regulating physiological angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89: 10686-90.
  26. Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E, Grondahl-Hansen J, Eriksen J, Blasi F, Dano K. Urokinase-type plasminogen activator is expressed in stromal cells and its receptor in cancer cells at invasive foci in human colon adenocarcinomas. *Am J Pathol* 1991; 138: 1059-67.
  27. Polette M, Clavel C, Muller D, Abecassis J, Binnering I, Birembaut P. Detection of mRNAs encoding collagenase 1 and stromelysin 2 in carcinomas of the head and neck by *in situ* hybridization. *Invasion Metastasis* 1991; 11: 76-83.
  28. Pyke C, Ralfkiaer E, Huhtala P, Hurskainen T, Dano K, Tryggvason K. Localization of messenger RNA for Mr 72,000 and 92,000 type IV collagenases in human skin cancers by *in situ* hybridization. *Cancer Res* 1992; 52: 1336-41.
  29. Clavel C, Polette M, Doco M, Binnering I, Birembaut P. Immunolocalization of matrix metallo-proteinases and their tissue inhibitor in human mammary pathology. *Bull Cancer* 1992; 79: 261-70.
  30. Jaffredo T, Vandenbunder B, Dieterlen-Lièvre F. *In situ* study of c-Myc protein expression during avian development. *Development* 1989; 105: 679-95.
  31. Mugrauer G, Ekblom P. Contrasting expression patterns of three members of the *myc* family of proto-oncogenes in the developing and adult mouse kidney. *J Cell Biol* 1991; 112: 13-25.
  32. Vandenbunder B, Pardanaud L, Jaffredo T, Mirabel MA, Stéhelin D. Complementary patterns of expression of *c-ets-1*, *c-myb* and *c-myc* in the blood-forming system of the chick embryo. *Development* 1989; 107: 265-74.
  33. Ghysdael J, Gegonne A, Pognonec P, Dernis D, Leprince D, Stéhelin D. Identification and preferential expression in thymic and bursal lymphocytes of a *c-ets-1* oncogene-encoded Mr 54,000 cytoplasmic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 1714-8.
  34. Queva C, Leprince D, Stéhelin D, Vandenbunder B. p54 *c-ets-1* and p68 *c-ets-1*, the two transcription factors encoded by the *c-ets-1* locus, are differentially expressed during the development of the chick embryo. *Oncogene* 1993; 8: 2511-20.
  35. Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandenbunder B, Stéhelin D. The *c-ets-1* proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularisation and other forms of angiogenesis in man. *Am J Pathol* 1992; 140: 119-27.
- teur de forte affinité à la surface des cellules endothéliales en migration. Parallèlement à ces observations, il faut noter l'existence d'un inhibiteur de la collagénase-I qui inhibe l'angiogenèse sur la membrane chorio-allantoïde de poulet; cette protéine a été purifiée à partir de milieu conditionné par les cellules du cartilage, le seul tissu avasculaire [22]. En outre, des anticorps dirigés contre les collagénases de type I ou IV, ou des inhibiteurs de la plasmine, empêchent la migration des cellules endothéliales dans un test *in vitro* [23].
- L'expression des protéases, au cours de l'angiogenèse**
- Les résultats précédents contredisent les observations faites *in vivo* à propos de l'expression des enzymes dégradant la matrice extracellulaire au cours de l'angiogenèse. Dans les cellules endothéliales de l'embryon de souris, ni les ARNm pour la collagénase-I (Virginie Mattot, résultats non publiés), ni les ARNm pour l'u-PA [24] ne sont détectés, alors que ces ARNm sont abondants dans d'autres tissus embryonnaires. C'est uniquement dans l'utérus, au cours du cycle ovarien, et pendant l'implantation de l'embryon que les ARNm pour l'u-PA sont détectés dans les cellules endothéliales des capillaires néoformés (figure 4, Grevin *et al.*, manuscrit sous presse, [25]), tandis que les ARNm pour PAI-I s'expriment dans les cellules situées à proximité des cellules contenant de l'u-PA [25]. La comparaison des résultats obtenus dans l'utérus et dans l'embryon illustre la diversité des mécanismes susceptibles d'être mis en jeu lorsque l'angiogenèse se déroule dans des contextes différents.
- Au cours de l'angiogenèse tumorale, il semble que les protéases dégradant la matrice extracellulaire ne s'expriment pas dans les cellules endothéliales. Dans une étude portant sur douze adénocarcinomes du colon chez l'homme, les ARNm pour l'u-PA ont été détectés dans les cellules fibroblastiques du stroma tumoral et il était précisé que les cellules endothéliales n'en contenaient pas [26]. Une étude analo-
- gue, portant sur vingt-six carcinomes de la tête et du cou, révèle que, ni les ARNm codant pour la collagénase-I et les stromélysines-I et II, ni les protéines correspondantes, ne sont détectables dans les cellules endothéliales de ces tumeurs qui sont, pourtant, fortement vascularisées [27]. L'absence d'ARNm pour la collagénase-I, la stromélysine-I et l'u-PA dans les cellules endothéliales a été confirmée pour différentes tumeurs invasives du poumon, du colon, du pancréas, du sein et de la thyroïde chez l'homme (Wernert *et al.*, manuscrit soumis). Enfin, les ARNm pour la collagénase-IV, qui sont abondants dans les fibroblastes du stroma près des formations invasives, ne sont pas non plus détectés dans les cellules endothéliales de tumeurs de la peau [28].
- L'absence de détection des ARN messagers codant pour ces protéases dans les cellules endothéliales au cours de l'angiogenèse, chez l'embryon et dans les tumeurs, est une observation inattendue si on considère les résultats obtenus *in vitro*, et le passage nécessaire des cellules endothéliales à travers la membrane basale et la matrice interstitielle. Cependant, plusieurs arguments peuvent justifier ces résultats observés *in vivo*. Il est d'abord vraisemblable que la migration des cellules endothéliales ne nécessite pas la dégradation de tous les composants de la membrane basale ou de la matrice extracellulaire: ainsi, les mailles du réseau de collagène-IV ont une taille de 800 nm, qui permet le passage des cellules endothéliales sans rupture mécanique ni digestion enzymatique. Il est possible, ensuite, que les cellules endothéliales utilisent la collagénase-I ou l'u-PA synthétisés par d'autres cellules du stroma tumoral en les fixant à leur surface [21]. En revanche, ces cellules endothéliales contrôlraient l'activité de ces protéases en synthétisant des inhibiteurs spécifiques. On détecte, en effet, la transcription du gène codant TIMP-I dans les cellules endothéliales des petits capillaires, dans 55 carcinomes du sein parmi 79 cas étudiés [29]. En outre, l'absence de TIMP-I pourrait favoriser l'invasion puisque les auteurs de ce travail ont observé que les cellu-



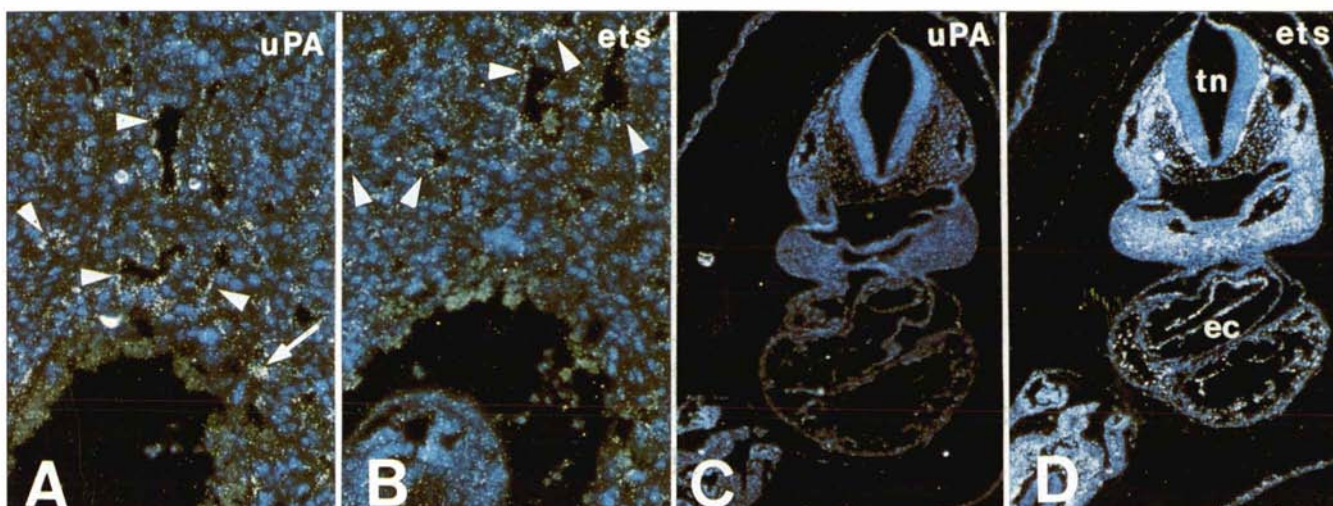


Figure 4. **Expression de l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) et du facteur de transcription c-Ets-1 au cours de l'angiogenèse dans l'embryon de souris et ses annexes.** Au jour 7,5 (A), les cellules trophoblastiques (flèches) et les cellules endothéliales dans certains vaisseaux de l'utérus (tête de flèche) situées à proximité de l'embryon expriment les ARNm pour l'u-PA. A ce stade, ainsi qu'au jour 10,5 (C), l'expression de ces ARNm n'est pas détectable à l'intérieur de l'embryon. Les planches B et D illustrent, en comparaison, la distribution des transcrits c-ets-1 sur des coupes adjacentes. Noter le signal sur les parois des vaisseaux de l'utérus (têtes de flèche en B), dans l'endothélium cardiaque (ec) et autour du tube neural (tn), dans une zone où l'angiogenèse est intense.

les endothéliales étaient dépourvues de TIMP-I à proximité d'un embol vasculaire ! Enfin, considérant l'importance d'un contrôle très strict de l'expression des protéases qui dégradent la matrice extracellulaire, à la fois dans le temps et dans l'espace, on ne peut pas exclure que la détection de la synthèse de ces enzymes par les cellules endothéliales, aux premiers stades de l'angiogenèse tumorale, ait échappé à l'investigation en raison d'une expression faible et/ou transitoire.

### Les facteurs de transcription

Les cellules endothéliales sont essentiellement quiescentes dans les tissus adultes sains. Leur activation par les facteurs angiogéniques se traduit notamment par la synthèse ou l'activation de facteurs de transcription qui participent à la régulation de l'expression des protéines mises en œuvre au cours de l'angiogenèse. Dans les cellules endothéliales quiescentes en culture, l'expression des protooncogènes nucléaires *c-jun* et *c-myc* peut être induite par des fac-

teurs angiogéniques. Cependant, dans les vaisseaux sanguins qui se forment autour du tube neural, dans l'ébauche du rein et sous l'épiderme au début de l'organogenèse de l'embryon de poulet, une sonde *c-jun* ne détecte pas de signal d'hybridation (X. Desbiens, communication personnelle). Au cours du développement de l'embryon, l'expression de *c-myc* peut être corréliée à la prolifération dans certains épithéliums ; elle peut être aussi dissociée de la prolifération, comme en témoignent l'absence de *c-myc* dans les cellules endodermiques et sa présence dans des neurones post-mitotiques [30]. Au cours de l'ontogenèse du foie [30] et du rein [31], où *c-myc* (ainsi que *N-myc* et *L-myc*) s'exprime, il est précisé que les cellules endothéliales dans les vaisseaux qui se forment ne sont pas marquées par les sondes *myc*. Une étude systématique de la distribution de la protéine Myc dans l'embryon de poulet révèle sa présence en faible quantité sur les veines et son absence sur les parois des artères qui se développent [30]. L'absence d'expression des proto-

oncogènes *c-jun* et *c-myc* dans les cellules endothéliales de l'embryon contraste donc avec l'induction de leur expression dans des cellules endothéliales en culture, activées par des facteurs angiogéniques. Pour interpréter cette différence, il faut considérer que les mécanismes d'activation des cellules endothéliales peuvent dépendre de leur origine (embryonnaire ou adulte) et de leur environnement.

### Le facteur de transcription c-Ets-1

C'est la description de l'expression de l'oncogène *c-ets-1* au cours du développement de l'embryon de poulet qui a permis de mettre en évidence la présence d'ARNm codant pour c-Ets-1 au cours de l'angiogenèse [32]. Les protéines c-Ets-1 sont des facteurs de transcription qui ont d'abord été détectés dans des lymphocytes T et B [33]. Cependant, une sonde spécifique de *c-ets-1* détecte un signal intense dans l'embryon de poulet dès la gastrulation, lorsque se forment les trois feuillets primitifs, ectoderme, mésoderme et endoderme. Les ARN mes-



## RÉFÉRENCES

36. Rosen GD, Birkenmeier TM, Dean DC. Characterization of the  $\alpha 4$  integrin gene promoter. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4094-8
  37. Wasylyk C, Gutman A, Nicholson R, Wasylyk B. c-Ets oncoprotein activates the stromelysin promoter through the same elements as several non-nuclear oncoproteins. *EMBO J* 1991; 10: 1127-34
  38. Wasylyk C, Wasylyk B. Oncogenic conversion alters the transcriptional properties of *ets*. *Cell Growth Diff* 1992; 3: 617-25
  39. Nerlov C, Rorth P, Blasi F, Johnsen M. Essential AP-1 and PEA3 binding elements in the human urokinase enhancer display cell type-specific activity. *Oncogene* 1991; 6: 1583-92.
  40. Herrmann JL, Chen JH, Nakajima M, Nicolson GL. A c-Ets-1 proto-oncoprotein binding site in the 72-kDa type IV collagenase promoter of human metastatic melanoma cells. *Clin Exp Metast* 1993; 10: 94.
  41. Sato H, Seiki M. Regulatory mechanism of 92 kDa type IV collagenase gene expression which is associated with invasiveness of tumor cells. *Oncogene* 1993; 8: 395-405.
  42. Edwards DR, Rocheleau H, Sharma RR, Wills AJ, Cowie A, Hassel JA, Heath JK. Involvement of AP1 and PEA3 binding sites in the regulation of murine tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) transcription. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1171: 41-55.
  43. Auerbach R. Vascular endothelial cell differentiation: organ-specificity and selective affinities as the basis for developing anti-cancer strategies. *Int J Radiat Biol* 1991; 60: 1-10.
  44. Folkman J, Ingber D. Inhibition of angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1992; 3: 89-96.
  45. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Polverini PJ, Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have antiangiogenic activity. *J Cell Biol* 1993; 122: 497-511.
  46. Ingber D, Fujita T, Kishimoto S, Sudo K, Kanamaru T, Brem H, Folkman J. Synthetic analogues of fumagillin that inhibit angiogenesis and suppress tumour growth. *Nature* 1990; 348: 555-7.
- sagers pour c-Ets-1 s'expriment dans certaines cellules mésodermiques. Cette expression est transitoire, plus intense autour des épithéliums au cours des processus morphogéniques; les épithéliums en sont, en revanche, toujours dépourvus, quelle que soit leur origine embryonnaire. Tout au long du développement de l'embryon, une grande quantité d'ARNm *c-ets-1* s'accumule dans les cellules endothéliales lorsque se forment les vaisseaux sanguins (figure 5 A-C), que ce soit *de novo* ou par bourgeonnement à partir d'un arbre vasculaire préexistant. Lorsque ces vaisseaux sont plus développés, que leur paroi comporte une tunique musculaire avec une membrane basale bien visible, les ARNm *c-ets-1* ne sont plus détectés dans les cellules endothéliales. Chez le poulet, les cellules endothéliales et les lymphocytes expriment différents ARNm *c-ets-1* issus d'un épissage alternatif [34]; les protéines codées par ces ARNm ont des domaines de transactivation différents.
- Les aspects essentiels de l'expression de *c-ets-1* dans l'embryon de poulet se retrouvent dans les embryons murin et humain, comme l'accumulation d'ARN messagers *c-ets-1* dans les cellules endothéliales des vaisseaux [35]. Dans les tissus sains adultes qui ont été examinés, l'observation d'un signal positif avec la sonde *c-ets-1* dans des capillaires n'est qu'exceptionnelle. En revanche, quand l'angiogenèse réapparaît dans des conditions pathologiques, comme dans le tissu de granulation au cours d'une réparation tissulaire et, surtout, pendant la croissance de carcinomes humains comportant des formes fortement vascularisées, l'expression des ARN messagers *c-ets-1* est induite dans les cellules endothéliales des capillaires néoformés (figure 5 D-E). *c-ets-1* s'exprime aussi dans les fibroblastes du stroma tumoral qui se trouvent souvent à proximité des formations tumorales invasives. Les cellules carcinomateuses en sont, quant à elles, toujours dépourvues (figure 5 D-E).
- On peut mimer, *in vitro*, la diminution du signal *c-ets-1* observée, *in vivo*, à la fin de l'angiogenèse [35]. Dans des cellules endothéliales provenant de l'aorte ou des capillaires du cerveau de bœuf, la quantité d'ARN messagers *c-ets-1* est élevée lorsque ces cellules croissent de façon exponentielle. Cette quantité d'ARNm diminue d'un facteur supérieur à 10 après la confluence de ces cellules.

## Quel rôle pour le facteur de transcription c-Ets-1 dans les cellules endothéliales ?

Puisque le gène *c-ets-1* code pour un facteur de transcription dont les ARN s'accumulent au début de l'angiogenèse, il est tentant de proposer que ce facteur de transcription participe au contrôle de ce processus, en réglant l'expression de gènes essentiels à la prolifération et/ou à la migration des cellules endothéliales. Il faut rappeler cependant que *c-ets-1* ne s'exprime pas spécifiquement dans les cellules endothéliales. Les ARNm *c-ets-1* sont aussi abondants dans les cellules de la crête neurale au cours de leur migration, dans les cellules du

**Figure 5. Quelques aspects de l'expression de *c-ets-1* dans l'embryon de poulet (A, B, C) et dans des tumeurs humaines (D, E, F).** Coupe transversale, au stade huit somites. Les cellules de la crête neurale (**A<sub>1</sub>**), des aortes et de l'endocarde (**A<sub>2</sub>**) sont marquées par la sonde *c-ets-1*. Coupe transversale, à six jours d'incubation, autour de l'aorte et des deux artères segmentaires qui se sont formées par bourgeonnement à partir de l'aorte (**B**). Le signal *c-ets-1* est plus intense le long des artères segmentaires. **C<sub>1</sub>**: foie, à six jours d'incubation. Les sinusoides sont marquées. **C<sub>2</sub>**: foie, après éclosion: on ne détecte plus de signal autour des vaisseaux sanguins. **D<sub>1</sub>** et **D<sub>2</sub>**: oncocytome bénin du rein. Entre les formations tumorales, les capillaires expriment l'ARNm *c-ets-1*. Il n'y a pas de marquage au niveau du gros vaisseau (triangles). **E<sub>1</sub>** et **E<sub>2</sub>**: carcinome du rein à cellules claires. Le stroma de cette tumeur est fortement vascularisé, avec des capillaires exprimant *c-ets-1*. **F<sub>1</sub>** et **F<sub>2</sub>**: adénocarcinome du colon peu différencié. Les fibroblastes du stroma proches des formations tumorales expriment l'ARNm pour *c-ets-1*. Les cellules tumorales ne l'expriment pas.



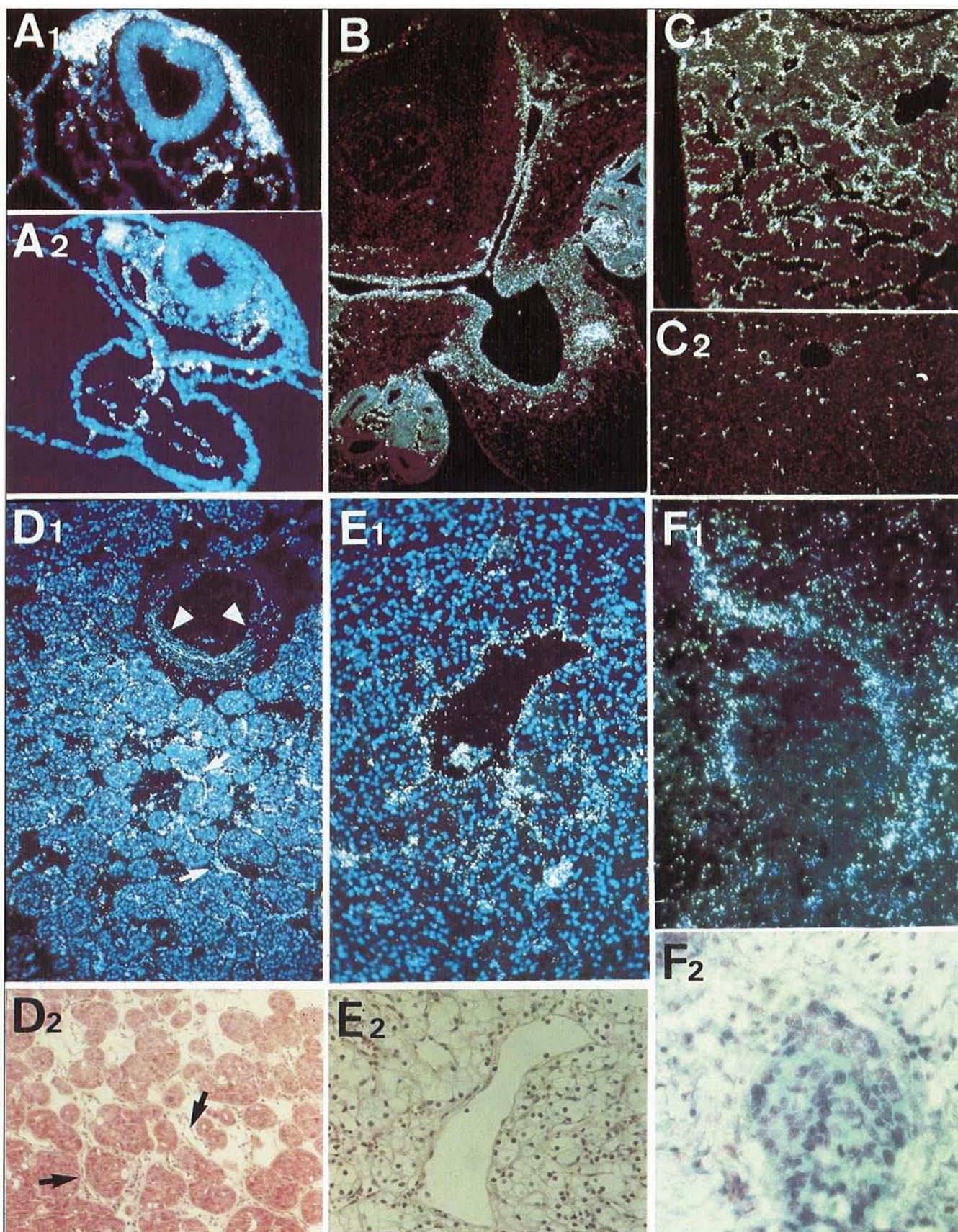




Tableau II			
QUELQUES PROMOTEURS SUSCEPTIBLES D'ÊTRE RÉGLÉS PAR LES PROTÉINES Ets AU COURS DE PROCESSUS INVASIFS			
Gène	Séquence des sites de fixation des protéines Ets	Ces sites de fixation sont-ils importants pour le promoteur ?	Ce promoteur est-il activable par un membre de la famille Ets ?
c-ets-1 (humain)	GAGC <b>CGAA</b> GTA	oui	c-Ets-1
αIV intégrine (humaine)	AGA <b>GGAA</b> GTG	oui	c-Ets-1
collagénase-I (humaine)	AGA <b>GGAT</b> GTT	oui	c-Ets-1
stromélysine-I (rat)	ACA <b>GGAA</b> GC	oui	c-Ets-1
	CCA <b>GGAA</b> GT	oui	
u-PA (humain)	GA <b>GGAA</b> ATG	oui	ND
TIMP-1 (souris)	CA <b>GGAA</b> GCCT	oui	ND
92 kD collagénase IV humain	GA <b>GGAA</b> GC	non (1)	

(1) Étude dans des cellules de fibrosarcome, ou d'hépatome. ND : non déterminé.

mésenchyme qui viennent s'accumuler sous l'ectoderme avant la formation de la peau, et dans les fibroblastes du stroma autour des formations tumorales invasives. Dans toutes ces situations, comme dans l'angiogenèse, l'expression de *c-ets-1* semble coïncider avec des processus de migration cellulaire.

L'étude de gènes susceptibles d'être contrôlés par c-Ets-1, ou gènes cibles de c-Ets-1, a été abordée, *in vitro*, par des expériences de co-transfection (Tableau II). Le facteur de transcription c-Ets-1 est ainsi capable de contrôler son propre promoteur. Parmi les gènes cibles présumés de c-Ets-1, se trouvent aussi des gènes susceptibles d'être mis en œuvre au cours des processus d'invasion, gènes codant pour des molécules d'adhérence comme l'αIV intégrine ([36], et communication personnelle de Doug Dean), et gènes codant pour des protéases dégradant la matrice extracellulaire. c-Ets-1 peut ainsi activer les promoteurs de la stromélysine-I [37] et de la collagénase-I [38]. Les promoteurs des gènes humain et murin codant pour l'activateur du plasminogène de type urokinase (u-PA) contiennent des sites de fixation pour les protéines c-Ets-1, et ces sites sont essentiels pour l'induction de la transcription de ce gène [39]. Ces mêmes sites de fixation sont pré-

sents dans les promoteurs des collagénases-IV, de 72 kDa et de 92 kDa [40, 41] et ils sont impliqués dans la régulation de la transcription du gène codant pour TIMP-1 [42].

La possibilité d'une contribution de c-Ets-1 à la régulation de la transcription de l'un ou l'autre de ces gènes au cours des processus invasifs représente une hypothèse attirante. La comparaison des cartes d'expression de *c-ets-1* avec celles de ces gènes cibles identifiés *in vitro* suggère que, s'il existe une relation entre ce facteur de transcription et l'initiation de la transcription de ces gènes, elle dépend du contexte dans lequel on la considère. L'expression de c-Ets-1 et celle de la collagénase-I, de la stromélysine ou de l'uPA se superposent dans les fibroblastes du stroma de certaines tumeurs invasives (Wernert *et al.*, soumis pour publication). En revanche, comme on l'a vu, dans les cellules endothéliales des vaisseaux qui se forment dans l'embryon ou dans des tumeurs solides, les gènes codant pour ces protéases ne sont pas transcrits ; ce n'est que dans les cellules endothéliales des vaisseaux qui se forment dans l'utérus, au cours de l'implantation de l'embryon, que c-Ets-1 est susceptible de participer à l'activation de la transcription de l'uPA (figure 4 C). Pour aller au-delà des

seules corrélations que permettent ces études descriptives, et comprendre le rôle du facteur de transcription c-Ets-1 au cours de l'angiogenèse, il faudra manipuler spécifiquement l'expression ou l'activité de c-Ets-1, identifier les gènes dont la transcription est alors perturbée, et définir dans quelle mesure cette perturbation est contrôlée directement par c-Ets-1.

### Perspective : bloquer l'angiogenèse

Beaucoup d'études de l'angiogenèse ont été réalisées *in vitro*. Ces études ont été utiles pour identifier les acteurs moléculaires potentiels de l'angiogenèse. Cependant, elles donnent parfois des renseignements trompeurs sur les mécanismes qui interviennent *in vivo*, parce que les propriétés des cellules endothéliales issues de différents organes, des capillaires ou de gros vaisseaux diffèrent, parce que ces propriétés spécifiques peuvent être rapidement perdues au cours de la mise en culture [43], et parce que l'environnement des cellules endothéliales, le dialogue qui intervient *in vivo* entre ces cellules, les péricytes voisins ou les cellules tumorales, ne sont pas reconstitués *in vitro*. C'est donc à partir de la description des acteurs moléculaires présents au cours de

l'angiogenèse tumorale, *in vivo*, que doivent s'élaborer les stratégies destinées à bloquer ce processus.

Il est parfois difficile de définir à quel niveau agissent certains inhibiteurs de l'angiogenèse tumorale. Ainsi l'un des premiers de ces inhibiteurs, isolé du cartilage, inhibe l'activité collagénase dans un tube à essais, mais aussi la prolifération et la migration des cellules endothéliales, *in vitro* (cité dans [44]). La thrombospondine, qui bloque la réponse angiogénique dans la cornée de rat, pourrait perturber l'adhérence des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire en fixant le plasminogène, l'u-PA ou son inhibiteur le PAI-I, ou en se fixant sur un récepteur à la surface des cellules endothéliales et interférer ainsi avec la transduction des signaux angiogéniques [45].

Plusieurs stratégies, visant à inactiver des facteurs angiogéniques (bFGF ou VEGF) avec des anticorps neutralisants [3, 13] ou à inhiber la réponse des cellules endothéliales à ces facteurs, ont été utilisées avec succès *in vivo*. Ainsi, un antibiotique sécrété par *Aspergillus fumigatus*, inhibe, *in vitro*, la prolifération des cellules endothéliales. L'injection d'un analogue de cette molécule, l'AGM 1470, inhibe l'angiogenèse dans différentes tumeurs induites chez la souris, sans présenter d'effet toxique majeur [46]. Par ailleurs, l'existence d'anticorps spécifiques de sous-populations de cellules endothéliales laisse entrevoir la possibilité de diriger spécifiquement, vers l'endothélium de certains tissus, des agents qui inhibent la migration et la prolifération des cellules endothéliales [43]. Dans cette perspective, le blocage d'un facteur de transcription comme c-Ets-1, qui s'exprime pendant l'angiogenèse, représente une possibilité intéressante actuellement testée dans notre laboratoire. Des rétrovirus recombinants peuvent être utilisés pour exprimer des ARN antisens dans les cellules endothéliales et bloquer spécifiquement l'expression de *c-ets-1*. Cependant, on se souviendra que les expériences de recombinaison homologue ont démontré par de nombreux exemples la redondance des mécanismes de régulation du vivant.

Aussi, comme pour le récepteur du VEGF [14], c'est peut-être avec un mutant transdominant négatif, susceptible de bloquer à la fois l'activité de *c-ets-1* et celle des autres membres de la famille de ce facteur de transcription, ou en associant au blocage de c-Ets-1 une autre molécule anti-angiogénique, qu'il sera possible de réaliser une synergie susceptible d'interférer efficacement avec l'angiogenèse tumorale ■

## Summary

### Molecular analysis of tumor angiogenesis

The formation of new blood vessels (angiogenesis) is a crucial step in the development of most solid tumors. Major advances in the identification of molecular actors that are presumably involved in the angiogenic process have been obtained by studies on cultured endothelial cells. However one may wonder if these actors that are active *in vitro* and in various angiogenic assays are actually expressed *in vivo* during angiogenesis. Using specific nucleotidic probes and antibodies it became recently possible to detect *in vivo* these presumptive molecular actors including angiogenic factors, matrix degrading proteases and their inhibitors, and transcription factors. The results of this contextual analysis, although fragmentary, challenge the models derived from *in vitro* analysis. These results will be essential for designing specific strategies aiming at the inhibition of tumor angiogenesis, which may result in limiting the proliferation and spreading of tumor cells.

## TIRÉS A PART

B. Vandenbunder.