médecine/sciences 1999 ; 15 : 382-6

Angiogenèse : une implication physiologique de plus pour la leptine

Dès sa découverte en 1994, la leptine, protéine adipocytaire de 16 kDa, identifiée comme étant le produit du gène *ob*, s'est révélée exercer un rôle important dans le maintien du poids corporel de par ses effets centraux sur le contrôle de la prise alimentaire, d'une part, et la stimulation de la dépense énergétique, d'autre part *(m/s 1995, n° 10, p. 1463)*. Des neurones hypothalamiques, particulièrement ceux du noyau arqué sécrétant le neuropeptide Y (NPY), ainsi que ceux des neurones des noyaux dorso- et ventro-médians, semblent être impliqués dans les signaux satiétogènes produits par la leptine [1, 2].

Très rapidement, de nouvelles découvertes sont venues compléter les conceptions initiales sur le rôle physiologique de cette hormone. Notamment, la découverte de sources cellulaires de leptine, différentes de l'adipocyte, ainsi que la mise en évidence de l'existence de nombreuses cibles périphériques de la leptine supposent un large spectre d'action et d'activités et confèrent à cette hormone un statut de cytokine. En effet, contrairement à ce que l'on croyait au moment de sa découverte, la leptine n'est pas produite par le seul adipocyte. Des cellules amniotiques et des cellules du syncytiotrophoblaste de l'unité fœto-placentaire synthétisent la leptine ; la régulation de leur sécrétion n'est pas encore connue [3, 4] *(m/s 1998, n° 8-9, p. 1153)* Les cellules principales de l'épithélium gastrique peuvent synthétiser et sécréter des quantités significatives de leptine. La prise alimentaire et l'administration de CCK-8 (fraction peptidique biologiquement active de la cholecystokinine) provoquent une libération de leptine *(m/s 1998, n° 11, p. 1298)* [5]. Toutefois, le tissu adipeux reste le site majeur de production de leptine. Des récepteurs de la leptine ont été identifiés dans de nombreux tissus (foie, cœur, muscle squelettique, pancréas endocrine) et des lignées hématopoïétiques ou transformées. Enfin, la leptine, *via* l'activation de ses récepteurs périphériques, exerce un contrôle sur la sécrétion et les effets de l'insuline [6] et module les fonctions immunitaires [7].

Une nouvelle cible périphérique de la leptine vient d'être identifiée : l'endothélium vasculaire. Des résultats récents montrent que la leptine stimule la prolifération des cellules endothéliales et l'angiogenèse *in vivo* [8, 9]. Ils ouvrent des perspectives importantes dans le domaine vasculaire et laissent entrevoir de nouveaux champs d'action et d'utilisation de la leptine. L'angiogenèse est un processus de néoformation de vaisseaux sanguins, à partir de vaisseaux préexistants. C'est un événement physiologique majeur qui contribue à la croissance des tissus au cours de la vie embryonnaire et est stimulé pendant le cycle menstruel et la grossesse ainsi que lors de la cicatrisation chez l'adulte. L'angiogenèse joue aussi un rôle notable dans la vascularisation des tumeurs. C'est un processus complexe qui comprend plusieurs phases cellulaires et biochimiques, que nous rappellerons brièvement : (1) la dégradation de la matrice extracellulaire ; (2) puis la migration et la prolifération des cellules endothéliales ; et (3) enfin leur différenciation [10-12].

Deux études, fondées sur des bases conceptuelles très différentes, démontrent que la leptine stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales *in vitro* et l'angiogenèse *in vivo* [8 , 9]. Dans un premier temps, les transcrits correspondant aux deux formes les plus abondantes du récepteur leptine (Ob-R), a et b, ont été identifiés dans les cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine en culture (HUVEC) *(figure 1)*. L'expression des protéines réceptrices a été confirmée par immunodétection en analyse par *Western blot* et par immunofluorescence en microscopie confocale, dans les cellules HUVEC ainsi que dans des cellules endothéliales bovines (microvasculaires ou de l'aorte) et les cellules endothéliales du système microvasculaire du tissu adipeux et du derme humain.

Le traitement des cellules endothéliales par la leptine, à des concentrations physiologiques, entraîne la phosphorylation de résidus tyrosine de diverses protéines endothéliales, dont les kinases activées par les mitogènes Erk1/2 et STAT3 de la famille des protéines STAT *(signal transducers and activators of transcription)* [13] ; ces phosphorylations sont associées à une stimulation de l'activité kinase des Erk1/2 et de liaison à l'ADN de STAT3. Ces résultats montrent que les récepteurs leptine endothéliaux sont parfaitement fonctionnels. L'expression des deux formes Ob-Ra et Ob-Rb de récepteurs leptine sur les cellules endothéliales permet de supposer que les deux Ob-R jouent des rôles différents et/ou complémentaires *(m/s 1997, n° 1, p. 99)*. Selon les concepts actuels, le récepteur de forme longue Ob-Rb contribuerait à la transmission du signal leptine alors que le récepteur de forme courte Ob-Ra semble être

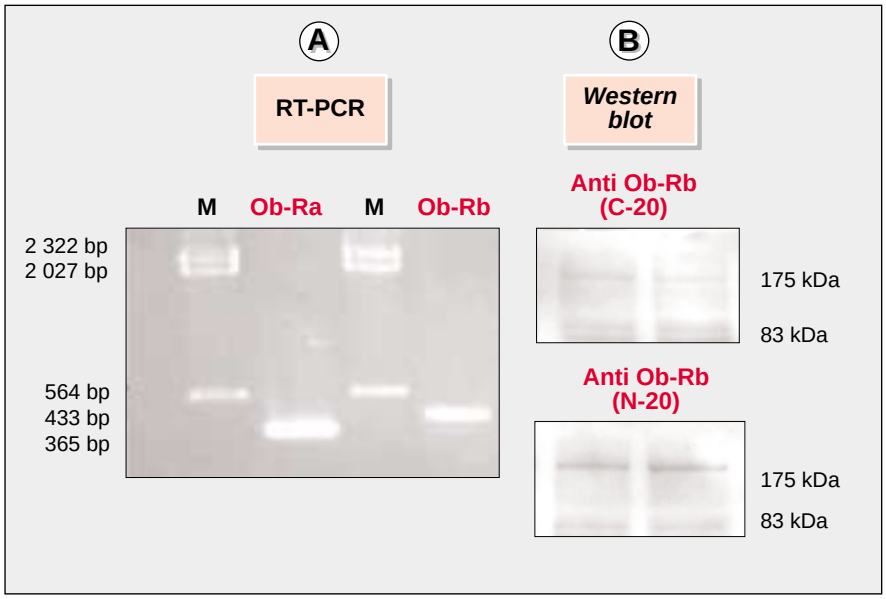

Figure 1. ***Identification des formes Ob-Ra et Ob-Rb des récepteurs leptine dans les cellules ombilicales humaines.*** *Par RT-PCR, à l'aide d'oligonucléotides sélectifs pour les ARNm des récepteurs Ob-Ra ou Ob-Rb* ***(A)*** *et par immunodétection avec des anticorps polyclonaux dirigés contre la région carboxy-terminale (C-20) ou amino-terminale (N-20) de la protéine réceptrice Ob-Rb* ***(B)****. M: marqueurs de taille de l'ADN.*

impliqué dans les voies d'endocytose de la cytokine [14].

L'activation des Ob-R endothéliaux est associée à une stimulation de la prolifération/survie des cellules HUVEC en culture ainsi qu'à une augmentation de la migration directionnelle des HUVEC à travers une membrane poreuse (chambres de Boyden). Les effets observés sont équivalents à ceux engendrés sur ce type de cellules par le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF). En parallèle, l'utilisation de modèles d'angiogenèse *in vitro* montrent que les HUVEC et les cellules endothéliales de l'aorte de porc cultivées sur billes se réorganisent en gel de fibrine en présence de leptine pour former des structures similaires à des capillaires; des effets comparables sont obtenus avec le VEGF.

Enfin, des modèles d'angiogenèse *in vivo* démontrent l'importance de cet effet. En effet, tant sur la membrane chorioallantoïde d'embryons de poulet que sur la cornée de rat, des implants de leptine provoquent une nette réponse angiogénique analogue à celle du VEGF. En revanche, la leptine n'exerce aucun effet angiogénique notable sur la cornée de rats *fa/fa* qui présentent une mutation inactivante du récepteur de la leptine.

Ces travaux montrent que la leptine peut être un puissant modulateur des processus angiogéniques, surtout chez les rongeurs. Bien que les effets *in vitro* aient été observés à des concentrations de leptine habituellement rencontrées dans le plasma, les études *in vivo* doivent être approfondies. Il est nécessaire de définir l'importance et l'amplitude de ces effets angiogéniques de la leptine sur divers types de cellules endothéliales, chez l'homme en particulier, et de préciser la contribution éventuelle de la leptine par rapport aux autres facteurs angiogéniques existants. Quoi qu'il en soit, ces résultats sur le rôle angiogénique de la leptine ouvrent des perspectives importantes dans des domaines aussi diversifiés que le développement du tissu adipeux, la néovascularisation de certaines tumeurs, la cicatrisation des plaies et la maturation de l'œuf et des embryons dans le domaine de la reproduction, pour ne citer que les plus immédiates.

Angiogenèse et tissu adipeux

Il est incontestable que le développement de la microcirculation du tissu adipeux, en phase prénatale, coïncide avec les processus angiogéniques opérant également dans de nombreux autres tissus et organes au fur et à mesure du développement fœtal. Le tissu adipeux a la capacité de poursuivre sa croissance et son développement tout au long de la vie adulte avec, parfois, des développements démesurés comme dans le cas des obésités morbides. Cette croissance continue est due à une adipogenèse: prolifération de précurseurs adipocytaires ayant gardé des capacités proliferatives, différenciation de préadipocytes et d'adipocytes immatures en adipocytes, accroissement spectaculaire de la taille des adipocytes existants conduisant à une hypertrophie notable de ces cellules. Il est fortement suspecté, bien que largement non démontré, qu'une angiogenèse doit exister, parallèlement à l'adipogenèse, afin de permettre la néovascularisation, l'oxygénation et le drainage harmonieux des nouveaux panicules adipeux ainsi constitués. On ne sait pas si les facteurs contrôlant le développement de la néovascularisation des tissus adipeux chez l'adulte sont identiques à ceux contrôlant l'angiogenèse dans le tissu adipeux en phase prénatale.

Comme l'obésité est associée chez l'homme et les mammifères à un accroissement de la production de leptine par les adipocytes hypertrophiques, il est tentant de proposer que le tissu adipeux est le site d'interaction privilégié entre les cellules productrices et réceptrices de leptine. On peut envisager que, parallèlement à l'hypertrophie adipocytaire, la leptine produite par les adipocytes hypertrophiés stimule les cellules endothéliales de la microvascularisation du tissu adipeux et contribue, par ces effets de proximité, au développement coordonné de la vascularisation de la masse grasse *(figure 2)*.

On doit cependant continuer à s'interroger sur l'importance physiologique du phénomène et fournir des preuves expérimentales convaincantes. Il est à remarquer que les animaux présentant des anomalies génétiques du système leptine, comme les souris *ob/ob*, *db/db* et les rats *fa/fa*, présentent des dépôts adipeux importants et des adipocytes hypertrophiques. Il n'a pas été mentionné d'altérations des processus angiogéniques ; en fait, ils n'ont pas été étudiés. Il n'est pas à exclure que les défauts fonctionnels du système leptine rencontrés chez ces animaux ont pu être compensés par la production d'autres facteurs angiogéniques tels que le VEGF.

Pour le moment, il n'y a pratiquement aucune information en ce qui concerne les mécanismes contrôlant l'angiogenèse au cours du développement des masses adipeuses et dans les obésités sévères. Certaines données acquises sur le tissu adipeux ou les adipocytes en culture méritent d'être ré-interprétées à la lumière de ces résultats récents. En effet, des travaux ont déjà attiré l'attention sur la présence éventuelle de facteurs angiogéniques dans le tissu adipeux sans que des considérations mécanistiques aient été abordées. Ainsi, on notera que des lambeaux de tissu adipeux épiploïque ont été utilisés par les chirurgiens pour optimaliser la cicatrisation de plaies et revasculariser le myocarde ischémique. L'implantation de tissu adipeux sous-cutané ou épiploïque dans la cornée de lapin induit une néovascularisation alors qu'un tel effet n'est pas observé lorsque du foie ou du muscle sont implantés. La suture de graisse à l'intestin favorise l'apparition d'une néovascularisation [15]. L'implantation sous-cutanée de préadipocytes de la lignée 3T3-L1 chez la souris athymique est suivie du développement d'un panicule adipeux, richement vascularisé, au site d'injection [16 , 17]. Des substances aux propriétés angiogéniques et vasoactives ont été identifiées dans des biopsies de tissu adipeux de sujets obèses sans que les aspects mécanistiques aient été réellement abordés jusqu'ici [18]. Le sujet reste largement ouvert. Des travaux ont montré que des milieux de culture conditionnés par des préadipocytes stimulent la prolifération de cellules endothéliales microvasculaires sans que le/les facteur(s) ait(ent) été identifié(s) [19]. Dès les années 1980, des études ont montré que les cellules 3T3-F442A, différenciées en adipocytes produisaient un facteur possédant une activité angiogénique. Sa production dépendait étroitement du niveau de différenciation des cellules [20, 21]. Une étude plus approfondie de composition de la fraction douée de propriétés angiogéniques a révélé que ce facteur était la monobutyrine (1-butyryl-glycérol). La monobutyrine stimule l'angiogenèse *in vivo* et la motilité des cellules endothéliales *in vitro*, mais sans affecter leur prolifération [22]. On peut penser que, dans certaines conditions, les effets de la monobutyrine viendront renforcer ceux de la leptine. Notons, enfin, que les adipocytes expriment des ARNm du bFGF et du VEGF. La régulation de la production de ces protéines a été peu étudiée jusqu'ici. Une étude récente a montré que le VEGF est un facteur angiogénique important du tissu épiploïque ; il est exprimé préférentiellement dans des conditions d'hypoxie [23].

Pour conclure ce chapitre en essayant d'intégrer les résultats obtenus sur la leptine et les données encore assez disparates sur la présence d'autres facteurs angiogéniques candidats produits par l'adipocyte, il est clair que nous manquons d'informations sur les mécanismes contrôlant l'angiogenèse dans le cas d'obésités sévères. Au vu de ces données, il paraît raisonnable de proposer que le contrôle de l'angiogenèse pourrait représenter un moyen nouveau de régler l'adipogenèse.

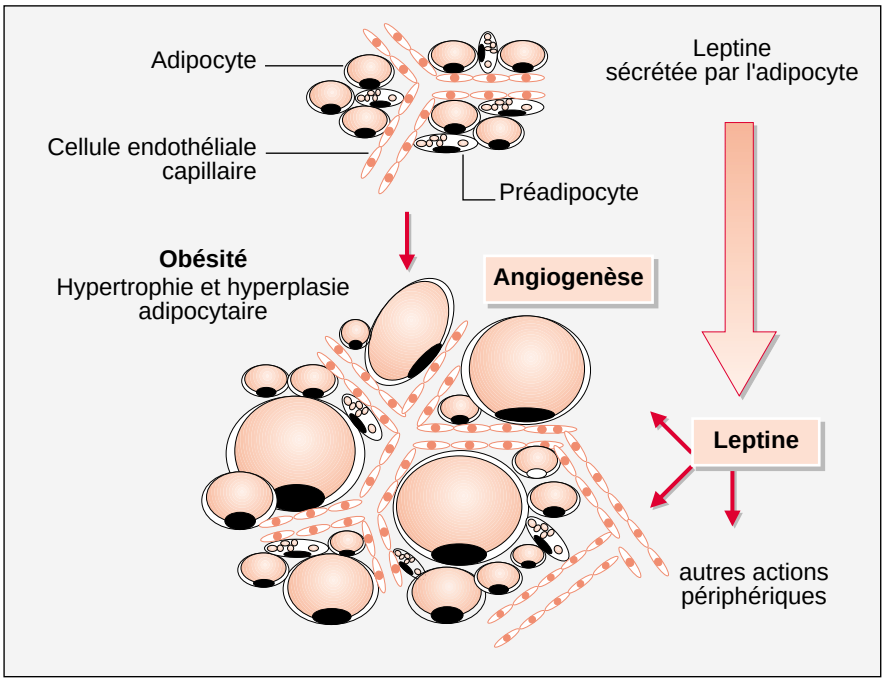

Figure 2. ***Schéma représentant l'implication possible de le leptine dans la régulation de l'angiogenèse lors du développement de la masse grasse.*** *Le tissu adipeux est le site d'interaction privilégié entre les cellules productrices et réceptrices de leptine. Parallèlement à l'hypertrophie adipocytaire, la leptine produite par les adipocytes hypertrophiés pourrait stimuler les cellules endothéliales de la microvascularisation du tissu adipeux et contribuer, par ces effets de proximité, au développement coordonné de la vascularisation de la masse grasse.*

Angiogenèse, fonctions de reproduction et cancer

La production de leptine a été décrite dans des populations cellulaires spécialisées de la granulosa et

du cumulus oophorus de follicules humains préovulatoires ainsi que dans des ovocytes mûrs [24, 25]. Cette production locale de leptine, au rôle mal compris, est susceptible de contribuer au développement de la vascularisation périfolliculaire qui joue un rôle essentiel dans l'oxygénation des ovocytes et le maintien de leur intégralité fonctionnelle, deux déterminants importants de la compétence des ovocytes.

Le placenta est un site de synthèse de la leptine et la production de cette hormone est réglée *in utero* [4]. L'unité fœto-placentaire semble être capable de produire de la leptine de manière quantifiable dans la circulation fœtale. La leptine est présente dans le liquide amniotique et le sang du cordon ombilical (veine et artères). La découverte de récepteurs de la leptine sur les cellules endothéliales (HUVEC) du cordon ombilical humain revêt un intérêt certain pour nous aider à comprendre le rôle de la leptine dans le contrôle de la circulation fœtale. La leptine placentaire doit aussi être considérée comme jouant un rôle important dans le développement de la vascularisation de cet organe. Les cellules amniotiques sont un des sites de production de la leptine. Une forte expression du gène *ob* a été trouvée dans le placenta humain et dans les villosités choriales dès la 8e semaine de grossesse avec une densité importante dans le syncytiotrophoblaste.

En ce qui concerne les aspects physiopathologiques, des tumeurs trophoblastiques bénignes ou malignes et des lignées cellulaires humaines, issues de choriocarcinomes, sécrètent de la leptine [3, 26]. Dans ce cas, on peut penser que la leptine sécrétée par les cellules tumorales pourra jouer ultérieurement un rôle non négligeable (seule ou associée aux autres facteurs angiogéniques) dans le développement de la néovascularisation lors du développement de certaines de ces tumeurs. Cette approche doit pouvoir être étendue à de nombreux autres types de cancers. On est en droit de penser que les capacités de production de la leptine par des cellules tumorales doivent être explorées, parallèlement à celles d'autres facteurs angiogéniques et antiangiogéniques découverts jusqu'ici.

Angiogenèse et cicatrisation

Le dernier aspect impliquant la leptine qui devrait retenir l'attention concerne la régulation des processus de cicatrisation. Comme nous l'avons mentionné plus haut, le tissu adipeux a été utilisé par des chirurgiens comme adjuvant des processus de cicatrisation. La leptine pourrait être un partenaire non négligeable dans le contrôle de ces processus. Il faut savoir que les processus de cicatrisation sont altérés chez les souris présentant une déficience du système leptine telles que les souris *ob/ob* ou *db/db* [27]. Les kératinocytes de ces animaux ont une production déficiente de VEGF [28]. Il sera intéressant de rechercher s'il est possible de moduler les processus de cicatrisation chez les animaux produisant une leptine mutée non active (souris *ob/ob*) par l'administration de leptine exogène. Une telle exploration des effets de la leptine sur les processus de cicatrisation pourra être étendue à d'autres modèles utilisés habituellement dans ce domaine d'investigation.

En conclusion, la découverte des effets angiogéniques de la leptine ouvre de nombreuses perspectives de recherche. Une grande prudence s'impose en l'état actuel de nos connaissances du sujet ; les validations physiologiques doivent être étoffées dans tous les domaines évoqués ci-dessus. Il reste à bien caractériser les sites vasculaires sensibles aux effets pro-angiogéniques de la leptine et à préciser si la régulation de cette activité angiogénique dépend de la présence d'autres cytokines dans l'environnement péricellulaire des cellules endothéliales. Les situations caractérisées par une hyperleptinémie locale ou systémique, telles que l'obésité, doivent être analysées avec plus d'attention en ce qui concerne les anomalies affectant la sphère micro- et macrovasculaire et l'implication éventuelle de la leptine dans la genèse de certaines maladies vasculaires chez l'obèse. Ces résultats laissent également entrevoir de nouveaux champs d'action et d'utilisation de la leptine et, éventuellement, d'antagonistes de cette hormone ■

RÉFÉRENCES

1. Schwartz MW, Seeley RJ, Campfield LA, Burns P, Baskin DG. Identification of targets of leptin action in rat hypothalamus. *J Clin Invest* 1996 ; 98 : 1101-6.

2. Friedman JM, Halaas JL. Leptin and the regulation of body weight. *Nature* 1998 ; 395 : 763-70.

3. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, *et al.* Nonadipose tissue production of leptin : leptin as a novel placenta-derived hormone in humans. *Nat Med* 1997 ; 3 : 1029-33.

4. Lepercq J, Cauzac M, Lahlou N, *et al.* Overexpression of placental leptin in diabetic pregnancy : a critical role for insulin. *Diabetes* 1998 ; 47 : 847-50.

5. Bado A, Lavasseur S, Attoub S, *et al.* The stomach is a source of leptin. *Nature* 1998 ; 394 : 790-3.

6. Girard J. Is leptin the link between obesity and insulin resistance. *Diabetes Metab* 1997 ; 23 (suppl 3) : 16-24.

7. Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RJ. Leptin modulates T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 1998 ; 394 : 897-901.

8. Sierra-Honigmann MR, Nath AK, Murakami C, *et al.* Biological action of leptin as an angiogenic factor. *Science* 1998 ; 281 : 1683-6.

9. Bouloumié A, Drexler HCA, Lafontan M, Busse R. Leptin, the product of ob gene, promotes angiogenesis. *Circ Res* 1998 ; 83 : 1059-66.

10. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997 ; 386 : 671-74.

11. Folkman J. Angiogenesis and angiogenesis inhibition : an overview. *EXS* 1997 ; 79 : 1-8.

12. Beck L, D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 1997 ; 11 : 365-73.

13. Vignais ML. Protéines JAK et STAT dans la signalisation cellulaire. *Med Sci* 1997 ; 13 : 1277-84.

14. Tartaglia LA. The leptin receptor. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 6093-96.

15. Silverman KJ, Lund DP, Zetter BR, *et al.* Angiogenic activity of adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1988 ; 153 : 347-52.

16. Green H, Kehinde O. Formation of normally differentiated subcutaneous fat pads by an established preadipose cell line. *J Cell Phys* 1979 ; 101 : 169-72.

17. Mandrup S, Loftus TM, MacDougald OA, Kuhajda FP, Lane MD. Obese gene expression at *in vivo* levels by fat pads derived from s.c. implanted 3T3-F442A adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 4300-5.

18. Crandall DL, Haussman GJ, Kral JG. A review of the microcirculation of adipose tissue: Anatomic, metabolic and angiogenic perspectives. *Microcirculation* 1997 ; 4 : 211-32.

19. Lau DCW, Shillabeer G, Li ZH, Wong KL, Varzaneh FE, Tough SC. Paracrine interactions in adipose tissue development and growth. *Int J Obesity* 1996 ; 20 (suppl 3) : S16-S25.

20. Castellot JJ, Karnovsky MJ, Spiegelman BM. Potent stimulation of vascular endothelial cell growth by differentiated 3T3 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980 ; 77 : 6007-11.

21. Castellot JJ, Karnovsky MJ, Spiegelman BM. Differentiation-dependent stimulation of neovascularisation and endothelial cell chemotaxis by 3T3 adipocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982 ; 79 : 5597-601.

22. Dobson DE, Kambe A, Block E, *et al.* 1-Butyryl-Glycerol: a novel angiogenesis factor secreted by differentiating adipocytes. *Cell* 1990 ; 61 : 223-30.

23. Zhang QX, Magovern CJ, Mack CA, Budenbender KT, Ko W, Rosengart TK. Vascular endothelial growth factor is the major angiogenic factor in omentum : mechanism of the omentum-mediated angiogenesis. *J Surg Res* 1997 ; 67 : 147-54.

24. Cioffi JA, Blerkom JV, Antczak M, Shafer A, Wittmer S, Snodgrass HR. The expression of leptin and its receptors in the preovulatory human follicles. *Mol Hum Reprod* 1997 ; 3 : 467-72.

25. Antczak M, Blerkom JV, Clark A. A novel mechanism of vascular endothelial growth factor, leptin and transforming growth factor-beta2 sequestration in a subpopulation of human ovarian follicle cells. *Hum Reprod* 1997 ; 12 : 2226-34.

26. Sagawa N, Mori T, Masuzaki H, Ogawa Y, Nakao K. Leptin production by hydatidiform mole. *Lancet* 1997 ; 350 : 1518-9.

27. Tsuboi R, Shi CM, Rifkin DB, Ogawa H. A wound healing model using healing-impaired diabetic mice. *J Dermatol* 1992 ; 19 : 673-5.

28. Frank S, Hubner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem* 1995 ; 270 : 12607-13.

Max Lafontan

Directeur de recherches Inserm.

Anne Bouloumié

Chargée de recherches Inserm.
Unité Inserm 317, Institut Louis-Bugnard, Université Paul-Sabatier, CHU Rangueil, 31403 Toulouse Cedex 4, France.

TIRÉS À PART

M. Lafontan.