

Angiogenèse tumorale : modèles, cibles et inhibition

Andreas Bikfalvi

LMMA et INSERM U 920, Université Bordeaux I, Avenue des Facultés, 33405 Talence, France

Auteur correspondant : Andreas Bikfalvi, a.bikfalvi@angio.u-bordeaux1.fr

Reçu le 9 février 2009

Résumé – L'angiogenèse est un processus fondamental au cours du développement ainsi qu'en pathologie. Les réseaux moléculaires impliqués dans l'angiogenèse sont incomplètement compris. Nous avons récemment développé un nouveau modèle d'angiogenèse tumorale chez le poulet qui permet des études à grande échelle. Par ailleurs, nous avons aussi mis en évidence une nouvelle voie d'induction qui fait appel au stress du réticulum endoplasmique. Ces recherches constituent de nouvelles perspectives prometteuses pour l'avenir.

Mots clés : Angiogenèse tumorale / membrane chorio-allantoïdienne du poulet

Abstract – Tumoral angiogenesis: models, targets and inhibition.

Angiogenesis is a basic process during development and in pathology as well. The molecular networks involved in angiogenesis are not totally understood. We have recently developed a new model for tumoral angiogenesis in the chicken embryo, which allows large scale studies. On the other hand we have uncovered a new induction pathway, which involves stress of the endoplasmic reticulum. These investigations open up novel prospects for the future.

Key words: Tumoral angiogenesis / chicken chorio-allantoic membrane

Introduction

La formation de vaisseaux sanguins (angiogenèse) est un processus fondamental qui se déroule non seulement au cours du développement embryonnaire et du développement postnatal, mais aussi dans un grand nombre de pathologies comme le cancer, les maladies inflammatoires chroniques et les maladies liées à l'ischémie tissulaire.

L'angiogenèse est maintenant un sujet majeur de la recherche biomédicale. Un grand nombre de mécanismes fondamentaux ont été déchiffrés et des cibles thérapeutiques identifiées. Des acteurs clés comme le facteur de croissance des fibroblastes (FGF), les *vascular endothelial growth factors* (VEGF) et les angiopoïétines ont été caractérisés, ainsi que des nouveaux acteurs inattendus comme les éphrines, les nétrines, Notch/Delta, les sémaphorines et *roundabout/slit* (Bikfalvi, 2006).

Par ailleurs, les recherches sur l'angiogenèse ont intégré à présent des approches de génomique et la

biologie des systèmes. Néanmoins, les modèles utilisés pour ces études sont limités et ne correspondent pas à la situation complexe telle qu'elle existe *in vivo*.

L'induction de l'angiogenèse dans la cellule tumorale met en jeu un mécanisme appelé le *switch* angiogénique, qui n'est pas bien caractérisé, mais semble faire intervenir l'activation oncogénique et d'autres médiateurs intracellulaires (North *et al.*, 2005). Un des facteurs de promotion du *switch* angiogénique est l'hypoxie, qui induit des facteurs spécifiques, les *Hypoxia-Inducible Factors* (HIF) et des Proline Hydroxylases (PHD). Cependant d'autres stresses et voies existent mais sont encore mal caractérisés.

Dans cet article, j'aborderai deux aspects des recherches actuellement menées dans notre laboratoire, c'est-à-dire la description d'un modèle chez l'embryon de poulet pour des études de génomique fonctionnelle et la caractérisation d'une nouvelle voie d'induction de l'angiogenèse, qui fait appel au stress du réticulum endoplasmique.

Le modèle de l'embryon de poulet dans la recherche sur l'angiogenèse

L'un des modèles les mieux adaptés pour étudier le développement vasculaire est la membrane chorio-allantoïdienne (CAM) du poulet (Djonov & Schmid, 2000; Nguyen *et al.*, 1994; Borges *et al.*, 2003; Staton *et al.*, 2007). Cette membrane, richement vascularisée, est utilisée non seulement pour étudier *in vivo* le développement vasculaire normal, mais aussi pour étudier les processus angiogéniques pathologiques comme la vascularisation tumorale ou inflammatoire. Au cours des trois dernières décennies, la CAM a été utilisée principalement pour tester l'influence de facteurs pro- ou anti-angiogéniques sur le développement vasculaire. L'utilisation de ce modèle offre de nombreux avantages : le réseau vasculaire est d'accès et de manipulation facile ; les conditions de culture ne sont pas coûteuses et ne posent pas de problèmes éthiques liés à l'utilisation d'animaux vivants et à la souffrance engendrée par l'expérimentateur ; surtout, il autorise l'observation par microscopie « intravitale » du remodelage vasculaire, qui permet d'observer un tissu vivant sans fixation ni coloration.

Ces modèles ont été utilisés jusqu'alors pour tester l'effet de molécules stimulatrices ou inhibitrices sur l'angiogenèse ou étudier le pouvoir angiogénique de certaines lignées cellulaires. Nous avons souligné que ce modèle serait très utile pour identifier de nouveaux réseaux moléculaires au cours de l'angiogenèse et de l'invasion tumorale grâce à des études de génomique fonctionnelle.

À cette fin, nous avons d'abord caractérisé ce modèle d'un point de vue morphologique (Hagedorn *et al.*, 2004) et plus récemment le transcriptome de la CAM normale au cours de son développement (Hagedorn *et al.*, soumis). Puis, nous avons également effectué une étude de protéomique par une stratégie de *shot-gun* et par la biotinylation *in vivo* (Kilarski *et al.*, en préparation). Dans cette dernière approche, nous avons pu biotinyler l'embryon de poulet de 17 jours et identifier un grand nombre de molécules de la membrane et de la matrice extracellulaire dans différents organes, au niveau de la CAM et au niveau du tissu de cicatrisation induit. Nous avons, par ailleurs, caractérisé le métabolome de la CAM en développement (Coll : Hector Keun, Imperial College, London).

Nous avons développé un nouveau modèle d'angiogenèse tumorale en utilisant l'embryon de poulet et identifié les gènes responsables de l'induction de l'angiogenèse (*switch* angiogénique) dans ce modèle (Hagedorn *et al.*, 2005). Ce modèle, que nous avons baptisé « gliome expérimental », répond aux règles éthiques des 3R, et concilie de nombreux avantages, notamment l'accessibilité à la tumeur *in vivo*, la rapidité, le faible coût, la reproductibilité et les

récentes avancées dans la connaissance de la génétique du poulet (séquençage complet du génome). Dans ce modèle, les cellules tumorales d'origine humaine forment rapidement et de manière reproductible des tumeurs vascularisées par angiogenèse présentant les caractéristiques morphologiques des glioblastomes humains. Nous avons mis au point des marquages fluorescents permettant de visualiser les composantes cellulaires majeures sur des coupes de tissu tumoral (Hagedorn *et al.*, 2004, 2005). L'endothélium est marqué par la lectine *Sambucus nigra* (SNA-1), les cellules tumorales humaines par un anticorps anti-ventine et les péricytes d'origine aviaire par un anticorps anti-desmine. Grâce à ces marquages visualisés par microscopie confocale, nous avons montré que le gliome expérimental récapitule les caractéristiques histopathologiques majeures des glioblastomes humains.

La qualité de modélisation de l'organisation et de l'interaction entre cellules tumorales et cellules de l'hôte suggère qu'au niveau moléculaire également, le modèle simule les régulations nécessaires à la croissance tumorale. Parce que le gliome expérimental est une tumeur hybride dans laquelle seules les cellules tumorales sont d'origine humaine, il offre l'avantage unique de pouvoir étudier spécifiquement la régulation génique soit au niveau des cellules tumorales (puces à ADN humain), soit au niveau des cellules endothéliales et péricyaires (puces à ADN de poulet).

Nous avons d'abord validé la pertinence de l'utilisation des micropuces à ADN. Le criblage stringent d'une micropuce à ADN comprenant 20 % du génome humain a ainsi permis d'identifier 21 gènes spécifiquement régulés au cours de la transition angiogénique (Borges *et al.*, 2003). La fonction de dix-huit de ces gènes, telle qu'elle est décrite dans la littérature, entre dans le cadre des grandes fonctions clefs de la progression tumorale. Quatre de ces gènes, IL6, CYR61, LUM (tous trois surexprimés au stade vascularisé) et FBX06 (sous-exprimé au stade vascularisé) ont été étudiés de façon plus approfondie. Afin de savoir si un tel criblage a une valeur prédictive de la régulation génique qui a lieu chez les patients en phase évolutive, l'expression de ces quatre gènes a été déterminée à partir de biopsies de patients. Dès lors, le modèle aurait une valeur pronostique pour des gènes non caractérisés à ce jour.

En dehors des gliomes, d'autres types de tumeurs (adénocarcinome pancréatique, cancer du rein) ont été étudiés dans ce modèle. Nous avons ainsi obtenu des résultats très intéressants concernant l'invasion des tumeurs pancréatiques et des cancers du rein à cellules claires (ccRCC) et la caractérisation du patron d'expression (Dumartin *et al.*, soumis). Par ailleurs, nous avons établi le rôle fonctionnel de la nétrine-1 et de CXCL4L1 dans ce modèle (Dumartin *et al.*, soumis).

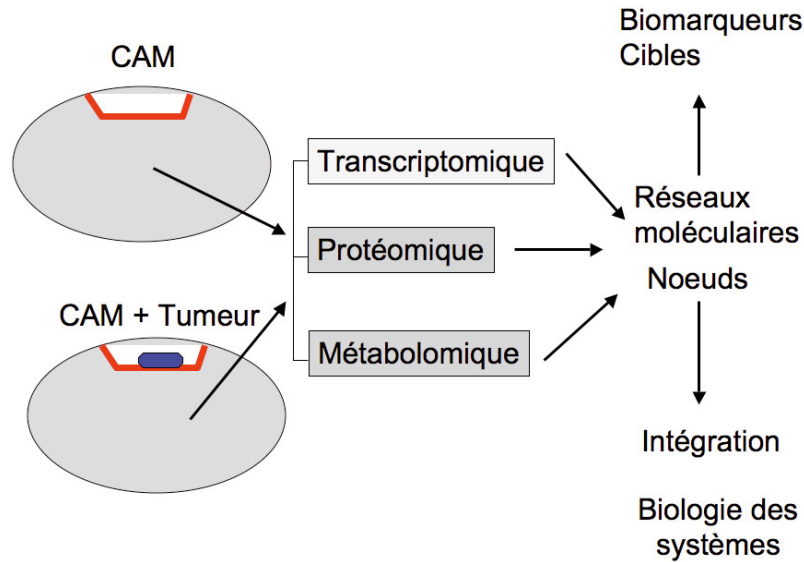


Fig. 1. Représentation schématique de l'utilisation du modèle expérimental sur membrane chorioallantoïdienne du poulet (CAM).

Le modèle a été également validé pour le *knock-down* de gènes. Par exemple, le *knock-down* du VEGF (VEGF-kd) par interférence à l'ARN ne compromet ni la prolifération, ni la migration des cellules en culture mais induit des tumeurs pratiquement avasculaires dans le modèle CAM. Le phénotype normal est restauré lorsque les tumeurs en croissance sont traitées avec du VEGF exogène (protéine). Le système étant approprié pour rechercher des nouveaux réseaux, nous avons initié une analyse transcriptomique différentielle en comparant, d'une part, les cellules VEGF-kd aux cellules témoins en culture, d'autre part, les tumeurs VEGF-kd aux tumeurs de référence. L'analyse de cette expérience a validé l'approche puisqu'elle met en évidence des réseaux fonctionnels majeurs liés au cycle cellulaire et à l'apoptose, ainsi qu'à la régulation métabolique en réponse à la carence ou à l'hypoxie (Saidi *et al.*, 2008). Par ailleurs le *knock-down* combinatoire de IL6 et VEGF a été réalisé dans le modèle (Javerzat *et al.*, sous presse).

Les différentes utilisations et applications de notre modèle sont représentées dans la figure 1.

Nouvelles voies de signalisation de l'angiogenèse tumorale

L'hypoxie joue un rôle essentiel sur le développement tumoral au niveau de l'angiogenèse, de la modulation du métabolisme énergétique et de l'apoptose (North *et al.*, 2005). Les voies métaboliques activées par l'hypoxie comportent des cibles intéressantes pour

le développement de stratégies thérapeutiques anti-angiogéniques. Ainsi, diverses approches ont été proposées pour bloquer l'activation d'HIF-1, cible privilégiée de l'hypoxie, dans les tumeurs et fragiliser les cellules transformées en les rendant incapables à l'hypoxie. Cependant, cette stratégie pourrait ne pas être totalement satisfaisante du fait de la mise en évidence récente de signaux alternatifs générés par d'autres stress. En accord avec ces résultats, nous avons pu également observer qu'HIF-1 α n'est pas impliqué dans l'induction du VEGF-A lors d'une carence en glucose, sur les modèles de cellules A549/8 de carcinome humain et de gliome U87. Une seconde protéine de signalisation, IRE1, impliquée dans la réponse du réticulum endoplasmique (*Unfolded Protein Response*, UPR) aux stress, constitue par contre une excellente cible pour des stratégies thérapeutiques visant à inhiber à la fois des signaux de réponse à l'hypoxie et à la carence en glucose (Drogat *et al.*, 2007). Nous avons montré que le blocage de l'activité de cette protéine avait un effet dramatique sur l'angiogenèse et le pouvoir invasif des gliomes. Par ailleurs, la signature transcriptomique de cellules dans lesquelles IRE1 α est inhibée est profondément modifiée avec un blocage de facteurs pro-angiogéniques et une induction de facteurs anti-angiogéniques. Il semble cependant que l'invasion des cellules tumorales soit nettement augmentée si IRE1 α est inhibée. Ceci indique que le sensor IRE1 α a un rôle clé dans l'induction du signal angiogénique des cellules tumorales et le renforcement du comportement invasif.

Les différentes voies d'induction de l'angiogenèse tumorale sont représentées dans la figure 2.

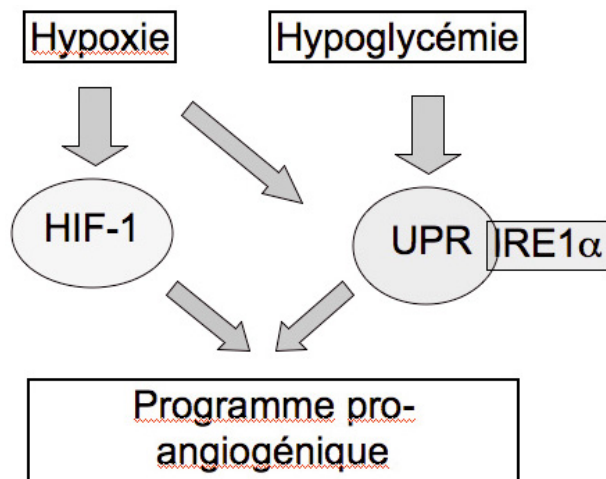


Fig. 2. Représentation schématique des voies du stress cellulaire dans l'induction de l'angiogenèse. UPR, *Unfolded Protein Response* ; HIF-1, Hypoxia-Inducible Factor-1 ; IRE-1 α , *Inositol Regulated Enzyme-1 α* .

Conclusions

Dans notre laboratoire, nous avons apporté récemment deux contributions significatives à l'étude de l'angiogenèse tumorale. La première est le développement du modèle de la CAM de l'embryon de poulet, à notre avis très pertinent pour des études de génomique fonctionnelle qui pourra certainement, dans l'avenir, être utilisée dans des approches de biologie des systèmes (*Systems biology*).

La deuxième contribution concerne l'identification d'une nouvelle voie de l'angiogenèse tumorale qui jouera très certainement un rôle majeur dans les recherches sur l'angiogenèse dans les années à venir.

Remerciements

Je remercie tous les membres du laboratoire pour leurs contributions aux travaux présentés ici et en particulier à Martin Hagedorn, Michel Moenner, et Sophie Javerzat. Ces travaux étaient financés par différentes subventions et notamment : ANR Jeune

Chercheur (MH), la Commission Européenne (projet intégré STROMA, 6FP) (AB), l'ARC (AB, MM), et la Ligue contre le Cancer (MM, SJ).

Références

- Bikfalvi A., Angiogenesis : health and disease. *Ann Oncol* 2006, 17 Suppl 10, 65–70.
- Borges J., Tegtmeier F.T., Padron N.T., Mueller M.C., Lang E.M., Stark G.B., Chorioallantoic membrane angiogenesis model for tissue engineering : a new twist on a classic model. *Tissue Eng*, 2003, 9, 441–450.
- Djonov V., Schmid M., Intussusceptive angiogenesis : its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res*, 2000, 86, 286–292.
- Drogat B., Auguste P., Nguyen D.T., Bouche-careilh M., Pineau R., Nalbantoglu J., Kaufman R.J., Chevet E., Bikfalvi A., Moenner M., IRE1 signaling is essential for ischemia-induced vascular endothelial growth factor-A expression and contributes to angiogenesis and tumor growth *in vivo*. *Cancer Res*, 2007, 67, 6700–6707.
- Hagedorn M., Balke M., Schmidt A., Bloch W., Kurz H., Javerzat S., Rousseau B., Wilting J., Bikfalvi A., VEGF coordinates interaction of pericytes and endothelial cells during vasculogenesis and experimental angiogenesis. *Dev Dyn*, 2004, 230, 23–33.
- Hagedorn M., Javerzat J., Gilges D., Meyre A., de Lafarge B., Eichmann A., Bikfalvi A., Accessing key steps of human tumor progression *in vivo* by using an avian embryo model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102, 1643–1648.
- Nguyen M., Shing Y., Folkman J., Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. *Microvasc Res*, 1994, 47, 31–40.
- North S., Moenner M., Bikfalvi A., Recent developments in the regulation of the angiogenic switch by cellular stress factors in tumors. *Cancer Lett*, 2005, 218, 1–14.
- Saidi A., Javerzat S., Bellahcène A., De Vos J., Bello L., Castronovo V., Deprez M., Loiseau H., Bikfalvi A., Hagedorn M., Experimental anti-angiogenesis causes upregulation of genes associated with poor survival in glioblastoma. *Int J Cancer*, 2008, 122, 2187–2198.
- Staton C.A., Lewis C., Bicknell R., Angiogenesis Assays : A Critical Appraisal of Current Techniques. Ed Wiley, John & Sons, Incorporated, February 2007, ISBN-13 : 9780470016008, 400pp.